

ISSN 2499-9962

**НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ**

**Актуальные вопросы  
биологической физики  
и химии**

**Том 6, № 1  
2021**

**Севастополь**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И  
ХИМИИ**

**Научный журнал**

**Том 6, № 1  
2021**

**RUSSIAN JOURNAL of  
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY  
Volume 6, No. 1, 2021**

Севастополь  
2021

## **Учредитель и издатель**

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»  
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация

«Актуальные вопросы биологической физики и химии» – научный журнал, посвященный актуальным вопросам общей и молекулярной биофизики, нанобиофизики, экологической биофизики, а также современным проблемам биоорганической, биофизической и медицинской химии. Издание рассчитано на научных работников, аспирантов, студентов.

Журнал зарегистрирован в Международном центре ISSN (ISSN 2499-9962), Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (свидетельство ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018), индексируется в библиографической базе данных научных публикаций российских ученых (РИНЦ). Издается с апреля 2016 г. С 2018 г. выходит 4 раза в год.

### **Главный редактор**

Евстигнеев М.П. (Севастополь).

### **Chief Editor**

Evstigneev M.P. (Sevastopol).

### **Научный редактор**

Твердислов В.А. (Москва).

### **Science Editor**

Tverdislov V.A. (Moscow).

### **Редакционная коллегия**

Артюхов В.Г. (Воронеж);  
Бержанский В.Н. (Симферополь);  
Костюков В.В. (Севастополь);  
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);  
Ризниченко Г.Ю. (Москва);  
Солдатов А.А. (Севастополь);  
Тихонов А.Н. (Москва);  
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

### **Editorial Board**

Artyuhov V.G. (Voronezh);  
Berzhansky V.N. (Simferopol);  
Kostjukov V.V. (Sevastopol);  
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);  
Riznichenko G.Yu. (Moscow);  
Soldatov A.A. (Sevastopol);  
Tikhonov A.N. (Moscow);  
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico).

### **Ответственный секретарь**

Воронин Д.П. (Севастополь).

### **Executive Secretary**

Voronin D.P. (Sevastopol).

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

## СОДЕРЖАНИЕ

Том 6, № 1, 2021

## ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

**Г.Д. Аббасова, Л.С. Гаджиева**Изучение комплекса глюкозы и ди-глюкозы с оксидом железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  .....9**Г.А. Агаева, У.Т. Агаева, Н.М. Годжаев**

Сопоставление конформационных свойств ангигипертензивного пептида IRW и его изомера LRW ..... 15

**Г.А. Агаева, Г.Р. Сафарли, Н.М. Годжаев**

Конформационное поведение молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12) ..... 20

**Ю.П. Чукова**

Энергетика биосферы как основа для прогноза судьбы нашей цивилизации .....26

**Л.В. Беловолова, М.М. Беловолов, М.В. Глушков**

Роль активных форм кислорода в проявлении ритмических процессов в сильно разбавленных водных системах.....35

**Д.С. Истомин, Я.Н. Демури, М.Л. Золотавина**

Метод тонкослойной хроматографии как альтернатива методу высокоэффективной жидкостной хроматографии при определении токоферольного состава семян подсолнечника в генетике и селекции.....42

**Г.А. Кораблев**

S-кривые и энтропийные условия стабилизации систем..... 46

## МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

**Л.И. Исмаилова, Р.М. Аббаслы, Н.А. Ахмедов**

Структурная организация молекулы GLY-PRO-ARG-PRO.....53

**Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов**

Пространственная структура молекулы цитохрофина 4 .....57

**Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Р.М. Аббаслы, Л.И. Исмаилова**

Трёхмерная структура молекулы КАЗОКСИНА А.....62

**Н.А. Захаров, Е.М. Коваль, М.А. Орлов, Е.В. Шелехов, А.Д. Алиев,****Т.В. Захарова, М.Р. Киселёв, В.В. Матвеев**Особенности влияния гиалуроновой кислоты (ГК) на биоминерализацию биосовместимого гидроксиапатита кальция в системе  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$  ..... 69



<b>Л.О. Костюкова, Д.П. Воронин, К.А. Рыбакова, Е.В. Савченко, В.В. Костюков</b> Фотовозбуждение красителя лазурного с в водном растворе: теоретический анализ.....	75
<b>Л.И. Велиева, Р.Э. Алиев</b> Изучение электронной структуры и динамических свойств молекул аллатостатинов .....	83

## МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

<b>Н.Е. Беликов, О.В. Демина, А.Ю. Лукин, Л.Е. Петровская, Д.А. Складнев, С.Д. Варфоломеев, А.А. Ходонов</b> Исследование технологии селективного маркирования рекомбинатных белков-мишеней и разработка путей синтеза модифицированных квантовых точек CdTe в водных растворах .....	88
<b>Г.М. Бехбудова</b> Условие формирования одиночных полиионовых ионных каналов и изучение их свойств в зависимости от субстратного окружения мембран .....	97
<b>Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина, А.О. Симонян</b> Ингибиторы липоксигеназ подавляют Ca <sup>2+</sup> -ответы, вызываемые трифлуоперазином в перитонеальных макрофагах крысы.....	105
<b>Э.А. Масимов, С.Р. Багирова, Х.Т. Гасанова</b> Реологическое исследование водных растворов молекулярно-массовых фракций (ПВП) поливинилпирролидона .....	111
<b>Н.Д. Федорова, Д.А. Сумбатян, М.А. Стукова, А.В. Иванов, Е.В. Семенова, М.В. Филатов, Е.Ю. Варфоломеева</b> Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови .....	115
<b>С.Б. Ланда, Н.А. Верлов, М.В. Филатов, В.С. Бурдаков, В.Л. Эмануэль</b> Внеклеточные везикулы как носители холестерина не связанного с липопротеинами .....	124
<b>А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина</b> Диклофенак модулирует трансэпителиальный транспорт Na <sup>+</sup> в коже лягушки .....	133
<b>К.Д. Казаринов, И.Г. Полников, И.И. Власова, Е.В. Михальчик, А.А. Гусев, О.А. Баранова, В.А. Щелконогов, А.В. Чеканов</b> Изучение радикал-генерирующей способности активированных нейтрофилов в эксперименте <i>in vitro</i> в условиях микроволнового облучения .....	137
<b>Е.В. Семенова, Е.В. Малышко, В.А. Твердислов</b> Взаимосвязь хиральности лекарственных препаратов и их биоактивности.....	142
<b>Л.Н. Шишкина, А.Н. Смирнова, Л.И. Мазалецкая, А.С. Дубовик, В.О. Швыдкий</b> Взаимосвязь физико-химических свойств с составом липидов из листьев и сока алоэ древовидного .....	148

<b>А.П. Нечипоренко, О.С. Везо, У.Ю. Нечипоренко, Л.В. Плотникова, В.Е. Ситникова, П.П. Плотников</b> Влияние природных сахаридов на фурье-спектр плазмы крови человека .....	154
<b>Е.И. Трушковская, М.Л. Золотавина, А.В. Братова</b> Оценка аналитической надежности биохимических методов в диагностике новой коронавирусной инфекции .....	165
<b>А.А. Васильева, М.Л. Золотавина, А.А. Комаренко</b> Применение современных методов оценки показателей антикоагулянтной системы у беременных.....	169

## **ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**

<b>Г.А. Даллакян</b> Влияние фуллерена на рост и развитие водных организмов .....	175
<b>Э.А. Иванова</b> Супермолекулярная реорганизация протеомных ансамблей супрамолекулярных структур хроматина растений в стрессовых условиях окружающей среды.....	179
<b>Н.Н. Гурова, И.И. Дигурова, С.Д. Гусев</b> Сравнительный анализ морфометрических показателей листовых пластин березы и осины при длительном техногенном воздействии .....	186
<b>А.С. Гулин, Р.П. Тренкеншу</b> Разработка автономной экспедиционной установки для исследования микроводорослей в естественных условиях.....	192

## CONTENTS

### Volume 6, No. 1, 2021

#### GENERAL BIOPHYSICS

**G.D. Abbasova, L.S. Hajiyeva**

Study of the complex of glucose and di-glucose with iron oxide  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  .....9

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

Comparison of conformational properties of antihypertensive peptide IRW and its isomer LRW ..... 15

**G.A. Agaeva, G.R. Safarli, N.M. Godjaev**

Conformational behaviour of hylambatin and its (5-12) fragment ..... 20

**Yu.P. Chukova**

Energy laws of the biosphere as a basis for predicting the fate of our civilization .....26

**L.V. Belovolova, M.M. Belovolov, M.V. Glushkov**

Role of reactive oxygen species in the manifestation of rhythmic processes in strongly diluted water systems .....35

**D.S. Istomin, Ya.N. Demurin, M.L. Zolotavina**

Determination of tocopherol composition of sunflower seeds by thin-layer chromatography as an alternative to high-efficiency liquid chromatography in genetics and breeding .....42

**G.A. Korablev**

S-curves and entropic conditions of system stabilization ..... 46

#### MODELLING IN BIOPHYSICS

**L.I. Ismailova, R.M. Abbasli, N.A. Akhmedov**

Structural organization of the GLY-PRO-ARG-PRO molecule .....53

**L.N. Agayeva, A.A. Abidinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, N.A. Akhmedov**

Spatial structure of cytochrome-4 molecule .....57

**N.A. Akhmedov, L.N. Agayeva, R.M. Abbasli, L.I. Ismailova**

Spatial structure of casoxin a molecule .....62

**N.A. Zakharov, E.M. Koval, M.A. Orlov, E.V. Shelichov, A.D. Aliev,**

**T.V. Zakharova, M.R. Kiselev, V.V. Matveev**

Hyaluronic acid (Ha) effect singularities on bimineralization calcium hydroxyapatite (HA) in system  $\text{CaCl}_2-(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$  ..... 69

<b>L.O. Kostjukova, D.P. Voronin, K.A. Rybakova, E.V. Savchenko, V.V. Kostjukov</b> Photoexcitation of azure c dye in aqueous solution: a theoretical analysis .....	75
<b>L.I. Velieva, R.E. Aliev</b> Study of the electronic structure and dynamic properties of allatostatin molecules .....	83

### **MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY**

<b>N.E. Belikov, O.V. Demina, A.Yu. Lukin, L.E. Petrovskaya, D.A. Skladnev, S.D. Varfolomeev, A.A. Khodonov</b> 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 .....	88
<b>G.M. Behbudova</b> The condition for the formation of single polyene ion channels and study of their properties depending on the substrate environment of the membranes .....	97
<b>L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina, A.O. Simonyan</b> Lipoxygenase inhibitors attenuate Ca <sup>2+</sup> responses induced by trifluoperazine in peritoneal macrophages .....	105
<b>E.A. Masimov, S.R. Bagirova, Kh.T. Hasanova</b> Rheological study of water solutions molecular mass fractions (PVP) of polyvinylpyrrolidone .....	111
<b>N. Fedorova, D. Sumbatian, M. Stukova, A. Ivanov, E. Semenova, M. Filatov, E. Varfolomeeva</b> Viral infections affect the functional activity of peripheral blood neutrophils.....	115
<b>S.B. Landa, N.A. Verlov, M.V. Filatov, V.S. Burdakov, V.L. Emmanuel</b> Extracellular vesicles as carriers of cholesterol not associated with lipoproteins.....	124
<b>A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina</b> Diclofenac modulates transepithelial Na <sup>+</sup> transport in frog skin.....	133
<b>K.D. Kazarinov, I.G. Polnikov, I.I. Vlasova, E.V. Mikhalechik, A.A. Gusev, O.A. Baranova, V.A. Shchelkonogov, A.V. Chekanov</b> Study of the radical-generating capacity of activated neutrophils in the <i>in vitro</i> experiment under microwave irradiation .....	137
<b>E.V. Semenova, E.V. Malyshko, V.A. Tverdislov</b> Relationship between chirality and bioactivity of drugs .....	142
<b>L.N. Shishkina, A.N. Smirnova, L.I. Mazaletskaya, A.S. Dubobik, V.O. Shvydkiy</b> Interrelation of the physicochemical properties with composition of lipids from leaves and juice of <i>aloe arborescens</i> mill.....	148
<b>A.P. Nechiporenko, O.S. Veso, U.Yu. Nechiporenko, L.V. Plotnikova, V.E. Sitnikova, P.P. Plotnikov</b> Effect of natural saccharides on the fourier spectrum of human blood plasma.....	154
<b>E.I. Trushkovskaya, M.L. Zolotavina, A.V. Bratova</b> Criteria for assessing the efficiency of biochemical methods in diagnostics of new coronavirus infection.....	165



**A.A. Vasilyeva, M.L. Zolotavina**

Application of modern methods for evaluation of indicators of anti-coagulant system in pregnant women .....169

**ECOLOGICAL BIOPHYSICS****G.A. Dallakyan**

The effect of fullerene on the growth and development of aquatic organisms..... 175

**E.A. Ivanova**

Supramolecular reorganization of proteomic ensembles of supramolecular structures of plant chromatin under stress environmental conditions ..... 179

**N.N. Gurova, I.I. Digurova, S.D. Gusev**

Comparative analysis of morphometric indicators of birch and aspen leaf plates under long technogenic exposure .....186

**A.S. Gulin, R.P. Trenkenshu**

Development of an autonomous expedition unit for researching microalgae under natural conditions .....192

## ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ГЛЮКОЗЫ И ДИ-ГЛЮКОЗЫ С ОКСИДОМ ЖЕЛЕЗА $\text{Fe}_2\text{O}_3$

Аббасова Г.Д., Гаджиева Л. С.

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: lala-h@mail.ru

Поступила в редакцию: 17.06.2021

**Аннотация.** Современная наномедицина достигла впечатляющих успехов в поиске и создании новых классов лекарственных препаратов, используемых в терапии раковых заболеваний. Известно, что противоопухолевые препараты обладают низким терапевтическим индексом и эффективность их использования ограничена высокой общей токсичностью, метаболической неустойчивостью в организме и плохим проникновением в раковую клетку. Для решения таких проблем используются носители противоопухолевых препаратов, которые бы защищали лекарственное средство от воздействий ферментов и предотвращали их биодеструкцию в биологических жидкостях, например, в крови. Многочисленные исследования последних лет направлены на поиск и создание эффективных заменителей крови, к числу которых относится декстран  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  – полимер глюкозы, вырабатываемый разными видами бактерий семейства стрептококковых (*Streptococcaceae*). Декстран не вызывает токсических реакций и исключает возможность передачи вируса сывороточного гепатита. В данной работе методами молекулярного моделирования и квантовой химии изучено пространственное и электронное строение глюкозы-мономерной единицы декстрана, исследовано влияние водного окружения на ее электронно-конформационные свойства. Полуэмпирическими методами молекулярной механики и квантовой химии с помощью вычислительных компьютерных программ исследовано пространственное и электронное строение мономерной единицы декстрана–глюкозы, изучены комплексы глюкозы и ди–глюкозы с оксидом железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Рассчитаны геометрические параметры, характеризующие энергетически устойчивые состояния исследуемых соединений и их координационных комплексов.

**Ключевые слова:** декстран, глюкоза, ди-глюкоза, оксид железа.

Наиболее перспективные направления в исследованиях структуры и свойств биологических систем на молекулярном и клеточном уровне связаны с нано биотехнологией, целью которой является управление транспортом лекарственных и диагностических средств. Загруженная наночастица концентрирует в себе несколько десятков тысяч и более молекул лекарственного вещества, что дает возможность эффективного транспорта химических соединений непосредственно к месту доставки без поражения здоровых клеток различных органов и тканей, то есть с наименьшей токсичностью. Сегодня наномедицина имеет большие возможности в реализации этого процесса, поскольку с помощью применяемых суперпарамагнитных частиц можно реализовать многочисленные функции лекарственных и диагностических средств. Для этих целей используют комплексную систему, содержащую пептидные молекулы, которые различают свернутые белки плазмы крови в окрестностях опухолевых клеток и направленно движутся к опухолям, где присоединяются к стенкам сосудов и опорной структуре опухоли. Бурный прогресс в клинической и диагностической медицине достигнут, прежде всего, благодаря использованию суперпарамагнитных частиц как контрастных агентов в магнитно-резонансных исследованиях и системах лечения, основанных на использовании наночастиц. Наночастицы оксида железа и липосомы, покрытые такими пептидами, аккумулируются в сосудах опухолей, где они вызывают дополнительное локальное свертывание белков крови, вызывая таким образом образование новых участков связывания для большего числа пептидных молекул. Усиление действия наночастиц на основе сворачивания белков существенно усиливает выявление опухоли и позволяет предположить, что частицы могут выполнять функции переносчика лекарственных препаратов.

В качестве покрытия наночастиц часто используется декстран  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  – полимер глюкозы, вырабатываемый разными видами бактерий семейства стрептококковых *Streptococcaceae* (рис.1). Декстран относится к числу эффективных заменителей крови, не вызывает токсических реакций и исключает возможность передачи вируса сывороточного гепатита.

Ранее нами детально была исследована пространственная и электронная структура молекулы CREKA (Cys, Arg, Glu, Lys, Ala), изучена конформационная подвижность боковых цепей, а полученные результаты нашли свое отражение и в нынешней работе. В данной работе методами молекулярного моделирования и полуэмпирическими методами квантовой химии, исследована пространственная и электронная структура мономерной единицы декстрана–глюкозы и ди-глюкозы, изучены их координационные комплексы с оксидом железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . На рисунке 2 приведена расчетная модель глюкозы, нумерация атомов и используемые значения валентных связей. Электронная структура глюкозы и ди-глюкозы была рассчитана на основе координат равновесных конфигураций ядер, полученных в результате оптимизации геометрии молекулы в потенциалах полуэмпирического метода молекулярной механики MM+. В методах молекулярной механики атомы рассматриваются как ньютоновские частицы, находящиеся в силовом поле и взаимодействие между которыми

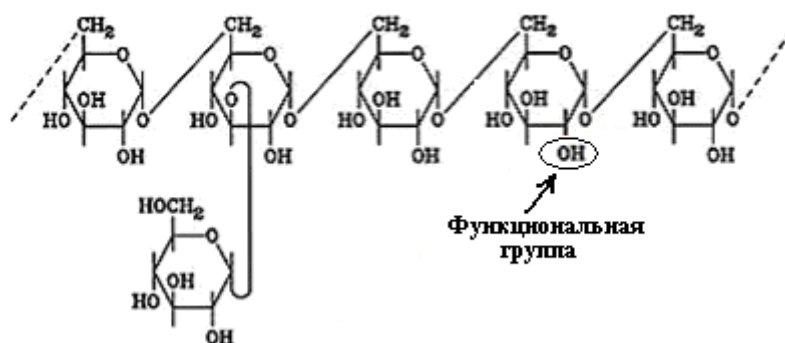


Рисунок 1. Полимер глюкозы

описывается потенциальной энергией. Потенциальная энергия зависит от длин связей, углов между связями двугранных углов вращения вокруг одинарных связей и от взаимодействия несвязанных молекулярных фрагментов с помощью электростатических сил, а также Ван-дер-ваальсовых сил или сил взаимодействий, обуславливающих водородные связи. В зависимости от приближений, используемых при расчете силового поля и от гармонических функций, описывающих это поле, встречаются различные модификации расчетных программ (MM<sup>+</sup>, AMBER, BIO и т.д.).

В данном исследовании расчеты были проведены с помощью метода MM<sup>+</sup>. Полученные результаты были использованы для расчетов параметров электронной структуры и величин дипольных моментов полуэмпирическим методом квантовой химии PM3. Программа позволяет проводить неэмпирические и полуэмпирические расчеты электронных, спектральных и магнитных характеристик молекул и межмолекулярных комплексов, а также вычислять энергию переходных состояний комплексов, характеристики гидратной или сольватной оболочки, производить простейшие расчеты характеристик кристаллов, расчеты электронных и колебательных спектров соединений. Полуэмпирические методы квантовой химии в зависимости от степени применения нулевого дифференциального перекрытия и аппроксимации основных, кулоновских и обменных интегралов, входящих в матричные элементы оператора Фока, имеют разные модификации. Это хорошо известные методы MO CCP INDO/1,2,S, CNDO/1,2, MINDO/1,2,3, MNDO, AM1, PM3, MP2, Хюккеля и ряд других. Каждый из методов позволяет в результате расчета получить набор тех или иных электронных или спектральных характеристик, значения которых хорошо совпадают с экспериментом. В работе расчеты проводились с помощью метода PM3, параметризованного для атомов переходных металлов.

В таблице 1 приведены результаты расчета полной энергии глюкозы и ди-глюкозы до и после оптимизации геометрии молекул методом MM<sup>+</sup>. Полная энергия глюкозы уменьшилась на 16,13 ккал/моль, а ди-глюкозы на 486,21 ккал/моль. Эти величины характеризуют также энергию связывания в исследуемых соединениях. Существенными являются изменения в величинах электронной энергии: для глюкозы наблюдается уменьшение электронной энергии на 828,46 ккал/моль, в то время как для ди-глюкозы относительная энергия увеличилась на 36747,21 ккал/моль. Соответственно, противоположная картина прослеживается и при сравнении энергии отталкивания ядер: если в глюкозе энергия отталкивания ядер увеличивается на 844,68 ккал/моль, то в ди-глюкозе эта величина составляет 37233,42 ккал/моль.

Одной из важных характеристик молекул, которая определяет их поведение в различных силовых полях, является дипольный момент, обладающий свойством аддитивности. Оптимизированная структура ди-глюкозы характеризуется величиной дипольного момента 4,71 Д, которая на 1,39 Д больше суммы дипольных моментов изолированных молекул глюкозы.

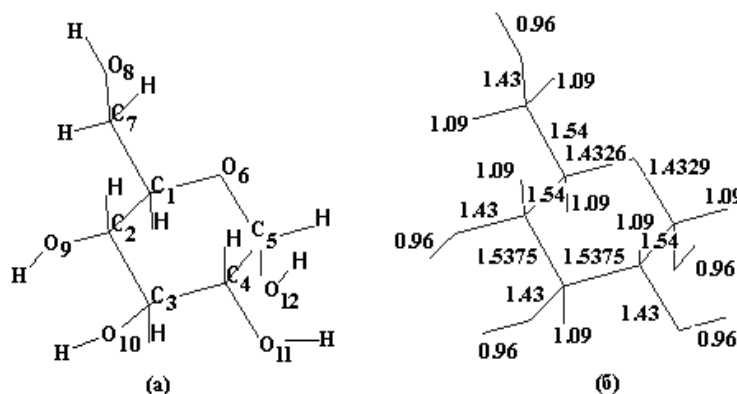


Рисунок 2. Расчетная модель (а) и длины валентных связей (Å) в молекуле глюкозы (б)

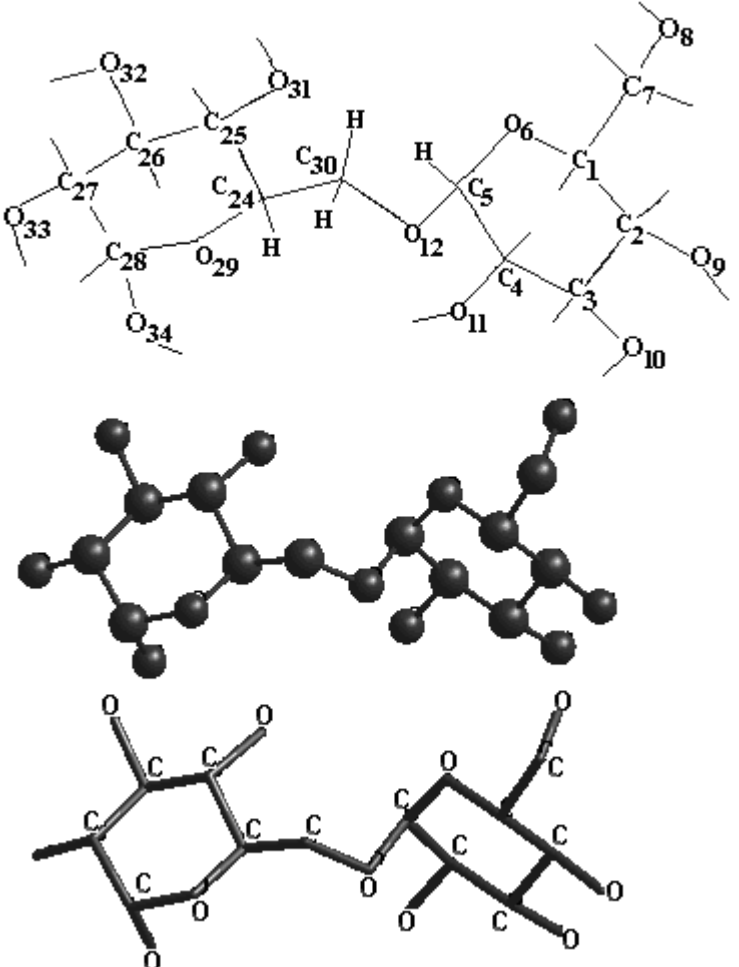
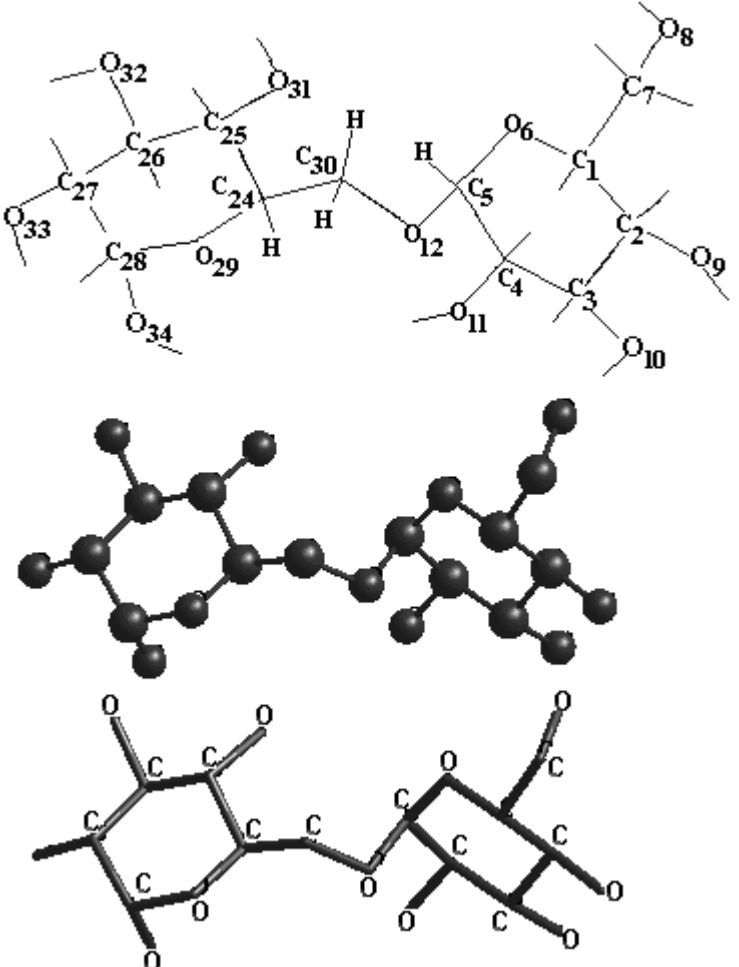
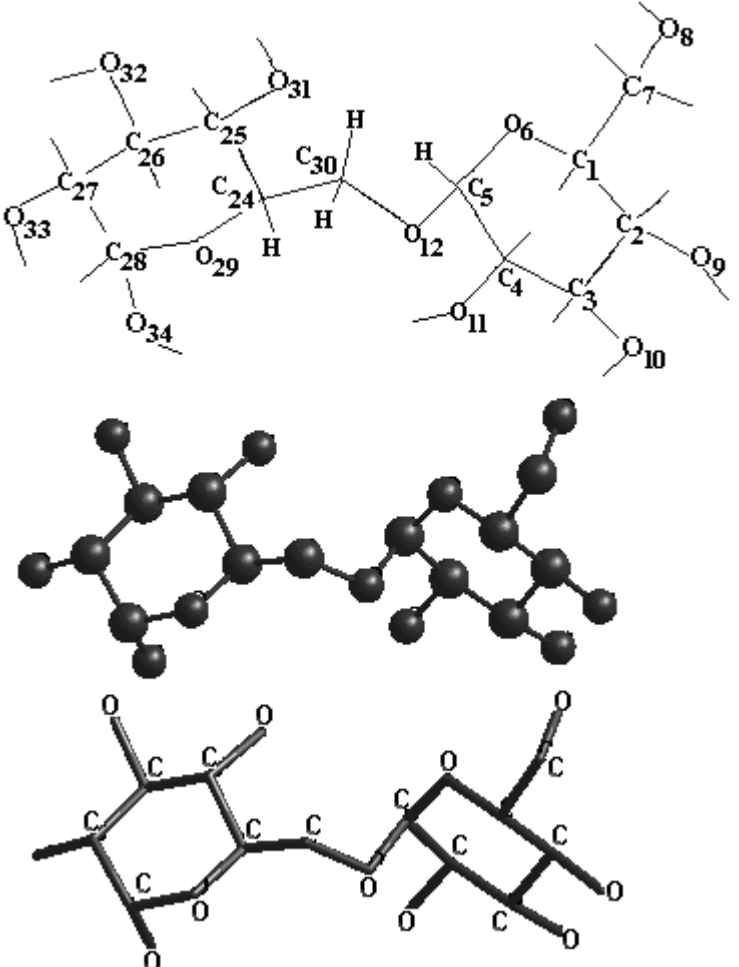
**Таблица 1.** Результаты расчета по данным метода РМЗ до (верхняя строка) и после (нижняя строка) оптимизации

Молекула	Энергетические параметры, ккал/моль				Дипольный момент, Дебай
	Полная энергия	Электронная энергия	Энергия отталкивания ядер	Энергия связывания	
Глюкоза	-61301 ,29	-325723 ,21	264421 ,91	-2258 ,03	2 ,30
	-61317 ,42	-324894 ,75	263577 ,33	-2274 ,16	1 ,66
Ди-глюкоза	-114656 ,53	-882892 ,67	768236 ,14	-3845 ,47	5 ,54
	-115142 ,74	-846145 ,46	731002 ,72	-4331 ,68	4 ,71

В таблице 2 приведены геометрические параметры, характеризующие оптимизированную пространственную структуру молекулы ди-глюкозы.

Несмотря на наличие различных заместителей у атомов  $C_5$  и  $C_{30}$ , длины связей  $C_5-O_{12}$  и  $C_{30}-O_{12}$  принимают практически одинаковые значения, равные 1,4177 и 1,4129 Å, соответственно. Торсионный угол, определяющий ориентацию молекул глюкозы друг относительно друга принимает значение, равное  $83,71^\circ$ , т.е. близкое к прямому. Приведены результаты расчетов парциальных зарядов на атомах глюкозы и ди-глюкозы до и после оптимизации геометрии с использованием критерия минимума общей энергии. Как следует из приведенных данных, при образовании ди-глюкозы выявлено незначительное изменение отрицательного заряда на атомах кислорода  $O_6$ ,  $O_9$  и  $O_{12}$ . Полученные на данном этапе расчета результаты были положены в основу расчета комплексов глюкозы и ди-глюкозы с оксидом железа  $Fe_2O_3$ . Однако этому этапу исследований предшествовало детальное изучение пространственной и электронной структуры  $Fe_2O_3$ . Расчеты пространственной структуры проводились методом ММ<sup>+</sup>, для расчетов электронной структуры был использован метод РМЗ, параметризованный для атомов переходных металлов.

**Таблица 2.** Параметры, характеризующие низкоэнергетическое состояние ди-глюкозы

	Валентный угол	Значение (град)
	Торсионный угол	Значение (град)
	$O_6-C_5-O_{12}$	106 ,09
	$C_5-O_{12}-C_{30}$	115 ,62
	$O_{12}-C_{30}-C_{24}$	112 ,64
	$C_{30}-C_{24}-O_{29}$	104 ,74
	$C_{30}-C_{24}-C_{25}$	111 ,42
	$O_6-C_5-C_4$	113 ,75
	$C_5-C_4-O_{11}$	112 ,24
	$C_4-C_5-O_{12}$	109 ,27
	$O_6-C_5-O_{12}-C_{30}$	89 ,23
	$C_5-O_{12}-C_{30}-C_{24}$	83 ,71
	$O_{12}-C_{30}-C_{24}-O_{29}$	103 ,74
	$C_{30}-C_{24}-O_{29}-C_{28}$	174 ,81
	$O_{12}-C_{30}-C_{24}-C_{25}$	135 ,44
	$O_{11}-C_4-C_5-O_{12}$	57 ,39
	$C_4-C_5-O_{12}-C_{30}$	147 ,75
	$O_{29}-C_{28}-C_{27}-C_{26}$	50 ,01
	Связь	Длина (Å)
	$C_5-O_{12}$	1 ,42
	$O_{12}-C_{30}$	1 ,41
	$C_{30}-C_{24}$	1 ,56
	$C_{24}-O_{29}$	1 ,43
	$C_{24}-C_{25}$	1 ,55
	$O_{29}-C_{28}$	1 ,41

Пространственные модели оптимизированных структур ди-глюкозы



**Таблица 3.** Результаты расчета электронных параметров оксида железа по данным метода РМЗ до (верхняя строка) и после (нижняя строка) оптимизации

Молекула	Энергетические параметры, ккал/моль				Дипольный момент, Дебай
	Полная энергия	Электронная энергия	Энергия отталкивания ядер	Энергия связывания	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-44186,76	-96126,14	51939,38	-168,80	1,56
	-44266,46	-97618,13	53351,67	-248,50	0,93

В таблице 3 приведены значения вкладов различных видов электронной энергии в полную энергию Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> до и после оптимизации электронной структуры. Как следует из результатов расчета, величина полной энергии уменьшается на 79,7 ккал/моль как результат уменьшения электронной энергии. Однако оптимизированная структура Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> обладает меньшей величиной дипольного момента, равной 0,93 Д.

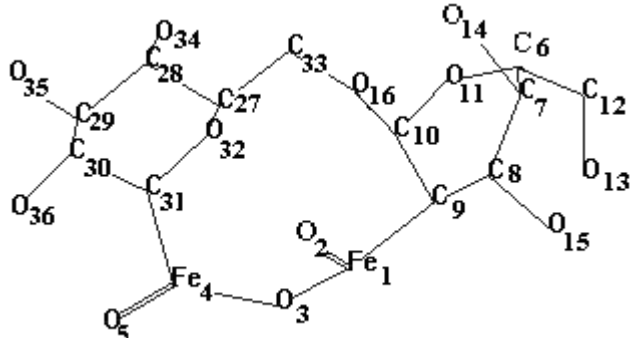
Полученные на данном этапе результаты расчета использованы для моделирования структуры комплекса глюкозы и ди-глюкозы с Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Такие исследования необходимы для построения модели комплекса, участвующего в транспорте пептидной молекулы к пораженным опухолевым участкам тканей. Результаты расчетов обобщены в таблицах 4, 5, где приведены пространственные структуры комплексов. Как следует из результатов расчета, образование комплекса глюкозы с Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> приводит к уменьшению полной энергии комплекса на 334,83 ккал/моль, в то время в комплексе ди-глюкозы с Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> эта величина составляет 169,71 ккал/моль. В комплексе с ди-глюкозой уменьшается величина дипольного момента на 1,49 Д, что свидетельствует о том, что характер межмолекулярного взаимодействия комплекса Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с ди-глюкозой со окружающей средой и способность к полимеризации в значительной степени различается от комплекса Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с глюкозой.

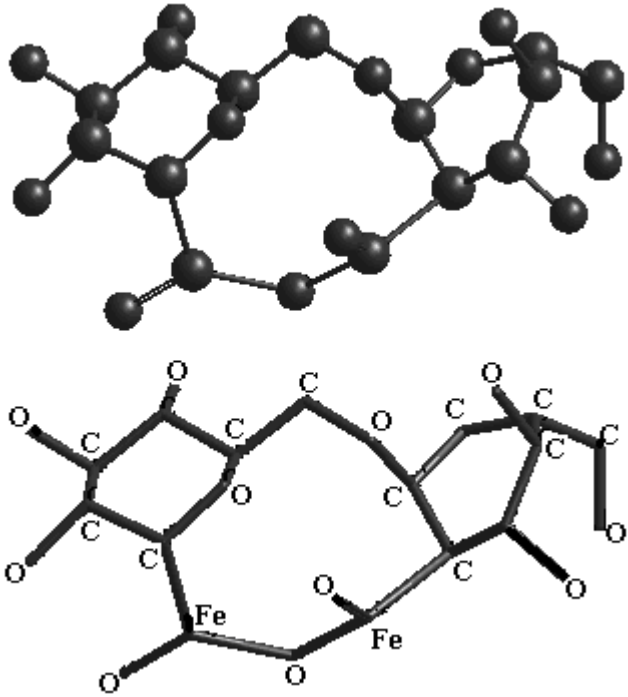
Проведем сравнительный анализ результатов расчета. При образовании комплекса Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с ди-глюкозой наблюдается изменение геометрических параметров, характеризующих пространственную и электронную структуру оксида железа.

**Таблица 4.** Результаты расчета электронных параметров комплексов глюкозы и ди-глюкозы с оксидом железа по данным метода РМЗ до (верхняя строка) и после (нижняя строка) оптимизации

Молекула	Энергетические параметры, ккал/моль				Дипольный момент, Дебай
	Полная энергия	Электронная энергия	Энергия отталкивания ядер	Энергия связывания	
Глюкоза+ Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-105153,49	-606952,90	501799,42	-2695,22	6,56
	-105488,32	-634087,64	528599,32	-3030,05	5,23
Ди-глюкоза+ Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-145302,60	-1114092,81	968790,21	-4421,56	3,41
	-145472,31	-1092282,25	946809,94	-4591,28	1,92

**Таблица 5.** Параметры, характеризующие структуру комплекса ди-глюкозы

	Валентный угол	Значение, град
	O <sub>3</sub> -Fe <sub>4</sub> =O <sub>5</sub>	119,03
	C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub>	112,33
	C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub>	118,29
	Fe <sub>1</sub> -O <sub>3</sub> -Fe <sub>4</sub>	119,36
	O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	117,32
	C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> =O <sub>5</sub>	119,71
	O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub> =O <sub>2</sub>	117,99
	Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub>	109,94
	Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	107,10
	C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub> -O <sub>16</sub>	109,88
	C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub>	112,51
	C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -O <sub>15</sub>	109,32
	C <sub>9</sub> -Fe <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>	118,16
	O <sub>16</sub> -C <sub>33</sub> -C <sub>27</sub>	110,61
	C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub> -O <sub>11</sub>	114,56
	C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub> -O <sub>14</sub>	108,60
	C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub>	115,17

	Торсионный угол	Значение, град
	C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> =O <sub>5</sub>	-12 ,28
Пространственные модели комплекса ди-глюкозы с Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub>	148 ,04
	O <sub>32</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> =O <sub>5</sub>	-136 ,03
	O <sub>32</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub>	24 ,30
	C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub>	23 ,70
	O <sub>5</sub> =Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub>	-175 ,84
	Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub> =O <sub>2</sub>	27 ,42
	Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub> -Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	-123 ,74
	O <sub>2</sub> =Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub>	28 ,09
	O <sub>2</sub> =Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	-93 ,16
	C <sub>27</sub> -C <sub>32</sub> -C <sub>31</sub> -Fe <sub>4</sub>	63 ,68
	Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub>	-145 ,89
	Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -O <sub>16</sub>	61 ,86
	Связь	Длина, Å
	Fe <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	2 ,00
	Fe <sub>1</sub> =O <sub>2</sub>	1 ,73
	Fe <sub>1</sub> -O <sub>3</sub>	1 ,85
	Fe <sub>4</sub> -O <sub>3</sub>	1 ,85
	Fe <sub>4</sub> =O <sub>5</sub>	1 ,73
	Fe <sub>4</sub> -C <sub>31</sub>	2 ,00

#### Список литературы / References:

- Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret L., Ferrari A., Hofmann H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, pp. 639-646.
- Koch A.M., Reynolds F., Merkle H.P., Weissleder R., Josephson L. Transport of surface-modified nanoparticles through cell monolayers. *Chem Biol Chem.*, 2005, vol. 6, pp. 337-345.
- Gould P. Nanoparticles probe biosystems. *Materials today*, 2004, vol. 7, iss. 2, pp. 36-43.
- Ruoslahti E. Anti-tumor Effect of nanoparticles that target blood clotting in tumor vasculature. *Cancer Biology & Therapy*, 2007, vol. 6, iss. 2, pp. 133-134.
- Simberg D., Duza T., Park J.H., Essler M., Pilch J., Zhang L., Derfus A.M., Yang M., Hoffman R.M., Bhatia S., Sailor M.J., Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *PNAS*, 2007, vol. 104, no. 3, pp. 932-936.
- Gamarra L.F., Brito G.E.S., Pontuschka W.M., Amaro E., Parma A.H.C., Goya G.F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, vol. 289, pp. 439-441.
- Hildebrandt N., Hermsdorf D., Signorell R., Schmitz S.A. Diederichsen U. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with peptides by electrostatic interactions. *ARKIVOC*, 2007, pp. 79-90.
- Saboktakin M.R., Maharramov A., Ramazanov M.A. Synthesis and characterization of polyaniline/poly (p-hydroxyaniline)/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposite. *N.Y.Science Journal*, 2008, vol. 2, no. 21, pp. 14-17.
- Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, iss. 18, pp. 3995-4021.
- Jain T.K., Morales M.A., Sahoo S.K., Leslie-Pelecky D.L., Labhasetwar V. Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents. *Mol. Pharm.*, 2005, vol. 2, no.3, pp. 194-205.
- Годжаев Н.М., Аббасова Г.Д., Алиева И.Н. Исследование пространственного строения нового противоопухолевого лекарственного препарата-молекулы CREKA. *Journal of Qafqaz University*, 2008, № 21, с. 30-37. [Godjaev N.M., Abbasova G.D., Alieva I.N. Investigation of the spatial structure of a new antitumor drug-molecule CREKA. *Journal of Qafqaz University*, 2008, no. 21, pp. 30-37. (In Russ.)]
- Аббасова Г.Д., Алиева И.Н., Годжаев Н.М. Конформационная динамика боковых цепей молекулы CREKA. *Бакы Университетинин Хябярляри (ф.-р.е.серийасы)*, 2007, № 4, с. 166-174. [Abbasova G.D., Alieva I.N., Godzhaev N.M. Conformational dynamics of the side chains of the CREKA molecule. *Baki Universitetinin Khabyarlyari (f.s.s. series)*, 2007, no. 4, pp. 166-174. (In Russ.)]
- Кобзев Г.И. Применение неэмпирических и полумэмпирических методов в квантово-химических расчетах, Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004, 150 с. [Kobzev G.I. *Application of non-empirical and semi-empirical methods in quantum-chemical calculations*, Orenburg: GOU OSU, 2004, 150 p. (In Russ.)]

14. Романова Т.А., Краснов П.О., Качин С.В., Аврамов П.В. *Теория и практика компьютерного моделирования нанообъектов*, Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2002, 223 с. [Romanova T.A., Krasnov P.O., Kachin S.V., Avramov P.V. *Theory and practice of computer modeling of nanoobjects*, Krasnoyarsk: IPC KSTU, 2002, 223 p. (In Russ.)]

#### STUDY OF THE COMPLEX OF GLUCOSE AND DI-GLUCOSE WITH IRON OXIDE $\text{Fe}_2\text{O}_3$

Abbasova G.D., Hajiyeva L.S.

Baku State University,

Z. Khalilov st., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: lala-h@mail.ru

**Abstract.** Modern nanomedicine has achieved impressive success in the search and creation of new classes of drugs used in the treatment of cancer. It is known that anticancer drugs have a low therapeutic index, and their effectiveness is limited by their high general toxic level, metabolic instability in the body, and poor penetration into the cancer cell. To solve such problems, carriers of anticancer drugs are used, which would protect the drug from the effects of enzymes and prevent their biodegradation in biological fluids, for example, in blood. Numerous studies in recent years are aimed at finding and creating effective blood substitutes, including dextran  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  – glucose polymer produced by different species of bacteria of the streptococcal family. Dextran does not cause toxic reactions and excludes the possibility of transmission of the serum hepatitis virus. In this work, the methods of molecular modeling and quantum chemistry are used to study the spatial and electronic structure of the glucose-monomeric unit of dextran, and the effect of the aquatic environment on its electronic-conformational properties. The spatial and electronic structure of the monomeric unit of dextran-glucose was researched by semiempirical methods of molecular mechanics and quantum chemistry using computer programs, complexes of glucose and di-glucose with iron oxide  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  were studied. Geometric parameters characterizing the energetically stable states of the studied compounds and their coordination complexes are calculated.

**Key words:** dextran, glucose, di-glucose, iron oxide.

## СОПОСТАВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ СВОЙСТВ АНГИГИПЕРТЕНЗИВНОГО ПЕПТИДА IRW И ЕГО ИЗОМЕРА LRW

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

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) играет важную роль в системах контроля артериального давления (ренин-ангиотензиновая система), поскольку он превращает ангиотензин I в ангиотензин II (Ang II), что приводит к развитию гипертонии. Следовательно, очень важно изучить ингибирование АПФ для предотвращения и лечения гипертонии. Ингибиторы АПФ широко назначают при сердечно-сосудистых заболеваниях, включая высокое кровяное давление, сердечную недостаточность и почечную недостаточность. Пептиды, ингибирующие АПФ, являются более безопасными, чем синтетические ингибиторы АПФ, и могут быть полезными в качестве гипотензивных средств. В настоящей работе методами молекулярной механики исследовано пространственное строение и конформационное поведение антигипертензивного трипептида IRW и его изомера LRW, выделенных из пищевых белков. В результате расчетов было показано, что в слабополярной среде пептиды предпочитают формировать похожие стабильные полностью свернутые структуры. Было показано, что предпочтительная конформация этих пептидов стабилизируется эффективными дисперсионными взаимодействиями с образованием водородной связи между атомами карбоксильной группы С-терминальной части и гуанидиновой группы боковой цепи аргинина. В результате сравнительного исследования двух структурно гомологичных трипептидов IRW и LRW были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях молекул. На основе полученных параметров были составлены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформаций трипептидов. Данное исследование позволило сопоставить все стабильные конформационные состояния двух трипептидных пептидов, что дает возможность выделить структурные критерии, возможно необходимые для создания ингибирующих свойств лекарственных препаратов для клинического использования.

**Ключевые слова:** трипептиды, ингибиторы АПФ, изомеры, конформация, метод молекулярной механики.

Как известно, гипертония – главный фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) играет важную роль в системах контроля артериального давления, поскольку он превращает ангиотензин I в ангиотензин II, что приводит к развитию гипертонии. Для лечения артериальной гипертонии использовался ряд фармакологических препаратов, и многие из этих препаратов требуют пожизненного соблюдения режима терапии. В то же время окислительный стресс сосудов, воспалительная реакция и пролиферация являются решающими медиаторами сосудистой дисфункции, которые вносят вклад в патологию гипертонии. Некоторые функциональные продукты питания получены из природных источников и обычно считаются безопасными, поэтому они стали потенциальной альтернативой синтетическим фармакологическим препаратам.

В настоящей работе методом молекулярной механики исследовано конформационные свойства антигипертензивного трипептида IRW и его изомера LRW, выделенные из продуктов питания [1,2]. Эти трипептиды структурно похожи. Трипептид IRW (Ile-Arg-Trp) с потенциальной АПФ ингибиторной активностью был выделен из яичного белка. Трипептид, LRW (Leu-Arg-Trp), был охарактеризован из белка боба гороха, и его ранее изученный изомер IRW (Ile-Arg-Trp), как сообщалось [1,2], проявлял антигипертензивную активность за счет активации ангиотензин-превращающего фермента II. Как было показано, трипептид LRW оказывает влияние на сосудистый стресс в гладкомышечных клетках сосудов (VSMC) в условиях клеточного стресса, вызванного ангиотензином II (Ang II) [2]. Введение LRW может снизить вызванную Ang II продукцию супероксида, воспаление и пролиферацию в гладкомышечных клетках сосудов (VSMC). Вышеупомянутые благоприятные эффекты, по-видимому, включают активацию оси ACE2-Ang-(1-7)-MasR и модуляцию пути ядерного фактора-κB. Эти данные указывают на перспективную роль LRW в качестве функционального пищевого ингредиента или нутрицевтика в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, особенно гипертонии и сосудистых повреждений.

Потому как осуществление и эффективность биологического действия молекулы пептида, так или иначе, связаны с его структурной комплементарностью с взаимодействующими молекулами, то для выяснения механизма функционального действия пептидной молекулы необходимо знание ее конформационно-динамических свойств.

В данной работе расчет стабильных конформаций трипептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [4]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [4]. Конформационное состояние



каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^1$ , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R,B,L или P) значений углов  $\phi$  и  $\psi$ . Углы  $\phi$  и  $\psi$  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 ( $\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных трипептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов ( $\phi$  и  $\psi$ ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида, а для монопептида пролина конформации выбирались из двух B и R областей [4]. Отсчет двугранных углов вращения  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^1$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [5]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [6]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [6]. Оптимизация геометрических параметров проминимизированных структур пептидов проводилась с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [7], позволяющего проводить расчеты молекул методом AM1.

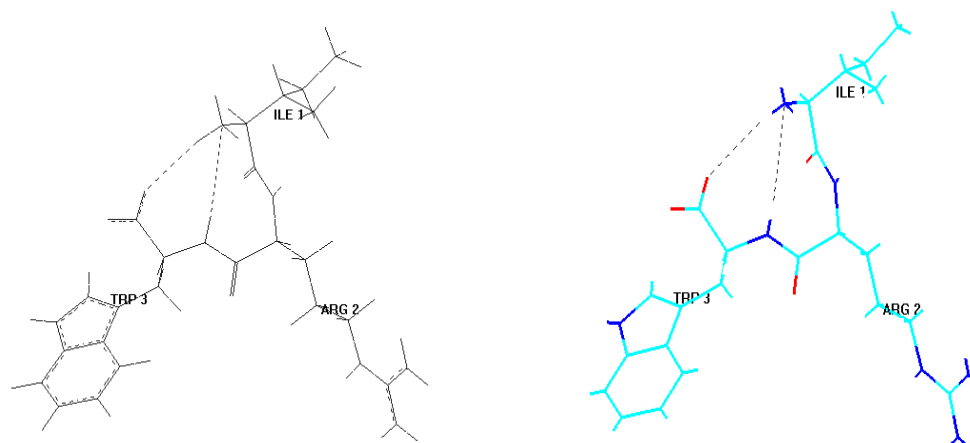
Определение конформационных свойств трипептидных молекул IRW и LRW проводилось путем минимизации потенциальной энергии выбранных конформационных состояний, исходя из особенностей, составляющих их аминокислотных остатков. При составлении структурных вариантов трипептидов ориентации боковых цепей остатков брались с учетом возможных межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в конформационных состояниях.

В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации трипептидных молекул IRW и LRW. Для каждой из рассчитанных конформаций трипептидов определены вклады всех видов энергий внутримолекулярных взаимодействий. В таблице 1 приведены энергетические параметры наиболее стабильных конформаций для каждого из трипептидов. Как следует из таблицы 1 энергетически наиболее предпочтительными для каждого трипептида оказались конформации одного структурного типа с формой основной цепи RRR. Все низкоэнергетические конформации трипептидов формируют свернутые формы. Эти конформации отличаются в основном энергетическим вкладом электростатических и дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Самые низкоэнергетические конформации трипептидов отличаются структурной особенностью и ориентацией боковой цепи второго аминокислотного остатка – аргинина. Благодаря свернутой форме основной цепи, стабильные конформации трипептидов LPP, IRW и LRW характеризуется образованием эффективных ди-, и трипептидных межостаточных взаимодействий. Для трипептида IRW самой низкоэнергетической оказалась  $R_{32}R_{22}R_{31}$  конформация. В предпочтительной конформации этого трипептида все остатки вовлечены в эффективные взаимодействия. Самой низкоэнергетической структурой трипептида LRW является  $R_{21}R_{32}R_{11}$  конформация. Эта конформация превосходит следующую по стабильности конформацию  $B_{22}B_{21}$  лишь на 0,5 ккал/моль. Образование системы дисперсионных и электростатических взаимодействий между пептидными звеньями цепи, а также наличие водородной связи между противоположно заряженными концами молекул придает свернутой структуре особую прочность. Молекулярные модели энергетически предпочтительных конформации молекул трипептидов IRW и LRW, построенные на основе рассчитанных величин двугранных углов, представлены на рисунке 1. Практически самые низкоэнергетические конформации трипептидов отличаются друг от друга структурой N-концевого остатка. Расчет конформаций антигипертензивных трипептидов позволяет сделать заключение, что молекулы обладают существенной конформационной ограниченностью. В таблице 2. представлены величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков молекул IRW и LRW в низкоэнергетических конформациях. На рисунке 2 приведены молекулярные модели энергетически другой предпочтительной конформации молекул трипептидов IRW и LRW с формой основной цепи RRL, реализующую водородную связь между атомом гуанидиной группы боковой цепи аргинина и карбоксильной группой C-конца пептида.

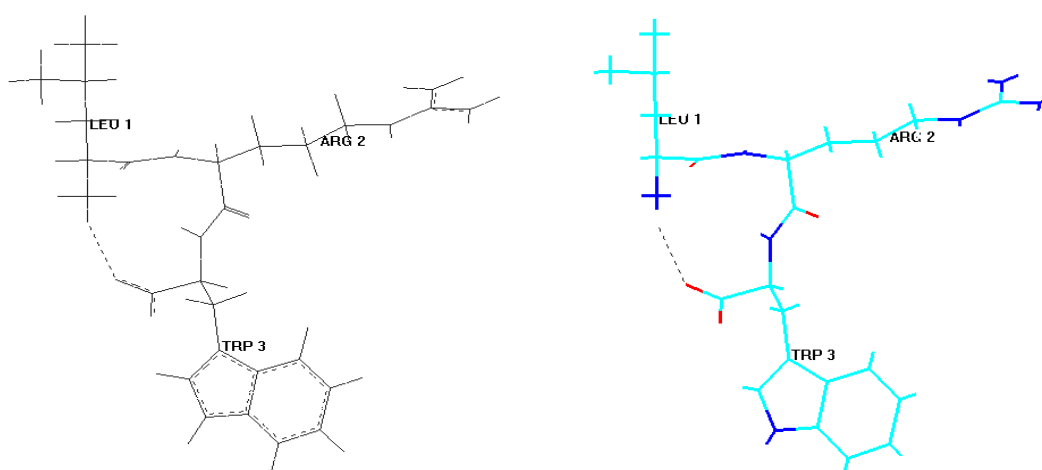
**Таблица 1.** Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в энергетически предпочтительных конформациях молекул IRW и LRW

№	Пептид	Конформация	Энергетические вклады, ккал/моль				
			$E_{нев}$	$E_{эл}$	$E_{торс}$	$E_{полн}$	$E_{отн}$
1.	IRW	$R_{32}R_{22}R_{31}$	-16,5	-1,5	4,0	-14,0	0
2.	IRW	$R_{33}R_{23}L_{31}$	-15,3	-1,8	3,6	-13,5	0,5
3.	IRW	$B_{22}B_{21}B_{11}$	-12,7	-0,6	2,3	-11,0	4,0
1.	LRW	$R_{21}R_{32}R_{11}$	-18,4	-0,8	4,0	-15,2	0
2.	LRW	$R_{21}R_{23}L_{31}$	-16,8	-1,5	3,8	-14,5	0,7
3.	LRW	$B_{21}B_{22}B_{31}$	-10,7	-1,6	1,6	-10,7	4,5

a)

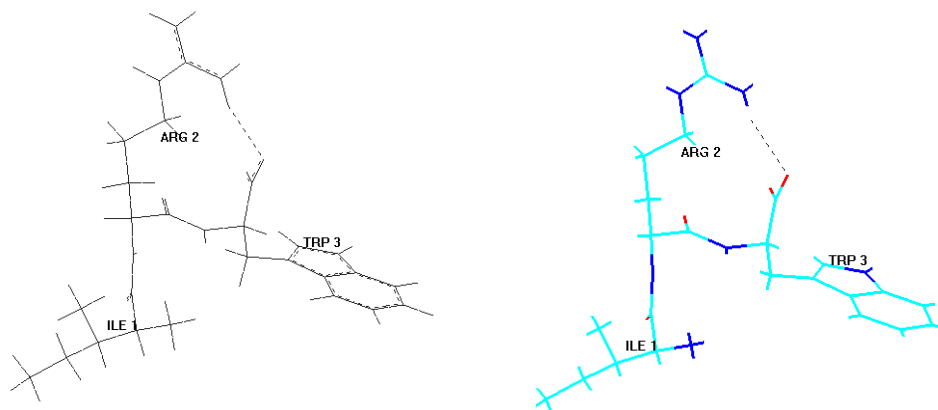


б)

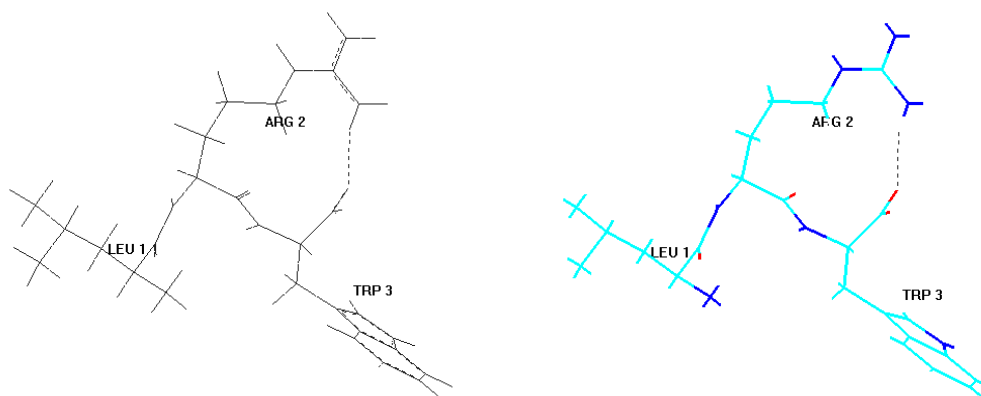


**Рисунок 1.** Молекулярные модели пространственных структур в форме RRR для трипептидов: IRW(a) и LRW (б) соответственно. Пунктирной линией указана водородная связь

Таким образом, результаты конформационного анализа антигипертензивных трипептидов IRW и LRW выявили для них одинаковую свернутую форму пептидного остова низкоэнергетических структур. Расчет показал, что данные структурно похожие трипептиды формируют практически идентичные пространственные конформации, различающиеся лишь ориентацией боковых цепей отдельных остатков. Полученные величины энергетических и геометрических параметров наиболее стабильных конформаций трипептидов дают представление о предпочтительной пространственной структуре молекул. В результате расчетов были определены и сопоставлены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекул. Полученные характеристики пространственной и электронной структуры антигипертензивных трипептидных молекул могут способствовать целенаправленному поиску эффективных аналогов молекул в качестве лекарственных препаратов для стимулирования или блокирования конкретного физиологического воздействия в лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний. Предполагается, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур находится биологически активная конформация трипептидов, способная участвовать в процессе ингибирования АПФ.



a)



б)

**Рисунок 2.** Молекулярные модели пространственных структур в форме RRL для трипептидов: IRW(a) и LRW (б) соответственно. Пунктирной линией указана водородная связь

**Таблица 2.** Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков молекул IRW и LRW.в двух низкоэнергетических конформациях I -  $R_{32}R_{22}R_{31}$  ( $E_{отн} = 0$  ккал/моль), II –  $R_{33}R_{23}L_{31}$  ( $E_{отн} = 0,5$  ккал/моль), I –  $R_{21}R_{32}R_{11}$  ( $E_{отн} = 0$  ккал/моль), II -  $R_{21}R_{23}L_{31}$  ( $E_{отн} = 0,7$  ккал/моль)

Пептид	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
IRW	I	-33	-63	170	-60	186	179	190
IRW	II	-66	117	181	180	185	177	-
LRW	I	-76	98	173	174	58	178	174
LRW	II	-60	146	177	181	70	179	176
IRW	I	-71	-51	171	172	182	174	182
IRW	II	-66	117	181	180	185	177	-
LRW	I	-76	98	173	174	58	178	174
LRW	II	-60	146	177	181	70	179	176
IRW	I	-103	-35	180	-50	92	-	-
IRW	II	-66	117	181	180	185	177	-
LRW	I	-76	98	173	174	58	178	174
LRW	II	-60	146	177	181	70	179	176

**Список литературы / References:**

1. Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Peptide Science*, 1997, vol. 43, pp. 129-134.
2. Liao W., Fan H., Wu J.J. Egg White-Derived Antihypertensive Peptide IRW (Ile-Arg-Trp) Inhibits Angiotensin II-Stimulated Migration of Vascular Smooth Muscle Cells via Angiotensin Type I Receptor. *J Agric Food Chem.*, 2018, vol. 66, no. 20, pp. 5133-5138.
3. Xiao Wang, Khushwant S. Bhullar, Hongbing Fan, Wang Liao, Yongjin Qiao, Di Su, Jianping Wu. Regulatory Effects of a Pea-Derived Peptide Leu-Arg-Trp (LRW) on Dysfunction of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells against Angiotensin II Stimulation. *J Agric Food Chem.*, 2020, vol. 68, no. 13, pp. 3947-3953.
4. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокинина-1 человека и гемокинина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470. [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godzhaev N.M. Features of the spatial organization of the molecules of human hemokinin-1 and mouse / rat hemokinin-1. *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 полужемпирического 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. 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, 2005, 875 Massachusetts, 02139 U.S.A.

**COMPARISON OF CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDE IRW AND IT ISOMER LRW****Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M.**

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

**Abstract.** Angiotensin converting enzyme (ACE) plays an important role in blood pressure control systems (renin-angiotensin system) because it converts angiotensin I to angiotensin II (Ang II), which leads to the development of hypertension. Therefore, it is very important to study ACE inhibition for the prevention and treatment of hypertension. ACE inhibitors are widely prescribed for cardiovascular diseases, including high blood pressure, heart failure, and kidney failure. ACE inhibiting peptides are safer than synthetic ACE inhibitors and may be useful as antihypertensive agents. In this work, the spatial structure and conformational behavior of the antihypertensive tripeptide IRW and its isomer LRW, isolated from food proteins, have been studied using molecular mechanics methods. As a result of calculations, it was shown that, in a weakly polar environment, peptides preferentially form similar stable fully folded structures. It was shown that the preferred conformation of these peptides is stabilized by effective dispersion interactions with the formation of a hydrogen bond between the atoms of the carboxyl group of the C-terminal part and the guanidine group of the arginine side chain. As a result of a comparative study of two structurally homologous tripeptides IRW and LRW, the energetically preferred ranges of the dihedral angles and the mutual arrangement of residues in the low-energy conformations of molecules were determined. Based on the obtained parameters, molecular models of the energetically preferred conformations of the tripeptides were compiled. This study made it possible to compare all the stable conformational states of two tripeptide peptides, which makes it possible to identify structural criteria that may be necessary to create inhibitory properties of drugs for clinical use.

**Key words:** antihypertensive tripeptide, angiotensin converting enzyme (ACE), conformation, inhibitor, molecular mechanics method.



## КОНФОРМАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА (5-12)

Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М.

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Тахикининовый пептид гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности – DPPDPNRFYGMМамид. Он структурно отличается от всех других известных тахикининов, главным образом, наличием остатка метионина, заменяющего обычный остаток лейцина в положении 2 от С-конца. Было показано, что его С-концевая октапептидная последовательность (5-12) была такой же активной, как и сама исходная молекула. В данной работе было проведено исследование конформационных свойств молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12), методом молекулярной механики. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации С-концевого октапептида (5-12) гиламбатина. Энергетически наиболее предпочтительными оказались  $\alpha$ -спиральные конформации октапептида. Было показано, что низкоэнергетические конформации октапептида, в основном, формируют  $\alpha$ -спираль на С-конце молекулы. Полученные конформации стабилизируются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки. Расчет показал, что самые низкоэнергетические конформации октапептида отличаются друг от друга относительной подвижностью N-концевого трипептидного участка фрагмента. Сопоставление низкоэнергетических конформаций С-концевых пентапептида, октапептида и целой молекулы гиламбатина обнаруживает некоторую преемственность энергетически предпочтительных структур. Во всех рассчитанных пептидах предпочтение отдается структурам, ведущим к удлинению  $\alpha$ -спирали. Конформационный анализ последовательно наращиваемых С-концевых фрагментов молекулы гиламбатина выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Действительно, начиная от С-концевого пентапептида и кончая додекапептидами, от фрагмента к фрагменту энергетически предпочтительными оказывались  $\alpha$ -спиральные конформации.

**Ключевые слова:** гиламбатин, гиламбатин (5-12), *octapeptide*, конформация, метод молекулярной механики.

Определение пространственного строения биологически активных природных пептидов позволяет определить структурные критерии, необходимые для их функционирования и может способствовать созданию более эффективных лекарственных препаратов. Член семейства тахикининов, гиламбатин, был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Гиламбатин обладает поразительной характеристикой, впервые наблюдаемой в семействе тахикининовых пептидов, наличием последовательности Met-Met-NH<sub>2</sub> в С-концевом дипептиде. Он структурно отличается от всех других известных тахикининов, главным образом, наличием остатка метионина, заменяющего обычный остаток лейцина в положении 2 от С-конца. [1]. Тахикининовые нейропептиды участвуют в патогенезе бронхиальных, воспалительных и желудочно-кишечных болезней, а также приступов мигрени, депрессии, эпилепсии и переносе болевых ощущений. Кроме того, было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови [1]. В работе [2] было показано, что молекула гиламбатина и его 12 фрагментов были тестированы на препарате подвздошной кишки морских свинок на сократительную активность [2]. Все фрагменты, кроме трех, обладали сократительной активностью. С-концевой фрагмент такой же длины, как октапептидная последовательность, был, по крайней мере, таким же активным, как и исходная молекула. Гептапептидный фрагмент (Hyl6-12) и гексапептидный фрагмент (Hyl7-12) были менее активными, а С-концевой пентапептидный фрагмент (Hyl8-12) и N-концевой гексапептидный фрагмент (Hyl1-6) были гораздо менее активными. N-концевой пентапептидный фрагмент (Hyl1-5) и N-концевой фрагмент, из которого были удалены N-концевые остатки Asp или Asp-Pro (Hyl2-6, Hyl3-6), были неактивными при используемых дозах. Эффективные и селективные агонисты и антагонисты тахикининовых рецепторов, созданные на основе относительно низкомолекулярного октапептида Hyl-1(5-12) могут иметь большой терапевтический потенциал. Поэтому определение особенностей пространственной структуры молекулы гиламбатина и его фрагментов может способствовать целенаправленному поиску ее эффективных аналогов в качестве лекарственных препаратов для стимулирования или блокирования конкретного физиологического воздействия в лечении ряда заболеваний. С этой целью в данной работе были исследованы пространственное строение молекулы гиламбатина и ее фрагментов методами молекулярной механики (AM1).

При параллельном биоанализе ряда тестовых объектов *in vitro* и *in vivo* гиламбатин и другой тахикининовый пептид физалаемин были почти неотличимы друг от друга с небольшими умеренными количественными различиями.

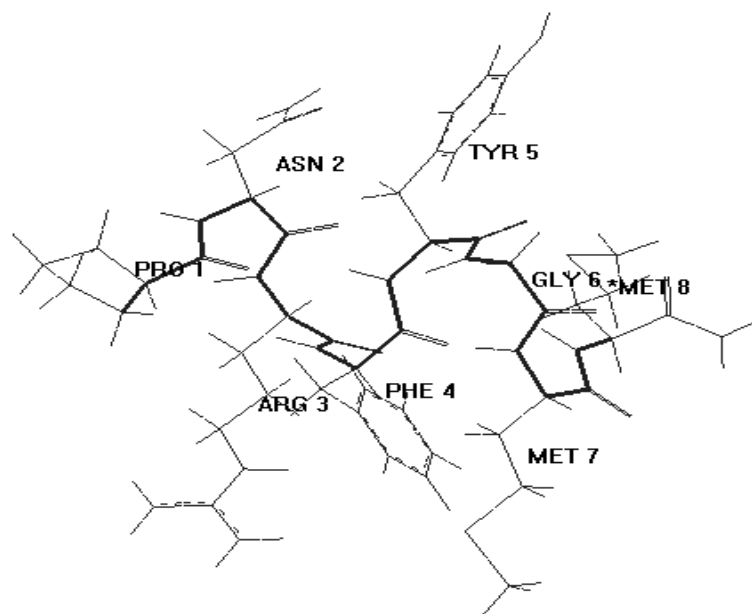
В данной работе расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [3]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [3]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$ , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов  $\phi$  и  $\psi$ . Углы  $\phi$  и  $\psi$  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 ( $\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных трипептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов ( $\phi$  и  $\psi$ ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида, а для монопептида пролина конформации выбирались из двух B и R областей [3]. Отсчет двугранных углов вращения  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^i$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [4]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [5]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [5]. Расчеты и оптимизация конформационных состояний проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [6], позволяющего проводить расчеты и оптимизацию конформационных состояний молекул методом молекулярной механики с силовым полем AM1.

Исследование пространственного строения биологически активного С-концевого октапептида гиламбатина: Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12- NH<sub>2</sub> проводилось на основе поэтапного подхода с использованием предварительно рассчитанных стабильных конформаций перекрывающихся по двум остаткам тетрапептида Pro5-Phe8 и С-концевого пентапептида Phe8-Met12-NH<sub>2</sub>. При составлении структурных вариантов октапептида ориентации боковых цепей остатков перекрывающегося участка Phe7-Tyr8 брались с учетом сохранения максимума межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в перекрывающихся фрагментах. Таким образом, было составлено более 200 структурных вариантов, охватывающих все шейпы октапептида. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации С-концевого октапептида Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12 - NH<sub>2</sub> молекулы гиламбатина.

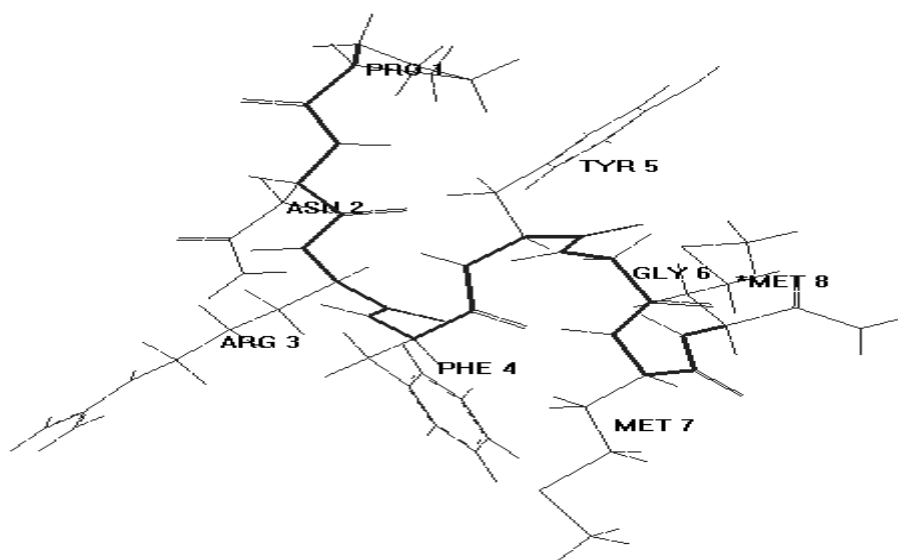
Для каждой из рассчитанных конформаций определены вклады всех видов энергий взаимодействия октапептида. В таблице 1 приведены энергетические параметры стабильных конформаций октапептида гиламбатина. Как следует из таблицы, в интервал относительной энергии 0-10 ккал/моль входят конформации 10 структурных типов октапептида. Не трудно заметить, что все низкоэнергетические конформации формируют  $\alpha$ -спираль на С-конце молекулы. Иными словами, чем длиннее  $\alpha$ -спираль на С-конце пептида, тем стабильнее структура октапептида. Эти конформации отличаются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Практически самые низкоэнергетические конформации октапептида отличаются друг от друга относительной стабильностью N-концевого трипептидного участка фрагмента. Расчет конформаций октапептида молекулы гиламбатина позволяет сделать заключение, что этот

**Таблица 1.** Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в стабильных конформациях молекулы Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12- NH<sub>2</sub> октапептида гиламбатина

№	Конформация	Энергетические вклады, ккал/моль				
		Е <sub>нев</sub>	Е <sub>эл</sub>	Е <sub>торс</sub>	Е <sub>полн</sub>	Е <sub>отн</sub>
1	RR <sub>2</sub> R <sub>22</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-39,1	7,2	5,8	-26,1	0
2	RB <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-36,0	6,5	4,4	-25,1	1,0
3	BR <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-38,2	7,5	5,8	-24,8	1,3
4	BB <sub>2</sub> B <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-35,2	6,4	4,5	-24,3	1,8
5	RB <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-36,7	7,1	5,3	-24,3	1,8
6	RB <sub>2</sub> B <sub>31</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-33,1	6,6	4,4	22,1	4,0
7	BR <sub>2</sub> B <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-34,3	7,1	6,7	-20,6	5,5
8	RR <sub>2</sub> B <sub>11</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,4	5,7	6,3	-20,4	5,7
9	BB <sub>2</sub> B <sub>11</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,1	7,4	4,9	-19,8	6,3
10	BR <sub>2</sub> B <sub>13</sub> B <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,9	7,2	6,6	-19,1	7,0



a)



б)

**Рисунок 1.** Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур С-концевого октапептида гиламбатина. Жирной линией указан пептидный остов молекулы

С-концевой фрагмент обладает заметной конформационной ограниченностью. Самой низкоэнергетической конформацией октапептида является  $\alpha$ -спиральная конформация. Эта конформация превосходит следующую по стабильности конформацию на 1,0 ккал/моль. Спиральная структура, благодаря периодичности своего строения, характеризуется образованием эффективных три-, тетра- и пентапептидных межостаточных взаимодействий. Этого нельзя сказать о других низкоэнергетических структурах, строение пептидного остова которых носит более неупорядоченный характер. Проекция двух энергетически предпочтительных конформаций октапептида гиламбатина представлены на рисунке 1 (а, б).

Расчет конформаций октапептида молекулы гиламбатина позволяет сделать заключение, что С-концевой фрагмент обладает заметной конформационной ограниченностью. Результаты расчетов конформаций N-концевого пентапептида Asp1-Pro2-Pro3-Asp4-Pro5 свидетельствуют о заметной конформационной лабильности этого фрагмента. В данном пентапептиде имеются два сопряженных остатка пролина и в пятой позиции еще один пролин, которые ограничивают конформационные возможности предыдущих остатков. Остатки пролина, как известно [7], обладают конформационным своеобразием, благодаря циклическому строению основной цепи. Эти остатки пролина ограничивают конформационные возможности предыдущего остатка, для которого реализуется только В форма основной цепи. Поэтому для рассматриваемого пентапептида стерически допустимы только две формы основной цепи BBRBR и BBBBR.

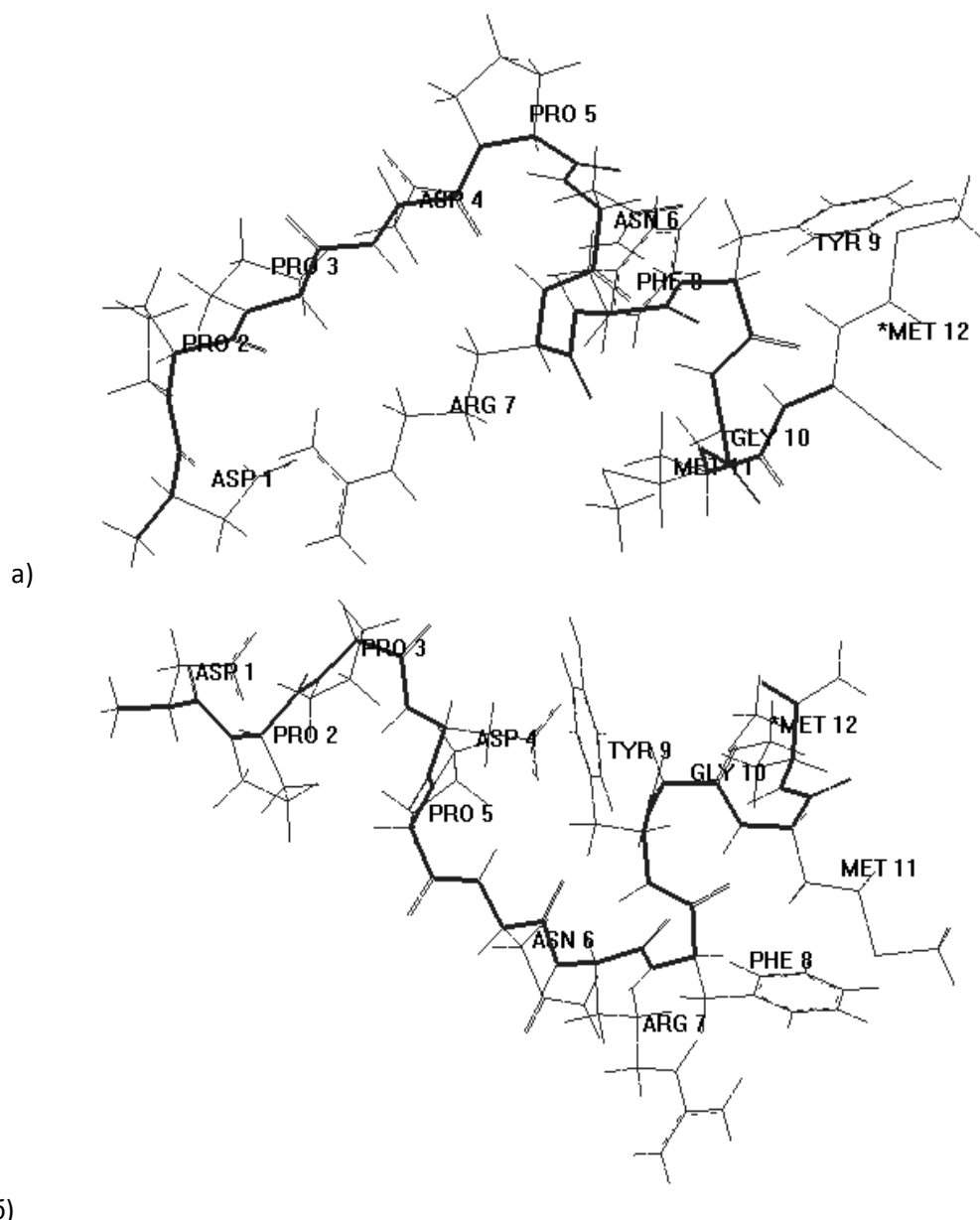
Исследование пространственного строения молекулы гиламбатина проводилось на основе стабильных конформаций С-концевого октапептида и низкоэнергетических конформаций N-концевого пентапептида. Расчеты показали, что молекула гиламбатина может формировать стабильные конформационные состояния с

одинаковым С-концевым структурным сегментом. Одни из них содержат около двух витков  $\alpha$ -спирали, а другие представляет собой свернутую неупорядоченную структуру с небольшим витком спирали на С-конце. Эти структуры мало отличаются по величине относительной энергии. Иерархия предпочтительных структур спирального типа при переходе от октапептидного фрагмента к целой молекуле сохраняется. По-прежнему энергетически предпочтительны конформации, в которых  $\alpha$ -спираль формируется на С-конце молекулы. Следует отметить, что образование стабильных конформаций молекулы гиламбатина сопровождается созданием ряда внутримолекулярных водородных связей. Так, например, в глобальной конформации образуется система регулярных водородных связей, характерных для правой  $\alpha$ -спирали. Распределение конформаций молекулы гиламбатина по энергии в основном зависит от числа взаимодействий между остатками лабильного и консервативного фрагментов. Интересно отметить, что  $\alpha$ -спиральные конформации молекулы гиламбатина, составленные из наилучших по ближним и средним взаимодействиям форм фрагментов пентапептида и октапептида, оказываются самыми предпочтительными и на целой молекуле. На рисунке 2 приведены проекции двух наиболее стабильных конформаций молекулы гиламбатина. Контур основной цепи конформаций показаны жирной линией.

Тем самым предполагается, что устойчивый  $\alpha$ -спиральный сегмент на С-конце молекулы гиламбатина является минимальным структурным элементом, необходимым для связывания с рецептором, а N-концевая относительно подвижная часть этих пептидов может выполнять двойную роль с одной стороны стабилизировать конформацию целой молекулы, а с другой стороны обеспечивать селективность к одному из тахикининовых рецепторов. Проведенное исследование показало также степень конформационной подвижности молекулы гиламбатина.

**Таблица 2.** Двугранные углы (град) аминокислотных остатков молекулы гиламбатина в низкоэнергетических конформациях I – B<sub>2</sub>BBB<sub>2</sub> RR<sub>2</sub>R<sub>32</sub>R<sub>2</sub> R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> (E<sub>отн</sub> = 0,0 ккал/моль), II – B<sub>2</sub> BRB<sub>2</sub>RB<sub>2</sub> R<sub>1</sub>B<sub>32</sub> R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> (E<sub>отн</sub> = 1,7 ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
Asp <sup>1</sup>	I	-66	138	177	190	79	-	-
	II	-66	139	176	191	79	-	-
Pro <sup>2</sup>	I	-60	153	168	-	-	-	-
	II	-60	171	172	-	-	-	-
Pro <sup>3</sup>	I	-60	146	182	-	-	-	-
	II	-60	-41	182	-	-	-	-
Asp <sup>4</sup>	I	-124	122	186	187	92	-	-
	II	-125	133	184	191	92	-	-
Pro <sup>5</sup>	I	-60	-44	198	-	-	-	-
	II	-60	-41	188	-	-	-	-
Asn <sup>6</sup>	I	-84	-53	193	184	88	-	-
	II	-96	145	190	186	90	-	-
Arg <sup>7</sup>	I	-101	-57	-174	-56	183	182	180
	II	-88	-49	-179	-50	180	188	179
Phe <sup>8</sup>	I	-64	-49	181	181	91	-	-
	II	-61	-48	181	180	91	-	-
Tyr <sup>9</sup>	I	-74	-30	-184	181	90	-	-
	II	-74	-32	-186	181	89	-	-
Gly <sup>10</sup>	I	-62	-39	-178	-	-	-	-
	II	-62	-39	-179	-	-	-	-
Met <sup>11</sup>	I	-82	-55	-177	180	172	66	53
	II	-83	-55	-177	181	172	67	52
Met <sup>12</sup>	I	-87	-54	180	-60	184	180	182
	II	-87	-54	179	-59	184	180	182



**Рисунок 2.** Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур молекулы додекапептида гиламбатина. Жирной линией указан пептидный остов молекулы.

Таким образом, результаты конформационного анализа молекулы гиламбатина и ее С-концевого октапептида выявили ограниченный набор низкоэнергетических структур. Как видим С-концевой фрагмент молекулы в свободном состоянии отдает предпочтение формированию  $\alpha$ -спирали. Принимая во внимание, тот факт, что молекула октапептида сама по себе обладает биологической активностью, полученные величины энергетических и геометрических параметров наиболее стабильных конформаций дают представление о предпочтительной пространственной структуре додекапептидной молекулы. Можно предположить, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур находится биологически активная конформация молекулы гиламбатина и ее С-концевого октапептида (5-12), способная связываться с рецептором.

#### Список литературы / References:

1. Güllner H.G., Harris V., Yajima H., Unger R.H. Hylambatin, a structurally unique tachykinin: effects on insulin and glucagon secretion. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1984, vol. 272, no. 2, pp. 304-309.
2. Inoue A., Fukuyasu T., Nakata Y., Yajima H., Nomizu M., Inagaki Y., Asano K., Segawa T. Structure-activity relationship of hylambatin and its fragments as studied in the guinea-pig ileum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1988, vol. 40, iss. 1, pp. 72-73.
3. 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., Godzhaev N.M. Features of the spatial organization of the molecules of human hemokinin-1 and mouse / rat hemokinin-1. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 457-470. (In Russ.)]



4. 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.
5. 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. 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. Schimmel P.R., Flory P.J. Conformational energies and conformational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol.34, pp. 105-111.

#### CONFORMATIONAL BEHAVIOUR OF HYLAMBATIN AND IT (5-12) FRAGMENT

Agaeva G.A., Safarli G.R., Godjaev N.M.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

**Abstract.** The tachykinin peptide hylambatin was isolated and chemically characterized from methanol extracts of the skin of *Hylambates maculatus*, an African crustacean frog. Hylambatin consists of twelve amino acid residues in the sequence - DPPDPNRFYGMMamide. It differs structurally from all other known tachykinins mainly by the presence of a methionine residue replacing the usual leucine residue at position 2 from the C-terminus. It was shown that its C-terminal octapeptide sequence (5-12) was as active as the parent molecule. In this work, the study of the conformational properties of the hylambatin molecule and its fragment (5-12) was carried out by the method of molecular mechanics. As a result of minimizing the energy of the composed structural variants, low-energy conformations of the C-terminal octapeptide (5-12) hylambatin were found. The  $\alpha$ -helical conformations of the octapeptide were found to be energetically most preferable. It has been shown that the low-energy conformations of the octapeptide mainly form the helix at the C-terminus of the molecule. The resulting conformations are stabilized mainly by the energy of dispersion interactions, i.e. ultimately, packing density. The calculation showed that the lowest-energy conformations of the octapeptide differ from each other in the relative mobility of the N-terminal tripeptide region of the fragment. Comparison of the low-energy conformations of the C-terminal pentapeptide, octapeptide, and the whole hylambatin molecule reveals some continuity of energetically preferred structures. In all calculated peptides, preference is given to structures leading to the elongation of the  $\alpha$ -helix. Conformational analysis of the sequentially extended C-terminal fragments of the hylambatin molecule revealed a significant consistency of results with an increase in the length of the peptide chain under consideration. Indeed, starting from the C-terminal pentapeptide and ending with dodecapeptidamide, the  $\alpha$ -helical conformations turned out to be energetically preferable from fragment to fragment.

**Key words:** hylambatin, octapeptide (5-12), conformation, molecular mechanics method.

## ЭНЕРГЕТИКА БИОСФЕРЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПРОГНОЗА СУДЬБЫ НАШЕЙ ЦИВИЛИЗАЦИИ

Чукова Ю.П.

Краснопресненский региональный фонд охраны природы и здоровья населения

г. Москва, РФ; e-mail: y.chukova@mtu-net.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** Квантовая термодинамика, разработанная во второй половине XX века для технических устройств, оказалась работоспособной в сфере живых существ (биосфере). Термодинамический закон диктует свои ограничения и запреты там, где этого никто не ждал. Он смог ответить на множество вопросов биосферы, сформулированных около 100 лет назад и лежащих в области зрения человека, фотосинтеза растений и фотодвижения простейших организмов. Ключом к пониманию всех этих процессов оказалась энтропия воздействующего электромагнитного излучения (ЭМИ), а главной характеристикой – КПД преобразования энергии ЭМИ в свободную энергию. Условием устойчивого функционирования системы является линейный рост скорости генерации энтропии в системе с ростом поглощения энергии или его слабое отклонение от линейной зависимости. В этих условиях КПД растёт по логарифмическому закону (закон Вебера-Фехнера). Самым неожиданным оказалось совпадение ответных реакций систем, подчиняющихся статистике Бозе-Эйнштейна, Ферми- Дирака и Максвелла-Больцмана. Это означает, что закон Вебера-Фехнера является термодинамическим законом очень широкой общности и значимости. Линейный рост скорости генерации энтропии может иметь место при изменении поглощения энергии разного типа на 10 - 20 порядков, но при более высоком поглощении скорость генерации энтропии начинает расти сверх линейно. Это приводит к ограничению роста КПД и его последующему спаду. Различие между биосферой и ноосферой гораздо меньше, чем между живым и неживым миром. Термодинамический прогноз для судьбы нашей цивилизации даёт тот же результат, что и работы Римского клуба. Это требует самого внимательного обсуждения, поскольку термодинамика (в отличие от Римского клуба) допускает положительный исход в смысле сохранения нашей цивилизации при разумной поведенческой реакции населения.

**Ключевые слова:** *эффективность преобразования энергии, закон Вебера-Фехнера, пределы роста КПД и всех эффектов.*

Во второй половине XX века была разработана квантовая термодинамика необратимых изотермических процессов [1-3]. Она разрабатывалась, ориентируясь на процессы преобразования энергии электромагнитного излучения в рукотворных неживых объектах, таких как люминесцирующие устройства и нетепловые преобразователи солнечного излучения. На этих системах была проведена проверка её соответствия экспериментальным данным, и было выявлено не только качественное, но и количественное соответствие теоретических и экспериментальных результатов.

Законы, полученные для неживых систем, оказались применимыми к живым системам и позволили ответить на ряд кардинальных вопросов фотобиологии, которые были сформулированы 100 лет назад и не могли найти ответа при использовании индуктивных методов разных наук. Таковы, например, проблемы спектральной чувствительности глаза человека и основной рабочей характеристики его (зависимости отклика от силы внешнего воздействия) [4]. Для ответа на эти вопросы оказалось достаточным рассмотрение термодинамического предела КПД  $\eta$  преобразования света. Для ответа на вопросы, лежащие в области фотосинтеза растений и фотодвижения простейших организмов, потребовалось рассмотрение необратимости процессов [5]. Учёт необратимости позволил понять, почему за три десятилетия стараний многих лабораторий мира не удалось повысить продуктивность риса [6]. Учёт сверхлинейного роста необратимости позволил выявить причину смены положительных типов фотодвижения на отрицательные [7]. В итоге в настоящее время можно считать, что основы энергетики биосферы сформулированы, ибо кроме выше упомянутых эффектов квантовая термодинамика сумела объяснить много других прежде не до конца понятых эффектов [3].

Тот факт, что термодинамика, разработанная для неживых систем, оказалась работоспособной в сфере живых систем (биосфера) имеет первостепенную важность потому, что позволяет заглянуть в глубь процессов и установить их связь друг с другом. Поскольку процессы в неживых системах просты, то можно понять и объяснить функциональный смысл разных частей итоговой формулы для КПД  $\eta$ , которая выведена с учётом необратимости процессов и представлена формулой (3.10) в [1], (16) в [2], (4.7) в [3], формулой (7) в [8], формулой (1) в данной статье и изображена сплошной линией на рисунке 1.

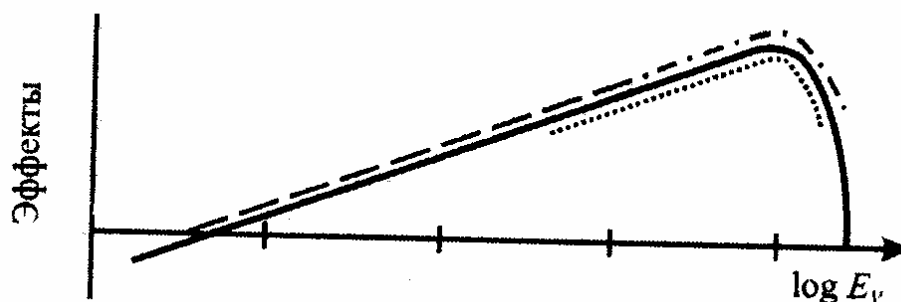


Рисунок 1. Зависимость эффектов от силы воздействия

На рисунке 1 использован полулогарифмический масштаб. На оси абсцисс отложен логарифм спектральной плотности поглощённого излучения ( $\log E_v$ ), но может быть приведена любая другая величина, пропорциональная ей, а именно поглощённая мощность, падающая мощность, освещённость, интенсивность, поглощённая или воздействующая доза. На оси ординат в линейном масштабе приводится КПД  $\eta$  (если работа термодинамическая!), но может быть отложен любой тест, измеряемый экспериментатором. Пунктиром на этом рисунке отмечена область работы глаза человека. Это возрастающая пунктирная прямая. На этом участке протекания процесса легко выявить его суть. Для этого напомним схему, рассмотренную квантовой термодинамикой (рис. 2).

На ней представлены пунктирными стрелками три возможных пути преобразования энергии электромагнитного излучения. Из них в данной статье рассматриваются лишь два процесса: преобразование энергии электромагнитного излучения в свободную энергию Гельмгольца (КПД  $\eta$ ) и её преобразование в тепло. Прямая линия в полулогарифмических координатах означает логарифмическую зависимость (рис. 1).

$$\eta = 1 - T (\dot{S}_a + \dot{S}_i) / \dot{W}_a. \quad (1)$$

Глаз человека нормально функционирует при изменении освещённости на 10–20 порядков при смене дня и ночи. Логарифмическая зависимость была обнаружена почти 200 лет назад в середине 19 века и носит название закона Вебера-Фехнера. Драматическая судьба этого закона описана в [9, 10] и сейчас не будет предметом нашего рассмотрения. Для нас сейчас важно другое: Эта зависимость обеспечивает стабильность и ординарную работу глаза в условиях неординарно широкого диапазона изменения внешнего воздействия. Это уникальный преобразователь электромагнитного излучения в свободную энергию. Для электромагнитного излучения как внешнего источника энергии проблема исчерпывающе изложена в книгах [1-5] и статье [8].

Но прекрасный экспериментатор Э.Г. Вебер обнаружил ту же зависимость для других органов чувств (слух и осязание), не имеющих никакого отношения к электромагнитному излучению.

Серьёзных учёных (особенно теоретиков) это должно было насторожить, так что закон Вебера-Фехнера в их работах не встречался. Его изучали (кроме физиологов) только узкие специалисты, например, светотехники [11], рекламщики, врачи-глазники и отоларингологи.

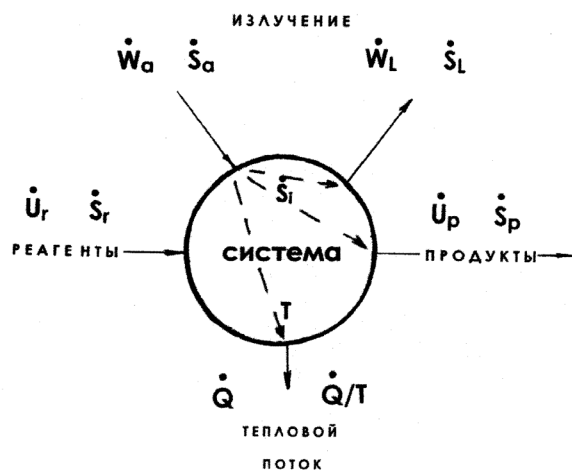


Рисунок 2. Открытая термодинамическая система

#### Обозначения

- $\dot{W}_a$  – поток поглощённой энергии воздействующего излучения
- $\dot{S}_a$  – поток энтропии этого излучения
- $\dot{W}_L$  – поток излучённой энергии системы
- $\dot{S}_L$  – поток энтропии этого излучения
- $\dot{U}_r$  – поток внутренней энергии реагентов
- $\dot{S}_r$  – поток их энтропии
- $\dot{U}_p$  – поток внутренней энергии продуктов
- $\dot{S}_p$  – поток их энтропии
- $\dot{Q}$  – поток тепловой энергии от системы
- $\dot{Q}/T$  – поток его энтропии

Квантовая термодинамика позволила упрочить научную основу этого закона и поднять статус закона, обнаруженного двумя профессорами Лейпцигского университета, как закона физиологии органов чувств человека до уровня всеобщего закона преобразования воздействующей энергии в свободную энергию Гельмгольца. Сейчас будет показано, как она это сделала.

Логарифмический закон для КПД  $\eta$  изотермического эндоэргического процесса появился как следствие учёта энтропии возбуждающего поглощённого излучения  $\dot{S}_a$ , Электромагнитное излучение - это поток частиц с целочисленным спином, которые подчиняются статистике Бозе-Эйнштейна (бозоны) [12],

$$\dot{S}_a = 2\pi k c^2 [v^2 [(1+\rho)\ln(1+\rho) - \rho \ln \rho] dv. \quad (2)$$

Для электромагнитного излучения параметр  $\rho$  связан со спектральной плотностью поглощённого излучения, которая является главной величиной в нашем рассмотрении и даётся формулой  $\rho = c^2 E_\nu / 2\pi h \nu^3$ , где  $c$  – скорость света,  $h$  – постоянная Планка,  $k$  – постоянная Больцмана,  $\nu$  – частота.

Кроме бозонов в физике широко изучаются фермионы (частицы с полуцелым спином), а именно электроны, протоны, нейтроны, нейтрино и т.д., которые подчиняются статистике Ферми-Дирака, а в классическом ансамбле частиц работает статистика Максвелла-Больцмана [13-14].

Исследователь, интересы которого выходят за пределы электромагнитного излучения, может оказаться лицом к лицу с тремя разными зависимостями энтропии  $S$ , которые представлены на рисунке 3.

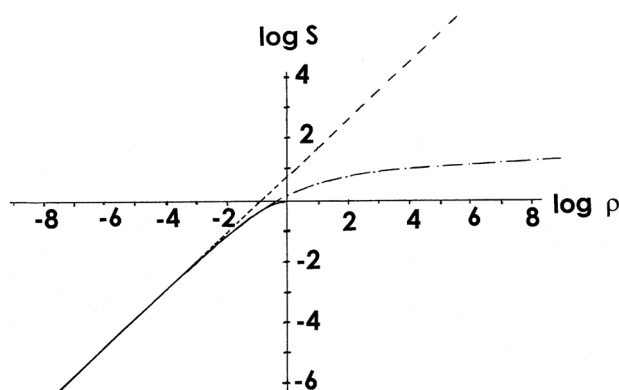
На рисунке 3 по оси ординат отложен логарифм энтропии  $S$  для всех трёх выше названных распределений. А по оси абсцисс отложен логарифм параметра  $\rho$ , который характеризует степень заполнения энергетических уровней.

Сплошной линией дана величина энтропии системы фермионов, для которых согласно принципу Паули  $\rho$  не может быть больше 1. Для системы бозонов эта величина может быть как меньше 1, так и больше 1. Но для всех процессов на поверхности Земли, протекающих под воздействием излучения Вина (коротковолновое излучение), она была меньше единицы. Поэтому энтропия системы бозонов на рисунке 3 состоит как бы из двух частей (одна представлена сплошной линией для  $\rho$  меньше единицы, а вторая – штрих-пунктиром для  $\rho$  выше единицы).

Как видно из рисунка 3 энтропия всех трёх главных физических распределений показывает одинаковую зависимость от  $\rho$  при её величине меньше 1. А это значит, что закон Вебера-Фехнера работает для всех систем (вне зависимости от их специфики), т.е. является одним из самых фундаментальных физических законов. А это открывает дорогу для самых серьёзных обобщений.

Общность этого закона так велика, что невольно вспоминаются закон сохранения энергии и закон всемирного тяготения. От закона, демонстрирующего неожиданно широкую объясняющую силу, можно ожидать и предсказательную силу тоже. Но об этом ниже.

Правоммерно возникает вопрос, если закон имеет такую общность, то почему он не на слуху у студентов, аспирантов и учёных? Ответ достаточно прост. Общий путь «открывания» новых законов таков. Некий экспериментатор наносит полученные им экспериментальные точки на плоскость ( $x$ ,  $y$ ) и проводит через них некую линию. А далее привлекается математика для того, чтобы выяснить, какой формулой описывается полученная линия. Какой функцией она является? Достаточно часто точки ложатся на прямую или близкую к прямой линию. Чем выше уровень постановки эксперимента, чем шире диапазон изменения воздействующего фактора, тем чаще кривая оказывается степенной функцией с показателем более высоким, чем единица (прямая линия). И только экспериментатор экстра класса, работающий в очень широком диапазоне изменения воздействующего параметра, на очень совершенном устройстве может обнаружить закон Вебера-Фехнера (логарифмическую зависимость).



**Рисунок 3.** Зависимость энтропии от параметра  $\rho$  для трёх распределений: Ферми-Дирака (сплошная линия), Бозе-Эйнштейна (сплошная линия и штрих-пунктир) и Максвелла-Больцмана (сплошная линия и пунктир)

В истории закона Вебера-Фехнера произошло прямо противоположное. На праздновании 100-летнего юбилея закона американский физиолог С.С. Стивенс предложил «отменить» закон Вебера-Фехнера и заменить его на степенные функции. Юбилейная статья была опубликована в журнале Science [15] и стала указующим перстом для физиологов всего мира. А Journal of Photochemistry and Photobiology более полувека публиковал статьи, в которых воздействующий стимул изменялся на 2-3 порядка, и степенные функции хорошо описывали эксперимент. В этих условиях осторожность наиболее крупных учёных, особенно теоретиков, вполне понятна [16,17]. Но квантовая термодинамика всё расставила по своим местам, и можно продолжить рассмотрение, опираясь на логарифмическую зависимость КПД преобразования энергии в свободную энергию Гельмгольца.

**Таблица 1.** Характеристика необратимости различных систем и процессов

Система и тест	частотный диапазон	$\dot{S}_i / \dot{S}_a$
Зрение человека	красная граница видимый свет	0,6 - 1,1
Фотодвижение	видимый свет	
фотокинез		1,4
топотаксис		3 - 10
фоботаксис		10
Фотосинтез	видимый свет	
одноклеточных водорослей		2,3
тенелюбивых растений		2,6
светлюбивых растений		3,1
Кремниевый солнечный элемент	солнечный свет	2,5 - 4
Технический фотолиз I <sub>2</sub>	видимый свет	9
Распад молекул и ионов	лазер CO <sub>2</sub>	
SF <sub>5</sub> NF <sub>2</sub>		2·10 <sup>2</sup>
[(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O] <sub>2</sub> H <sup>+</sup>		10 <sup>3</sup>
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>		10 <sup>5</sup>
Кишечная палочка		
синтез колицина ,	мм-излучение	1,2·10 <sup>4</sup>
синтез		
лямбда-профага		6,1·10 <sup>4</sup>
Золотистый стафилококк		
синтез пенициллиназы	мм-излучение	1,5·10 <sup>5</sup>
Дрожжи		
скорость роста	мм-излучение	7,6·10 <sup>6</sup>
Крысы		
электрическая	мм-излучение	1,6·10 <sup>7</sup>
активность		
гипоталамуса ,		
изменение количества	мм-излучение	2,9·10 <sup>7</sup>
клеток костного мозга ,		
изменение числа	мм-излучение	2,9·10 <sup>7</sup>
кариоцидов		
Гемоглобин		
жесткость связи		
гем-белок	мм-излучение	1,5·10 <sup>8</sup>

Итак, для ответа на «безответные» вопросы, связанные со зрением человека, оказалось достаточно рассмотрения термодинамического предела (обратимого процесса). Однако все процессы в живой природе необратимы. Величина необратимости различна в разных живых и неживых объектах и может быть рассчитана по формулам квантовой термодинамики с учётом экспериментальных данных. Результаты некоторых расчётов приведены в таблице 1 [1-3].

Можно было бы представить саму скорость генерации энтропии  $\dot{S}_i$  в абсолютных единицах, но она была бы ненаглядна. Отношение  $\dot{S}_i$  к  $\dot{S}_a$  наглядно демонстрирует величину необратимости.

Проблема жизни – это прежде всего проблема поступления энергии, которую объект может преобразовать в свободную энергию для обеспечения всех форм своей жизнедеятельности. Следующей проблемой жизни является проблема величины и закона роста необратимости. Учёт линейной необратимости (линейного роста скорости генерации энтропии), не внося радикальных изменений в вид закона для предельного КПД, показывает причину отличия численного значения реального КПД от термодинамического предела.

На текущей стадии биологических исследований исключительной удачей следует считать правомерность закона (1) как для живых, так и для неживых объектов. Дело в том, что рукотворные физические системы крайне просты по сравнению с живыми системами. Рукотворные системы демонстрируют внутренние связи предельно отчётливо, что позволяет с новых позиций посмотреть на процессы в живых системах.

Возьмём, к примеру, солнечные батареи, которые сейчас покрывают крыши многоквартирных домов в южных городах на побережье и островах Средиземного моря. Италия была одним из лидеров их разработки, и на рис. 4 представлена эффективность первых изделий промышленного производства (крестики и квадратики). Образцы отличаются структурой p-n переходов. Измерения проводились в условиях концентрации солнечного излучения. Концентраторы представляют различным образом выполненные зеркала, в фокусе которых находится солнечный элемент. Таким способом можно увеличить освещённость в 100, 500 и даже 1000 раз.

На оси абсцисс рисунку 4 отложен логарифм мощности падающего излучения (разработчики солнечных батарей ведут расчёты на падающую энергию, а не на поглощённую: так им удобнее), а по оси ординат – эффективность  $\zeta$ . Сплошная прямая линия в верхней части рисунка – термодинамический предел эффективности  $\zeta^*$  для кремниевых преобразователей с концентраторами солнечного излучения. Квадратики – экспериментальные результаты для кремниевой структуры p+ - n- p+ с удельным сопротивлением базовой области 0,3 Ом·см. Крестики – для кремниевой структуры с сопротивлением базовой области 1,5 Ом·см. Для кривой 3 скорость генерации энтропии выше, чем для кривой 2. Сплошные участки кривых 2 и 3 соответствуют диапазону линейного роста скорости генерации энтропии, а пунктирные части этих кривых иллюстрируют диапазон сверх линейной скорости генерации энтропии. Символично эти результаты изображены так же на рис. 1 точками.

Рисунок 4 позволяет понять глубинный физический смысл процессов в солнечных батареях, который удивительно прост. Логарифмическая функциональная зависимость интересна тем, что в пределах её в системе соблюдается паритет двух различных целевых процессов. При любом значении абсциссы сохраняется долевая часть поглощённой энергии, переходящей в свободную энергию и в тепловую энергию. И этот паритет может сохраняться при возрастании поглощения на много порядков. Когда система начинает демонстрировать отклонение от этого закона, это означает, что скорость генерации энтропии становится сверх линейной. А это

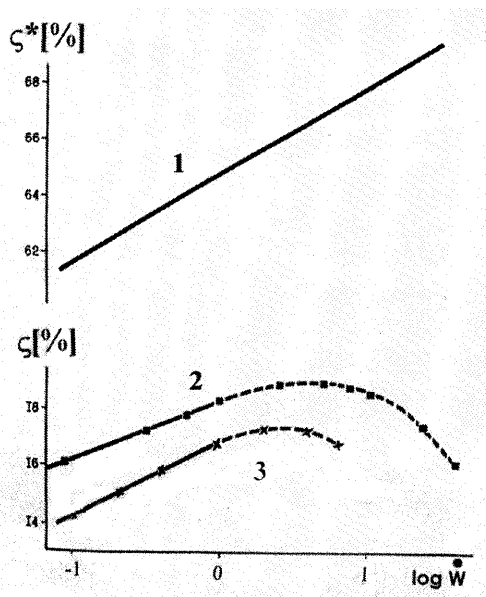


Рисунок 4. Предельная  $\zeta^*$  и реальная  $\zeta$  эффективность солнечных батарей



круто изменяет течение процессов в системе: в ней начинает преобладать превращение энергии электромагнитного излучения в тепло, и убывает доля поглощённой энергии, которая превращается в полезную свободную энергию. А это означает, что начинается падение КПД  $\eta$  (или эффективности  $\zeta$ ) и всех других многочисленных эффектов (тестов), которые изучает экспериментатор. В условиях концентрации солнечного излучения солнечные элементы (батареи) очень быстро выходят из строя, и эксперименты автоматически прекращаются.

На максимум кривых КПД  $\eta$  и эффективности  $\zeta$  приходится процесс фотосинтеза растений и водорослей (штрих-пунктирная линия на рисунке 1). Фотосинтез, от которого человек требует увеличения продуктивности, продуктивности и ещё раз продуктивности и никак не может этого добиться, оказался лежащим в максимуме кривой рисунка 1. Всем тем, кто вложил свой труд (а иногда и жизнь) в попытки увеличить его эффективность, полезно понять, что они штурмовали второй закон квантовой термодинамики и пытались преодолеть термодинамический запрет.

Но особый интерес в рамках данной публикации представляет фотодвижение простейших организмов [7], детально рассмотренное в [2,3,5], где отмечена предсказательная сила квантовой термодинамики: зная одну характеристику фотодвижения, можно заранее сказать, как будет выглядеть другая. Эта область биосферы заставляет ввести новую характеристику (отсутствующую в термодинамике!) – поведенческую реакцию, которая отслеживает комфортность жизни биообъекта. Очень продолжительное время непонимаемые экспериментаторами явления отрицательного фототаксиса, отрицательного фоботаксиса и отрицательного фотокинеза имеют очень простой смысл: это акты самосохранения. Мельчайшие живые создания, не имеющие не только мозгов, а иногда не имеющие даже ядра в клетке, любят комфортную жизнь!!! А комфортность их жизни создаёт (согласно законам квантовой термодинамики!) свободная энергия, которую они могут расходовать на все формы жизнедеятельности.

Вот почему эвглена начинает двигаться в сторону источника света, как только он появляется. Это её движение продолжается до тех пор, пока приближение к источнику увеличивает свободную энергию, т.е. пока скорость генерации энтропии (о существовании которой она не подозревает!) растёт линейно с ростом поглощения, а КПД процесса возрастает пропорционально логарифму поглощения, и паритет двух направлений (рукавов!) преобразования энергии сохраняется. Но этот паритет кончается, когда скорость генерации энтропии начинает расти сверх линейно, превращение энергии электромагнитного излучения в тепло начинает расти опережающими темпами, КПД прекращает свой рост, и у эвглены пропадает стимул для дальнейшего движения в сторону источника. Она останавливается.

Если поглощение света продолжает нарастать, вызывая увеличение тепловой энергии в системе, то это приводит к увеличению температуры системы, а требование постоянства температуры – это основное требование в мире живых существ. И это жёсткое требование! Так, например, для человека весь диапазон изменения температуры не превышает 10 градусов. Повышение температуры эвглены воспринимает как уменьшение комфорта, и, стремясь вернуть утерянный комфорт, начинает двигаться в сторону меньшего освещения, удаляется от источника. Вот почему появляется отрицательный фототаксис! Если эвглена почему-либо не может отодвинуться от источника, то её температура будет повышаться, КПД полезного процесса наработки свободной энергии будет падать, и эвглена будет погибать. В условиях полного солнечного освещения эвглена погибает за несколько часов. Здесь мы видим полную аналогию с судьбой солнечных батарей при работе с концентраторами.

Устойчивое функционирование разных систем имеет место в условиях логарифмической зависимости КПД эффекта от силы воздействия на систему, а также при слабом отклонении от этого закона. Сильное отклонение приводит к гибели системы.

Законы, работающие в каждом отдельном живом организме, легко просматриваются на популяционном уровне. Условия освещённости в океане с увеличением глубины меняются очень сильно, а фотоотклик каждого индивидуального организма обеспечивает выбор места распространения всей популяции. Таким образом, каждый тип водоросли нашёл себе оптимальную освещённость. Биологи давно установили, что в океане на глубине 10 метров живут зелёные водоросли. Под ними до глубины 25 метров располагаются бурые водоросли, а ещё ниже на глубине до 100 метров обитают красные водоросли.

Итак, два мира, различающихся очень сильно (мир живой и неживой материи) подчиняются одному и тому же закону квантовой термодинамики. Глубокая дифференциация науки в XX веке разделила живой мир на биосферу и ноосферу, и законы развития природы, общества и цивилизации изучаются разными науками, что вполне понятно. Но специалист по квантовой термодинамике понимает, что энергетические корни у столь разных процессов одинаковы. И на это пришла пора обратить внимание.

Крайне важным в этом аспекте явилось то, что глобальная экосистема, рассмотренная Римским клубом [18], и прогнозирующая гибель нашей цивилизации, по существу является частным случаем общей открытой термодинамической системы в квантовой термодинамике (рис. 2). Здесь уместно и полезно напомнить, как выглядит система, рассчитанная Медоузами (рис. 5)



Рисунок 5. Глобальная экосистема, рассмотренная Медоузом

Главным источником энергии у Медоузов названа солнечная энергия, и это строго соответствует термодинамическому рассмотрению, где эта энергия имеет более точное и общее название – электромагнитное излучение, а в рассмотрение вводится её поглощённая часть  $W_a$ . Медоуз называет эту энергию высококачественной. Квантовая термодинамика позволяет численно охарактеризовать качество энергии, принимая во внимание её энтропию  $S_a$ , рассчитываемую по формуле (2) и частотный диапазон поглощённого преобразуемого излучения. Что касается стока энергии, то Медоуз называет его «потери в виде тепла», а в

квантовой термодинамике – это поток тепловой энергии от системы  $\dot{Q}$ . Качество этой энергии в квантовой термодинамике может быть рассчитано по формуле  $\dot{Q}/T$ .

Но есть и существенное отличие. Медоузов интересует то, что находится внутри круга глобальной системы, и рассматривает он эту картину глазами математика, работающего в области бизнеса. Бизнесмен всегда чувствует себя владыкой, потому что он может влиять на потоки внутри системы, а это потоки промышленного капитала, численности населения, увеличение или нехватка продуктов питания, истощение невозобновляемых ресурсов, деградация природной среды. И Медоузы использовали свои возможности в лице могучей компьютерной техники, рассчитав для начала 13 моделей, а потом и ещё как минимум одну [19]. Но в итоге расчетов многих моделей получился один и тот же результат: гибель цивилизации.

Термодинамика, используя простой и эффективный метод «чёрного ящика», содержимым экосистемы не интересуется. Исследователь смотрит на систему глазами стороннего наблюдателя, пытаясь выявить законы природы, и у него нет ни малейшей возможности втиснуть в них свои желания. А что в итоге получилось изложено выше и ранее в [1-3]. Вывод о гибели системы в условиях большого поглощения энергии получен и даётся ниспадающей частью кривой рисунка 1. Он однозначно (без вариантов!) подтверждается экспериментами на солнечных батареях. А что касается живых систем, то здесь ситуация оказывается более интересной.

На примере собственного зрения мы знаем, что когда освещённость становится высокой, глаз сужает зрачок. Если этого недостаточно, в глазу возникают болевые ощущения. Они связаны с избыточным превращением энергии в тепло. Глаз теряет комфортность работы. Чтобы вернуть утерянную комфортность нужно уменьшить поток энергии, поступающий в глаз. Это достигается с помощью солнцезащитных очков. Если и этого недостаточно, то глаз сигнализирует болевыми ощущениями до тех пор, пока не выйдет из строя. Чтобы сохранить зрение, надо в нужный момент уменьшить световое воздействие на глаз.

Ещё более интересно включённое в наше рассмотрение фотодвижение простейших организмов. Оно показывает, что правильная поведенческая реакция простейших организмов позволяет избежать гибели. Эта поведенческая реакция сыграла основополагающую роль в эволюции жизни на Земле. Дело в том, что некоторые простейшие организмы обладают сразу двумя способностями (фотодвижение и фотосинтез). Результатом их жизнедеятельности оказываются углеводы и свободный кислород. Тем самым они способствовали наработке углеводов на Земле и кислорода в её атмосфере. А в итоге их жизнедеятельности изменился тип атмосферы планеты: она стала окислительной, хотя изначально была восстановительной. Поразительный факт: создания размером 2-3 мкм изменили атмосферу небесного тела диаметром более 12000 км. Честь этой трансформации по утверждению альгологов (специалистов по водорослям) принадлежит цианобактериям. Но работали они 200 миллионов лет и работали аккуратно, стремясь сохранить свой комфорт. А степень комфортности их жизни определяется величиной КПД преобразования солнечной энергии в свободную энергию: чем выше КПД, тем больше комфортность. Но ниспадающая часть кривой рисунка 1 обязательна для всех: это термодинамический закон! Наступление этой части они чувствовали по уменьшению комфортности из-за повышения температуры и, используя свои жгутики перемещались в область с меньшей освещённостью (отрицательный фототаксис), тем самым, спасая себя, свою популяцию и создав условия, в которых смогла возникнуть весьма разнообразная флора и фауна и её венец – человек.

Около 30 000 лет он занимался охотой и собиранием растений, мало чем отличаясь от прочих представителей фауны. Но 10000 лет (сто веков) назад начался переход к земледелию и скотоводству. Затем homo

sapiens начал создавать орудия из камней и костей, шить одежду и даже рисовать на скалах. Зарождение ремёсел предшествовало рождению элементарной науки (измерение времени и линейных размеров тел). Эпоха античности (6 век до н.э. – 5 век н.э.), когда Архимед открыл основной закон гидростатики, а Птолемей создал геоцентрическую теорию мироздания, стала прародительницей современной науки. Эпоха Возрождения (XV – XVI век) подарила миру Леонардо да Винчи и Коперника, а затем Галилея и Кеплера, а создание в 1712 году в Англии первой водоподъёмной установки ознаменовало собой начало научно-технической революции. «Так пришёл конец той культуре и образу жизни, которые вели своё начало от далёкой эпохи неолита». Это слова создателя Римского клуба А. Печчеи [20].

Использование новых источников энергии в XIX и особенно в XX веке привело к росту многих показателей нашей цивилизации совершенно аналогично показателям фотодвижения простейших (см. рис. 7 в [8] и [1-3]), и все руководители государств и промышленных объединений планировали и требовали дальнейшего роста. Наша цивилизация проскочила максимум (оптимум) своего существования [21]. Первым и самым надёжным указателем его прохождения является повышение температуры. Первыми на это обратили внимание в 60-ые годы полярники, отметив начало таяния ледников Антарктиды. Они были обеспокоены. Но их беспокойства утонули в ликовании всей планеты после полёта Ю. Гагарина

Потепление климата продолжалось, сопровождаясь таянием ледников на всех материках и повышением уровня Ледовитого океана, и, наконец, достигло такой величины, что на это обратил внимание обыватель с его огородом. На это отреагировали и простейшие живые создания, для которых постоянство температуры – первое требование сохранения жизни. Появление коронавируса – закономерное последствие изменения климата. На борьбу с ним брошены все силы современной медицины. Но это борьба с побегами и цветочками, а корень зла не затронут. Он кроется в том, что за последние 10 лет на треть возросло энергопотребление на планете, и никто не собирается его сокращать. А это означает, что планету ожидает массовая гибель морских животных, которая уже зафиксирована в Авчинской бухте и Каспийском море. И не только морских...

Заканчивая эту статью, хочу ещё раз подчеркнуть, что в отличие от Римского клуба термодинамика указывает вполне определённый, хотя и не симпатичный путь спасения цивилизации – шаг назад к существенному снижению общего потребления энергии на Земле.

На данном уровне развития нашей цивилизации наиболее важным является вопрос глобального потепления, от которого можно попытаться избавиться существенным снижением общего потребления энергии на планете. Каждый житель планеты – энергопотребитель [22]. И от него зависит будущее нашей цивилизации.

#### Список литературы / References:

1. Chukova Yu.P. *Advances in nonequilibrium thermodynamics of systems under electromagnetic radiation*. Moscow, Khristostom, 2001, 116 p.
2. Чукова Ю.П. *Эффекты слабых воздействий. Термодинамический, экспериментальный (биологический и медицинский), социальный, законодательный, международный и философский аспекты проблемы*. М.: «Алес», 2002, 426 с. [Chukova Yu.P. *Low impact effects. Thermodynamic, experimental (biological and medical), social, legislative, international and philosophical aspects of the problem*. М.: "Ales", 2002, 426 p. (In Russ.)]
3. Чукова Ю.П. *Введение в квантовую термодинамику необратимых изотермических процессов*. М.: Мегapolis, 2018, 480 с. [Chukova Yu.P. *Introduction to quantum thermodynamics of irreversible isothermal processes*. М.: Megapolis, 2018, 480 p. (In Russ.)]
4. Чукова Ю.П. *Загадки зрения (Успехи теоретической биофизики в области эффекта Пуркине)*. М.: Изд. "Знание", серия «Физика», № 4, 1990. [Chukova Yu.P. *Riddles of sight (Advances in theoretical biophysics in the field of the Purkinet effect)*. Moscow: Ed. "Knowledge", series "Physics", no. 4, 1990. (In Russ.)]
5. Чукова Ю.П. *Неожиданное родство (Термодинамическое рассмотрение некоторых фотопроцессов)*. М.: Изд. "Знание", серия «Физика», № 4, 1991. [Chukova Yu.P. *Unexpected relationship (Thermodynamic consideration of some photoprocesses)*. Moscow: Ed. "Knowledge", series "Physics", no. 4, 1991. (In Russ.)]
6. Гусев М.В., Никитина А.А. *Цианобактерии (физиология и метаболизм)*. М.: Наука. 1979, 228 с. [Gusev M.V., Nikitina A.A. *Cyanobacteria (physiology and metabolism)*. М.: Science. 1979, 228 p. (In Russ.)]
7. Конев С.В., Волотовский И.Д. *Фотобиология*. Минск, 1974. [Konev S.V., Volotovskiy I.D. *Photobiology*. Minsk, 1974. (In Russ.)]
8. Чукова Ю.П. Энергетические законы биофизики: теория и эксперимент. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, том 5, № 1, с. 52-62. [Chukova Yu.P. Energy laws of biophysics: theory and experiment. *Topical issues of biological physics and chemistry*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 52-62. (In Russ.)]
9. Чукова Ю.П. *Закон Вебера-Фехнера*. К 150-летию издания книги Г.Т. Фехнера «Элементы психофизики». Москва, ЗФО МП «Гигиена», ISBN 978-5-904207, 2009. [Chukova Yu.P. *Weber-Fechner law*. To the 150th anniversary of the publication of the book by G.T. Fechner "Elements of Psychophysics". Moscow, ZFO MP "Hygiene", ISBN 978-5-904207, 2009. (In Russ.)]
10. Чукова Ю.П. О судьбе закона. *Знание-сила*. 2011, № 6, с. 45-51. [Chukova Yu.P. About the fate of the law. *Knowledge is power*. 2011, no. 6, pp. 45-51. (In Russ.)]
11. Мешков В.В. Основы светотехники. ч. 1, М.-Л., ГЭИ, 1957. [Meshkov V.V. Basics of lighting engineering. Part 1, М.-L., GEI, 1957. (In Russ.)]

12. Ландау Л.Д. *О термодинамике люминесценции*. Собрание трудов. М.: Наука, 1969, том 2, с. 26-31. [Landau L.D. *On the thermodynamics of luminescence*. Collection of works. Moscow: Nauka, 1969, vol. 2, pp. 26-31. (In Russ.)]
13. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Статистическая физика*. М.: Наука, 1964. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Statistical physics*. Moscow: Nauka, 1964. (In Russ.)]
14. Киттель Ч. *Статистическая термодинамика*. Перевод с англ. Под ред. С.П.Капицы. М.: Наука, 1977. [Kittel Ch. *Statistical thermodynamics*. Translation from English. Ed. S.P. Kapitsa. Moscow: Nauka, 1977. (In Russ.)]
15. Stevens S.S. To honor Fechner and repeal his law. A power function? Njt a log function? Describes operating characteristic of a sensory system. *Science*, 1961, no. 133, pp. 80-86.
16. Вавилов С.И. *Глаз и Солнце*, М. Из-во АН СССР, 1961. [Vavilov S.I. *Eye and Sun*, M. Iz-vo USSR Academy of Sciences, 1961. (In Russ.)]
17. Ландсберг Г.С. *Оптика*, М. ГИТТЛ, 1964. [Landsberg G.S. *Optics*, M. GITTL, 1964. (In Russ.)]
18. Медоуз Д.Х., Медоуз Д.Л., Рандерс Й. *За пределами роста: предотвратить глобальную катастрофу, обеспечить устойчивое развитие*. М.: Прогресс, 1992. [Meadows D.H., Meadows D.L., Randers J. *Beyond growth: preventing global catastrophe, ensuring sustainable development*. Moscow: Progress, 1992. (In Russ.)]
19. Пестель Э. *За пределами роста*. М.: Прогресс, 1988. [Pestel E. *Beyond Growth*. Moscow: Progress, 1988. (In Russ.)]
20. Печчеи А. *Человеческие качества*. М.: Прогресс, 1985. [Pecchei A. *Human qualities*. Moscow: Progress, 1985. (In Russ.)]
21. Чукова Ю.П. *От М. Планка, А.Эйнштейна и Л.Ландау до Римского клуба*. М.: Мегapolis, 2020, 216 с. [Chukova Yu.P. *From M. Planck, A. Einstein and L. Landau to the Club of Rome*. M.: Megapolis, 2020, 216 p. (In Russ.)]
22. Вайцзекер Э., Ловинс Э., Ловинс Л. *Фактор четыре. Затрат – половина, отдача – двойная*. М.: Academia, 2000. [Weizsacker E., Lovins E., Lovins L. *Factor four. The costs are half, the return is double*. M.: Academia, 2000. (In Russ.)]

## ENERGY LAWS OF THE BIOSPHERE AS A BASIS FOR PREDICTING THE FATE OF OUR CIVILIZATION

Chukova Yu.P.

Krasnopresnensky ecology Fund  
Moscow, Russia; e-mail: y.chukova@mtu-net.ru

**Abstract.** Quantum thermodynamics, developed in the second half of the twentieth century for technical devices, turned out to be workable in the sphere of living beings (the biosphere). The thermodynamic law dictates its limitations and prohibitions where no one expected it. It was able to answer many questions of the biosphere formulated about 100 years ago and lying in the field of human vision, plant photosynthesis and photomovement of protozoa. The key to understanding all these processes was the entropy of the absorbed electromagnetic radiation (EMR), and the main characteristic was the efficiency of converting EMR energy into free energy. The condition for the stable functioning of the system is a linear increase of entropy generation rate in the system with an increase in energy absorption or its weak deviation from the linear dependence. Under these conditions, the efficiency increases according to the logarithmic law (the Weber-Fechner law). The most unexpected was the coincidence of the responses of the systems obeying the statistics of Bose-Einstein, Fermi - Dirac and Maxwell-Boltzmann. This means that the Weber-Fechner law is a thermodynamic law of very broad generality and significance. A linear increase of entropy generation rate can occur when the energy absorption of different types changes by 10 to 20 orders of magnitude, but with a higher absorption, the entropy generation rate begins to grow beyond linearly. This leads to a limited increase in efficiency and its subsequent decline. The difference between the biosphere and the noosphere is much smaller than between the living and inanimate world. The thermodynamic forecast for the fate of our civilization gives the same result as the work of the Club of Rome. This requires the most careful discussion, since thermodynamics (unlike the Club of Rome) allows for a positive outcome in the sense of preserving our civilization with a reasonable behavioral reaction of the population.

**Key words:** efficiency of energy conversion, Weber-Fechner law, limits of efficiency growth and all effects.

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПРОЯВЛЕНИИ РИТМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СИЛЬНО РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ

Беловолова Л.В., Беловолов М.М., Глушков М.В.

Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН  
ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: est123321@mail.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** 0,2 М растворы хлористого натрия, хлористого калия и ацетона одновременно разводили водой со встряхиванием до пятнадцатого сотенного разведения (15С – стократное разведение, произведенное 15 раз). В качестве контроля использовали исходную очищенную воду без обработки, а также воду, неоднократно перелитую из пробирки в пробирку перед измерением (динамизированная вода). Кроме того, исследовали воду, разведенную водой до пятнадцатого сотенного разведения ( $\text{H}_2\text{O}$ -15С). Исследованы флуоресценция ( $\lambda_{\text{ex}} = 260$  нм), рэлеевское светорассеяние ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{obs.}} = 260$  нм), электропроводность, редокс-потенциал и его скачок после двух минут облучения ультрафиолетом (УФ) этих образцов. Методом фликкер-шумовой спектроскопии показано, что наиболее резкие изменения состояния водных систем происходят с близким набором частот миллигерцового диапазона, но с разной амплитудой и соотношением вклада отдельных частот. После приготовления и по крайней мере, в течение последующих двух суток системы NaCl-15С, KCl-15С и  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ -15С достоверно отличаются друг от друга и от воды по значениям редокс-потенциала и скачку редокс-потенциала в результате УФ облучения. УФ облучение приводит к различному изменению электропроводности для этих систем со временем. Наблюдаемые эффекты отражают динамику активных форм кислорода, сформировавшуюся во время разведения и встряхивания каждой из водных систем,

**Ключевые слова:** высокоразбавленные водные системы, активные формы кислорода и воды (АФК), редокс-потенциал, электропроводность, УФ облучение.

Известно, что некоторое увеличение содержания АФК, относительно равновесных значений, оказывает на биологические системы нормализующее, стимулирующее и протекторное влияние (см., например, [1-3]). Это влияние может передаваться через воду и может быть зарегистрировано чувствительными методами анализа. Измененное состояние воды сохраняется в течение десятков часов [1-5], сопровождается колебаниями интенсивности хемилюминесценции [4], УФ флуоресценции и рэлеевского светорассеяния [5]. О долговременных колебаниях интенсивности хемилюминесцентного сигнала «чистой» воды и разбавленных водных растворов после различных воздействий, влияющих на систему АФК, сообщается в работах [1,4,6-8]. Ритмические проявления АФК можно усилить, добавив в воду малые количества перекиси водорода и бикарбоната натрия. Тогда в закрытой пробирке в течение многих месяцев наблюдаются колебания интенсивности свечения, сопровождающего образование и распад АФК [9]. Аналогичные явления возникают при малых добавках в воду ацетона и флуоресцентного зонда АНС [10]. Процесс идет через периодическое накопление и разрушение перекисных соединений с возникновением излучений света и изменений pH водной среды.

Изучение процессов с участием АФК в воде требует применения высокочувствительных методов наблюдений из-за высокой активности и малых концентраций АФК в стационарных условиях.

В работах [5,11] выявлены условия, отражающие состояние системы АФК в чистой воде в момент измерения. Изменение окислительно-восстановительного (редокс-) потенциала под влиянием УФ облучения, названное скачком потенциала, дает информацию о текущем состоянии системы АФК в воде, поскольку приводит к возбуждению и разложению молекул воды и газов в зависимости от текущего состояния системы АФК и воды [5]. Величина и знак скачка редокс-потенциала измерялись в одинаковых условиях для независимых образцов воды в течение трех суток. Было обнаружено, что в течение нескольких часов значения величин скачка потенциала на разных образцах воды могут хорошо воспроизводиться. Однако в некоторые моменты времени наблюдаются резкие изменения величины скачка потенциала, в том числе и со сменой знака влияния УФ-облучения на редокс-потенциал системы. Эти наблюдения позволили зарегистрировать самопроизвольные изменения системы АФК в чистой воде с течением времени. Они показали, что есть разные режимы состояния системы АФК, поэтому УФ облучение способно приводить к различным результатам. В течение нескольких часов результаты могут хорошо воспроизводиться, но есть моменты резких переходов между различными состояниями. Оказалось, что система АФК чрезвычайно чувствительна к наличию малых примесей, облучению и механическим воздействиям. Особенно сильно неравновесность системы проявляется вблизи условий перехода между состояниями. Эти наблюдения позволили предположить, что при высоких степенях разбавления со встряхиванием водных образцов (когда даже одна молекула исходно растворенного в воде вещества может отсутствовать) система АФК может проявиться и определить состояние водной системы. Данная работа посвящена исследованию этой гипотезы.

Рассмотрены особенности высоко разбавленных водных систем на основе одновременно приготовленных образцов 15-го сотенного разведения исходно 0,2 М растворов хлористого натрия, хлористого калия и ацетона.

Исследованы флуоресценция ( $\lambda_{\text{ex}} = 260$  нм), рэлеевское светорассеяние ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{obs.}} = 260$  нм), электропроводность, редокс-потенциал и его скачок при УФ облучении этих образцов. В качестве контроля использовали исходную очищенную воду без обработки, а также чистую воду, которую разбавляли со встряхиванием чистой водой так же, как это было сделано для вышеуказанных образцов 15С-разведения. Кроме того, при измерениях флуктуаций светорассеяния использовали исходную воду, которую 8 раз перелили из пробирки в пробирку (такую воду называли динамизированной).

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

**Приготовление образцов.** В работе использовали дистиллированную воду, дополнительно очищенную на угольном фильтре В-300 и на многоступенчатой водоочистной установке Аквамед-1 ДВС/М1 (Россия). Исходная электропроводность очищенной воды не превышала 0,2 мкСм/см. Для приготовления NaCl-15С, KCl-15С и C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-15С использовали три одинаковые стеклянные пробирки объемом 20 мл и три одинаковых бюкса. Для разведения в 100 раз отбирали автоматической пипеткой по 20 мкл каждого раствора и переносили в соответствующую пробирку, куда добавляли по 2 мл очищенной воды, закрывали притертыми пробками и встряхивали все три пробирки в одной руке в течение 1 минуты. После этого содержимое каждой пробирки выливали в соответствующий бюкс, из которого затем вновь отбирали 20 мкл для последующего разведения, а остаток образца выливали. Для получения пятнадцатого сотенного разведения эту процедуру повторяли 15 раз. Предпоследнее разведение готовили в большем объеме для того, чтобы провести необходимые измерения характеристик. Редокс-потенциал ( $E_{\text{ox/red}}$ ) относительно хлорсеребряного электрода ЭВЛ-1М3.1 измеряли с помощью анализатора жидкости Эксперт-001 (Эконикс-эксперт) с платиновым электродом ЭПВ-1СР. Поскольку для чистой воды и сильно разбавленных водных систем  $E_{\text{ox/red}}$  устанавливается медленно, все образцы одинаково перемешивали магнитной мешалкой до установления постоянных значений  $E_{\text{ox/red}}$  (~10 мин после помещения образца в измерительную ячейку). После чего открывали заслонку осветителя ОИ-18А с ртутно-кварцевой лампой ДРК-120 и облучали образец (не засвечивая электродов) в кварцевом сосуде через выделенное окошко в течение 2 мин, не прерывая записи  $E_{\text{ox/red}}$ . Разницу между значением  $E_{\text{ox/red}}$  в момент начала и конца облучения ( $\Delta E_{\text{ox/red}}$ ) условно назвали «скачком потенциала». Все условия опыта поддерживали одинаковыми для всех образцов. Ошибки измерения  $E_{\text{ox/red}}$  и  $\Delta E_{\text{ox/red}}$  определяли при записи кинетики установления постоянных значений по отклонению этих величин от средних значений. Электропроводность образцов измеряли кондуктометрами фирмы Hanna instruments: UPW HI98309 для особо чистой воды в диапазоне 0–2 мкСм/см с погрешностью 0,1 мкСм/см и DIST WP3 для диапазона 2–1999 мкСм/см с погрешностью 1 мкСм/см. Ошибки измерения электропроводности определяли по четырем независимым образцам, разлитым из одного маточного объема. Температуру образцов, хранящихся при одной температуре ( $23 \pm 0,5$ )°С, контролировали посредством датчика ДКТП-02.4. Спектры флуоресценции и светорассеяния записывали под прямым углом к возбуждающему свету с помощью модифицированного спектрально-измерительного комплекса СДЛ-2 (ЛОМО, Россия) в режиме счета фотонов.

Числовые ряды кинетических зависимостей рэлеевского светорассеяния водных систем исследовали методами фликкер-шумовой спектроскопии (ФШС) [12]. Сигналы  $V(t)$  фиксируются через каждый временной промежуток  $\Delta t = T/N$  ( $T$  – временной интервал, на котором записывается сигнал,  $N$  – число членов временного ряда), который определяет частоту дискретизации  $f_d = 1/\Delta t$ . Проведен анализ как исходных кинетических кривых, так и их отображений по факторам нестационарности (ФН), показывающим моменты скачкообразных перестроек (всплесков интенсивности светорассеяния) рассматриваемых систем.

Исследуются косинус-преобразование автокорреляционной функции –  $S(f)$  ( $f$  – частота):

$$S(f) = 2 \int_0^T \langle V(t)V(t+\tau) \rangle_{T-\tau} \cos(2\pi f\tau) d\tau \quad (1)$$

и разностные моменты  $\Phi^{(2)}(\tau)$  2-го порядка:

$$\Phi^{(2)}(\tau) = \langle [V(t) - V(t+\tau)]^2 \rangle_{T-\tau}, \quad (2)$$

где  $\tau$  – параметр временной задержки.

ФН отражают динамику изменений функций  $\Phi^{(2)}(\tau)$  при последовательном смещении пробного интервала  $[t_k, t_k + \Delta T]$ , где  $k = 0, 1, 2, 3, \dots$  и  $t_k = k\Delta t$ , по всей длине  $T$  имеющегося экспериментального ряда данных ( $t_k + \Delta T \leq T$ ). Временные зависимости ФН рассчитываются на основе выражений:

$$C(t_k) = 2 \cdot \frac{Q_k - P_k}{Q_k + P_k} \cdot \frac{\Delta t}{\Delta T}, \quad (3)$$

$$\text{где } Q_k = \frac{1}{\alpha(\Delta T)^2} \int_0^{\alpha\Delta T} d\tau \int_{t_k}^{t_k+\Delta T} [V(t) - V(t+\tau)]^2 dt, \quad P_k = \frac{1}{\alpha(\Delta T)^2} \int_0^{\alpha\Delta T} d\tau \int_{t_k}^{t_k+\Delta T-\Delta t} [V(t) - V(t+\tau)]^2 dt.$$



Зависимости  $\Phi^{(2)}(\tau)$  рассчитываются для области изменения аргумента  $\tau [0, \alpha \Delta T]$ , где  $\alpha < 0.5$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для того, чтобы исследовать флуктуации рэлеевского светорассеяния образцы перед измерением переливали из пробирки в пробирку 8 раз, поскольку при такой обработке интенсивность флуктуаций светорассеяния была значительно выше, чем в необработанных образцах. Такие образцы называем динамизированными. Их выдерживание в кювете без движения в течение 1–3 часов обычно приводит к сильному уменьшению флуктуаций. На рисунке 1 представлены исходные кинетические зависимости светорассеяния при  $\lambda_{\text{ex.}} = \lambda_{\text{obs.}} = 260$  нм – (а) и аналогичные зависимости для ФН – (б). Оказалось, что для NaCl-15C, KCl-15C и C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-15C наблюдаются близкие частоты наиболее заметных перестроек водных систем, измеряемых по ФН (рис. 2).

Повторные записи светорассеяния образцов 15C-разведения, хранящихся после приготовления в закрытых сосудах, из которых отбирали пробы для анализа, выявили в каждом из них свои ритмы изменения интенсивности и относительного вклада проявленных частот. Например, для независимых образцов NaCl-15C, записанных с трехчасовым промежутком времени, проявлен (рис. 3) один и тот же набор главных резонансных частот ФН (3,2; 6,2; 9,5 и 12,7 мГц), но с течением времени меняется вклад разных компонент.

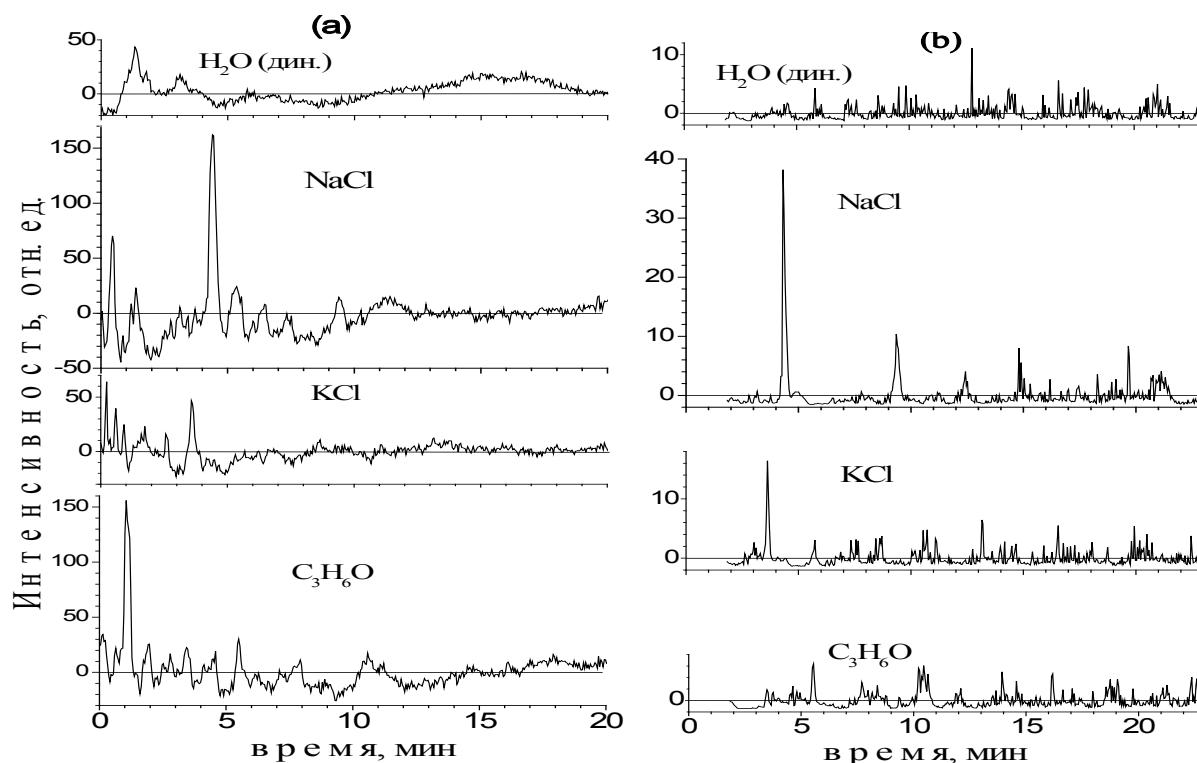


Рисунок 1. Кинетические зависимости рэлеевского светорассеяния 15C-систем (а) и их отображения по ФН (б)

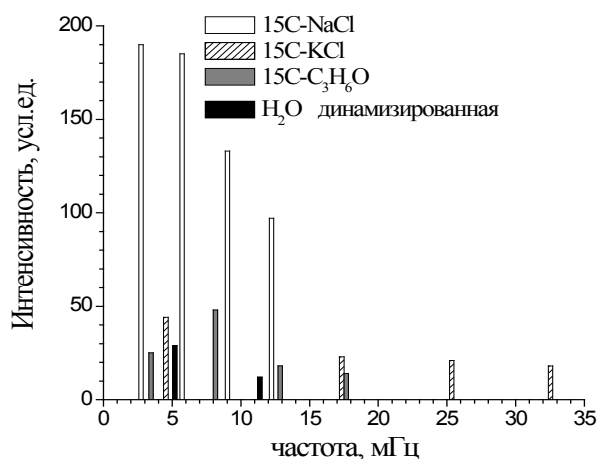


Рисунок 2. Частоты фликкер-шумов по ФН для систем 15C и воды

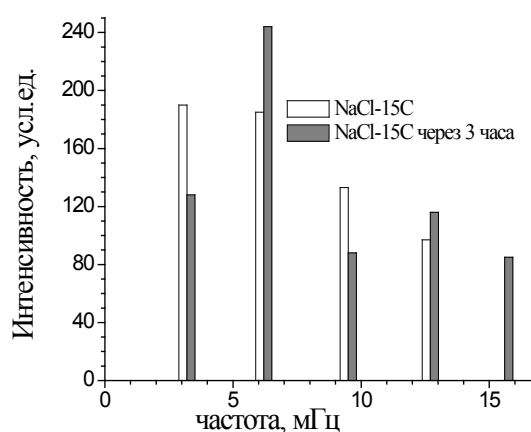
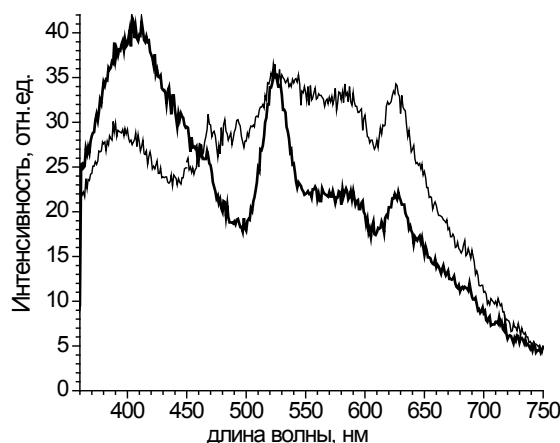


Рисунок 3. Частоты фликкер-шумов по ФН для NaCl-15C исходно (белые столбики) и через 3 часа



**Рисунок 4.** Пример типичных спектров люминесценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 260$  нм), наблюдаемых во время резких скачков интенсивности рэлеевского светорассеяния разбавленных водных сред

Таким образом, эксперимент показал, что в динамике рэлеевского светорассеяния каждой из высоко разбавленных водных систем (не содержащих, согласно расчетам, молекул исходного вещества, т.е. разбавленных выше предела Авогадро), реализуются близкие наборы частот наиболее резких перестроек. Однако их амплитуда и вклад различных компонент меняется со временем по-разному. Также в каждом из образцов проявлен свой ритм хаотических и упорядоченных составляющих сигнала.

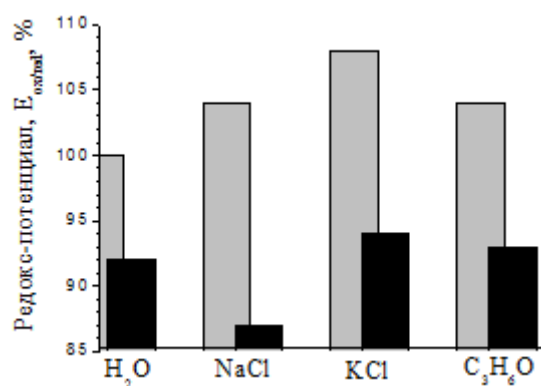
Обнаружено, что в моменты резких уменьшений интенсивности рэлеевского светорассеяния появляются спектры УФ флуоресценции, характерные для процесса распада перекиси водорода (реакция Фентона) [11]. В этих спектрах проявлены также полосы, сопровождающие реакции синглетного кислорода в газовых пузырьках (рис. 4).

Обнаружено, что сразу после приготовления и по крайней мере, в течение последующих двух суток системы NaCl-15C, KCl-15C и  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ -15C достоверно отличаются друг от друга и от исходной воды по значениям электропроводности и  $E_{\text{ox/red}}$ , а также по изменениям этих параметров под действием УФ облучения. В таблице 1 приведены значения  $E_{\text{ox/red}}$  и  $\Delta E_{\text{ox/red}}$  после УФ облучения для исходной воды и NaCl-15C, KCl-15C и  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ -15C. На рисунке 4 данные для  $E_{\text{ox/red}}$  представлены в графическом виде относительно потенциала исходной воды, который принят за 100%.

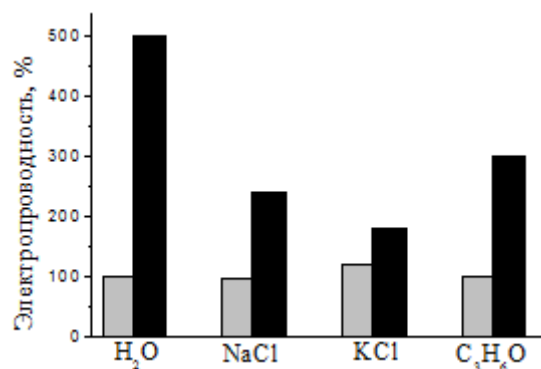
Из рисунка 5 можно видеть, что при одинаковом химическом составе водных систем, приготовленных одновременно и разбавленных одинаково выше предела Авогадро, величины  $E_{\text{ox/red}}$  до УФ облучения и после него заметно отличаются, что говорит о том, что состояние этих водных систем различно. Оно определяется системой АФК, которая в каждой из этих систем колеблется в собственном ритме.

**Таблица 1.** Значения  $E_{\text{ox/red}}$  и  $\Delta E_{\text{ox/red}}$  для исходной воды и NaCl-15C, KCl-15C и  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ -15C

Образец	$E_{\text{ox/red}}$ , мВ	$\Delta E_{\text{ox/red}}$ , мВ
Вода	$288 \pm 1$	$-26 \pm 1$
NaCl-15C	$303 \pm 2$	$-52 \pm 2$
KCl-15C	$314 \pm 1$	$-30 \pm 1$
Ацетон-15C	$302 \pm 2$	$-32 \pm 2$



**Рисунок 5.** Значения  $E_{\text{ox/red}}$  для исходной воды и NaCl-15C, KCl-15C и  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ -15C до УФ облучения (серые столбики), после УФ облучения (черные столбики). За 100% принято значение  $E_{\text{ox/red}}$  исходной воды



**Рисунок 6.** Электропроводность исходной воды и NaCl-15C, KCl-15C и C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-15C исходно (серые столбики) и сразу после УФ-облучения (черные столбики)

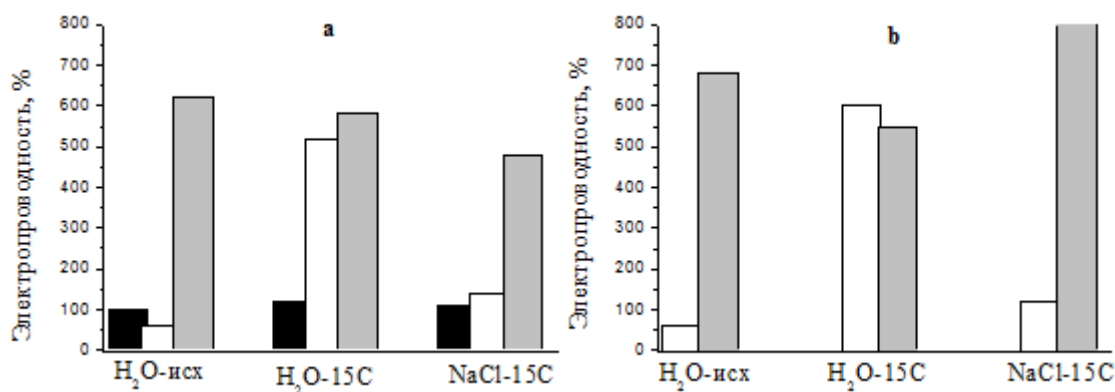
На рисунке 6 показана электропроводность этих систем исходно и сразу после УФ облучения. Электропроводность исходной воды до УФ облучения принята за 100%. Относительная ошибка измерения электропроводности образцов не превышала  $\pm 5\%$ . Можно видеть, что электропроводность всех образцов исходно мало отличалась от электропроводности исходной воды, но УФ облучение действовало на эти системы по-разному. Это говорит о том, что водные системы 15C-разведения различаются по способности генерировать электрические заряды при УФ облучении.

Изменения электропроводности облученной и необлученной исходной воды, а также двух систем пятнадцатого сотенного разведения (NaCl-15C, H<sub>2</sub>O-15C) в течение двух суток после УФ обработки приведены на рисунке 7. В данном эксперименте одновременно готовились со встряхиванием два образца 15C-разведения (хлористого натрия и чистой воды, разводимой водой). Здесь за 100% принята проводимость исходной необработанной воды. Половину образцов сразу после приготовления подвергали УФ облучению.

Можно видеть, что встряхивание и разведение воды водой сильно изменяет динамику ее электропроводности. Образцы исходной воды и H<sub>2</sub>O-15C через сутки различаются довольно заметно, как для необлученных, так и облученных образцов. Через двое суток измененное состояние электропроводности всех образцов относительно исходного образца сохраняется. Для образца NaCl-15C значительные изменения электропроводности после облучения происходят на вторые сутки после облучения.

## ВЫВОДЫ

Приведенные результаты показывают, что постепенное разведение со встряхиванием исходно разных химических растворов приводит к различному состоянию системы АФК, всегда присутствующей в водных средах. Каждая из высоко разбавленных водных систем на основе разных химических растворов характеризуется определенными значениями редокс-потенциала, электропроводности и их отклика на УФ облучение, а также долговременной динамикой после приготовления. Особенности динамики изменения рэлеевского светорассеяния со временем, регистрируемые по ФН, позволяют заключить, что при высоких разведениях исходно разных химических систем реализуются близкие частоты наиболее резких перестроек водной матрицы, хотя и с разными амплитудами и относительным содержанием отдельных компонент фликкер-шумов. Опыт показал, что в каждой из высоко разбавленных водных систем есть свой ритм проявления упорядоченных и



**Рисунок 7.** Значения электропроводности образцов 15C-разведения сразу после приготовления (черные столбики). Белые и серые столбики показывают изменение электропроводности необлученных и облученных образцов соответственно через сутки после приготовления (а). Значения электропроводности через двое суток для необлученных (белые столбики) и облученных (серые столбики) образцов (б)

хаотических процессов, который требует дополнительных исследований. Поскольку методика эксперимента не позволяет исследовать светорассеяние нескольких образцов одновременно, мы можем только констатировать, что в момент записи светорассеяния каждого из образцов мы случайным образом выявляем фазу внутреннего процесса, в котором колебания и хаос могут то нарастать, то уменьшаться. Эти наблюдения делают бессмысленными усреднения наблюдаемых характеристик в разных опытах, проведенных в разное время.

Заметные изменения редокс-потенциала и электропроводности высокоразбавленных водных систем по отношению к исходной воде позволяют предполагать, что процедура постепенного разведения и встряхивания влияет на концентрацию (и/или подвижность) электрически заряженных соединений в системе. Поскольку один из видов АФК – супероксидный анион-радикал обладает отрицательным зарядом и сильно взаимодействует с протонами водной матрицы, можно полагать, что в исходно разных химических системах в процессе приготовления 15С-разведения реализуются разные условия появления и стабилизации электрического заряда. Конкретные механизмы этих процессов требуют дополнительных исследований.

#### Список литературы / References:

1. Voeikov V.L. *Reactive Oxygen Species, Water, Photons and Life*. Rivista di Biologia, Biology Forum, 2001, vol. 94, pp.193-214
2. Belovolova L.V. *Reactive Oxygen Species in Aqueous Media*. (A Review) Optics and Spectroscopy, 2020, vol. 128, pp. 932-951. DOI: 10.1134/S0030400X20070036.
3. Ставровская И.Г., Сирота Т.В., Саакян И.Р., Кондрашова М.Н. Оптимизация энергозависимых процессов в митохондриях печени и мозга крыс после вдыхания отрицательных аэроионов. *Биофизика*, 1998, т. 43, вып. 5, с.766-771. [Stavrovskaya I.G., Sirota T.V., Sahakyan I.R., Kondrashova M.N. Optimization of volatile processes in the mitochondria of the liver and brain of rats after inhalation of negative air ions. *Biophys.*, 1998, vol. 43, no. 5, pp. 766-771. (In Russ.)]
4. Gudkov S.V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A.V., Yaguzhinsky L.S., Zakharov S.D. Oxygen-Dependent Auto-Oscillations of Water Luminescence Triggered by the 1264 nm Radiation. *J. Chem. Phys. B*, 2011, vol. 115, pp. 7693-7698. [www.biophys.ru/archive/h2o-00022.pdf](http://www.biophys.ru/archive/h2o-00022.pdf)
5. Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A. Influence of Dissolved Gases on Highly Diluted Aqueous Media. *Biophys.*, 2014, vol. 59, no. 4, pp.524-530. DOI: 10.1134/S0006350914040046.
6. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода под действием тепла при восстановлении растворенного кислорода воздуха. *ДАН*, 2001, т. 381, № 2, с. 262-264. [Bruskov V.I., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. Formation of reactive oxygen species under the action of heat during the reduction of dissolved oxygen in the air. *Dokl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 381, no. 2, pp. 262-264. (In Russ.)]
7. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла. *ДАН*, 2002, т. 384, № 6, с. 821-824. [Bruskov V.I., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. Formation of reactive oxygen species in water under the action of heat. *Dokl. Acad. Sci.*, 2002, vol. 384, no. 6, pp. 821-824. (In Russ.)]
8. Воейков В.Л. Благотворная роль активных форм кислорода. "МИС-РТ"-2001г. *Сборник № 24-1, Научно-исследовательский центр «ИКАР»*. [Voeikov V.L. The beneficial role of reactive oxygen species "MIS-RT"-2001. *Collection No. 24-1, Research Center "IKAR"*. (In Russ.)]
9. До Минь Ха, Мухитова О.Г., Виленская Н.Д., Малышенко С.И., Воейков В.Л. Активированные перекисью водорода водные растворы бикарбонатов – долговременные источники низкоинтенсивного излучения, реагирующие на слабые и сверхслабые воздействия. *Биомед. Радиоэлектроника*, 2011 т. 2, с. 28-38. [Do Min Ha, Mukhitova O.G., Vilenskaya N.D., Malyshechenko S.I., Voeikov V.L. Hydrogen peroxide activated aqueous solutions of bicarbonates are long-term sources of low-intensity radiation that respond to weak and ultra-weak effects. *Biomed. Radioelectronics*, 2011, vol. 2, pp. 28-38. (In Russ.)]
10. Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A. Effect of Acetone and the Probe 1-Anilino-8-Naphthalenesulfonate on Water as Estimated by Fluorescence in the UV Region. *Biophys.*, 2011, vol. 56, no. 2, pp. 181-187. DOI: 10.1134/S0006350911020059.
11. Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A., Babintsev V.A., Golovanov V.I. Ultraviolet fluorescence of water and highly diluted aqueous media. *Phys. Wave Phenom.*, 2009, vol. 17, no. 1, pp. 21-31. DOI: 10.3103/S1541308X0901004X
12. Тимашев С.Ф. *Фликкер-шумовая спектроскопия. Информация в хаотических сигналах*. М.: Физматлит, 2007. [Timashev S.F. *Flicker noise spectroscopy. Information in chaotic signals*. Moscow: Fizmatlit, 2007. (In Russ.)]

**ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE MANIFESTATION OF RHYTHMIC PROCESSES IN STRONGLY DILUTED WATER SYSTEMS.****Belovolova L.V., Belovolov M.M., Glushkov M.V.**

A.M. Prokhorov General Physics Institute RAS

Vavilova str. 38, Moscow, 119991, Russia; e-mail: est123321@mail.ru

**Abstract.** 0.2 M solutions of sodium chloride, potassium chloride, and acetone were simultaneously diluted by water with shaking to a dilution of 15C – a hundredfold dilution made 15 times. As a control, we used the initial purified water without any treatment, as well as water repeatedly poured from a test tube into a test tube before measurement (dynamized water). In addition, we investigated water diluted with water up to the fifteenth centesimal dilution (H<sub>2</sub>O-15C). Fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm), Rayleigh light scattering ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{obs.}} = 260$  nm), electrical conductivity, redox potential and its jump after two minutes of ultraviolet (UV) irradiation of these samples were studied. It was shown by the method of flicker noise spectroscopy that the most abrupt changes in the state of water systems occur with a similar set of frequencies in the millihertz range, but with different amplitudes and ratios of the contribution of individual frequencies. After preparation and at least for the next two days, the systems NaCl-15C, KCl-15C, and C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-15C significantly differ from each other and from water in terms of the redox potential values and the redox potential jump as a result of UV irradiation. UV irradiation results in different changes in conductivity for these systems over time. The observed effects reflect the dynamics of reactive oxygen species formed during the dilution and shaking of each of the aqueous systems,

**Key words:** *highly diluted aqueous systems, reactive oxygen and water forms (ROS), redox potential, electrical conductivity, UV irradiation.*

# МЕТОД ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА МЕТОДУ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТОКОФЕРОЛЬНОГО СОСТАВА СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ

Истомин Д.С.<sup>1</sup>, Демури Я.Н.<sup>1,2</sup>, Золотавина М.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru

<sup>2</sup> Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта»

ул. Филатова, 17, г. Краснодар, 350038, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2021

**Аннотация.** В работе рассматриваются способы выделения токоферолов из семян подсолнечника *Helianthus annuus* L. и разделения их на разные гомологичные формы. Целью данной работы является сравнение методов выделения и разделения токоферолов семян подсолнечника для анализа их состава гомологичных форм. Методы позволяют оценить состав токоферолов в сортах и гибридах подсолнечника. Выбор способа оценки токоферолов особенно важен для селекционеров сельскохозяйственных культур и зависит от лабораторного оборудования. В работе рассматриваются метод тонкослойной хроматографии на силикагеле и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Данные способы являются одними из лучших в своей группе методов, но подходят не для всех областей исследования. Для определения токоферолов в области биохимии, пищевой и аналитической химии, в которых требуется точное измерение концентрации и состава гомологов токоферолов, наиболее полезной будет ВЭЖХ. Этот метод совмещает в себе высокие точность и чувствительность и способен производить анализ быстрее других методов в своей группе. При помощи тонкослойной хроматографии невозможно производить количественное определение вещества, либо возможно производить их с очень высокой погрешностью. Тем не менее этот метод все еще является достаточно чувствительным для точного определения разных соединений. При необходимости возможно определение гомологов и изомеров искомым соединений, по своим химическим свойствам находящимся близко к искомым соединениям. Эти особенности метода позволяют использовать его для определения состава токоферолов в малом диапазоне наук. Особенно полезен этот метод будет в селекции и генетике масличных культур, поскольку он способен предоставить исчерпывающую информацию о биохимических свойствах исследуемых гибридов и сортов не только подсолнечника, но и других масличных растений.

**Ключевые слова:** витамин Е, гомологи токоферолов, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

## ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько лет интерес к маслам, полученным методом холодного отжима, вырос. Масло, полученное таким образом, используют в сфере пищевого производства, а также в косметической индустрии и фармацевтической промышленности. Такой интерес обусловлен высоким содержанием природных антиоксидантов, которые обладают высокими антиокислительными свойствами. Среди этих соединений наибольшей активностью обладают токоферолы (1).

Токоферолы представляют собой соединения, входящие в состав витаминов группы Е и являются основной группой соединений в этом витамине. Они относятся к производным хромана и являются гомологами по отношению друг к другу. Разница в их строении заключается в разном положении и количестве метильных групп при фенольном кольце молекулы. Альфа-токоферол отличается от других форм наличием трех метильных групп (5,7,8-триметилтокол). Бета- и гамма-токоферол отличаются от других наличием двух метильных групп вокруг фенольного кольца (5,8-диметилтокол и 7,8-диметилтокол соответственно), тем самым являясь изомерами по отношению друг к другу. Дельта-токоферол имеет всего одну метильную группу (8-метилтокол) (2).

Разнообразие типов токоферолов в подсолнечнике обеспечивается мутациями генов *tpH1* и *tpH2*. Данные гены не являются сцепленными и являются неаллельными по отношению друг к другу, что в результате их межгенного взаимодействия приводит к нарушениям в синтезе гомологов токоферола. Такое нарушение провоцирует качественные и количественные изменения в токоферольном составе подсолнечника (3). Все фракции токоферола, относительно других природных антиокислительных соединений, обладают высокой константой взаимодействия с перекисными радикалами. Этот факт диктует необходимость выведения новых сортов и гибридов подсолнечника с высоким уровнем токоферолов, что вызывает необходимость использования метода разделения разных фракций токоферола при анализировании их состава в семенах гибридов подсолнечника (4).

В качестве одного из методов разделения токоферолов может выступать метод тонкослойной хроматографии, выполненный на силикагелевой пластинке. Данный метод отличается от других своей простотой



и надежностью. Он не требует сложного оборудования и время его проведения короче, чем многие другие методы, однако этот способ определения токоферольного состава не позволяет получать точные количественные данные содержания токоферола, но его можно использовать в качестве экстренного метода, способного быстро и с высокой точностью показать какие гомологи токоферола содержатся в образце.

Другим методом разделения гомологов токоферола на разные фракции может выступать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Сейчас метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позиционирует себя как один из лидирующих методов в определении соединений, в том числе и токоферолов. Такое место среди других методов он обеспечил себе благодаря возможности точного определения не только качественного, но и количественного состава. Метод менее трудоемкий и более быстрый в сравнении с другими традиционными методами определения соединений химического и физического принципов. Среди всех модификаций наиболее удобным и оправданным считается нормально-фазовый вариант ВЭЖХ. При помощи этой вариации данного метода можно различить все гомологи токоферола без потери чувствительности и скорости определения (5).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

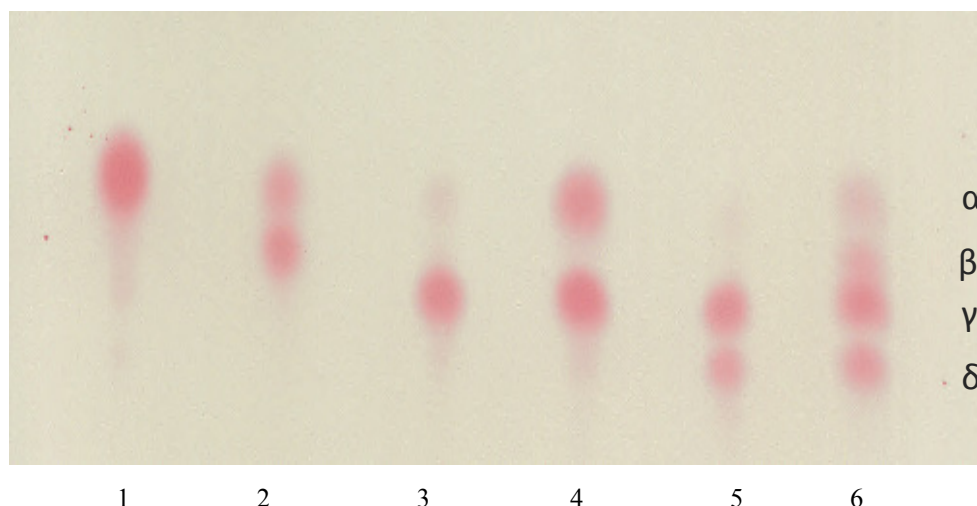
Материалом исследования служили вызревшие семена разных линий гибридов подсолнечника *Helianthus annuus* L. Линии гибридов обладают мутациями в генах *tph1* и *tph2* с ярко выраженной разностью экспрессии. Анализ методом тонкослойной хроматографии проводили на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта».

Методика проведения тонкослойной хроматографии заключается в следующем. В тонкослойной хроматографии для экстракции токоферолов семена подсолнечника подвергают дроблению с аскорбиновой кислотой в пробирке до состояния мелкого порошка, после чего в полученную порошковую смесь добавляют 0,5 мл 2М гидроксида калия. Полученный раствор ставят на водяную баню при 80 °С на 20 минут. По истечению времени в полученный раствор добавляют 0,5 мл дистиллированной воды и 1 мл гексана, после чего встряхивают пробирку с образцом и ожидают 5–7 минут. В это время происходит разделения фаз и полный переход токоферолов в гексан. Когда произойдет разделение фаз, отбирают гексановый слой, в котором растворены токоферолы, из пробирки в лунки планшета для биохимических исследований. После ожидают испарения гексана. В результате на дне лунок не останется тонкий слой соединений, включающий токоферолы.

Далее наносят на силикагелевые пластинки раствор токоферолов. Для этого в лунку с оставшимся на дне количеством токоферолов вносим 40 мкл гексана и при помощи механического аппликатора Sorbfil с нагревательным устройством УСП-2 и микрошприцем МШ-10Н наносим раствор токоферолов на силикагелевые пластинки размером 10×10 см. Нанесение происходит на ровной линии, параллельной нижнему краю пластинки. Расстояние между образцами рекомендовано брать не менее 5 мм. После нанесения образцов на силикагелевые пластинки их помещают в хроматографическую камеру по размеру пластинки. В качестве подвижной фазы преждевременно в камеру вносят 4 мл гексана и 1 мл диэтилового эфира. Подвижную фазу с пластинкой накрывают герметичной крышкой. После прохождения подвижной фазы 6 см по пластинке, пластинку изымают из камеры, сушат и производят окраску соединений токоферола.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы было проведен анализ токоферолов при помощи метода тонкослойной хроматографии. Пример результата разделения разных фракций токоферолов на силикагелевой пластинке изображен на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Состав токоферолов семян различных генотипов подсолнечника: 1 – нормальный; 2 – *tph1*; 3 – *tph2* max; 4 – *tph2* min; 5 – *tph1tph2* max; 6 – *tph1tph2* min

На рисунке отмечалось разделение токоферолов на все 4 фракции с четким преобладанием у разных мутаций своих доминирующих фракций токоферола. На пластинке под номером один изображен состав токоферолов у растений с нормальным генотипом без мутаций. У таких растений наблюдается наличие только альфа-токоферола. А у растений со слабой экспрессией мутантных генов *tph1* и *tph2*, состав токоферолов которых обозначен шестой позицией, наблюдаются все 4 формы токоферолов.

Противоположно методу тонкослойной хроматографии выступает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В исследованиях Ещенко и соавт. (2) получены результаты исследования состава токоферолов методами нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод нормально-фазовой ВЭЖХ проводится при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа. Данный метод отличается наличием полярной неподвижной фазы (силикагель) и неполярной подвижной фазы (гексан). В данном методе с увеличением полярности веществ, проходящих через колонку, растет их удержание. При изменении элюирующей силы подвижной фазы происходит разделение соединений в анализируемом растворе. Элюирующая сила зависит от силы взаимодействия компонентов подвижной фазы и поверхности неподвижной фазы.

Данные, полученные исследователями, показывают высокую чувствительность метода, что подтверждает способность определять как качественный состав токоферолов, так и количественные показатели фракций. Однако данный метод не дает четкого разделения гамма-токоферола и бета-токоферола, поскольку они являются изомерами друг для друга.

Результаты показывают, что метод тонкослойной хроматографии может быть удобнее метода ВЭЖХ в области генетики и селекции. Поскольку на пластинке видно все формы токоферола можно судить о наличии и уровне экспрессии мутантных аллелей *tph1* и *tph2* в генотипах разных гибридов подсолнечника. Такие данные могут позволить делать предположения о перспективе выведения новых сортов подсолнечника из разных линий экспериментальных гибридов для получения высококачественного масла.

Помимо этого, метод тонкослойной хроматографии в отличие от метода ВЭЖХ не требует сложного оборудования и сложных дорогих реактивов, что будет полезно для небольших частных селекционных компаний. Время анализа при использовании метода тонкослойной хроматографии, начиная от подготовки биоматериала и заканчивая высушиванием силикагелевых пластинок, занимает около 40 минут при использовании ручного метода нанесения экстракта токоферолов на силикагелевую пластинку, что обеспечивает быстрое получение результатов.

Кроме всего перечисленного, еще одним преимуществом метода тонкослойной хроматографии состоит в том, что им можно анализировать и другие части растений. Метод является универсальным и при помощи него можно рассматривать содержание разных гомологов токоферола в пыльце, стеблях, листьях и молодых побегах, если такая необходимость возникает у исследователей. Данный метод можно применять и к другим видам растений, что обеспечивает широкий диапазон исследований в разных направлениях селекции масличных и других культур.

Таким образом способ разделения изомеров токоферола хроматографическим методом на силикагелевой пластинке способен давать информацию о биохимических свойствах гибридов подсолнечника, его генетических особенностях, а также об окислительных свойствах масел в кратчайшее время, что позволяет контролировать токоферольный состав подсолнечника. Метод тонкослойной хроматографии способен выполнять те же функции, что и метод ВЭЖХ, однако он быстрее, позволяет визуализировать информацию, не требует дорогостоящего оборудования и в целом более экономически более выгоден, что делает его более доступным для широкого круга исследователей и начинающих предпринимателей в области селекции растений.

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

1. Sionek B. Cold-pressed oils. *Annals of PZH*, 1997, vol. 48, no. 3, pp. 283-294. (In Poland)
2. Ещенко А.Ю., Зенкевич И.Г. Определение токоферолов и токотриенолов в растительных маслах и некоторые особенности их состава. *Вестник СПбГУ*, 2006, сер. 4, № 4, с. 68-75. [Eshchenko A.Yu., Zenkevich I.G. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and some features of their composition. *Vestnik St. Petersburg State University*, 2006, ser. 4, no. 4, pp. 68-75. (In Russ.)]
3. Демури́н Я.Н., Ефименко С.Г., Перетягина Т.М. Линии подсолнечника с различной экспрессивностью мутаций состава токоферолов в семенах. *Масличные культуры*, 2006, № 2(135), с. 35-37. [Demurin Ya.N., Efimenko S.G., Peretyagina T.M. Sunflower lines with different expressiveness of mutations in the composition of tocopherols in seeds. *Maslichnye kultury*, 2006, no. 2(135), pp. 35-37. (In Russ.)]
4. Сизова Н.В. Снижение концентрации токоферолов в процессе окисления жирных масел. *Химия растительного сырья*, 2009, № 1, с. 117-119. [Sizova N.V. Decrease in the concentration of tocopherols in the process of oxidation of fatty oils. *Chemistry of vegetable raw materials*, 2009, no. 1, pp. 117-119. (In Russ.)]
5. Кищенко В.А., Левчук И.В., Ефименко С.Г. Определение токоферолов в маслах и маслосодержащих продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Масличные культуры*, 2007, № 2, с. 35-38. [Kishchenko V.A., Levchuk I.V., Efimenko S.G. Determination of tocopherols in oils and oily products by high performance liquid chromatography. *Maslichnye kultury*, 2007, no. 2, p. 35-38. (In Russ.)]

**DETERMINATION OF TOCOPHEROL COMPOSITION OF SUNFLOWER SEEDS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AS AN ALTERNATIVE TO HIGH-EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY IN GENETICS AND BREEDING**

**Istomin D.S.<sup>1</sup>, Demurin Ya.N.<sup>2</sup>, Zolotavina M.L.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Kuban State University

*Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru*

<sup>2</sup> Federal Scientific Center «All-Russian Research Institute of Oilseeds named after V.S. Pustovoyta»

*Filatova str., 17, Krasnodar, 350038, Russia*

**Abstract.** The paper discusses the methods for the isolation of tocopherols from *Helianthus annuus* L. sunflower seeds and their separation into different homologous forms. The aim of this work is to describe and compare the techniques for the isolation and separation of tocopherols of sunflower seeds into different homologous forms for the analysis of their composition. The techniques described in this work allow us to assess the composition of tocopherols in sunflower varieties and hybrids. The choice of method for evaluating tocopherols is especially important for crop breeders and depends on laboratory equipment and field of study. The paper considers the method of thin-layer chromatography on silica gel and the method of high performance liquid chromatography (HPLC). These methods are universal in their group of methods, but they are not suitable for all areas of research. For the determination of tocopherols in the fields of biochemistry, food and analytical chemistry, in which an accurate measurement of the concentration and composition of tocopherol homologues is required, HPLC will be most useful. This method combines high accuracy and sensitivity and is able to perform analysis faster than other methods in its group. Using the method of thin-layer chromatography, it is impossible to quantitatively determine a substance, or it is possible to produce them with a very high error. However, this method is still sensitive enough to accurately identify different compounds. If necessary, it is possible to determine the homologues and isomers of the desired compounds, which are close to the desired compounds by their chemical properties. These features of the method make it possible to use it to determine the composition of tocopherols in a small range of sciences. This method will be especially useful in the breeding and genetics of oilseeds, since it is able to provide comprehensive information on the biochemical properties of the studied hybrids and varieties of not only sunflower, but also other oilseeds.

**Key words:** vitamin E, homologues of tocopherol, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, HPLC.

## S-КРИВЫЕ И ЭНТРОПИЙНЫЕ УСЛОВИЯ СТАБИЛИЗАЦИИ СИСТЕМ

Кораблев Г.А.

Ижевская государственная сельскохозяйственная академия,  
ул. Студенческая, 11, г. Ижевск, 426069, РФ; e-mail: korablevga@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2021

**Аннотация.** Графики S-кривых характеризуют общую динамику изменения энтропийных составляющих в зависимости от основных параметров процесса. При этом, их сумма равна максимальной величине каждой из них в данном взаимодействии. Условием стационарного состояния системы является равенство или постоянная величина соотношения ее энтропии и негэнтропии (равновесная динамика). Такие закономерности имеют место во многих явлениях и в конформационных взаимодействиях в физико-химии, в природе, в технике и даже в экономике. Приведены примеры их функционального вклада. На основе российских данных показана возможность объективного анализа хода регионального сценария коронавируса.

**Ключевые слова:** S-кривые, их многоплановость, энтропия, негэнтропия, стабилизация систем, физико-химические закономерности, сценарий коронавируса.

### ВВЕДЕНИЕ

Графические характеристики функционального развития биологических систем в зависимости от времени процесса были известны [1] уже в начале двадцатого века: численность бактерий, созревание плода, рост растений и т.п. В них выделялись три последовательных этапа: постепенное нарастание, быстрый и активный рост, стабилизация процесса. Аналогичные кривые позднее были получены и для технических систем. Пример приведен на рисунке 1 – график изменения удельной прочности стали по годам.

В таких графиках по вертикальной оси откладывается одна из основных характеристик, например, скорость, объем продукции или мощность двигателя; а по горизонтальной оси – время процесса, или расходы на финансирование системы.

В соответствии с формой кривой они получили название S-кривые, иногда их называют «линии жизни», а применительно к техническим системам – кривые развития технических систем.

«Считается, что S-кривых закон, совершенно не отражает существа происходящих в системах изменений – он лишь демонстрирует их результат, выраженный в изменении главных показателей. Но в реальности он, не вдаваясь в технические тонкости, позволяет своевременно увидеть закономерности процесса и приближающиеся тенденции и сделать соответствующие выводы.

S-кривая, это индикатор который описывает состояние системы и способствует своевременному принятию решения по поиску новых направлений ее развития. Это позволяет сократить технологический разрыв, а в случае отсутствия решений, стимулировать их поиски» [2].

Таким образом S-кривые это номограммы изменения основных параметров процесса. И поэтому они нашли широкое применение, например, кривая Лоренца. В кривой Лоренца [3] дана пространственно-временная графическая зависимость параметра скорости ( $\theta$ ) от самой скорости ( $\beta$ ) – рисунок 2.

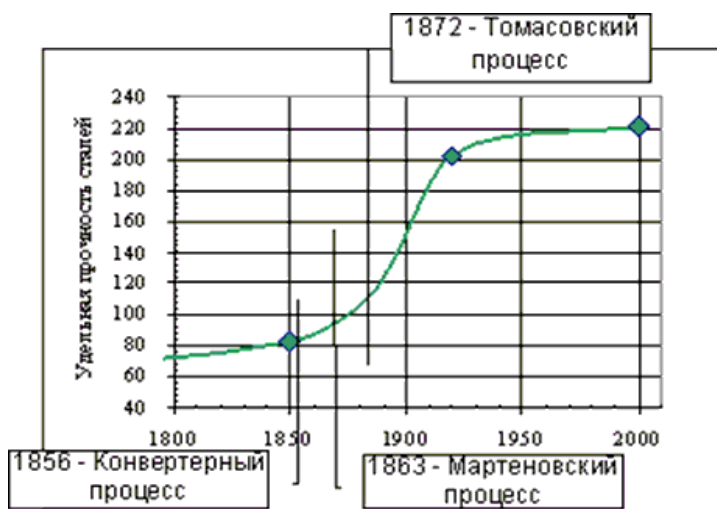


Рисунок 1. Зависимость удельной прочности сталей от времени

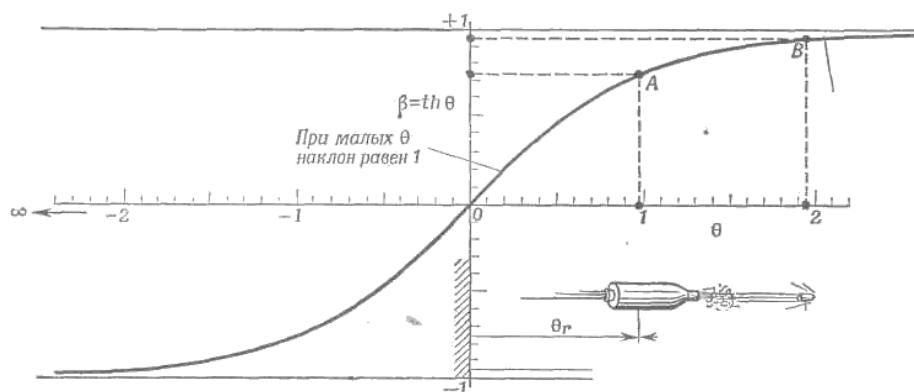


Рисунок 2. Связь между параметром скорости  $\theta$  и самой скоростью  $\beta = th\theta$

Аналогичные примеры таких номограмм в биофизике:

- Поверхностно-диффузионные процессы при карбонизации наноструктур;
- В кинетике ферментативных процессов;
- Зависимость биофизических критериев от их частотных характеристик;
- Флуктуации проводимости биомембран в зависимости от их частоты;
- Зависимость скорости электронного транспорта от времени диффузии ионов.

Как известно, понятие энтропии может являться критерием направленности термодинамических процессов. Поэтому в данном исследовании для объяснения уникальных свойств  $S$  – кривых используется это свойство с позиции изменения энтропии и негэнтропии. Кроме таких терминов, нередко особенно в математической статистике применяются: "производство энтропии", как производная энтропии по времени и "информация", как производная негэнтропии по времени.

## ИСХОДНЫЕ ДАННЫЕ

На основе анализа первого начала термодинамики было получено [4]:

«1. В системах, в которых взаимодействие идет по градиенту потенциала (положительная работа) результирующая потенциальная энергия, как и приведенная масса, находятся по принципу сложения обратных значений соответствующих величин подсистем. Это – корпускулярный процесс, теоретической концепцией которого может являться энтропия.

2. В системах, в которых взаимодействие идет против градиента потенциала (отрицательная работа) выполняется алгебраическое сложение их масс и также соответствующих энергий подсистем. Это – волновой процесс, теоретической концепцией которого может являться негэнтропия.

3. Резонансное стационарное состояние систем выполняется при условии равенства степеней их корпускулярных и волновых взаимодействий». [4] Так в термодинамике открытых систем продукция энтропии в стационарном состоянии полностью компенсируется потоком негэнтропии.

Для оценки структурных взаимодействий в простых и сложных системах классическая физика и квантовая механика широко используют кулоновские взаимодействия и их разновидности.

Согласно работе [5], электронно-конформационные процессы в биосистемах оцениваются через ориентационные, заряд-дипольные и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. А обменно-резонансный перенос энергии рассматривается только как частный случай конформации. Но по своей структурной основе многие биосистемы и кластерные образования – электронейтральные. Для них основное значение имеют не взаимодействия кулоновского типа, а процессы равновесного перетекания электронных плотностей за счёт перекрытия их волновых функций. Чем ближе значение этих параметров, тем легче идёт процесс стабилизации системы.

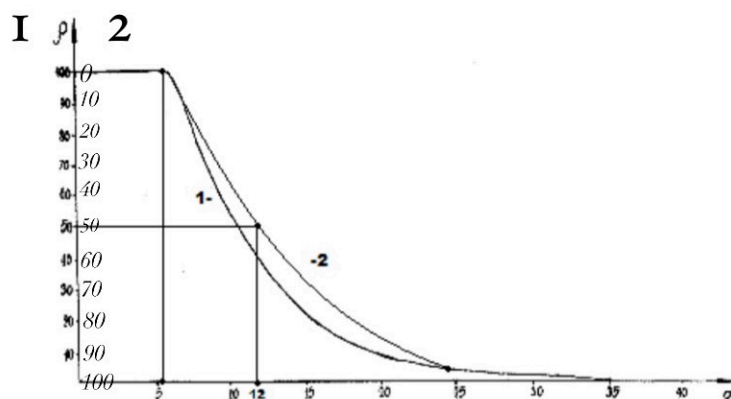
Так, Гейзенберг и Дирак [6], исходя из предположения о прямом перекрытии волновых функций, предложили обменный гамильтониан:

$$\bar{H} = -I_0 S_1 S_2,$$

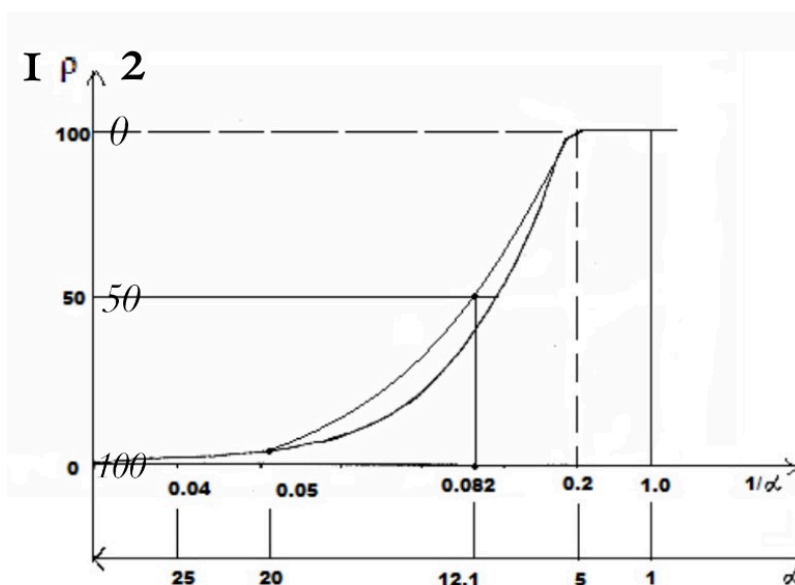
где  $\bar{H}$  – спиновый оператор изотропного обменного взаимодействия для пары атомов,  $I_0$  – постоянная обмена,  $S_1$  и  $S_2$  – интегралы перекрытия волновых функций.

Такие обменно-равновесные конформационные взаимодействия регулируют стабилизацию многих органических систем (кластеры, полипептидные цепи и т.п.). Поэтому, в данном подходе интегралы перекрытия волновых функций моделируются через величину относительной разности энергетических параметров взаимодействующих центров – коэффициент  $\alpha$  [7-8].

По многочисленным экспериментальным данным была получена номограмма зависимости степени структурных взаимодействий ( $\rho$ ) от коэффициента  $\alpha$ , единая для широкого класса структур (рис.3). Этот вид номограммы и ее зеркально-симметричный вариант (рис. 4) позволяют оценить степень и направление



**Рисунок 3.** Номограмма зависимости степени структурных взаимодействий ( $\rho$ ) от коэффициента  $\alpha$  (энтропийная кривая)



**Рисунок 4.** Номограмма зависимости степени структурных взаимодействий ( $\rho$ ) от коэффициента  $1/\alpha$  (негэнтропийная кривая)

структурных взаимодействий процессов фазообразования, изоморфизма и растворимости в многочисленных системах, в том числе в молекулярных [7,8].

Чем меньше величина  $\alpha$ , тем выше степень волновой составляющей взаимодействия в соответствии с рисунком 4 (негэнтропийная кривая – шкала №1). По шкале №2 оценивается степень уменьшения корпускулярной составляющей. А в рисунке 3 увеличение значений  $\alpha$  характеризует нарастание корпускулярных и электростатических свойств в микро системах (энтропийная кривая – шкала №2). Уменьшение волновых свойств определяется по шкале №1. Таким образом, понятие энтропии количественно моделируется через коэффициент  $\alpha$ , а негэнтропия через величину  $1/\alpha$ .

### УСЛОВИЯ РАВЕНСТВА И СООТНОШЕНИЙ ЭНТРОПИЙНЫХ ПАРАМЕТРОВ

Выполнение пункта 3 исходных положений классифицируется в зависимости от особенности динамики процесса. Так в электромагнитной волне разность хода составляющих векторов равна  $90^\circ$ . В общем случае при вращательном движении системы из двух одинаковых по величине векторов ( $\vec{R}$ ) с разностью фаз  $90^\circ$  их равнодействующая:

$$\vec{C} = 2^{1/2} \vec{R}, \text{ где для данного угла } \text{tg} 45^\circ = 1 \quad (1)$$

Если такой процесс дополняется движением по спиральной динамике, то вектор ( $\vec{C}$ ) станет касательным вектором и образует угол спирального вращения, для которого:

$$\text{tg} \varphi = C/R = 2^{1/2}, \text{ где } \varphi \text{ геодезический угол, равен } 54,733^\circ \quad (2)$$

Под этим углом тутовый шелкопряд наматывает шелковую нить на основу.

Таким образом при чисто вращательном движении выполняется условие равенства составляющих векторов энтропийных характеристик, а при спиральном движении их соотношение равно  $2^{1/2}$ . При поступательном движении действуют условия или равенства или постоянного соотношения величин их составляющих. При этом



в статистических процессах проявляются экспоненциальные зависимости. Такой подход определяет общие принципы многих физических закономерностей.

1) Характеристика спин-орбитального взаимодействия – постоянная тонкой структуры  $\alpha = \frac{r}{\lambda}$ , где  $r$  – классический радиус электрона,  $\lambda$  – его комптоновская длина волны.

2) Число  $\pi$  равно отношению длины окружности ( $l$ ) к ее диаметру ( $2r$ ).

3) В работах [9; 10] используются понятия разрушающего напряжения при растяжении пластика нити на шаг ее намотки, где:  $\sigma_\alpha$  – осевое,  $\sigma_\beta$  – окружное напряжения заменяются пропорциональной им величиной  $N_\alpha$  – осевое «усилие» и  $N_\beta$  – окружное «усилие» по уравнению:

$$\frac{\sigma_\beta}{\sigma_\alpha} = \frac{N_\beta}{N_\alpha} = \operatorname{tg}^2 \varphi = 2. \quad (3)$$

«Это условие позволяет получать равнонапряженную систему нитей с минимальной массой изделия» [10].

В гармонических колебаниях тела отношение потенциальной энергии обусловленной квазиупругой силой к кинетической энергии равно  $\operatorname{tg}^2 \delta$ , то есть:

$$E_n/E_k = \operatorname{tg}^2 \delta, \quad (3a)$$

где  $\delta$  – угловая характеристика колебаний.

Сумма обоих видов энергий равна максимальному значению каждой из них.

При условии равенства  $\delta = \varphi$  система получает энтропийное равновесное состояние.

4) Магнитомеханическое (гиромангнитное) отношение ( $g$ ) – это отношение магнитного момента частицы к ее механическому моменту, где  $g_s = 2$ , если магнитный момент электрона обусловлен только спиновой составляющей и  $g = 1$ , если он создается орбитальным движением электронов. Такие значения  $g$  их соотношения характеризуют соответствующие энтропийные зависимости.

5) Уравнение Планка (квантовый переход):

$h = E/\nu$ , где  $E$  орбитальная энергия, в стационарном состоянии – величина постоянная, процесс идет по градиенту поля (энтропия),  $h$  – постоянная Планка.

6) Уравнение скорости движения

$V = S/t$ , где  $S$  – путь при механическом движении с затратой энергии (негэнтропия),  $t$  – время, всегда возрастает и направлено по градиенту (энтропия). Кривая Лоренца (рис. 2) так же свидетельствует о проявлении пространственно-временной зависимости. Условием стационарного состояния в этих случаях является постоянство скорости движения, что выполняется как в микромире атомов и молекул, так и в макромире при движении планет.

7) Микроструктурные взаимодействия [11]:

По значениям  $\rho$  и  $\alpha$  в равновесном состоянии согласно исходной номограммы – рисунок 3, получается уравнение:

$$\ln \left( \frac{\rho}{\alpha} \right) = \operatorname{tg} \varphi, \quad (4)$$

где  $\varphi$  – геодезический угол;  $\alpha$  – относительная разность энергетических параметров взаимодействующих систем;  $\rho$  – степень структурного взаимодействия.

8) При вращательном движении заряженной частицы в гравитационном поле [11]:

$$\ln \left( \frac{G}{\varepsilon_0} \right) = \operatorname{tg}^2 (\alpha_0 \varphi), \quad (5)$$

где  $\varepsilon_0$  – электрическая постоянная;

$G$  – гравитационная постоянная;

$\alpha_0 = 1,00233$  – квантовая поправка к гиромангнитному отношению электрона в атоме, которая возможно в данном случае характеризует влияние прецессии движения частиц.

9) Из термодинамического определения энтропии следует:

$T = dw/ds$ , где  $dw$  – тепловая энергия, поэтому средняя температура ( $T$ ) является постоянно величиной, как в биологических системах, так и для планет.

10) В химической кинетике выполняется принцип Ле-Шателье: При внешнем воздействии на систему, находящуюся в равновесии, равновесие будет сдвигаться в направлении того процесса, который противодействует данному воздействию.

11) Исходные условия находятся в соответствии с Принципом дополнительности Н. Бора: для полного описания квантово-механических явлений необходимо применять два взаимоисключающих (дополнительных) набора классических понятий, совокупность которых дает исчерпывающую информацию об этих явлениях как о целостных. Например, описание объекта как частицы и как волны.

В таких случаях:

- Если процессы идут по градиенту (энтропия), то это параметры –  $t, \alpha, E, \sigma_\alpha, r, \varepsilon_0, E_n$ ;
- Если процессы идут против градиента (негэнтропия), то это параметры –  $S, \rho, \nu, \sigma_\beta, \lambda, \mu, G, E_k, l$ .

## S-КРИВЫЕ В ЭКОНОМИКЕ

S-кривые часто используются в экономических исследованиях, например, динамика ВВП, количество и объем продукции, прогнозирование инновационного потенциала и т.д. Так для оценки рациональной рыночной

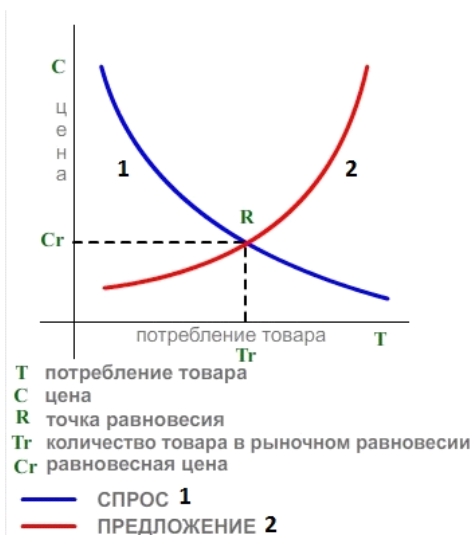


Рисунок 5. График спроса и предложения

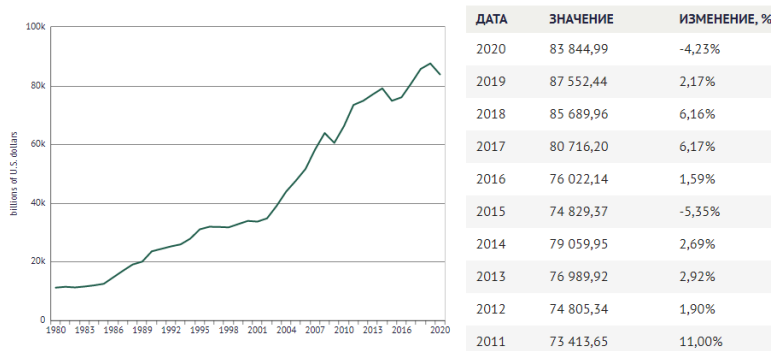


Рисунок 6. График мирового ВВП

цены используются графики линии спроса (аналогия энтропии) и линии предложения (аналогия негэнтропии) – рисунок 5.

Из графика следует, что рациональная рыночная цена устанавливается при условии равенства линий спроса и предложения.

Показательна диаграмма мировой динамики ВВП, которая практически соответствует графику негэнтропии – рисунок 6. Основное уменьшение роста ВВП начинается с 2018 года и во время пандемии коронавируса становится очень значительным.

При этом ВВП Китая постоянно увеличивается, хотя и с замедлением даже в 2020 году. Чтобы не было стагнации ВВП возможно некоторым негэнтропийным экономикам необходимо дать небольшое дополнение энтропийной составляющей. В Мире уже есть опыт Китая и опыт борьбы с коронавирусом. Так те государства, у которых процент госпредприятий был сравнительно небольшим быстрее сориентировались и лучше справляются с этой проблемой.

### S-КРИВЫЕ И COVID-19

Аналогичная динамика может проявляться и в вирусной этиологии, которая может интерпретироваться как плавный переход от атомно-молекулярных взаимодействий на микроуровне к формально аналогичному процессу в макросистемах. Эта аналогия подтверждается количественными расчетами для коронавирусного сценария. Рассмотрим это на примере российского сценария коронавируса для числа заболеваний на данный момент ( $\rho$ ) по рисунку 7.

Графики такого типа отражают взаимодействие энтропийных составляющих процесса: кривая негэнтропии постепенно переходит в энтропийную кривую.

«В исходных номограммах имеется точка, которая делит каждый график на две симметричные части при  $\rho=50\%$ . Детализация данных около этого значения (рис. 7) дает еще другие близкие к нему величины. Так, для первой волны эта ситуация соответствует по дням с 21.04.2020 по 25.04.2020 и дает среднее значение  $\rho = 5493$ . Это значит, что при  $\rho=100\%$  должно быть плато с численным значением в два раза больше, то есть 10987. Фактически за 13 дней от 03.05.2020 до 15.05.2020 среднее  $\rho$  оказалась равным – 10661» [12].



**Рисунок 7.** Количество заболеваний на данный момент времени

Для второй волны пандемии точка симметричного изменения такого графика примерно равна половине от его максимального значения.

Если провести корреляцию между временем пандемии на рисунке 7 и коэффициентом  $\alpha$ , то можно оценить длительность верхнего плато графика. Такой расчет находится в соответствии с реальными результатами [12]. «Применение данной методики в других регионах и государствах позволило бы сделать анализ и прогнозы по некоторым важным этапам сценария коронавируса. Только в этих случаях необходимо предварительно оценить региональный коэффициент корреляции» [12].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный подход не является принципиально новым, а приведенные к нему примеры не единичны. Так еще тысячи лет назад было установлено: «Все явления окружающего нас мира, включая человека и природу интерпретируются китайской медициной, как взаимодействие между двумя началами инь и ян, представляющие собой противоположные аспекты единой действительности». С позиции этих представлений физиотерапию и рефлексотерапию можно рассматривать как методику выравнивания потенциалов двух проявлений энергетических начал, которыми по современным понятиям являются энтропия и негэнтропия (п.3 исходных положений).

В данной ситуации с пандемией против вируса работает коллективный иммунитет и даже холодная зима способствует вынужденной самоизоляции. Двадцатый век – век войн эпидемий и революций имел большие человеческие потери. Но коэффициент прироста населения оказался самым высоким за всю историю человечества. В России в послевоенное время прирост родившихся мальчиков был значительно выше, чем до Второй мировой войны. В настоящее время экологических проблем есть актуальный принцип: сколько углекислого газа создается, столько его и должно поглощаться.

Все это – явления паритетного соотношения энтропии и негэнтропии.

## ВЫВОДЫ

1. Графики S-кривых характеризуют общую динамику изменения энтропийных составляющих в зависимости от основных параметров процесса. При этом их сумма равна максимальной величине каждой из них в данном взаимодействии.
2. Условием стационарного состояния системы является равенство или постоянная величина соотношения ее энтропии и негэнтропии (равновесная динамика).
3. Такие закономерности имеют место во многих явлениях и в конформационных взаимодействиях в физико-химии, в природе, в технике и даже в экономике. Приведены примеры их функционального вклада.
4. На основе российских данных показана возможность объективного анализа хода регионального сценария коронавируса.

### Список литературы / References:

1. Кынин А.Т., Леньшин В.А. *Оценка параметров технических систем с использованием кривых роста* [Электронный ресурс] URL: <http://www.metodolog.ru/01428/01428.html> (дата обращения 02.10.2020) [Kynin A.T., Lenyashin V.A. *Ocenka parametrov tekhnicheskikh sistem s ispol'zovaniem krivyyh rosta* [Electronic resources] URL: <http://www.metodolog.ru/01428/01428.html> (accessed 02.10.2020) (In Russ.)]

2. Сорокин А. *S-кривая роста* [Электронный ресурс] URL: <http://www.electrosad.ru/Jornal/SCur.htm>. [Sorokin A. *S-krivyye* [Electronic resources] URL: <http://www.electrosad.ru/Jornal/SCur.htm> (accessed 02.10.2020) (In Russ.)]
3. Тэйлор Э.Ф., Уилер Дж.А. Физика пространства-времени. М.: Мир, 1987, 320 с. [Taylor E.F., Wheeler J.A. *Fizika prostranstva-vremeni*. Moscow: Mir, 1987, 320 p. (In Russ.)]
4. Кораблев Г.А. О проблемных вопросах физико-химии. *Современные проблемы науки и образования*. Российская Академия Естествознания, 2020, т. 19, с. 26-31. [Korablev G.A. O problemnykh voprosakh fiziko-himii. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. Rossijskaya Akademiya Estestvoznaniya, 2020, vol. 19, pp. 26-31 (In Russ.)]
5. Рубин А.Б. *Биофизика. Кн.1. Теоретическая биофизика*. М.: Высш. шк., 1987, 319 с. [Rubin A.B. *Biophysika. Book 1. Theoretical biophysics*. M.: V.sh., 1987, 319 p. (In Russ.)]
6. Dirac P.A. *Quantum Mechanics*. London, Oxford Univ., Press, 1935.
7. Korablev G.A., Petrova N.G., Osipov A.K. et al. Diversified Demonstration of Entropy. *Nev Book Announcement. Nanotechnologies to Nanoindustry*. - USA, Winter 2013/14. - Chapter 8, pp. 120-130.
8. Кораблев Г.А., Заиков Г.Е. Биоструктурные энергетические критерии функциональных состояний. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2012, № 1 (2), с. 118-124. [Korablev G.A., Zaikov G.E. Biostrukturnye energeticheskie kriterii funktsional'nykh sostoyanij. *Proceedings of universities. Applied Chemistry and Biotechnology*, 2012, no. 1 (2), pp. 118-124. (In Russ.)]
9. Пидгайный Ю.М., Морозова В.М., Дудко В.А. *Механика полимеров*, 1967, № 6, с. 1096-1104. [Pidgainy Yu.M., Morozova V.M., Dudko V.A. *Mechanika Polymetov*, 1967, no. 6, pp. 1096-1104. (In Russ.)]
10. Кодолов В.И. *Полимерные композиции и технология изготовления из них двигателей летательных аппаратов*. Ижевский механический институт, 1992, 200 с. [Kodolov V.I. *Polimernye kompozicii i tekhnologiya izgotovleniya iz nih dvigatelej letatel'nykh apparatov*. Izhevsk Mechanical Institute, 1992, 200 p. (In Russ.)]
11. Кораблев Г.А. О механизме процессов тяготения. *Естественные и технические науки*, 2020, № 1 (139), с. 21-25. [Korablev G.A. O mekhanizme processov tyagoteniya. *Natural and technical sciences*, 2020, no. 1 (139), pp. 21-25 (In Russ.)]
12. Korablev G.A. Virus entropic characteristics. *ELJASR Journal*, 2020, vol. 3, iss. 3, pp. 146-152.

## S-CURVES AND ENTROPIC CONDITIONS OF SYSTEM STABILIZATION

Korablev G.A.

Izhevsk State Agricultural Academy

*Studencheskaya St., 11, Izhevsk, 426069, Russia; e-mail: korablevga@mail.ru*

**Abstract.** The graphs of S-curves characterize the general dynamics of change of entropic components depending on the process main parameters. At the same time, their sum is equal to the maximum value of each of them in this interaction. The condition of the system stationary state is the equality or constant of the correlation between its entropy and negentropy (equilibrium dynamics). Such regularities are found in many phenomena and conformational interactions in physical chemistry, nature, engineering and even economy. The examples of their functional contribution are given. The possibility of objective analysis of the coronavirus regional scenario is demonstrated based on the Russian data.

**Key words:** *S-curves, their diversity, entropy, negentropy, system stabilization, physical and chemical regularities, coronavirus scenario.*

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ GLY-PRO-ARG-PRO

Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем  
ул. 3. Халалива, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.06.2021

**Аннотация.** Компьютерное моделирование помогает решить одну из основных проблем молекулярной биофизики – определить структурно-функциональную организацию пептидных молекул. Данная работа посвящена изучению пространственного строения и конформационных свойств тетрапептидной молекулы глипролинов Gly-Pro-Arg-Pro. Расчеты проводились с помощью метода теоретического конформационного анализа и специальной компьютерной программы. Сначала была найдена пространственная структура природной глипролиновой молекулы Gly-Pro-Gly-Pro, затем его аналога Gly-Pro-Arg-Pro. Эти молекулы участвуют в жизненно важных процессах в живых организмах и используются в качестве лекарственных препаратов. Потенциальная энергия каждой из этих молекул рассматривалась как сумма невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найденны низкоэнергетические конформации тетрапептидных молекул, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для данных молекул являются свернутые и полусвернутые формы основной цепи. Такие формы сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в эти молекулы, и приводят к их эффективным взаимодействиям.

**Ключевые слова:** конформация, тетрапептид, молекула, аналог, структура.

В настоящее время активно исследуется роль регуляторных пептидов в жизни и деятельности организмов. Регуляторные пептиды относятся к группе нейромодуляторов. Выяснение структурно-функциональных свойств этих пептидов имеет большое прикладное значение в медицине и фармакологии. При создании новых лекарственных препаратов исследователи все чаще обращаются к использованию собственных резервов человеческого организма. Единый механизм регуляции функций объединяет нервную, эндокринную и иммунную системы, управляющие жизнедеятельностью организма. Одной из актуальных задач современной медицины и биотехнологии является создание высокоэффективных лекарств, которые характеризуются не только широким спектром действия, но и минимальным числом побочных эффектов.

В последнее время открываются новые семейства регуляторных пептидов. Среди них класс глипролинов, коротких пептидных молекул, состоящих из аминокислотных остатков глицина и пролина, привлекает внимание ученых, так как они являются источниками фармацевтических препаратов, которые производит сам организм. Глипролины – это нейрорхимические молекулы психотропного действия, регулируют систему свертывания крови, влияют на работу иммунной и нервной систем [1, 2]. Создание новых лекарственных препаратов на основе глипролинов – современное направление фармакологии. Понять механизмы действия этих биомолекул можно, если решить задачу их структурно-функциональной организации.

Создание синтетических аналогов глипролинов, молекулы которых отличаются высокой стабильностью и эффективностью, является важной задачей молекулярной биофизики. Целью данной работы является определение трехмерной структуры глипролиновой тетрапептидной молекулы с аминокислотной последовательностью Gly-Pro-Gly-Pro и её аналога Gly-Pro-Arg-Pro. Молекула аналога получается заменой аминокислотного остатка Gly в третьем положении на аминокислоту Arg. Следует отметить, что боковая цепь аминокислоты Pro жесткая, у Gly боковая цепь отсутствует, а боковая цепь Arg – длинная, лабильная, несет положительный заряд.

Компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, позволяющих получать графическое изображение пространственной структуры молекулы, было выполнено для данных молекул. Метод теоретического конформационного анализа дает возможность рассчитывать трехмерную структуру пептидных молекул исходя из известной аминокислотной последовательности [3]. В расчетах использовалась разработанная специальная классификация (конформация, форма основной цепи, шейп). Формы остатков определялись областями В, R, L и P двугранных углов основной цепи  $\phi$ - $\psi$ . При расчете рассматривались развернутые формы дипептидной молекулы (BB, BR, LB, LR, RL, PL, RP- шейп e) и свернутые формы основной цепи (RB, RR, BL, LL, PR, PB- шейп f). Для глицина начальные приближения формировались из низкоэнергетических конформаций (R форма –  $\phi = -90^\circ$ ;  $\psi = -90^\circ$ ; B форма –  $\phi = -90^\circ$ ;  $\psi = 100^\circ$ ; L форма –  $\phi, \psi = 90^\circ$  и P форма основной цепи –  $\phi = 90^\circ$ ;  $\psi = -90^\circ$ ). Для аминокислоты пролин учитывались два положения (B форма –  $\psi = 130^\circ$  и R форма –  $\psi = -50^\circ$ ), а для Arg только B и R формы. Положения боковой цепи Arg определялись четырьмя двугранными углами  $\chi^1, \chi^2, \chi^3, \chi^4$ .

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных ( $E_{\text{нв}}$ ), электростатических ( $E_{\text{эл}}$ ), торсионных взаимодействий ( $E_{\text{тор}}$ ) и энергии водородных связей ( $E_{\text{вс}}$ ). Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном

приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности каждой молекулы изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Конформационное состояние каждого аминокислотного остатка обозначалось через  $X_{ij}$ , где  $X$  – характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L, P), а символы  $ij = 11..., 12..., 13..., 21...,$  и т.д. отвечают положениям боковой цепи ( $\chi^1, \chi^2, \dots$ ); индекс 1 соответствует значениям углов области  $0-120^\circ$ , индекс 2 – области  $120^\circ - (-120^\circ)$ , а индекс 3 – области  $(-120^\circ)-0^\circ$ . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют принятой международной номенклатуре [4]. Для нахождения пространственного строения данных пептидных молекул использовалась специально разработанная программа [5]. Расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определить геометрические и энергетические параметры пептидов, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий. Данная работа является продолжением исследований пространственного строения пептидных молекул [6-10].

Определение пространственной структуры тетрапептида Gly-Pro-Gly-Pro мы начали с выяснения конформационных возможностей дипептидной молекулы Gly-Pro, затем трипептида Gly-Pro-Gly, и, наконец, всей тетрапептидной молекулы.

Расчет данной дипептидной молекулы выполнялся на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-пролина и L-глицина. Для аминокислоты пролин учитывались R и B формы основной цепи. Остаток глицина в расчетах имел четыре формы основной цепи R, B, L, P. Так же для глицина в расчет были включены граничные начальные приближения углов  $\phi, \psi$ . Для дипептида Gly-Pro, содержащего 27 атомов и 6 переменных двугранных углов, возможны 2 шейпа и 8 форм основной цепи. Развернутый шейп  $e$  включает шесть форм BB, BR, LB, LR, RP, RL, а свернутый шейп  $f$  включает формы основной цепи RB, RR, PR, PB, BL, BP.

Учитывая специфику боковых цепей аминокислотных остатков глицина и пролина, важно подчеркнуть, что остаток Gly лишен боковой цепи (в боковой цепи находится один атом водорода), а боковая цепь остатка Pro представляет жестко фиксированное кольцо. Конформационные возможности дипептидной молекулы определяются углами только основной цепи этих остатков:  $\phi, \psi, \omega$ . Расчет показал, что основной вклад в энергию молекулы вносят дипептидные взаимодействия, их энергия варьируется от -1,0 до -3,0 ккал/моль.

Формы основной цепи шейпа  $e$  имеют одинаковый развернутый ход основной цепи, при этом боковые цепи Gly и Pro находятся по разные стороны от основной цепи, а формы шейпа  $f$  имеют одинаковый свернутый ход основной цепи, где боковые цепи аминокислот оказываются сближенными. Низкой энергией для дипептидной молекулы обладают конформации PR, RR, RB, которые имеют свернутую форму основной цепи.

Трипептидная молекула Gly-Pro-Gly имеет 34 атома и 9 переменных двугранных углов. Для нее возможны 32 формы основной цепи. Расчет показал, что из них низкую энергию имеют формы RRB, PRB, которые также имеют свернутую форму основной цепи. Всего 0,7 ккал/моль проигрывает глобальной конформации RRB полусвернутая форма LRB.

Тетрапептид Gly-Pro-Gly-Pro включает 48 атомов и 11 переменных двугранных углов. Было составлено свыше 200 начальных приближений, которые были проминимизированы по энергии. В результате только ограниченное число конформаций попадает в энергетический интервал 0–4 ккал/моль. Возможные структуры Gly-Pro-Gly-Pro описываются низкоэнергетическими конформациями свернутых RRRR, PRRB (fff) и полусвернутых LRRR (eff), RRBR (ffe) форм основной цепи (табл. 1).

**Таблица 1.** Энергетические параметры низкоэнергетических конформаций тетрапептида Gly-Pro-Gly-Pro и его аналогов

№	Конформация (шейп)	Е нв	Е эл	Е торс	Е общ	Е отн
Молекула Gly-Pro-Gly-Pro						
1.	BRRR (eff)	-6,5	-2,6	1,3	-7,8	0,0
2.	BRRB (eff)	-3,0	-3,0	0,9	-5,0	2,8
3.	BBPR (eff)	-3,3	-3,3	1,3	-5,1	2,7
4.	RRRR (fff)	-5,3	-2,6	1,2	-6,7	1,1
5.	PRRB (fff)	-4,7	-2,6	1,0	-6,3	1,5
6.	RRBR (ffe)	-4,5	-3,0	1,0	-5,7	2,1
7.	RBRR (fef)	-4,1	-2,5	1,5	-5,0	2,8
Молекула Gly-Pro-Arg-Pro						
1	RRB <sub>2122</sub> R (ffe)	-10,5	-2,1	1,7	-11,8	0,0
2	PRB <sub>3222</sub> R (ffe)	-9,3	-2,6	1,0	-10,8	1,0
3	RBR <sub>3222</sub> R (fee)	-8,3	-3,7	1,8	-10,3	1,5
4	RB B <sub>3222</sub> B (fee)	-7,2	-3,6	1,8	-9,1	2,7
5	LRB <sub>3222</sub> BB(efe)	-6,9	-1,9	0,9	-7,9	3,9

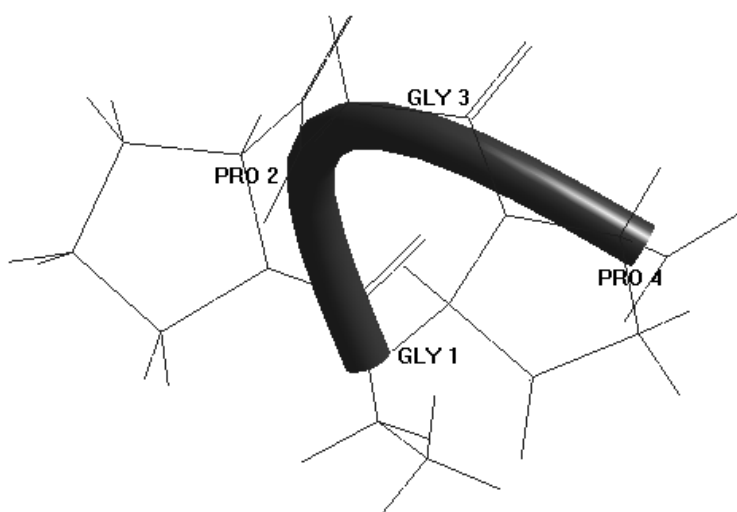
**Таблица 2.** Геометрические параметры низкоэнергетических конформаций тетрапептида Gly-Pro-Gly-Pro

Остаток	Углы	BRRR	RRRR	RRBR	RBRR
Gly	$\varphi_1$	-86	-112	-78	-62
	$\Psi_1$	-177	-86	-76	-70
	$\omega_1$	176	180	175	175
Pro	$\Phi_2$	-60	-60	-60	-60
	$\Psi_2$	-52	-46	-54	157
	$\omega_2$	179	-172	-178	179
Gly	$\varphi_3$	-72	-54	-123	-50
	$\Psi_3$	-69	-71	87	-64
	$\omega_3$	-174	178	174	175
Pro	$\varphi_4$	-60	-60	-60	-60
	$\Psi_4$	-52	-49	-55	-53
	$\omega_4$	-178	180	179	178
Е отн (ккал/ моль)		0.0	1.1	2,1	2,8

В таблице 1 представлены энергетические вклады невалентных (Е нв), электростатических (Е эл), торсионных (Е торс) взаимодействий, общая (Е общ) и относительная (Е отн) энергии тетрапептида. Глобальная конформация с относительной энергией 0,0 ккал/моль представлена на рисунке 1. В самой низкоэнергетической конформации этого тетрапептида вклад невалентных взаимодействий составляет -6,5 ккал/моль, электростатических взаимодействий -2,6 ккал/моль, торсионных 1,3 ккал/моль. В этой конформации вклад дипептидных взаимодействий равен -7,6 ккал/моль, трипептидных -2,5 ккал/моль, тетрапептидных -4,1 ккал/моль. Расстояние между атомами углерода N- С- концов тетрапептида составляет 3,9 Å. Из таблицы 1 видно, что всего 1,1 и 1,5 ккал/моль уступают по энергии конформации с полностью свернутой формой основной цепи RRRR и PRRB. Геометрические параметры низкоэнергетических конформаций тетрапептида Gly-Pro-Gly-Pro приведены в таблице 2. Таким образом, расчет дает количественные характеристики энергетических и геометрических параметров тетрапептидной молекулы.

Полученные результаты использованы при определении пространственной структуры тетрапептида Gly-Pro-Arg-Pro, который является аналогом природной молекулы Gly-Pro-Gly-Pro. Этот тетрапептид применяется в качестве средства для лечения тромбообразований, снижает повышенный уровень глюкозы в крови при инсулинзависимом диабете. Аминокислота Arg снижает риск развития сахарного диабета. Молекула содержит 65 атомов и 15 переменных двугранных углов. Боковая цепь аргинина представляет собой длинную, объемную и положительно заряженную цепь, конформационные возможности которой задаются четырьмя углами  $\chi^1$ ,  $\chi^2$ ,  $\chi^3$ ,  $\chi^4$ .

Для тетрапептида Gly-Pro-Arg-Pro самыми низкоэнергетическими оказались конформации с формой основной цепи RRBB, PRBR, RBBR, имеющие полусвернутую основную цепь (табл. 1). Расчет показал, что

**Рисунок 1.** Низкоэнергетическая пространственная структура глипролина Gly-Pro-Gly-Pro

глобальной конформацией молекулы является RRB<sub>2122</sub>R (ffe) (0,0 ккал/моль). В этой низкоэнергетической конформации данного тетрапептида вклад невалентных взаимодействий составляет -10,5 ккал/моль, электростатических взаимодействий -2,1 ккал/моль, торсионных 1,7 ккал/моль. Вклад дипептидных взаимодействий равен -12,3 ккал/моль, трипептидных -3,0 ккал/моль, тетрапептидных -2,9 ккал/моль. Расстояние между атомами углерода N- C- концов тетрапептида составляет 6,9 Å°.

Таким образом, пространственную структуру молекулы Gly-Pro-Arg-Pro можно представить пятью низкоэнергетическими конформациями, в которых тетрапептидная молекула выподняет свои функции. Теоретический конформационный анализ тетрапептидов привел к таким структурным организациям молекул, которые не исключают реализацию ими функций, требующих специфических взаимодействий с различными рецепторами.

#### Список литературы / References

1. Falalyeyeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V. et al. Effects of glyprolines PGP, PG and GP on homeostasis of gastric mucosa in rats with experimental ethanol-induced gastric ulcers. *Bull Exp Biol Med*, 2010, vol. 149, № 6, pp. 699-701.
2. Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А. и др. Структурно-функциональные исследования глицин и пролин содержащих пептидов, являющихся нейропротекторами. *Биоорг.хим.*, 2009, том 35, № 2, с. 165-171. [Martynova K.V., Andreeva L.A., Klimova P.A. et al. Structure-functional investigation of the glysin and prolin containing peptides, which are neuroprotectors. *Bioorg.chim.*, 2009, vol. 35, № 2, pp. 165-171. (In Russ.)]
3. Попов Е.М. *Белки и пептиды*. М.: Наука, 1995, с. 49-52. [Popov E.M. *Proteins and peptides*. Moscow: Scenes, 1995, pp. 49-52. (In Russ.)]
4. IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry, 1988. vol. 39, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
5. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, том 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjajev N.M. Program of the semi-empirical calculation of the conformations of the molecular complexes on the IBM. *Journal of structural chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4. pp. 147-148. (In Russ.)]
6. Akhmedov N.A., Gadjeva Sh.N., Abbasli R.M. Structural organization of Asp-Pro- Lys-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> molecule. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2009, vol. 10, pp. 57-62.
7. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
8. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Use of Informational Technologies in Study of the spatial structure of glyprolines, AICT 2012, *VI International Conference Application of Information and Communication Technologies*, Tbilisi, Georgia, 2012, pp. 389-392.
9. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Akhmedova S.R. Spatial structure of Octarphin Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
10. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Use of Informational Technologies in Study of the spatial structure of glyprolines, AICT 2012, *VI International Conference Application of Information and Communication Technologies*, Tbilisi, Georgia, 2012, pp. 389-392.

#### STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE GLY-PRO-ARG-PRO MOLECULE

Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A.

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov Str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru

**Abstract.** Computer modeling helps us to solve the problem of the investigating of structure–functional organization of the peptide molecules. This work is devoted to study the spatial organization and conformational possibilities of the glyproline tetrapeptide molecule Gly-Pro-Arg-Pro. The calculations were carried out by the method of theoretical conformational analysis and a special computer program. Using this glyproline peptides of the human body, you can create new and effective drugs. The potential energy of the each molecule was chosen as the sum of the non-valent, electrostatic and torsional interaction energies and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of these molecules, the dihedral angles of the backbone and side chains of the amino acid residues of the tetrapeptides, and the energies of intra- and inter-residual interactions were determined. It is revealed that low energy conformations of this molecules have the folded and half-folded type of backbone. These forms bring parts of the backbone and the side chains of the amino acids together, and they result in convenient interactions.

**Key words:** conformation, tetrapeptide, molecule, analogue, structure.



## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ЦИТОХРОФИНА 4

Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: leylanamig@mail.ru

Азербайджанский государственный педагогический университет

г. Баку, Азербайджан

Азербайджанский технический университет

г. Баку, Азербайджан

Поступила в редакцию: 16.06.2021

**Аннотация.** Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы цитохрофина 4 (Tyr1-Pro2-Phe3-Thr4). Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы цитохрофина 4, представляется конформациями четырех шейпов пептидного скелета. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул цитохрофинов.

**Ключевые слова:** экзорфин, цитохрофин, опиоид, структура, конформация.

Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Обнаружен ряд молочных экзорфинов, имеющих свойства антагонистов опиоидных рецепторов. К ним относятся казоксины А, В, С, человеческий казоксин D, а также лактоферроксины А, В и С. Возможность образования этих пептидов при гидролизе соответствующих белков пептидазами желудочно-кишечного тракта доказана *in vitro*. Представителями экзорфинов являются также цитохрофины и геморфины. Предполагается, что эти пептиды могут образовываться *in vivo* при протеолитическом расщеплении цитохрома b и гемоглобина. Проведено исследование нейротропных эффектов опиоидных пептидов фрагментов глутена, рубиско и цитохрома b. Показано, что обладающие относительной  $\delta$ -селективностью экзорфин С и рубисколи-5 характеризуются сходным по направленности действием на поведение детенышей белых крыс. Слабо влияя на состояние экспериментальных животных при острых инъекциях, после хронического введения в 1 и 14-й дни жизни они вызвали снижение тревожности и улучшение обучения в лабиринте с пищевым подкреплением. Последствия применения цитохрофина-4 были наиболее близки к действию  $\beta$ -казоморфина-5 короткого  $\mu$ -селективного фрагмента  $\beta$ -казеина. Оба эти пептида оказывали анксиолитическое влияние при острых инъекциях; после хронического введения их эффекты быстро угасали по мере созревания мозга детенышей [1-3].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динорфинов, неэндорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [4-10].

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы рубисколины изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции [4-6].

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа  $X_{ij}$ , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты

**Таблица 1.** Энергетическое распределение конформаций цитохрофина 4

Шейп	Интервал энергии, ккал/моль					
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5>
efe	3	2	3	1	3	30
eff	3	6	1	3	3	28
eef	-	-	3	6	9	24
eee	-	-	5	7	5	26

$\varphi - \psi : R(\varphi, \psi = -180^\circ - 0^\circ), B(\varphi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ), L(\varphi, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$  и  $P(\varphi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$ ;  $ij \dots = 11 \dots, 12 \dots, 13 \dots, 21 \dots$  определяет положение боковой цепи ( $\chi_1, \chi_2 \dots$ ), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до  $120^\circ$ , 2 – от  $120^\circ$  до  $-120^\circ$ , и 3 – от  $-120^\circ$  до  $0^\circ$ . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [11].

Трехмерная структура молекулы цитохрофина 4 (Tyr1-Pro2-Phe3-Thr4) была исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков.

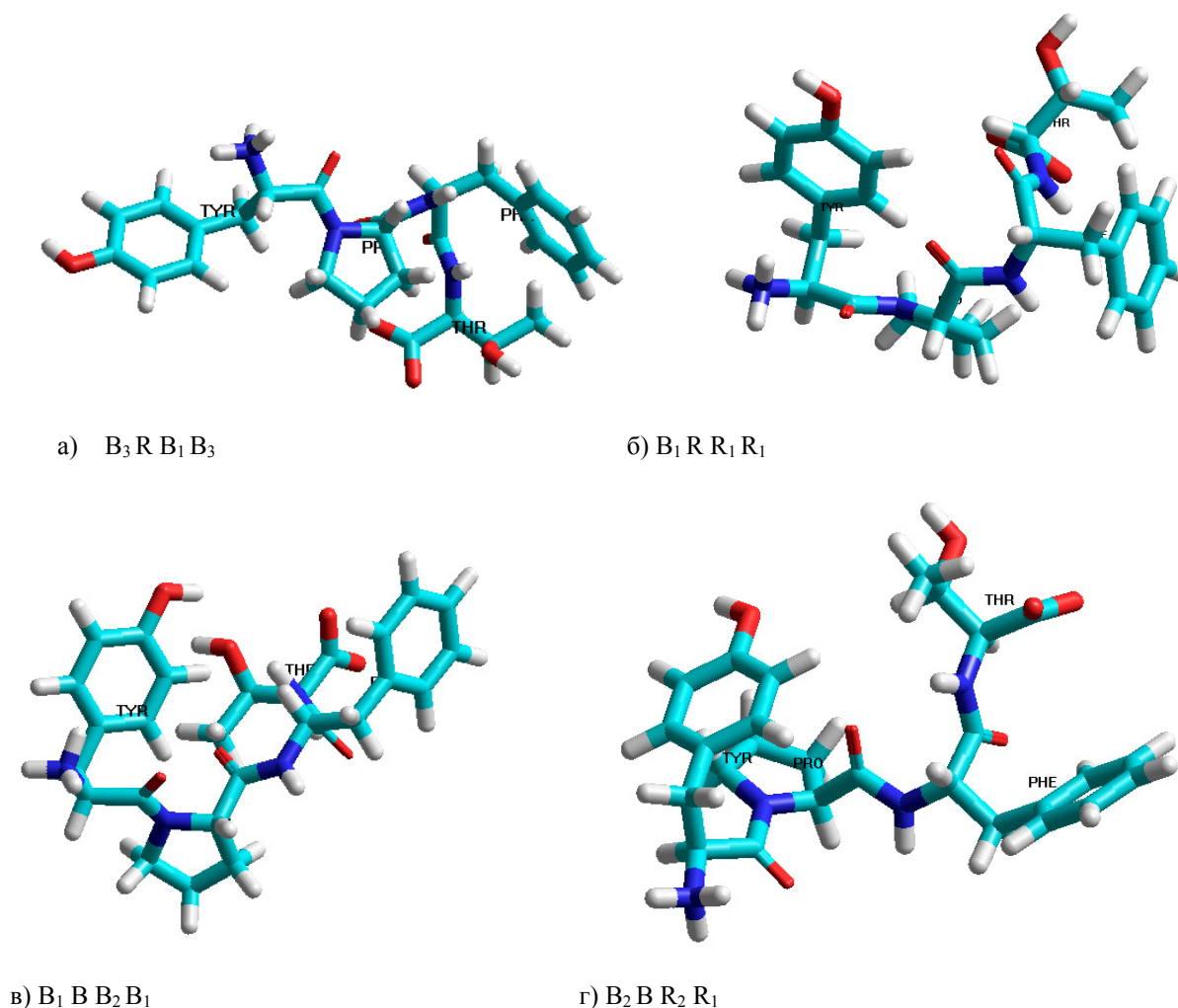
В тетрапептидной молекулы цитохрофина 4 (Tyr1-Pro2-Phe3-Thr4) входит аминокислотный остаток пролин. Известно, что перед пролином R форма основной цепи является высокоэнергетической. Поэтому для данной молекулы цитохрофина 4 (Tyr1-Pro2-Phe3-Thr4) рассчитаны конформации четырех шейпов. Энергетическое распределение рассчитанных конформаций молекулы цитохрофина 4 показано в таблице 1. Результаты расчета показывают, что в энергетический интервал 0–2 ккал/моль попадают конформации двух шейпов efe и eff и они представлены соответственно пятью и девятью конформациями. Относительные энергии конформаций шейпов eef и eee больше, чем 2 ккал/моль. Таким образом, в энергетический интервал 0–3 ккал/моль попадают конформации всех четырех шейпов. Из каждой формы выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в таблице 2. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ( $U_{нев.}$ ), электростатических ( $U_{эл.}$ ), торсионных ( $U_{торс.}$ ) взаимодействий и относительная ( $U_{отн.}$ ) энергия оптимальных конформаций молекулы цитохрофина 4. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры четырех

**Таблица 2.** Относительная энергия и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ( $U_{нев.}$ ), электростатических ( $U_{эл.}$ ), торсионных ( $U_{торс.}$ ) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы цитохрофина 4

Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{отн.}$
		$U_{нев.}$	$U_{эл.}$	$U_{торс.}$	
e f e	$B_3 R B_1 B_3$	-12,8	-1,2	2,0	0
e f f	$B_1 R R_1 R_1$	-13,2	-2,0	3,6	0,4
e e e	$B_1 B B_2 B_1$	-11,6	0,1	1,7	2,1
e e f	$B_2 B R_2 R_1$	-12,9	0,5	2,4	2,1

**Таблица 3.** Энергия внутри-и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы цитохрофина 4:  $B_3 R B_1 B_3$  ( $U_{отн.}=0$  ккал/моль, 1-ая строка),  $B_1 R R_1 R_1$  ( $U_{отн.}=0,4$  ккал/моль, 2-я строка),  $B_1 B B_2 B_1$  ( $U_{отн.}=2,1$  ккал/моль, 3-я строка),  $B_2 B R_2 R_1$  ( $U_{отн.}=2,1$  ккал/моль, 4-я строка),

Tyr1	Pro2	Phe3	Thr4	
3,6	-4,3	-6,7	-3,3	Tyr1
2,6	-4,2	-2,8	-6,4	
2,1	4,7	-3,4	-2,0	
2,1	-5,6	-8,3	-2,2	
	0,2	-2,0	-0,3	Pro2
	0,3	-2,5	-1,6	
	0,3	-0,2	-0,5	
	0,5	-0,2	-1,0	
		0,9	-2,8	Phe3
		0	-2,0	
		0	-3,9	
		0,3	-3,0	
			0,7	Thr4
			1,2	
			0,9	
			1,1	



**Рисунок 1.** Пространственное расположение аминокислотных остатков в низкоэнергетических конформациях молекулы

конформаций, относительная энергия которых меньше 3.0 ккал/моль представлены в таблицах 3, 4. На рисунке 1 показано пространственное расположение аминокислотных остатков в этих низкоэнергетических конформациях молекулы.

Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале  $(-13,2)$ – $(-11,6)$  ккал/моль, электростатических взаимодействий  $(-2,0)$ – $(0,5)$  ккал/моль, торсионных взаимодействий  $(1,7)$ – $(3,6)$  ккал/моль (табл. 2). Шейп ефе молекулы цитохрофина 4 представлен девятью низкоэнергетическими конформациями. Их относительная энергия изменяется в энергетическом интервале 0–4.0 ккал/моль (табл. 1). Глобальной конформацией молекулы цитохрофина 4 является конформация  $B_3 R B_1 B_3$  шейпа ефе (рис. 1). Конформация является выгодной по невалентным и электростатическим взаимодействиям (табл. 2, рис. 1). В этой конформации возникают эффективные ди-, три и тетрапептидные взаимодействия, Tyr1 эффективно взаимодействует с трипептидным фрагментом Pro2-Phe3-Thr4, вклад которых составляют  $(-14,3)$  ккал/моль, также Pro2 с Phe3 и Phe3 с Thr4. Общий вклад межостаточных взаимодействий составляет  $(-19,4)$  ккал/моль (табл. 3).

Конформация  $B_1 R R_1 R_1$  шейпа eff с относительной энергией 0,4 ккал/моль сразу выгодна по невалентным взаимодействиям и электростатическим взаимодействиям и их вклад наибольшей, чем в других конформациях (табл. 2). В этой конформации также возникают эффективные ди-, три и тетрапептидные взаимодействия, Tyr1 эффективно взаимодействует с трипептидным фрагментом Pro2-Phe3-Thr4, вклад которых составляют  $(-13,4)$  ккал/моль, также Pro2 с Phe3 и Thr4 и Phe3 с Thr4. Общий вклад межостаточных взаимодействий составляет  $(-19,5)$  ккал/моль (табл. 3).

Конформация  $B_1 B B_2 B_1$  шейпа eee имеет относительную энергию 2.1 ккал/моль. В этой конформации вклад Tyr1 с трипептидным фрагментом Pro2-Phe3-Thr4 составляет  $(-10,1)$  ккал/моль. Как видно этот вклад меньше, чем в предыдущих конформациях. Взаимодействия между остатком Pro2 с другими аминокислотными остатками не возникают. Только Phe3 эффективно взаимодействует с остатком Thr4. Общий вклад межостаточных взаимодействий составляет  $(-14,0)$  ккал/моль (таблица3). Конформация  $B_2 B R_2 R_1$  шейпа eee имеет также относительную энергию 2,1 ккал/моль. Межостаточных взаимодействий в этой конформации приблизительно такие же как в предыдущей конформации.

Таблица 4. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы цитохрофина 4

Остаток	Конформации											
	B <sub>3</sub> R B <sub>1</sub> B <sub>3</sub>			B <sub>1</sub> R R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>			B <sub>1</sub> B B <sub>2</sub> B <sub>1</sub>			B <sub>2</sub> B R <sub>2</sub> R <sub>1</sub>		
Тур1	-91	155	170	-88	-148	178	-79	150	178	-70	121	171
	-72	107	0	58	82	0	67	90	0	169	78	0
Pro2	-60	-38	178	-60	-63	172	-60	110	-173	-60	103	-178
Phe3	-94	165	179	-150	-45	165	-106	142	176	-98	-52	179
	60	82		53	90		174	87		-174	93	
Thr4	-102	135	-	-89	-59	-	-119	143	-	-82	-48	-
	-57	178	174	44	179	178	59	-179	176	58	-176	175
ΔU	0 ккал/моль			0,4 ккал/моль			2,1 ккал/моль			2,1 ккал/моль		

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности  $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2, \dots$

Таким образом, пространственную структуру молекулы цитохрофина 4 можно представить четырьмя структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур, можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ тетрапептидной молекулы цитохрофина 4 привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

#### Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46. (In Russ.)]
2. Соколов О.Ю., Кост Н. В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с. 29-35. [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K., Tarakanova Yu.N., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. The possible role of casomorphins in the pathogenesis of autism. *Psixiatriya*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 29-35. (In Russ.)]
3. Lew R.A., Mustafa T., Ye S. et al. *Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP)*. *J. of Neurochemistry*, 2003, vol. 86, no. 2, pp. 344-350.
4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул  $\beta$ -казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная Биология*, 1989, т. 23, с. 240-248. [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of  $\beta$ -casomorphin, valmuceptin and morphiceptin molecules. *Molecular Biol.*, 1989, vol. 23, pp. 240-240. (In Russ.)]
5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667. [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667. (In Russ.)]
6. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
7. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590. (In Russ.)]
8. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
9. Hasanov E.M., Akhmedov N.A. Spatial Structure of Peptide BAM-20P. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 2018, iss. no. 4-2456-2165, vol. 3, pp. 72-76.
10. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. *Conference proceedings Modern Trends In Physics*, 2019, pp. 201-104.
11. IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford 1993.

## SPATIAL STRUCTURE OF CYTOCHROPHIN-4 MOLECULE

Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.F., Akhmedov N.A.

Baku State University

Z. Khalilov st.23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: leylanamig@mail.ru

Azerbaijan State Pedagogical University

Baku, Azerbaijan

Azerbaijan Technical University

Baku, Azerbaijan

**Abstract.** By the method of the theoretic conformational analysis the conformational capabilities of the cytochromphin-4 molecule (Tyr1-Pro2-Phe3-Thr4) were studied. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valent, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. Low-energy conformations of the cytochromphin-4 molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues that make up the molecules are founded; the energy of intra- and inter-residual interactions is estimated. It is shown that the spatial structure of the cytochromphin-4 molecule can be represented by the conformations of four shapes of the peptide backbone. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of cytochromphin-4 molecules.

**Key words:** exorphin, cytochromphin-4, opioid, structure, conformation.

## ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ КАЗОКСИНА А

Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, Азербайджан; e-mail: Namiq.49@bk.ru

Поступила в редакцию: 16.06.2021

**Аннотация.** Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы казоксина А (Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub>). Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы казоксина А, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы казоксина А представляется конформациями четырнадцати шейпов пептидного скелета. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул казоксина.

**Ключевые слова:** экзорфин, казоксин, опиоид, структура, конформация.

Регуляторные пептиды, впервые обнаруженные во второй половине XX века, активно изучаются как физиологами, так и фармакологами, поскольку область биологической активности пептидов чрезвычайно широка. Они являются одним из главных звеньев, объединяющих три регуляторные системы организма – нервную, эндокринную и иммунную в единое целое. В настоящее время у разных видов животных и у человека охарактеризовано уже более 9000 физиологически активных пептидов. Это короткие цепочки аминокислот (2-70 остатков), выполняющие функцию сигнальных молекул. Большинство таких пептидов нельзя с уверенностью отнести ни к нейромедиаторам, ни к гормонам, поскольку они синтезируются как нейронами (передавая сигнал на уровне синапса), так и клетками периферических тканей (передавая сигнал на более дальние расстояния, подобно гормонам). Для регуляторных пептидов характерно воздействие сразу на многие системы организма.

Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Обнаружен ряд молочных экзорфинов, имеющих свойства антагонистов опиоидных рецепторов. К ним относятся казоксины А, В, С, человеческий казоксин D, а также лактоферроксины А, В и С. Возможность образования этих пептидов при гидролизе соответствующих белков пептидазами желудочно-кишечного тракта доказана *in vitro*.

Казоксины и казоморфины представляют собой пептиды, которые воздействуют на опиоидную систему, которая влияет на темп пищеварения. Казоморфины являются опиоидными агонистами (активаторами), а казоксины – опиоидными антагонистами. Казеин обладает высоким содержанием казоксина и казоморфина, что объясняет сниженную пропускную способность после потребления (поскольку активация опиоидной системы снижает моторику кишечника). Физиологическое действие антагонистических экзорфинов до сих пор изучено очень слабо. Некоторые молочные экзорфины (казоморфины, казоксины, лактоферроксины) могут не только образовываться при переваривании молока в желудочно-кишечном тракте, но и содержаться в сырах, поскольку технология изготовления сыра связана с ферментативной обработкой [1-3].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динарфинов, неондорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [4-10].

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы рубисколины изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции.

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную

Таблица 1. Энергетическое распределение конформаций фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 казоксина А

Шейп	Форма основной цепи	Интервал энергии, ккал/моль					
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5>
eee	B B B B	1	2	5	1	1	14
eff	B R R R	-	-	-	-	-	20
eef	B B R R	1	4	5	1	-	12
efe	B R B B	3	1	4	-	-	16

молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа  $X_{ij}$ , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты

$$\varphi - \psi : R(\varphi, \psi = -180^\circ - 0^\circ), B(\varphi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ), L(\varphi, \psi = 0^\circ - 180^\circ) \text{ и}$$

$$P(\varphi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ); ij...=11..., 12..., 13..., 21... \text{ определяет положение боковой цепи } (\chi_1, \chi_2...),$$

причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до  $120^\circ$ , 2 – от  $120^\circ$  до  $-120^\circ$ , и 3 – от  $-120^\circ$  до  $0^\circ$ . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [11].

Трехмерная структура молекулы казоксина А (Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub>) была исследована фрагментарно. Сначала, на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков изучена пространственная структура N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 и C-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы казоксина А и определены их стабильные конформации. На втором этапе, на основе низкоэнергетических конформаций N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 и C-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы была рассчитана пространственная структура казоксина А (Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub>).

В N-концевой тетрапептидный фрагмент Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 входит аминокислотный остаток пролин. Известно, что перед пролином R форма основной цепи является высокоэнергетической. Поэтому для данного тетрапептидного фрагмента рассчитаны конформации четырех шейпов. Энергетическое распределение рассчитанных конформаций N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 молекулы казоксина А показано в таблице 1. Результаты расчета показывают, что в энергетический интервал 0–5 ккал/моль попадают конформации трех шейпов eee, eef, efe. Только конформации шейпа eff оказались высокоэнергетическими, их относительная энергия выше 5 ккал/моль. Поэтому для расчета трехмерной структуры молекулы казоксина А выбраны конформации трех шейпов eee, eef и efe N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 молекулы.

Таблица 2. Энергетическое распределение конформаций фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7 казоксина А

Шейп	Форма основной цепи	Интервал энергии, ккал/моль					
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5>
eee	B B B B	-	-	2	8	4	11
	R L B B	-	-	3	5	2	15
fff	R R R R	1	8	7	4	3	2
	B P R R	2	3	7	5	3	1
eef	B B R R	1	1	3	5	4	7
	R L R R	-	1	-	3	5	12
eff	R P R R	-	-	2	2	2	15
	B R R R	-	-	1	3	4	13
efe	B R B B	-	-	3	4	2	12
	R P B B	1	1	6	5	4	4
fef	R B R R	-	2	3	4	5	7
	B L R R	-	-	5	1	4	11
fee	R B B B	-	1	4	2	9	5
	B L B B	-	-	4	5	2	10
ffe	R R B B	-	-	1	5	10	5
	B P B B	-	-	1	3	11	6

**Таблица 3.** Относительная энергия и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ( $U_{нев.}$ ), электростатических ( $U_{эл.}$ ), торсионных ( $U_{торс.}$ ) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы казоксина А

Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{отн}$
		$U_{нев.}$	$U_{эл.}$	$U_{торс.}$	
efefff	$B_3RB_1R_2RR_{21}R_{31}$	-20,8	1,9	6,4	5,2
efefee	$B_3RB_1B_3LB_{32}B_{31}$	-20,2	1,8	5,4	4,7
efeffe	$B_3RB_1B_3PB_{21}B_{31}$	-19,8	1,7	4,6	4,2
eeefeee	$B_1BR_1B_1BB_{21}B_{31}$	-21,8	1,0	5,6	2,5
eeefeee	$B_1BR_1R_2LB_{21}B_{31}$	-20,2	1,2	4,3	3,0
eeefeef	$B_1BR_1B_2BR_{21}R_{31}$	-23,8	1,7	6,6	2,3
eeefefe	$B_1BR_1B_2RB_{31}B_{31}$	-25,8	-0,3	8,4	0
eeefefe	$B_1BR_1R_2PB_{31}B_{31}$	-22,5	0,8	5,1	1,2
efeffe	$B_1BR_1B_1PB_{21}B_{31}$	-22,1	0,3	7,5,3	3,2
eeeeeee	$B_1BB_3B_2BB_{21}B_{31}$	-20,3	1,4	6,1	4,8
eeeffff	$B_1BB_3B_1PR_{21}R_{31}$	-22,8	1,5	6,9	3,3
eeeeef	$B_1BB_3B_2BR_{21}B_{31}$	-21,1	1,6	5,7	3,9
eeeeef	$B_1BB_3R_2LR_{21}B_{31}$	-21,5	1,9	6,5	4,5
eeefefe	$B_1BB_3R_3PB_{31}B_{31}$	-21,6	0,9	7,1	4,1
eeefef	$B_1BB_3R_3BR_{21}R_{21}$	-23,8	1,4	6,6	1,9
eeefef	$B_1BB_3B_1LR_{32}R_{31}$	-21,7	1,5	6,3	3,9
eeefee	$B_1BB_3R_3BB_{32}B_{31}$	-21,3	1,0	6,2	3,6
eeefee	$B_1BB_3B_3LB_{32}B_{31}$	-23,6	0,9	5,5	0,5
eeeffe	$B_1BB_3R_3RB_{21}B_{31}$	-20,9	1,2	5,8	3,9

В аминокислотной последовательности С-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы казоксина А входит аминокислотный остаток глицин и известно, что у него низкоэнергетическими являются четыре формы основной цепи R, B, L, P. Поэтому во всех восьми возможных шейпах пептидного скелета пришлось считать конформации двух форм основной цепи. Энергетическое распределение рассчитанных конформаций С-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы казоксина А показано в таблице 2. Результаты расчета показывают, что в энергетический интервал 0–5 ккал/моль попадают конформации восьми шейпов, шестнадцати форм основной цепи. Для расчета трехмерной структуры молекула казоксина А выбраны конформации всех шестнадцати форм основной цепи С-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы.

Для исследования пространственной структуры молекулы казоксина А начальные приближения формировались на основе трех форм основной цепи N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4 и шестнадцати форм основной цепи С-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы. Поэтому на первом этапе были рассчитаны несколько сот конформаций гептапептидной молекулы казоксина А. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основных цепей и шейпами. В энергетический интервал 0–7,0 ккал/моль попадают конформации четырнадцати шейпов пептидного скелета. Эти шейпы представлены девятнадцатью формами основной цепи. Из каждой формы выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в таблице 3. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ( $U_{нев.}$ ), электростатических ( $U_{эл.}$ ), торсионных ( $U_{торс.}$ ) взаимодействий и относительная ( $U_{отн.}$ ) энергия оптимальных конформаций молекулы казоксина А. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры трех конформаций, относительная энергия которых меньше 5,0 ккал/моль представлены в таблицах 4, 5. На рисунке 1 показано пространственное расположение аминокислот в этих низкоэнергетических конформациях молекулы.

N-концевой трипептидный участок Tyr1-Pro2-Ser3 молекулы казоксина А является конформационно жестким, представлен тремя шейпами (eef, eee, efe) и тремя формами 5,0 ккал/моль представлены в таблицах 4, 5.

Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале (-23,8)–(-19,8) ккал/моль, электростатических взаимодействий (-0,3)–(1,9) ккал/моль, торсионных взаимодействий (4,3)–(8,4) ккал/моль (табл. 3) основной цепи (BBR, BBB, BRB). С-концевой тетрапептидный участок Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub> молекулы является конформационно лабильным. Шейп eef N-концевого трипептидного участка молекулы представлен шестью низкоэнергетическими формами основной цепи. Их относительная энергия изменяется в энергетическом интервале 0–3,2 ккал/моль (табл. 3). Глобальной конформацией молекулы казоксина А является конформация  $B_1BR_1B_2RB_{31}B_{31}$  шейпа eeefefe. Конформация является выгодной по невалентным и электростатическим взаимодействиям (табл. 3). В этой конформации возникают водородные связи между атомом N-H Tyr1 и C=O атомом основной цепи Tyr4, между атомом N-H Tyr1 и C=O атомом боковой цепи Asn7 и между атомом C=O основной цепи Tyr1 и атомом N-H атомом боковой цепи Asn7. Здесь N- и C- концы молекулы казоксина сближены в пространстве, при этом возникают эффективные



взаимодействия между ними (рис. 1а). Взаимодействия Tyr1 с остальными остатками составляет (-13,7) ккал/моль, Pro2 с остатками - (-0,9) ккал/моль, Ser3 с остатками - (-1,6) ккал/моль, Tyr4 с остатками (-7,3) ккал/моль, Gly5 с остатками (-2,9) ккал/моль (табл. 4).

Шейп ее N-концевого трипептидного участка молекулы представлен десятью низкоэнергетическими формами основной цепи. Их относительная энергия изменяется в энергетическом интервале 0,5–4,8 ккал/моль (табл. 3). Вторая низкоэнергетическая конформация молекулы казоксина А является B<sub>1</sub>BR<sub>1</sub>B<sub>2</sub>RB<sub>31</sub>B<sub>31</sub> шейпа eefee (рис. 1в).

**Таблица 4.** Энергия внутри-и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы казоксина А: B<sub>1</sub>BR<sub>1</sub>B<sub>2</sub>RB<sub>31</sub>B<sub>31</sub> (U<sub>отн</sub>=0 ккал/моль, 1-я строка), B<sub>1</sub>BB<sub>3</sub>B<sub>3</sub>LB<sub>32</sub>B<sub>31</sub> (U<sub>отн</sub>=0,5 ккал/моль, 2-я строка), B<sub>3</sub>RB<sub>1</sub>B<sub>3</sub>PB<sub>21</sub>B<sub>31</sub> (U<sub>отн</sub>=4,2 ккал/моль, 3-я строка)

Tyr1	Pro2	Ser3	Tyr4	Gly5	Leu6	Asn7	
19,7	-15,5	-16,0	-11,8	-3,4	-0,8	0,8	Tyr1
14,3	-18,5	-31,5	-2,5	-0,4	0	-0,4	
19,7	-16,4	-16,0	-15,5	-10,9	0	0	
	1,3	-8,0	-5,0	-9,7	-3,4	-0,4	Pro2
	0,8	-9,7	-2,1	0	0	0	
	1,3	-4,1	-5,5	-6,7	-5,0	0	
		1,3	-10,5	-5,0	-8,8	-15,5	Ser3
		4,6	-9,2	-4,6	-5,0	-13,9	
		1,7	-9,7	-4,2	-0,4	0	
			5,5	-2,9	-4,6	-9,2	Tyr4
			2,1	-9,7	-2,1	-0,4	
			4,6	-10,5	-0,4	-0,8	
				5,0	-7,6	-4,2	Gly5
				1,7	-14,3	-2,5	
				6,7	-4,6	-3,4	
					0	-7,1	Leu6
					1,3	-4,6	
					-1,3	-1,3	
						-2,1	Asn7
						-1,7	
						-1,7	

**Таблица 5.** Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы казоксина А

Остаток	Конформации		
	B <sub>1</sub> BR <sub>1</sub> B <sub>2</sub> RB <sub>31</sub> B <sub>31</sub>	B <sub>1</sub> BB <sub>3</sub> B <sub>3</sub> LB <sub>32</sub> B <sub>31</sub>	B <sub>3</sub> RB <sub>1</sub> B <sub>3</sub> PB <sub>21</sub> B <sub>31</sub>
Tyr1	-69 66 157 66 89 0	-71 154 161 63 88 0	-67 161 161 -69 109 0
Pro2	-60 91 -170	-6 0 85 172	-60 -76 179
Ser3	-100 -73 -171 55 178	-86 138 -175 -60 180	-97 124 179 57 179
Tyr4	-97 149 -171 -168 64 0	-106 164 180 -59 89 0	-106 147 -179 -60 90 0
Gly5	-64 -48 -176	72 58 -178	89 -72 175
Leu6	-88 114 -178 -71 68 179 169	-97 103 -177 -52 179 -174 -179	-104 124 180 177 65 179 176
Asn7	-121 139 180 -51 103	-135 139 180 -57 100	-115 140 180 -59 95
ΔU	0 ккал/моль	0,5 ккал/моль	4,2 ккал/моль

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности φ, ψ, ω, χ<sub>1</sub>, χ<sub>2</sub>,...

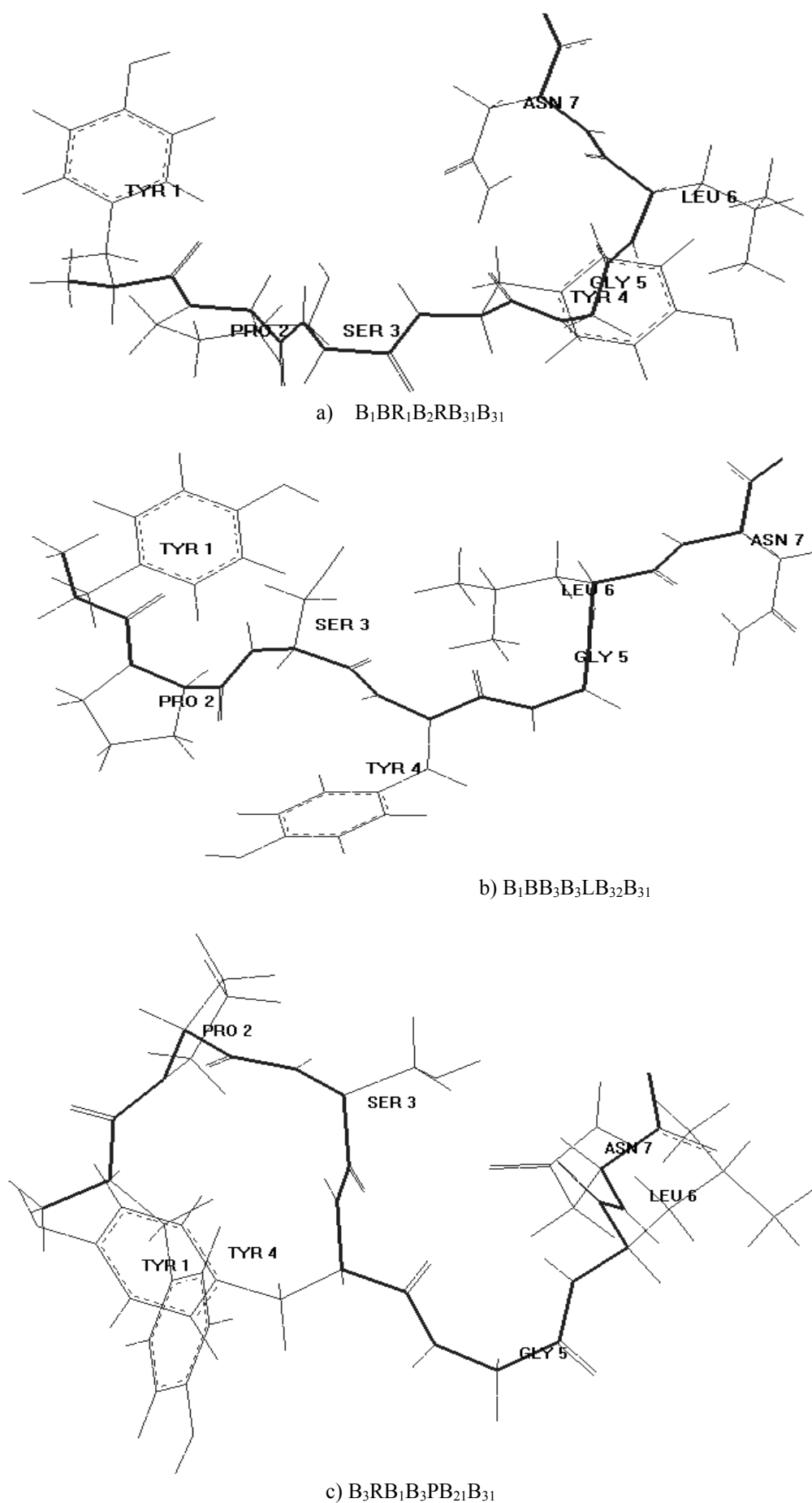


Рисунок 1. Стабильные конформации молекулы казоксина А

Эта конформация в основном стабилизируется за счет ди- и трипептидных взаимодействий. Взаимодействия Tyr1 с остальными остатками составляет (-10,9) ккал/моль, Pro2 с остатками Ser3, Tyr4 (-2,8) ккал/моль, Ser3 с остатками Tyr4-Gly5-Leu6 (-3,2) ккал/моль, Tyr4 с остатками Gly5-Leu6 (-2,7) ккал/моль, Gly5 с остатками Leu6-Asn7 (-3,3) ккал/моль (табл. 4). В этой конформации возникает водородная связь между атомом N-H Tyr1 и C=O атомом основной цепи Ser3. Шейп efe N-концевого трипептидного участка молекулы представлен тремя низкоэнергетическими формами основной цепи. Их относительная энергия изменяется в энергетическом интервале 4,2–5,2 ккал/моль (табл. 3). Эти конформации проигрывают по невалентным и электростатическим взаимодействиям. Самой стабильной конформацией этой группы является B<sub>3</sub>RB<sub>1</sub>B<sub>3</sub>PB<sub>21</sub>B<sub>31</sub> шейпа efeffe, относительная энергия которой равна 4,2 ккал/моль (табл.3). В этой конформации образуется водородная связь между C=O атомом основной цепи Ser3 и N-H атомом боковой цепи Asn7.

Таким образом, пространственную структуру молекулы казоксина А можно представить четырнадцатью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур, можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ гептапептидной молекулы казоксина А привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

#### Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46. (In Russ.)]
2. Соколов О.Ю., Кост Н. В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с.29-35. [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K., Tarakanova Yu.N., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. The possible role of casomorphins in pathogenesis of autism. *Psixiatriya*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 29-35. (In Russ.)]
3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.*, 2009, vol. 19, no. 4, pp. 258-263.
4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул β-казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная Биология*, 1989, т. 23, с. 240-248. [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of β-casomorphin, valmuceptin and morphiceptin molecules. *Molecular.Biol.*, 1989, vol. 23, pp. 240-240. (In Russ.)]
5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667. [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667. (In Russ.)]
6. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
7. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590. (In Russ.)]
8. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp.66-70.
9. Hasanov E.M., Akhmedov N.A. Spatial Structure of Peptide BAM-20P. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 2018, vol. 3, pp.72-76. ISSN: №4-2456-2165.
10. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. *Conference proceedings Modern Trends In Physics*, 2019, pp. 201-104.
11. IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford 1993.

**SPATIAL STRUCTURE OF CASOXIN A MOLECULE**  
**Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Abbasli R.M., Ismailova L.I.**  
Baku State University, Institute for Physical Problems  
Z. Khalilov Str. 23, Baku, Azerbaijan, e-mail: Namiq.49@bk.ru

**Abstract.** By the method of the theoretic conformational analysis the conformational capabilities of the Casoxin A molecule (Tyr1-Pro2-Ser3-Tyr4-Gly5-Leu6-Asn7-NH<sub>2</sub>) were studied. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valent, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. Low-energy conformations of the casoxin A molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues that make up the molecules are founded; the energy of intra- and inter-residual interactions is estimated. It is shown that the spatial structure of the casoxin A molecule can be represented by the conformations of fourteen shapes of the peptide backbone. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of casoxin molecules.

**Key words:** *exorphin, casoxin, opioid, structure, conformation.*

## ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ (ГК) НА БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЮ БИОСОВМЕСТИМОГО ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ В СИСТЕМЕ $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$

Захаров Н.А.<sup>1</sup>, Коваль Е.М.<sup>1</sup>, Орлов М.А.<sup>1</sup>, Шелехов Е.В.<sup>2</sup>, Алиев А.Д.<sup>3</sup>, Захарова Т.В.<sup>4</sup>,  
Киселёв М.Р.<sup>3</sup>, Матвеев В.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова

Ленинский просп., 31, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: zakharov@igic.ras.ru

<sup>2</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

Ленинский просп., 4, г. Москва, 119049, РФ

<sup>3</sup> Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина

Ленинский просп., 31, г. Москва, 119071, РФ

<sup>4</sup> Российский университет транспорта «МИИТ»

ул. Образцова, 9/9, г. Москва, 127994, РФ

Поступила в редакцию: 20.06.2021

**Аннотация.** Определено влияние гиалуроновой кислоты (ГК – биополимера, компонента внеклеточного матрикса, высокомолекулярного компонента, простая структура которого при эволюционном развитии не изменилась и одинакова у всех млекопитающих) на осаждение биосовместимого гидроксиапатита кальция ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ГА) в водной системе  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$  (25 °C). Синтезированные наноразмерные органоминеральные композиты (ОМК) ГА/ГК составов  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(ГК)}_x\cdot z\text{H}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1, 0,2, 0,3$ ;  $z = 5,3\text{-}10,0$  изучены методами физикохимического анализа (регнтенофазового, химического и термического анализа, инфракрасной спектроскопии), установлены фундаментальные взаимосвязи состав – структура – свойства и предложены способы направленного синтеза ОМК ГА/ГК – перспективных материалов для костных имплантатов.

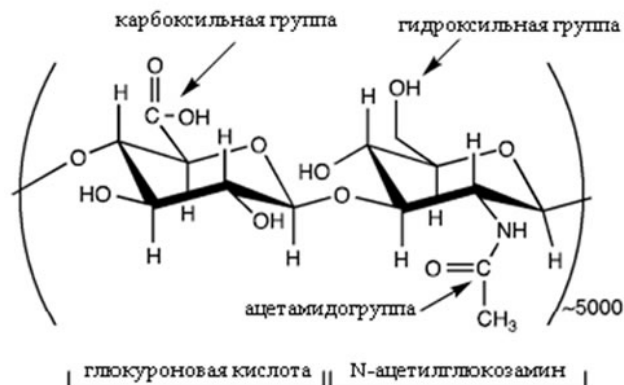
**Ключевые слова:** гидроксиапатит, гиалуроновая кислота, нанокompозит, синтез, свойства.

Создание органоминеральных композиционных материалов (ОМК) на основе биосовместимых фосфатов кальция и биополимеров является актуальным направлением разработки перспективных материалов для костных имплантатов с улучшенными характеристиками [1]. Гидроксиапатит кальция ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (ГА)) – кристаллохимический аналог неорганической компоненты костной ткани млекопитающих [2]. Он обладает характеристиками биосовместимости и биоактивности. Костная ткань, являясь природным наноразмерным ОМК, включает в свой состав биополимеры (в основном, коллаген), клетки и др. нативные ткани [3]. Моделирование состава природного ОМК – костной ткани – достигается с использованием биополимеров, позволяющих имитировать наиболее характерные свойства нативной костной ткани.

Одним из перспективных представителей подобных биополимеров является гиалуроновая кислота (ГК) [4]. ГК, компонент внеклеточного матрикса, является высокомолекулярным гликозаминогликаном, который состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и ГК (рис. 1). Эта относительно простая структура не изменилась при эволюционном развитии, и одинакова у всех млекопитающих. Это позволяет предположить, что ГК является биологической молекулой особой важности. В организме ГК присутствует в форме соли, гиалуроната, и обнаружена в высоких концентрациях в некоторых мягких соединительных тканях, в составе кожи, пуповины, синовиальной жидкости, и стекловидного тела. Значительное количество ГК найдено также в легких, почках, головном мозге, и мышечных тканях. При промышленном производстве ГК обычно экстрагируется из гребня петуха и человеческой пуповины, она производится в больших количествах путем бактериальной ферментации.

Структура ГК обеспечивает уникальные физико-химические и биологические свойства, которые находятся в зависимости от ее молекулярного веса [5]. Если экстрагировать ГК из тканей, она полидисперсна по размеру, со средним молекулярным весом в несколько миллионов. Вторичные водородные связи формируются вдоль оси ГК, обеспечивая стабильность и формируя гидрофобные участки, благодаря чему ГК организуется в упорядоченные структуры. Раствор ГК обладает высокой вязкоэластичностью, другими словами, при увеличении скорости сдвига цепи ГК выстраиваются по направлению движения, что приводит к снижению вязкости ее раствора.

Создание ОМК на основе ГА и биополимеров является актуальным направлением разработки материалов костных имплантатов с улучшенными характеристиками. Перспективным подходом для решения задачи создания ОМК на основе ГА и биополимеров является совместное осаждение солей кальция, фосфора и биополимеров из растворов различного состава. Это позволяет в ходе решения задачи синтеза ОМК найти подходы к моделированию процессов биоминерализации в ходе остеогенеза. Такие методы направленного синтеза будут способствовать созданию новых материалов с регулируемыми в ходе синтеза и последующей обработки свойствами (размер и морфология кристаллов фосфатов кальция, их растворимость, пористость, биосовместимость и др.).



**Рисунок 1.** Структура природной ГК – биополимера, состоящего из повторяющихся дисахаридов, включающих в себя N-ацетилглюкозамин и глюкуроновую кислоту. Молекулярный вес нативной ГК обычно составляет несколько миллионов. Каждый дисахаридный мономер ГК содержит три возможных участка для модификации: гидроксильную, карбоксильную группы и ацетиамидогруппу

Сообщается о разработке метода направленного синтеза ОМК ГА/ГК из водных растворов  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$  ( $25^\circ\text{C}$ ), получении наноразмерных ОМК ГА/ГК, содержащих 0,1, 0,2, 0,3 масс. % ГК, идентификации продуктов синтеза методами физикохимического анализа, анализе взаимосвязей состав – условия синтеза – структура – дисперсность – свойства полученных ОМК ГА/ГК составов  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(ГК)}_x\cdot z\text{H}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1, 0,2, 0,3$ ;  $z = 5,3\text{--}10,0$  с регулируемые в ходе синтеза и последующей обработки размером и морфологией нанокристаллов ГА (НКГА).

В качестве исходных реактивов для синтеза ОМК ГА/ГК использовали водные растворы  $\text{CaCl}_2$  (ЧДА),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Ч), аммиака, 1% водный раствор ГК (ЗАО «Эвалар») и дистиллированную воду. Процедура синтеза ОМК ГА/ГК в системах  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$  ( $25^\circ\text{C}$ ), выбранные значения pH и соотношений  $\text{CaCl}_2/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в исходных смесях соответствовали установленным ранее [6] оптимальным условиям образования ГА. В ходе изучения водных систем  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-NH}_3\text{-[C}_6\text{H}_7\text{KO}_6\text{]}_n\text{-H}_2\text{O}$  соблюдались условия, при которых содержание  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  во всех пробах составляло 0,05 моль/л; в исходных смесях отношение компонентов выдерживалось равным  $n_1 = \text{CaCl}_2/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 = 1,67$ ; значение pH поддерживалась в пределах 10–10,5; концентрация ГК находилась в области 0,001 – 0,003 моль/л, что соответствует отношению  $n_2 = \text{ГК} / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 = 0,1\text{--}0,3$ . В ходе синтеза раствор АК добавляли в последнюю очередь, суммарный объем реагирующих смесей составлял в ходе экспериментов 200 мл, перемешивание происходило в продолжение 14 суток магнитной мешалкой при комнатной температуре.

По окончании реакции синтеза в равновесных жидких фазах проводили измерение pH (прибор pH121). С целью установления химического состава твердых продуктов синтеза определяли содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (комплексометрический метод вытеснения в комбинации с комплексонатом цинка с эриохромом черным Т в качестве индикатора [7]) и  $\text{PO}_4^{3-}$  (весовой хинолинмолибдатный метод) для установления соотношения  $n_3 = \text{Ca}^{2+} / \text{PO}_4^{3-}$  в образовавшихся твердых фазах. После декантации жидкой фазы образовавшийся осадок отфильтровали, промывали дистиллированной водой до полного удаления ионов хлора и сушили на воздухе при комнатной температуре с целью получения образцов для физико-химического анализа.

Определение фазового состава, кристаллической структуры и морфологии НКГА порошкообразных образцов проводили с использованием рентгеновского дифрактометра ДРОН-4 ( $\text{Cu-K}\alpha$  излучение; режим пошагового сканирования с шагом 0,1 град. и временем экспозиции 3с), сфокусированного по Бреггу-Бретано [8], с графитовым монохроматором на дифрагированном пучке, управляемым с помощью программы EXPRESS. Измерения проводили на  $\text{Cu-K}\alpha$  излучении в режиме пошагового сканирования с шагом 0,1 град.; время экспозиции на одну точку составляло 3 с. Для анализа использованы программы PHAN и PHAN% (модифицированный полнопрофильный анализ с оценкой размер блоков Коши и величин микродеформаций решеток; банк данных с карточками в формате JCPDS [9]).

Инфракрасные спектры ИКС диффузного отражения продуктов синтеза регистрировали в диапазоне  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  с шагом сканирования  $1\text{ см}^{-1}$  (ИК-Фурье спектрометр Nexus (фирмы Nicolet, США, образцы в виде спрессованных дисков смеси продуктов синтеза с KBr). Термический анализ образцов (ТГА, ДТА) проводили с помощью термоанализатора NETZSCH Simultaneous Thermal Analyzer STA 409 на воздухе в интервале температур  $20\text{--}1000^\circ\text{C}$  (скорость нагрева 10 град/мин, масса навески 5–20 мг). Морфологию поверхности образцов ОМК изучали с использованием микроскопа CamScanS4; рентгеновский микроанализ (ЭСХА) был выполнен с помощью энергодисперсионного микроанализатора Link Analytical (ток пучка  $10^{-10}\text{ А}$ ). Наблюдение наноструктуры образцов проводили методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием электронного микроскопа JEOL JEM 1210.

Результаты химического анализа методом остаточных концентраций и измерения pH (табл. 1)

**Таблица 1.** Остаточные концентрации, состав продуктов синтеза и pH в системе  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-NH}_3\text{-ГК-H}_2\text{O}$  (25°C)

№ п/п	pH	Найдено в растворе, г-ион/л		Потери вес *, масс. %	Брутто-формула
		$\text{Ca}^{2+}$	$\text{PO}_4^{3-}$		
1	9,6	отсутст.	отсутст.	16,10	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0.1 \text{ ГК} \cdot 10.6 \text{ H}_2\text{O}$
2	10,5	-	-	22,09	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0.2 \text{ 0.1 ГК} \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$
3	10,2	-	-	19,08	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0.3 \text{ 0.1 ГК} \cdot 17 \text{ H}_2\text{O}$

\* Потери веса после обжига продуктов синтеза (1000 °C, 1 ч).

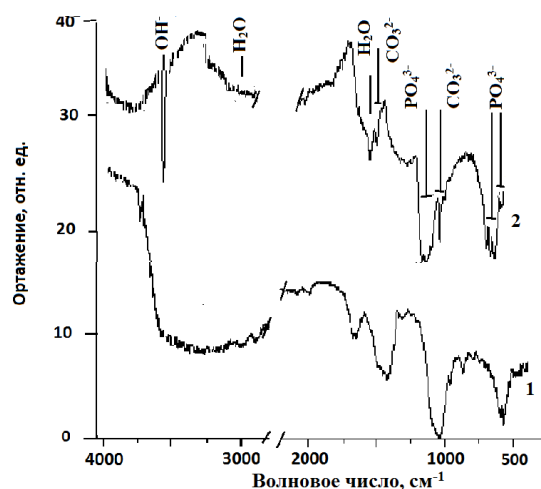
свидетельствуют о практически полном взаимодействии исходных прекурсоров в продолжение выбранного времени (14 суток) синтеза, незначительном (на уровне погрешности эксперимента) содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  в образующейся после отстаивания образовавшегося продукта синтеза жидкой фазе.

Рассчитанные отношения  $n_4 = \text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$  в твердых фазах при выбранных условиях синтеза ( $n_1 = 1,67$ ; pH 10–10,2 и времени перемешивания 14 суток) во всех проанализированных случаях составляли 1,67, что соответствует образованию фосфатов кальция со структурой ГА и стехиометрическим отношением (1,67) Са/Р. На основании результатов химического анализа можно сделать вывод об образовании в ходе синтеза ОМК ГА/АК составов  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(ГК)}_x\text{-zH}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1, 0,2, 0,3$ ;  $z = 5,3\text{--}10,0$ .

ИК спектры продуктов синтеза (рис. 2) характеризуются типичными для ГА полосами валентных (в области 1093, 1038 и 963  $\text{cm}^{-1}$ ) и деформационных (603, 567  $\text{cm}^{-1}$ ) колебаний группировок  $\text{PO}_4^{3-}$ . Деформационные колебания  $\text{PO}_4^{3-}$  проявляются в колебательном спектре поглощения при 604, 566, 470  $\text{cm}^{-1}$ . Полоса  $\nu(\text{OH})$  в области 3570  $\text{cm}^{-1}$ , как и в спектрах нативных апатитов [2], характеризуется незначительной интенсивностью, относительная величина которой возрастает после термической обработки синтезированных образцов. Фон в области 3500–2900  $\text{cm}^{-1}$  и полоса деформационных колебаний Н–О–Н приблизительно при 1671  $\text{cm}^{-1}$  (рис. 2) обусловлены высокой адсорбционной способностью развитой поверхности НГА в составе ОМК.

Полосы поглощения карбоната в составе ОМК фиксировались приблизительно в области 1500, 1458, 1420 и 875  $\text{cm}^{-1}$ . Сравнение полос поглощения для ОМК, полученных в настоящей работе, с литературными данными для иных типов апатитов [2] позволяет сделать вывод о преимущественном замещении  $\text{OH}^-$ -групп апатита ионами карбоната и свидетельствует об образовании в ходе синтеза НКГА преимущественно с А – типом замещений (т.е. замещение  $\text{OH}^-$  – групп). Ввиду незначительного содержания ГК в составе ОМК ГК/АК его спектральные характеристики не сказывались существенным образом на колебательных спектрах ОМК. Это, как правило, характерно и для ОМК на основе ГА и биополимеров иного состава при сопоставимом содержании последний в составе ОМК.

Синтезированные в составе ОМК ГА/АК апатиты по данным РФА (табл. 2) характеризовались как однородные твердые фазы на основе ГА (пр. гр. Р6<sub>3</sub>/m). Условия синтеза обеспечивали отсутствие в продуктах синтеза посторонних фаз ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ ), свидетельствуя о полном прохождении реакции.



**Рисунок 2.** ИК спектры отражения: 1 –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(ГК)}_x\text{-zH}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1$ ,  $z = 5,3$  и 2 – того же образца, подвергнутого термическому воздействию (1000°C, 1ч)

**Таблица 2.** Кристаллографические и морфологические характеристики НКГА в составе ОМК ГА/ГК

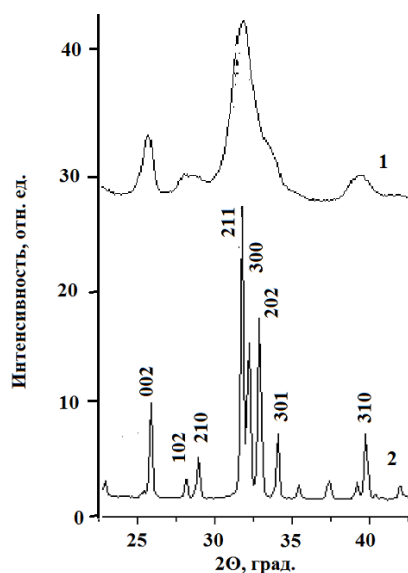
ГК, масс. %	Брутто-формула	Параметры элементарной ячейки, Å		Размер блока Коши, нм	
		<i>a</i>	<i>c</i>	$\parallel c$	$\perp c$
0,1	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,1$ ГК $\cdot 10,6\text{H}_2\text{O}$	9,42423	6,87745	14,7	8,9
0,2	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,2$ 0,1 ГК $\cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9,41899	6,87499	14,2	9,0
0,3	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,3$ 0,1 ГК $\cdot 17\text{H}_2\text{O}$	9,41964	6,87450	13,1	7,1

Уширение дифракционных линий (рис. 3) свидетельствует о вхождении НГА в состав ОМК ГА/АК. Термическая обработка также не приводила к образованию посторонних фаз, увеличивая, в то же время, степень кристалличности ГА и улучшая разрешение его дифракционных линий (рис. 3). Параметры элементарных ячеек НГА в составе ОМК ГА/АК находятся в удовлетворительном соответствии с данными JCPDS (№ 9-432) [9]. НКГА удлинены вдоль оси гексагональной *c* и имеют размеры и кристаллографические характеристики, близкие к таковым для НКГА нативной кости [10] (табл. 2) и некоторых композитов на основе ГА [11,12].

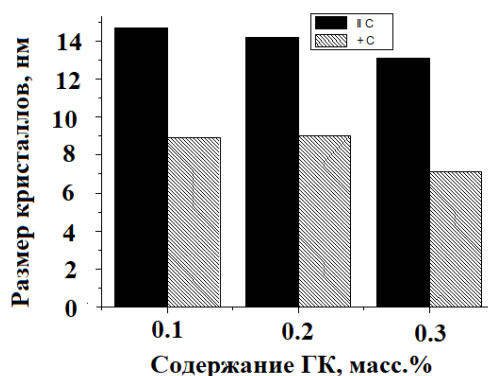
Увеличение содержания ГК в составе ОМК ГА/АК даже в незначительных количествах (0,1–0,3) сопровождалось ощутимым удлинением НКГА вдоль гексагональной оси *c* (рис. 4). При этом их толщина в направлении, перпендикулярном оси *c*, изменялась незначительным образом. Рост содержания АК сопровождался небольшим уменьшением параметра *c* и незначительным ростом параметра *a* элементарной ячейки НКГА (табл. 2).

Кривые термического разложения исходного ОМК ГА/АК состава  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,2\text{ГК} \cdot 8,3\text{H}_2\text{O}$  (рис. 5) характеризуются на начальном этапе потерей веса в области 100 °С (~3,5%), связанной с выделением адсорбированной воды. В области более высоких температур (~200–400 °С) происходило выгорание органической компоненты и дальнейшее обезвоживание с потерей веса (от начального его значения) порядка ~10%. Температура ~700 °С соответствует началу декарбонизации образца, в ходе которой при температуре 941,3 °С потери веса составили 16,12 масс.% (рис. 5).

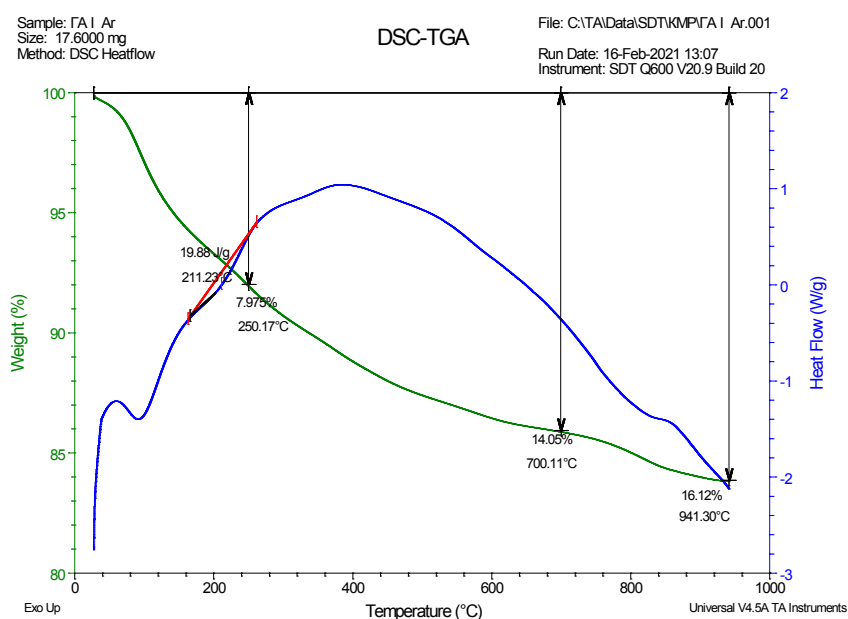
Как видно (рис. 5) образцы ОМК ГК/ГА способны сохранять состав неизменным только до температур, незначительно превышающих 100 °С, что следует принимать во внимание при необходимости термической обработки таких продуктов синтеза.

**Рисунок 3.** Дифрактограммы: 1 –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot (\text{ГК})_x \cdot z\text{H}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1$ ,  $z = 5,3$  и 2 – того же образца, подвергнутого термическому воздействию (1000°C, 1 ч)





**Рисунок 4.** Морфологические характеристики НКГА в составе ОМК ГА/АК с содержанием 0,1 (1), 0,2 (2), 0,3 (3) масс. % ГК



**Рисунок 5.** Зависимость ТГА и ДСК образца ОМК ГА/АК состава  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 0,2\text{ГК} \cdot 8,3\text{H}_2\text{O}$

Полученные зависимости позволяют сделать следующие выводы.

1. Разработанный подход позволяет реализовать направленный синтез ОМК ГА/ГК из водных растворов  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$  (25°C) и получение наноразмерных ОМК ГА/ГК составов  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(ГК)}_x \cdot z\text{H}_2\text{O}$ , где  $x = 0,1, 0,2, 0,3$ ;  $z = 5,3\text{--}10,0$ .

2. Результаты физико-химического анализа (химический, РФА анализы, ИКС, ДТГ, ДТА) промежуточных продуктов и продуктов синтеза позволили установить фундаментальные взаимосвязи состав – условия синтеза – структура – дисперсность – свойства полученных ОМК ГА/ГК и установить влияние состава и особенностей синтеза на размер и морфологию НКГА в составе ОМК.

3. Полученные результаты лягут в основу моделирования *in vitro* широко используемого в настоящее время препарата ГК с материалами, моделирующими состав и свойства нативной костной ткани (НКГА) и могут быть использованы для создания материалов костных имплантатов с улучшенными характеристиками, моделирующими состав и свойства нативной костной ткани.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Работа выполнена в рамках государственного задания ИОХ РАН в области фундаментальных научных исследований.*

#### Список литературы / References:

1. Dorozhkin S.V. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. *BIO*, 2011, vol. 1, pp. 1-51. DOI: 10.5618/bio.2011.v1.n1.1.
2. Elliot J.C. *Structure, chemistry of apatites and other calcium orthophosphates*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994, 350 p.

3. Касавина Б.С., Торбенко В.П. *Жизнь костной ткани*. 2-е изд. М.: Наука, 1979, 176 с. [Kasavina B.S., Torbenko V.P. *The live of bone tissue*. 2-edich. M.: Science, 1979, 176 p. (In Russ.)]
4. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. *Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине*. М.: Практическая медицина, 2012, 224 с. [Khabarov V.N., Boikov P.J., Seljanin M.A. *Hyaluronic acid: preparing, properties, application in biology and medicine*. M.: Practical Medicine, 2012, 224 p. (In Russ.)]
5. Хабаров В.Н. *Биохимия гиалуроновой кислоты*. М.: Тисо Принт, 2016, 292 с. [Khabarov V.N. *Biochemy of hyaluronic acis*. M.: Tiso Print, 2016, 292 p. (In Russ.)]
6. Орловский В.П., Родичева Г.В., Ежова Ж.А., Коваль Е.М., Суханова Г.Е. Изучение условий образования гидроксиапатита в системе  $\text{CaCl}_2 - (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - \text{NH}_4\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  (25 °C). *Журн. неорг. химии*, 1992, т. 37, № 4, с. 881-883. [Orlovskii V.P., Rodicheva G.V., Ejova J.A., Koval E.M., Sukhanova G.E. The study of formation of hydroxyapatite in system  $\text{CaCl}_2 - (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - \text{NH}_4\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  (25 °C). *J. Inorg. Chem.*, 1992, vol. 37, no. 4, pp. 881-883. (In Russ.)]
7. Шварценбах Г., Флашка Г. *Комплексонометрическое титрование*. М.: Химия, 1970. с. 172. [Shvartsenbach G., Flashka G. *Kompleksonometric titration*. M.: Chmistry, 1970, p. 172. (In Russ.)]
8. Горелик С.С., Скаков Ю.А., Расторгуев Л.Н. *Рентгенографический и электронно-оптический анализ*. М.: «МИСиС», 2002, 360 с. [Gorelik S.S., Skakov Ju.A., Rastorguev L.N. *Rentgenographycal and electronno-optical analysis*. M.: "MISiS", 2002, 360 p. (In Russ.)]
9. Powder diffraction file (inorganic phases). Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) File № 9-432, International Centre of Diffraction Data, Newton Square, PA, 1980.
10. Hench L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *J. Amer. Ceram. Soc.*, 1991, vol. 74, no. 7, p. 1487-1510.
11. Захаров Н.А., Бокарев В.П., Горнев Е.С., Нечипоренко А.П. Влияние углеродных нанотрубок на кристаллизацию и свойства наноразмерного гидроксиапатита кальция. *Электронная техника. Серия 3: Миколэлектроника*, 2019, № 1 (173), с. 55-60. [Zakharov N.A., Bokarev V.P., Gornev E.S., Nechiporenko A.P. The carbon nanotubes influence on crystallization and properties of nanosized calcium hydroxyapatite. *Eltctronic Technik. Part 3: Microelectronics*, 2019, № 1 (173), pp. 55-60. (In Russ.)]
12. Захаров Н.А., Бокарев В.П., Горнев Е.С., Нечипоренко А.П., Матвеев В.В., Алиев А.Д., Киселев М.Р., Шелехов Е.В., Коваль Е.М., Захарова Т.В., Орлов М.А. Влияние оксида графена на кристаллизацию и свойства наноразмерного гидроксиапатита кальция. *Электронная техника. Серия 3: Миколэлектроника*, 2019, № 3 (179), с. 46-51. [Zakharov N.A., Bokarev V.P., Gornev E.S., Nechiporenko A.P., Matveev V.V., Aliev A.D., Kiselev M.R., Shelichov E.V., Koval E.M., Zakharova T.V., Orlov M.A. The graphene oxyde influence on crystallization and properties of nanosized calcium hydroxyapatite. *Eltctronic Technik. Part 3: Microelectronics*, 2019, no. 3 (179), pp. 46-51. (In Russ.)]

**HYALURONIC ACID (Ha) EFFECT SINGULARIES ON BIMINERALIZATION CALCIUM  
HYDROXYAPATITE (HA) IN SYSTEM  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$**   
**Zakharov N.A.<sup>1</sup>, Koval E.M.<sup>1</sup>, Orlod M.A.<sup>1</sup>, Shelichov E.V.<sup>2</sup>, Aliev A.D.<sup>3</sup>, Zakharova T.V.<sup>4</sup>, Kiselev M.R.<sup>3</sup>,  
Matveev V.V.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Kurnakov Institute of Gentral and Inorganic Chemistry  
*Lininsky prosp., 31, Moscow, 119991, Russia; e-mail: zakharov@igic.ras.ru*

<sup>2</sup> NITU «MISiS»

*Lininsky prosp., 4, Moscow, 119991, Russia*

<sup>3</sup> Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry  
*Lininsky prosp., 31, Moscow, 119071, Russia F*

<sup>4</sup> Russian University of Transport «MIIT»

*Obraztsova st., 9/9, Moscow, 127994, Russia*

**Abstract.** Hyaluronic acid (Ha – biopolymer, the component of cell matrix, highemolecular component, which simple structure do not changes and identical for all mammals) influence on calcium hydroxyapatite precipitation ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA) in water system  $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-Ha-H}_2\text{O}$  (25 °C) estimated. Manufactured nanosized organomineral composited (OMC) HA/Ha with compositions  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-(Ha)}_x\cdot z\text{H}_2\text{O}$ ,  $x = 0.1, 0.2, 0.3$ ;  $z = 5.3\text{-}10.0$  with physical and chemical methods (X-ray, chemical and thermal analysis, infrared spectroscopy) studied, the fundamental couplings composition – structure – properties estimated and directed synthesis methods for OMC HA/Ha (prospective materials for bone implants) was proposed.

**Key words:** *hydroxyapatite, hyaluronic acid, nanocomposute, synthesis, properties.*

## ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕ КРАСИТЕЛЯ ЛАЗУРНОГО С В ВОДНОМ РАСТВОРЕ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Костюкова Л.О.<sup>1</sup>, Воронин Д.П.<sup>2</sup>, Рыбакова К.А.<sup>2</sup>, Савченко Е.В.<sup>2</sup>, Костюков В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Черноморское высшее военно-морское училище им. П.С. Нахимова

ул. Дыбенко, 1а, г. Севастополь, 299028, РФ

<sup>2</sup> Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 25.06.2021

**Аннотация.** При помощи нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) на уровне X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD вычислен вибранный спектр поглощения тиазинового красителя лазурного С (Azure С, АС) в водном растворе. Данное исследование является логическим продолжением опубликованной ранее работы [L.O. Kostjukova et al. Theor. Chem. Acc. 140 (2021) 114], в которой водное окружение АС задавалось неявно в приближении сплошной среды при помощи модели SMD. В настоящей работе использовалось комбинированное задание водного окружения: явным образом описывались четыре молекулы воды, образующие сильные водородные связи с молекулой красителя; остальная водная среда задавалась неявно, также методом SMD. Данный подход применялся с целью выяснения влияния сайт-специфических взаимодействий с растворителем как на основное, так и на возбужденное состояние молекулы красителя, и на переход между ними (сольватохромизм). Представляло интерес также и обратное влияние возбуждения молекулы АС на ее ближайшую гидратную оболочку. Расчеты показали, что имеет место усиление этих Н-связей при фотовозбуждении красителя. При этом максимум вибранный спектр поглощения АС испытывает батохромный сдвиг на 13 нм. Данные результаты проанализированы с точки зрения сольватохромной теории. Построены граничные молекулярные орбитали, между которыми происходит электронный переход, карты распределения электронной плотности и электростатического потенциала основного и возбужденного состояний системы «АС+4Н<sub>2</sub>О». Выполнен анализ фотоиндуцированной поляризации молекулы красителя.

**Ключевые слова:** лазурный С, водный раствор, возбужденное состояние, вибранный спектр поглощения, сольватохромизм, водородная связь, нестационарная теория функционала плотности.

### ВВЕДЕНИЕ

Лазурный С (3-(метиламино)фенотиазин, АС, рис. 1) – тиазиновый краситель, используемый в биологии и медицине для окрашивания клеток [1,2], в солнечных [3,4] и электрохимических [5,6] батареях, а также для спектрофотометрического определения микрограммовых количеств растворенных веществ [7,8].

Оптическими методами было обнаружено, что молекула АС способна нековалентно связываться с различными молекулярными системами: белками [9], глинами [10], наночастицами золота [11,12], пенициллином [7] и сахаринном [8]. Проведены экспериментальные оптические исследования самого АС - агрегации [13,14], деградации [15,16], триплетных состояний [17], флуоресценции [18], оптической плотности в растворах [13,14,17,19]. В то же время теоретические исследования электронно-оптических свойств переменного тока в литературе до последнего времени отсутствовали. Спектр поглощения АС не был получен теоретически. В частности, спорным моментом являлся характер узкого коротковолнового плеча ( $\lambda_{\text{shoulder}} \approx 580$  нм) в спектре поглощения водных растворов АС. Некоторые авторы традиционно считают, что это плечо связано с поглощением димеров [14]. Действительно, АС имеет высокое значение константы димеризации  $K_d \approx 2350$  в водной среде [13]. Однако в спектрах сильно разбавленных растворов красителей, где наблюдается плечо, доля димеров незначительна. Использование димерной концепции для объяснения природы плеча приводит к завышению расчетного максимума длины волны (624 нм) в спектрофотометрически разрешенном спектре мономера [14] по сравнению с экспериментальным пиком поглощения с  $\lambda_{\text{max}} \approx 620$  нм для разбавленных водных растворов АС [11,13,17].

В недавней работе [20] нами впервые был вычислен вибранный спектр поглощения АС в водном растворе, хорошо совпавший с экспериментальным по положениям главного максимума и плеча. Поскольку АС, как и остальные тиазиновые красители, относятся к классу цианинов (т.е. содержат углеродную цепь с атомами азота

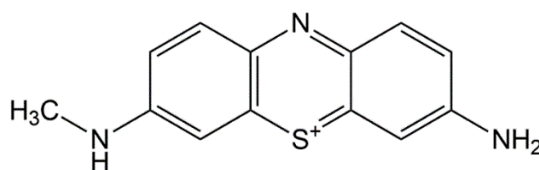


Рисунок 1. Химическая структура АС

на обоих концах), для них характерна т.н. «цианиновая проблема», заключающаяся в систематической недооценке расчетных длин волн максимумов поглощения при использовании TD-DFT с моделью растворителя PCM (Polarizable Continuum Model). Однако в [20] было показано, что использование модели SMD [21] вместо PCM позволяет преодолеть это затруднение (впервые этот подход был использован другими авторами [22] для оксазиновых красителей). Наилучшее совпадение расчетного спектра с экспериментальным продемонстрировал функционал X3LYP [23]. Однако влияние сайт-специфических взаимодействий (водородных связей) с водным окружением в [20] на возбуждение молекулы красителя осталась невыясненным, поскольку использованная в этой работе модель сплошной среды позволяет усредненно учесть лишь соответствующие диполь-дипольные взаимодействия. Вместе с тем, известно, что это влияние в целом на органические молекулы существенно [24,25]. Важно также и обратное влияние возбуждения молекулы красителя на ее Н-связи с растворителем. В настоящей работе этот анализ выполнен путем комбинированного задания растворителя: четыре молекулы воды, образующие сильные Н-связи с молекулой АС, задаются явно (см. рис. 3), а остальное водное окружение – неявно, при помощи модели SMD.

## ТЕОРИЯ И МЕТОДИКА

При поглощении фотона изменяется как электронная, так и колебательная энергия молекулы растворенного вещества, т.е. в ней происходит вибранный переход (рис. 2).

Согласно принципу Франка-Кондона [26], электронный переход от основного (GS) к возбужденному (ES) состоянию происходит при постоянных координатах ядер растворенной молекулы, а также ядер ближайшей сольватной оболочки (вертикальный переход  $E_{\text{vert}}$  на рис. 2). В этом случае молекула находится в возбужденном неравновесном (франк-кондоновском, FC) состоянии. Эта неравновесность приводит к активации колебательных уровней энергии (зеленая волна на рис. 2). Поскольку последние подчиняются распределению Больцмана, происходит множество переходов с различных колебательных уровней основного электронного состояния на различные колебательные уровни электронно-возбужденного состояния.

Для расчета вибранных спектров однофотонного поглощения использовался обобщенный подход [27], реализованный в программном пакете Gaussian16. Этот метод представляет собой нестационарное обобщение стационарной вибранный спектроскопии, в которой интенсивность вибранный перехода рассчитывается как

$$I = \alpha \omega \sum_m \sum_n \rho_m \mu_{mn}^2 \delta \left( \frac{E_n - E_m}{\hbar} - \omega \right), \quad (1)$$

где  $\alpha = \frac{10\pi N_A}{3\epsilon_0 \ln(10)\hbar c}$ ,  $\omega$  – частота поглощенного фотона, суммирование ведется по всем  $m$  колебательным уровням основного состояния и  $n$  колебательным уровням возбужденного состояния,  $\rho_m$  – больцмановская заселенность колебательных уровней основного состояния,  $\mu_{mn}$  – дипольный момент перехода,  $\delta$  – функция распределения Дирака.

Основная проблема (1) заключается в том, что аналитическое выражение для  $\mu_{mn}$  остается неизвестным. Поэтому на практике используется ряд Тейлора вблизи равновесной геометрии основного электронного состояния:

$$\mu_{mn}(\mathbf{Q}) = \mu_{mn}(\mathbf{Q}_{\text{GS}}) + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial \mu_{mn}}{\partial Q_i} \right)_0 Q_i + \dots, \quad (2)$$

где  $\mathbf{Q}$  – нормальные координаты, взвешенные по массе. Член нулевого порядка в (2) соответствует приближению Франка-Кондона (сильные разрешенные переходы) [26] и поправке первого порядка к подходу Герцберга-Теллера (слабые запрещенные переходы) [28]. В настоящей работе для расчета вибранных спектров использовался общий метод Франка-Кондона-Герцберга-Теллера [29].

Расчет электронно-колебательных спектров требует вычисления интегралов перекрытия, которые зависят от нормальных колебательных мод основного и возбужденного состояний. Для интегрирования используется линейное преобразование Душинского [30]:

$$\mathbf{Q}_{\text{GS}} = \mathbf{J}\mathbf{Q}_{\text{ES}} + \mathbf{K}, \quad (3)$$

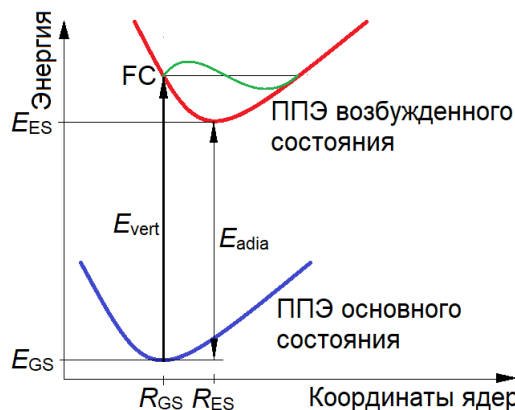


Рисунок 2. Энергетическая диаграмма вибранный перехода

где  $J$  – матрица Душинского,  $K$  – вектор сдвига. Выражения для  $J$  и  $K$  зависят от модели электронного перехода (адиабатический или вертикальный) и уровня аппроксимации (считаются ли ППЭ основного и возбужденного состояний одинаковыми (рис. 2) или нет).

Переход от нестационарного подхода к стационарному осуществляется путем замены суммирования по состояниям интегрированием по времени. Для этого функция распределения Дирака  $\delta$  в (1) заменяется выражением  $\delta = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\omega t} dt$ . В конечном итоге спектр поглощения вычисляется как преобразование Фурье следа экспоненциального оператора:

$$I = \alpha' \omega \int_{-\infty}^{+\infty} \chi(t) e^{i(\omega_{\text{adia}} - \omega)t} dt, \quad (4)$$

где  $\alpha' = \frac{\alpha}{Z}$ ,  $Z = \prod_{i=1}^N \left[ 2 \sinh \left( \frac{\hbar \omega_i}{2k_B T} \right) \right]^{-1}$  – полная больцмановская населенность колебательных уровней основного состояния,  $\omega_{\text{adia}} = \frac{E_{\text{adia}}}{\hbar}$ ,  $E_{\text{adia}}$  – адиабатическая энергия (разность энергий основных колебательных состояний основного состояния), и возбужденные электронные состояния, рис. 2),  $\chi(t)$  – колебательная волновая функция. Моделировалась температура  $T=298$  К. Для численного интегрирования (4) использовались  $2^{18}$  шагов и временной интервал  $\Delta t = 2^{18} \times 10^{-17} = 2,62 \times 10^{-12}$  с. Для уширения полос использовались гауссианы с полушириной на полувысоте  $\text{HWHM} = 400$   $\text{см}^{-1}$ , которая выбиралась таким образом, чтобы расчетный спектр лучше всего соответствовал экспериментальному.

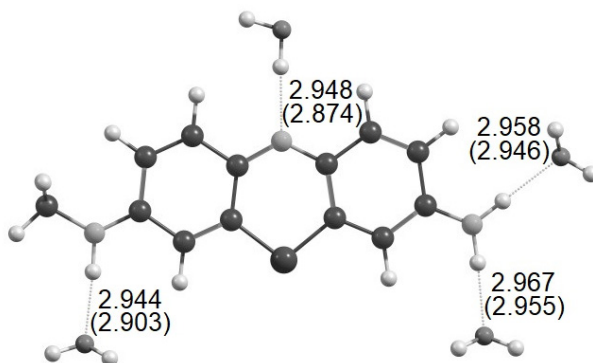
Спектр рассчитывался с использованием модели адиабатического гессиана, в которой основное и возбужденное состояния рассматриваются с одним основанием, а гармонические ППЭ рассчитываются вблизи их равновесной геометрии ( $R_{\text{GS}}$  и  $R_{\text{ES}}$ , соответственно, на рис. 2). Первые производные электронных моментов перехода по координатам  $\frac{\partial \mu_{mn}}{\partial Q_i}$  рассчитывались численно. Матрицы силовых констант рассчитывались из аналитических градиентов. Использовался базисный набор Поупла 6-31++G(d,p). Визуализация расчетных структур, электронной плотности и электростатических потенциалов проводилась с помощью программы Gaussview.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетная структура комплекса «АС+4H<sub>2</sub>O» представлена на рисунке 3. Согласно нашим расчетам, водородные связи АС с водой в возбужденном состоянии сильнее, чем в основном, что проявляется в их укорочении. Явление усиления водородных связей с растворителем при фотовозбуждении различных органических молекул было впервые обнаружено Zhao и Nan (см., например, [24]).

Вибронный спектр поглощения системы «АС+4H<sub>2</sub>O» показан на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, расчетный максимум поглощения находится на  $\lambda_{\text{vibron}} = 633$  нм, в то время как экспериментальный спектр имеет  $\lambda_{\text{max}} = 620$  нм. Эта же величина была также получена нами теоретически в [20] для одиночной молекулы АС на том же уровне теории X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD. При этом форма спектра остается практически такой же. В частности, у спектра сохраняется коротковолновое плечо, обусловленное вибранными переходами № 8...10 (табл. 1). Таким образом, четыре сильные водородные связи молекулы красителя с его ближайшей гидратной оболочкой вызывают длинноволновый (батохромный сдвиг) максимума поглощения на 13 нм. Эта закономерность имела место при расчете энергий вертикальных переходов профлавина в воде [25]. Ее можно объяснить следующим образом. Поскольку энергия взаимодействия с молекулами воды для АС в возбужденном состоянии больше, чем в основном, ППЭ возбужденного состояния расположена ниже, чем при неявном задании водного окружения (рис. 2). Сближение ППЭ основного и возбужденного состояний приводит к уменьшению значений  $E_{\text{adia}}$  и  $E_{\text{vert}}$  и, как следствие, к увеличению  $\lambda_{\text{vibron}}$ .



**Рисунок 3.** Расчетная структура гидратного комплекса АС с четырьмя молекулами воды. Прочные водородные связи показаны пунктирными линиями. Их длины в Å (расстояния между тяжелыми атомами) указаны для основного и равновесного возбужденного (в скобках) состояний







Рисунок 6. Матрица Душинского для системы «АС+4Н<sub>2</sub>О»

Из рисунка 5 видно, что электронное возбуждение гидратного комплекса существенно влияет на его колебания: значительно возрастает их интенсивность в целом, некоторые из них смещаются по частоте. Эти изменения можно наглядно показать при помощи матрицы Душинского (рис. 6). Количество атомов в системе «АС+4Н<sub>2</sub>О» составляет 41, соответственно, число нормальных мод колебаний  $N=3 \times 41 - 6 = 117$ .

Как и в случае одиночной молекулы АС в неявно заданной водной среде [20], полоса поглощения комплекса «АС+4Н<sub>2</sub>О» в видимой области соответствует синглет-синглетному переходу HOMO→LUMO. Комплекс содержит 166 электронов и, соответственно, 83 занятых молекулярных орбитали (МО). При этом МО №83 является HOMO, а МО №84 – LUMO (рис. 6). Однако, в целом, добавление сильно связанных молекул воды не изменяет существенно конфигураций данных граничных МО. Сумма франк-кондоновских факторов составила 99,85 %, следовательно, вкладом Герцберга-Теллера из (2) можно пренебречь.

При этом два других электронных перехода в видимой области спектра имеют очень малые силы осциллятора  $f$ , и поэтому практически не вносят вклада в спектр поглощения (табл. 2).

Изменение  $\Delta\rho$  электронной плотности при возбуждении гидратного комплекса (рис. 8) показывает, что фотоиндуцированный перенос заряда имеет весьма сложный характер, и затрагивает практически всю молекулу красителя – как хромофор, так и боковые группы. Однако наибольшее перераспределение заряда все же происходит в центральном кольце хромофора. Интересно отметить, что из четырех сильно связанных с красителем молекул воды заметная поляризация при фотовозбуждении АС имеет место только для одной – образующей водородную связь с гетероциклическим атомом кислорода О9 в центральном кольце хромофора (рис. 8 сверху). Данный атом претерпевает значительное изменение электронной плотности.

Карта распределения электростатического потенциала по ван-дер-ваальсовской поверхности гидратного комплекса в равновесном возбужденном состоянии показана на рисунке 9. Из нее следует, что при фотовозбуждении положительный заряд системы локализован на ее боковых кольцах и связанных с боковыми группами молекулах воды, а отрицательный – на центральном кольце и связанной с ним молекулой воды.

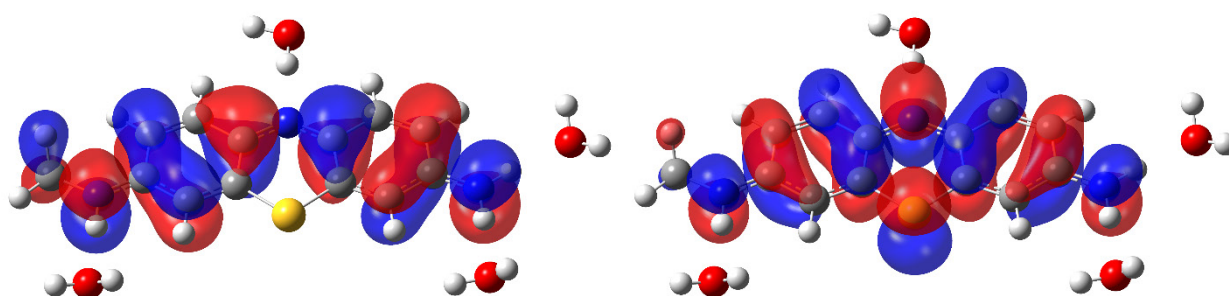
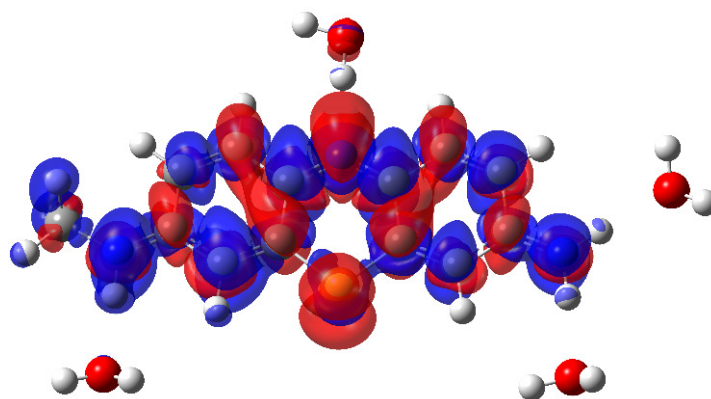


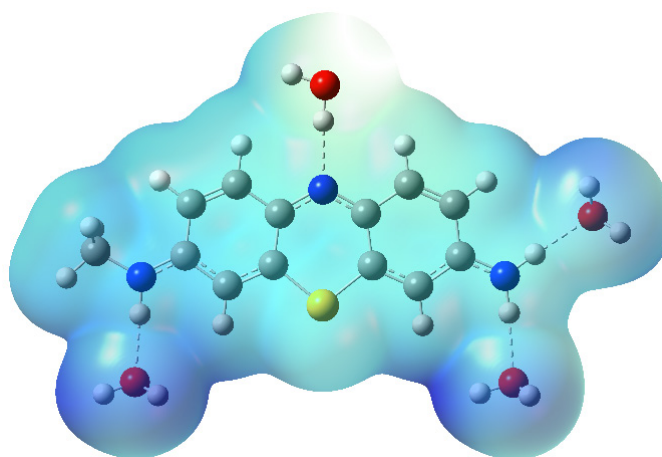
Рисунок 7. Граничные МО системы «АС+4Н<sub>2</sub>О», между которыми происходит рассматриваемый электронный переход: HOMO (слева) и LUMO (справа)

Таблица 2. Три наиболее низкоэнергетичных электронных перехода в системе «АС+4Н<sub>2</sub>О»

№	Переход	$\lambda_{\text{vert}}$ , нм	$E_{\text{vert}}$ , эВ	$f$	Задействованные МО
1	$S_0 \rightarrow S_1$	599	2,07	1,36	HOMO→LUMO
2	$S_0 \rightarrow S_2$	489	2,53	0,0236	(HOMO-1)→LUMO
3	$S_0 \rightarrow S_3$	342	3,63	0,0022	(HOMO-4)→LUMO



**Рисунок 8.** Разность  $\Delta\rho$  электронных плотностей во франк-кондоновском и основном состояниях комплекса «АС+4Н<sub>2</sub>О». Положительные значения  $\Delta\rho$  показаны красным цветом, отрицательные – синим



**Рисунок 9.** Карта распределения электростатического потенциала по ван-дер-ваальсовской поверхности системы «АС+4Н<sub>2</sub>О» (равновесное возбужденное состояние). Более темный синий цвет соответствует большему значению положительного потенциала

## ВЫВОДЫ

Явное задание четырех молекул воды, образующих сильные водородные связи с молекулой АС, вызывает батохромный сдвиг максимума и расчетного спектра поглощения в целом на 13 нм. При этом форма теоретического спектра, в частности его вибронного плеча, при таком комбинированном задании водного окружения практически не изменяется. Фотовозбуждение вызывает существенные изменения в ИК спектре молекулы красителя. Фотоиндуцированное перераспределение электронной плотности носит весьма сложный характер и охватывает практически всю молекулу красителя – как хромофор, так и боковые группы. Однако из четырех связанных молекул воды существенно поляризуется только одна – локализованная вблизи гетероциклического атома кислорода. Согласно расчетам, в возбужденном состоянии положительный заряд гидратного комплекса локализуется на боковых кольцах хромофора, боковых группах и связанных с ними трех молекулах воды, а отрицательный – на центральном кольце хромофора и связанной с ним четвертой молекулой воды.

### Список литературы / References:

1. Marshall P.N. The composition of stains produced by the oxidation of Methylene Blue. *Histochem. J.*, 1976, vol. 8, pp. 431-442.
2. Penney D.P., Powers J.M., Frank M., Willis C., Churukian C. Analysis and testing of biological stains – The Biological Stain Commission Procedures. *Biotech. Histochem.*, 2002, vol. 77, pp. 237-275.
3. Jana A.K., Bhowmik B.B. Enhancement in power output of solar cells consisting of mixed dyes. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1999, vol. 122, pp. 53-56.
4. Orak I., Turut A., Toprak M. The comparison of electrical characterizations and photovoltaic performance of Al/p-Si and Al/Azure C/p-Si junctions devices. *Synthetic Metals*, 2015, vol. 200, pp. 66-73.
5. Nakaminami T., Kuwabata S., Yoneyama H. Electrochemical Oxidation of Cholesterol Catalyzed by Cholesterol Oxidase with Use of an Artificial Electron Mediator. *Anal. Chem.*, 1997, vol. 69, pp. 2367-2372.



6. Bandyopadhyay P., Basu R., Das S., Bhar D.S., Manchanda R., Nandy P. Enhancement of Quantum Efficiency of a Dye-Sensitized Electrochemical Cell by using Triturated Zinc Oxide Mixed with Two Organic Dyes, Azure C and Rose Bengal. *Int. J. High Dilution Res.*, 2017, vol. 16, pp. 1-6.
7. Gowda A.T., Gowda N.M.M., Gowda H.S., Rangappa K.S. Application of Azure C for the Extractive Spectrophotometric Determination of Microgram Amounts of Penicillin. *J. Pharm. Methods*, 1985, vol. 13, pp. 275-280.
8. Gowda A.T., Gowda N.M.M., Rangappa K.S. Spectrophotometric Determination of Saccharin in Soft Drinks and Pharmaceuticals. *Anal. Lett.*, 1984, vol. 17, pp. 2129-2140.
9. Das S., Islam M., Jana G.C., Patra A., Jha P.K., Hossain M. Molecular binding of toxic phenothiazinium derivatives, azures to bovine serum albumin: a comparative spectroscopic, calorimetric, and in silico study. *J. Mol. Recognit.*, 2017, e2609.
10. AlRammahi D.Y., Waheeb A.Z. Removal of Azure C Dye from Aqueous Solution Using Natural Clay Adsorbent. *Int. J. Sci. Res.*, 2016, vol. 5, pp. 1110-1113.
11. Narband N., Uppal M., Dunnill C.W., Hyett G., Wilson M., Parkin I.P. The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionic dyes: enhanced UV-visible absorption. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, vol. 11, pp. 10513-10518.
12. Narband N. *Nanoparticles and photosensitisers; their interactions and antibacterial properties*, PhD Thesis, University College London, 2009.
13. Chakraborty A., Ali M., Saha S.K. Molecular interaction of organic dyes in bulk and confined media, *Spectrochim. Acta A*, 2010, vol. 75, pp. 1577-1583.
14. Marban G., Vu T.T., Valdes-Solis T. A simple visible spectrum deconvolution technique to prevent the artefact induced by the hypsochromic shift from masking the concentration of methylene blue in photodegradation experiments. *Appl. Catal. A*, 2011, 402, pp. 218-223.
15. AlShamsi H.A.H., Hamza A.T. Degradation of Thiazine Dyes Azure B and C by Sonolysis, Sonophotolysis and Sonocatalysis. *Asian J. Chem.*, 2015, 27, pp. 1935-1940. DOI: 10.14233/ajchem.2015.18842
16. Mills A., Hazafy D., Parkinson J., Tuttle T., Hutchings M.G. Effect of alkali on methylene blue (C.I. Basic Blue 9) and other thiazine dyes. *Dyes Pigments*, 2011, vol. 88, pp. 149-155.
17. Havelcova M., Kubat P., Nemcova I. Photophysical properties of thiazine dyes in aqueous solution and in micelles. *Dyes Pigments*, 2000, vol. 44, pp. 49-54.
18. Bertolotti S.G., Previtali C.M. The excited states quenching of phenothiazine dyes by p-benzoquinones in polar solvents. *Dyes Pigments*, 1999, vol. 41, pp. 55-61.
19. McKamey M.R., Spitznagle L.A. Chromatographic, Mass Spectral, and Visible Light Absorption Characteristics of Toluidine Blue O and Related Dyes. *J. Pharm. Sci.*, 1975, vol. 64, pp. 1452-1456.
20. Kostjukova L.O., Leontieva S.V., Kostjukov V.V. Vibronic absorption spectrum and electronic properties of Azure C in aqueous solution: TD-DFT study. *Ther. Chem. Acc.*, 2021, vol. 140, p. 114.
21. Marenich A.V., Cramer C.J., Truhlar D.G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 6378-6396.
22. Fleming S., Mills A., Tuttle T. Predicting the UV-vis spectra of oxazine dyes. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, vol. 7, pp. 432-441.
23. Xu X., Goddard W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2004, vol. 101, pp. 2673-2677.
24. Zhao G.J., Han K.L. Effects of hydrogen bonding on tuning photochemistry: Concerted hydrogen-bond strengthening and weakening. *ChemPhysChem*, 2008, vol. 9, pp. 1842-1846.
25. Qin Z., Lib X., Zhou M. A Theoretical Study on Hydrogen-Bonded Complex of Proflavine Cation and Water: The Site-dependent Feature of Hydrogen Bond Strengthening and Weakening. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2014, vol. 61, pp. 1199-1204.
26. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
27. Baiardi A., Bloino J., Barone V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 4097-4115.
28. Herzberg G., Teller E. Schwingungsstruktur der Elektronenübergänge bei mehratomigen Molekülen. *Z. Phys. Chem. Abt. B*, 1933, vol. 21, pp. 410-446.
29. Santoro F., Lami A., Improta R., Bloino J., Barone V. Effective method for the computation of optical spectra of large molecules at finite temperature including the Duschinsky and Herzberg-Teller effect: The Qx band of porphyrin as a case study. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, p. 224311.
30. Duschinsky F. The importance of the electron spectrum in multi atomic molecules. Concerning the Franck-Condon principle. *Acta Physicochim.*, URSS, 1937, vol. 7, p. 551.

## PHOTOEXCITATION OF AZURE C DYE IN AQUEOUS SOLUTION: A THEORETICAL ANALYSIS

Kostjukova L.O.<sup>1</sup>, Voronin D.P.<sup>2</sup>, Rybakova K.A.<sup>2</sup>, Savchenko E.V.<sup>2</sup>, Kostjukov V.V.<sup>2</sup><sup>1</sup> Nakhimov Black Sea Higher Naval School

Dybenko st. 1a, Sevastopol, 299028, Russia

<sup>2</sup> Sevastopol State University

Universitetskaya, st. 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viktorkostukov@gmail.com

**Abstract.** Using the time-dependent density functional theory at the X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD level, the vibronic absorption spectrum of the thiazine dye Azure C (AC) in an aqueous solution was calculated. This study is a logical continuation of the previously published work [20], in which the water environment of AC was set implicitly in the continuum approximation using the SMD model. In the present work, we used a combined setting of the aqueous environment: four water molecules were explicitly described, forming strong hydrogen bonds with a dye molecule; the rest of the aqueous medium was set implicitly, also by the SMD method. This approach was used to elucidate the effect of site-specific interactions with a solvent on both the ground and excited states of the dye molecule and on the transition between them (solvatochromism). The reverse effect of excitation of the AC molecule on its nearest hydration shell was also of interest. Calculations have shown that there is an increase in these H-bonds upon photoexcitation of the dye. In this case, the maximum of the vibronic absorption spectrum AC undergoes a bathochromic shift by 13 nm. These results were analyzed from the point of view of the solvatochromic theory. Frontier molecular orbitals, between which an electronic transition occurs, and maps of the distribution of electron density and electrostatic potential of the ground and excited states of the "AC+4H<sub>2</sub>O" system have been built. The photoinduced polarization of the dye molecule was analyzed.

**Key words:** azure C, aqueous solution, excited state, vibronic absorption spectrum, solvatochromism, hydrogen bond, time-dependent density functional theory.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ АЛЛАТОСТАТИНОВ

Велиева Л.И., Алиев Р.Э.

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: rashid\_aliev@mail.ru, lala\_yeliyeva@rambler.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2021

**Аннотация.** В данной работе методом молекулярной механики MM+ исследованы динамические свойства молекул аллатостатинов, выявлены устойчивые элементы пространственной структуры, проведена количественная оценка пределов изменения двугранных углов основной цепи пептидных молекул в процессе динамических перестроек. Полуэмпирическим методом квантовой химии MNDO в стандартной параметризации было исследовано также электронное строение аллатостатинов и проведен сопоставительный анализ полученных результатов.

**Ключевые слова:** аллатостатины, пространственная структура, электронное строение, динамические свойства.

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение электронной структуры и конформационно-динамических свойств биологических молекул, в том числе нейропептидов, становится все более актуальным в связи с высоким уровнем развития компьютерных технологий и все большим распространением соответствующих программных продуктов. Исследования в этом направлении актуальны также с точки зрения решения одной из важных проблем современной науки, связанной с установлением взаимосвязи между структурой молекул и их функциональной активностью. К числу объектов интенсивного исследования последнего десятилетия можно отнести нейропептиды семейства аллатостатинов, обладающих уникальной способностью регулировать процессы синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых [1-4]. Семейство аллатостатинов включает в себя пептидные молекулы, известные под названием аллатостатины I-IV или Dipu-ASTs.

В данной работе методами MNDO и MM+ исследовано электронное строение и динамические свойства молекул аллатостатинов, выявлены устойчивые элементы пространственной структуры, проведена количественная оценка пределов изменения двугранных углов основной цепи пептидных молекул в процессе динамических перестроек.

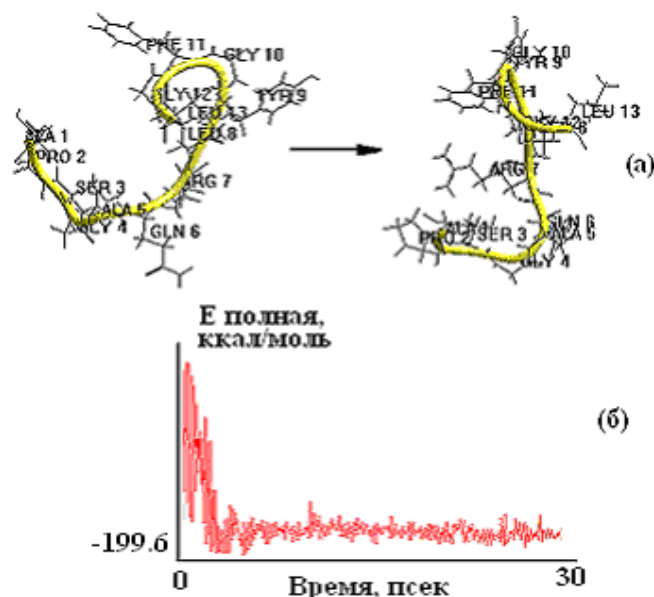
### МЕТОДЫ РАСЧЕТА

Методы квантовой химии и молекулярной динамики получили широкое распространение в численном моделировании электронной и атомной структур сложных молекулярных систем. В настоящее время известно достаточно много современных вычислительных комплексов, реализующих расчеты методами квантовой химии и молекулярной динамики. К числу таких функционирующих программных продуктов относится комплекс квантово-химических и молекулярно-динамических программ **HyperChem**. Все результаты электронного и молекулярно-динамического моделирования, представленные в данной работе получены с использованием этой программы, демонстрационная версия которой доступна на сайте <http://www.hyper.com> [5-7]. Расчетные модели молекул были построены на основе координат атомов, полученных методом теоретического конформационного анализа в рамках механической модели атома [8-11]. Оптимальная электронная структура нейропептидов установлена в процессе оптимизации электронной энергии валентных электронов при фиксированных координатах ядер атомов. При расчетах электронной структуры общий заряд молекул в основном состоянии взят равным нулю. Были рассчитаны величины полной, атомной и электронной энергии молекул, дипольные моменты и исследовано распределение зарядов на атомах исследуемых молекул. Изучен характер изменения парциальных зарядов атомов в зависимости от конформационных состояний исследуемых молекул. С целью уменьшения влияния краевых эффектов от сильно полярных концевых групп N-конец нейропептидов модифицировался ацетилом (ACE), а C-конец N-метиламином (NME) с образованием двух дополнительных пептидных связей.

### РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 1-4 приведены низкоэнергетические конформационные состояния аллатостатинов до и после молекулярной динамики, проведенной в течение 30 псек при постоянной температуре 273 К. Перед началом расчета проводилась релаксация молекул нейропептидов с использованием силового поля MM+. Электронные параметры исследуемых молекул, рассчитанные методом MNDO, обобщены в таблице 1.

**Аллатостатин I.** Аллатостатин I-нейропептид в химической структуре которого содержатся тринадцать аминокислотных остатков Ala1-Pro2-Ser3-Gly4-Ala5-Gln6-Arg7-Leu8-Tyr9-Gly10-Phe11-Gly12-Leu13. Конформация, соответствующая глобальному минимуму конформационной энергии, согласно данным

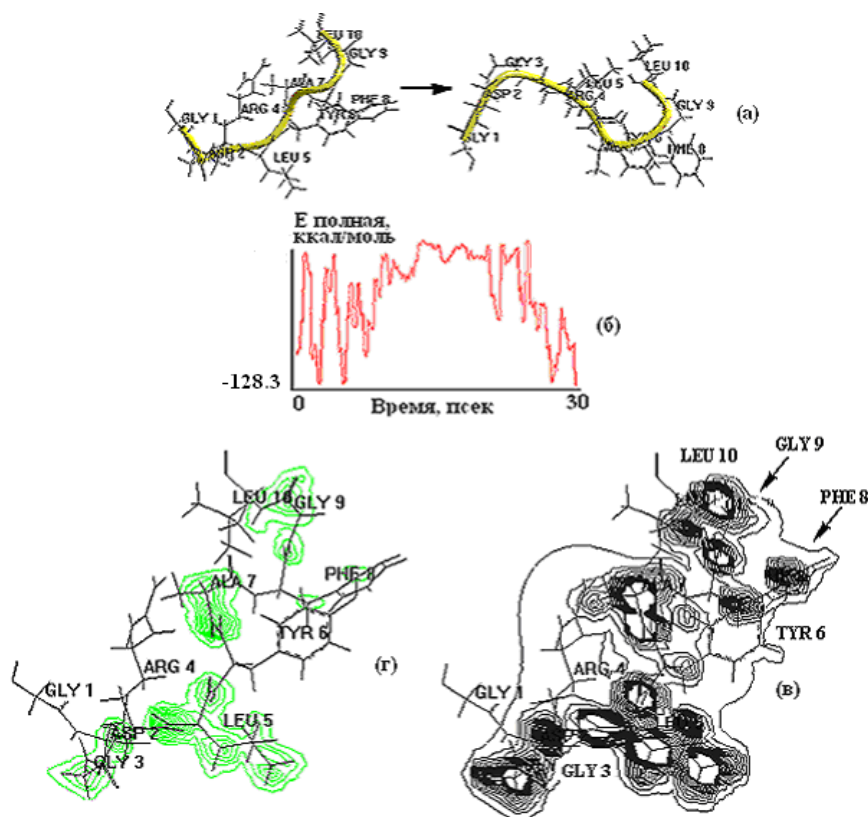


**Рисунок 1.** Конформационные превращения (а) и изменение полной энергии (б) молекулы аллатостатина I в процессе молекулярной динамики

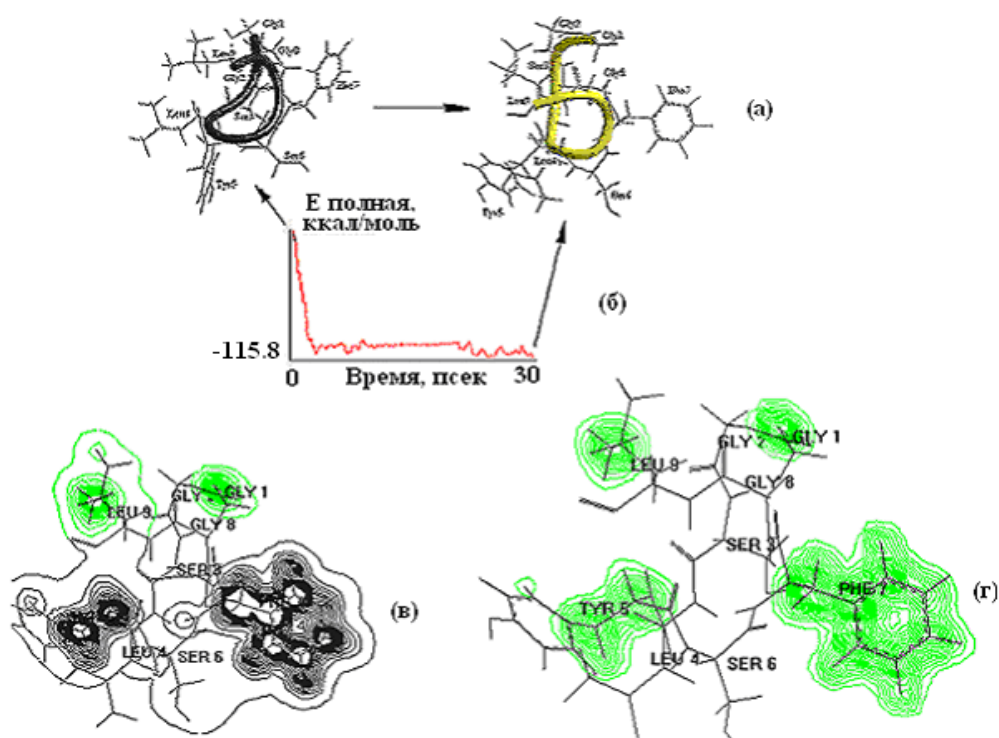
конформационного анализа и конформация, полученная к концу динамических превращений в процессе молекулярной динамики, приведены на рисунке 1а. Анализ полученных результатов показал, что в течение первых пяти пикосекунд происходят резкие изменения энергии молекулы, далее в процессе симуляции характер флуктуаций становится монотонным. К концу временного интервала (5-30 псек) энергия достигает своего минимального значения, что свидетельствует о стабилизации пространственной структуры. Как следует из результатов расчета, участок пептидной цепи Leu8-Leu13, формирующий  $\beta$ -поворот, более стабилен по сравнению с участком Ala1-Gln6 на N-конце пептидной молекулы. Этот результат согласуется с данными конформационного анализа, согласно которому  $\beta$ -поворот на участке Leu8-Leu13 реализуется в 70% рассчитанных низкоэнергетических состояний молекулы аллатостатина I.

**Аллатостатин II.** Аллатостатин II-нейропептид, состоящий из последовательности десяти аминокислотных остатков Gly1-Asp2-Gly3-Arg4-Leu5-Tyr6-Ala7-Phe8-Gly9-Leu10. Конформация, соответствующая глобальному минимуму конформационной энергии, согласно данным конформационного анализа, приведена на рисунке 2а [8]. Молекула содержит остаток аргинина (Arg4) с положительно заряженным боковым радикалом и остатки с ароматическими боковыми цепями (Tyr6, Phe8). Отрицательно заряженная карбоксилатная группа боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты (Asp2) и объемная боковая цепь в остатке лейцина (Leu10) также относятся к числу функционально важных групп, определяющих особенности пространственной структуры молекулы. Согласно результатам конформационного анализа особенностью пространственной структуры молекулы является наличие лабильного C-концевого участка при относительно жестком N-концевом фрагменте. Как следует из результатов расчета, изменение энергии молекулы носит немонотонный характер, наблюдаются флуктуации энергии на всем протяжении процесса динамики. К концу симуляции наблюдается резкое понижение энергии, которое достигает минимального значения -128,3 ккал/моль. В пространственной структуре аллатостатина II прослеживается формирование двух  $\beta$ -поворотов, в вершине которых находятся остатки Arg4 и Phe8. После релаксации молекулы были проведены квантово-химические расчеты методом MNDO. Любой квантово-химический расчет основан на минимизации энергии системы N электронов и M ядер. Методы поиска минимума позволяют отыскать на поверхности потенциальной энергии точку, отвечающую равновесной конфигурации молекулы с наименьшей энергией (или минимумы, если их несколько). Важную роль здесь играет выбор начальной геометрии и симметрии молекулы: при правильном учете симметрии из-за уменьшения количества варьируемых параметров время расчета может сократиться в несколько раз. В расчетах был использован метод сопряженных градиентов. Квантово-химический метод был также использован для расчетов дипольного момента и построения картины распределения молекулярного электростатического потенциала и плотности заряда для молекул аллатостатинов. Молекулярный электростатический потенциал определяется электронной плотностью  $\rho(r)$  и зарядами ядер Z. Потенциал характеризует энергию электростатического взаимодействия между молекулярным (отрицательным и положительным) распределением заряда и единичным положительным бесконечно малым зарядом.

**Аллатостатин III.** Аллатостатин III-нейропептид с первичной структурой, содержащей последовательность из девяти аминокислотных остатков Gly1-Gly2-Ser3-Leu4-Tyr5-Ser6-Phe7-Gly8-Leu9. Стартовая структура для молекулярно-динамических расчетов соответствует состоянию с минимальным значением конформационной энергии, полученной в результате конформационного анализа молекулы

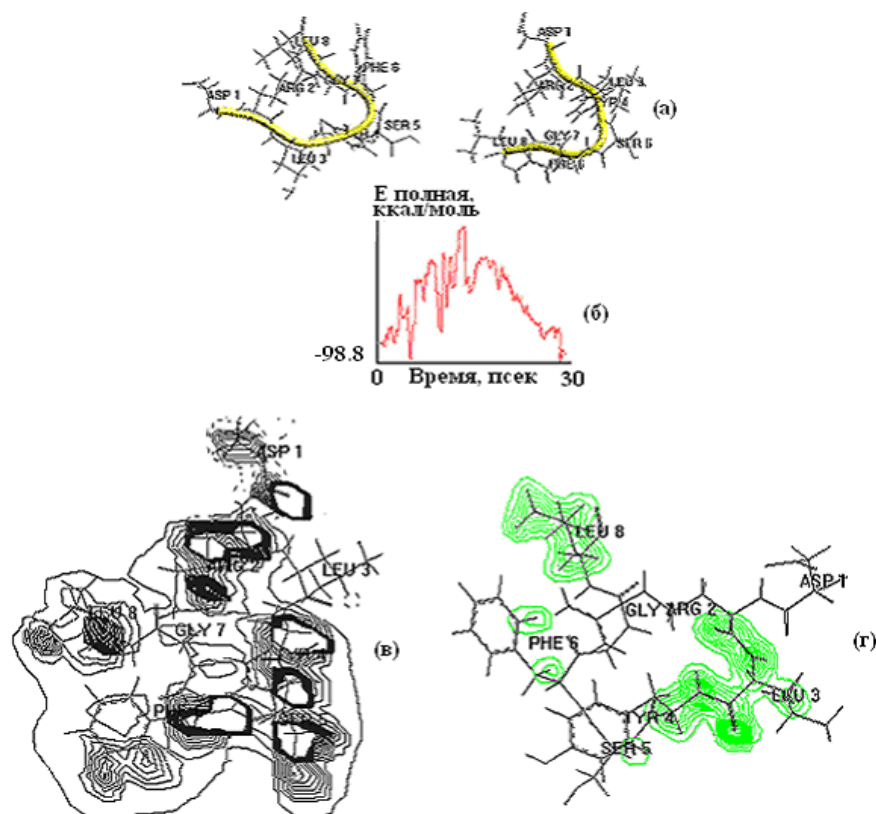


**Рисунок 2.** Конформационные превращения (а), изменение полной энергии (б), распределение электростатического потенциала (в) и плотности заряда (г) на плоскости XY, полученные для аллатостатина II



**Рисунок 3.** Молекулярная динамика аллатостатина III (а), изменение полной энергии молекулы (б), распределение электростатического потенциала (в) и плотности заряда (г) на плоскости XY

аллатостатина III [9]. Как следует из результатов расчета, резкое изменение энергии молекул в процессе симуляции происходит в течение первых пяти пикосекунд. Результатом такого изменения является увеличение расстояния между концевыми группами остатков Gly1 и Leu9 (увеличение происходит в пределах  $6,1 \div 7,3$  Å), которое однако не разрушает характерные элементы пространственной структуры молекулы аллатостатина III, в частности, свернутая структура на участке Leu4-Phe7 сохраняется на всем протяжении молекулярной динамики.



**Рисунок 4.** Молекулярная динамика аллатостатина IV (а), изменение полной энергии молекулы (б), распределение электростатического потенциала (в) и плотности заряда (г) на плоскости XY

**Аллатостатин IV.** В первичной структуре аллатостатина IV содержится восемь последовательно соединенных аминокислотных остатков Asp1-Arg2-Leu3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8. Конформация, соответствующая глобальному минимуму конформационной энергии, согласно данным конформационного анализа, приведена на рисунке 4а [10,11].

В процессе молекулярной динамики была установлена значительная конформационная подвижность N-концевой последовательности по сравнению с тетрапептидным фрагментом Tyr4-Leu8. Изменение энергии носит немонотонный характер, достигает максимального значения на 12-й псек, затем происходит монотонное уменьшение и дальнейшая релаксация структуры молекулы.

Полученные результаты будут использованы для молекулярного моделирования аналогов нейропептидов и изучения их структурно-функциональной взаимосвязи с целью выявления общих элементов пространственной структуры, ответственных за фармакологические эффекты исследуемых соединений.

#### Список литературы / References:

1. Veelaert D., Devreese B., Schoofs L. et al. Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1996, vol. 122, no. 2, pp.183-190.
2. Veelaert D., Devreese B., Schoofs L. et al. Isolation and characterization of schistostatin-2 (11-18) from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: a truncated analog of schistostatin-2. *Regulatory peptides*, 1996, vol. 67, no. 3, pp. 195-199.
3. Bendena W.G., Donly B.C., Tobe S.S. Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. *Ann.N.-Y.Academy of Sciences*, 1999, vol. 897, pp. 311-329.
4. Edwards J.P., Audsley N., Marris G.C., Weaver R. The role of allatostatic and allatropic neuropeptides in the regulation of juvenile hormone biosynthesis in *Lacania oleracea*. *Peptides*, 2001, vol. 22, no. 2, pp. 255-261.
5. Шноль Э.Э., Гривцов А.Г. и др. *Метод молекулярной динамики в физической химии*. М.: Наука, 1996.
6. Шайтан К.В., Сарайкин С.С. *Метод молекулярной динамики*. 1999, <http://www.moldyn.ru/library/md/default.htm>
7. <http://www.hyper.com>
8. Велиева Л.И., Мусаев М.А., Алиева И.Н. Структурное исследование молекулы аллатостатина-II. В материалах Международной научной Конференции *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем*, Минск, Беларусь, 2006, с. 111-113. [Velieva L.I., Musaev M.A., Alieva I.N. Structural study of the allatostatin-II molecule. In the materials of the International Scientific Conference *Molecular, membrane and cellular foundations of the functioning of biosystems*, Minsk, Belarus, 2006, pp. 111-113. (In Russ.)]

9. Alieva I.N., Veliyeva L.I., Musayev M.A., Gojayev N.M. Conformational features of the Dippu-AST 8 neuropeptide from Cockroach *Diploptera punctata*. *Protein and Peptide Letters*, 2006, vol. 13, pp. 1007-1015.
10. Мусаев М.А., Велиева Л.И., Алиева И.Н., Годжаев Н.М. Пространственная структура нейропептида аллатостатина-4. *Вестник Бакинского Университета*, серия физ-мат. наук, 2005, № 2, с. 167-178. [Musaev M.A., Velieva L.I., Alieva I.N., Godzhaev N.M. Spatial structure of the neuropeptide allatostatin-4. *Bulletin of Baku University*, Phys. nauk, 2005, no. 2, pp. 167-178. (In Russ.)]
11. Велиева Л.И., Мусаев М.А., Алиева И.Н., Годжаев Н.М. Молекулярная динамика нейропептидов семейства аллатостатинов. *Вестник Бакинского Университета*, серия физ-мат. наук, 2006, № 1, с. 120-131. [Velieva L.I., Musaev M.A., Alieva I.N., Godzhaev N.M. Molecular dynamics of neuropeptides of the allatostatin family. *Bulletin of Baku University*, Phys. nauk, 2006, no. 1, pp. 120-131. (In Russ.)]

#### STUDY OF THE ELECTRONIC STRUCTURE AND DYNAMIC PROPERTIES OF ALLATOSTATIN MOLECULES

Velieva L.I., Aliev R.E

Baku State University

Z. Khalilov str.23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: rashid\_aliev@mail.ru , lala\_veliyeva@rambler.ru

**Abstract.** In this work, the dynamic properties of allatostatin molecules are investigated by the method of molecular mechanics MM +, stable elements of the spatial structure are revealed, and a quantitative assessment is made of the limits of changes in the dihedral angles of the main chain of peptide molecules in the process of dynamic rearrangements. The electronic structure of allatostatins was also investigated by the semiempirical method of quantum chemistry MNDO in standard parametrization, and a comparative analysis of the obtained results was carried out.

**Key words:** *allatostatins, spatial structure, electronic structure, dynamic properties,*



## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕЛЕКТИВНОГО МАРКИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАТНЫХ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ И РАЗРАБОТКА ПУТЕЙ СИНТЕЗА МОДИФИЦИРОВАННЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК CdTe В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Беликов Н.Е.,<sup>1</sup> Демина О.В.,<sup>1</sup> Лукин А.Ю.,<sup>2</sup> Петровская Л.Е.,<sup>3</sup> Складнев Д.А.,<sup>4</sup>

Варфоломеев С.Д.,<sup>1</sup> Ходонов А.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> МИРЕА – Российский технологический университет,  
пр-кт Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ;

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ;

<sup>4</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
Ленинский пр-кт, 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ;

Поступила в редакцию: 08.06.2021

**Аннотация.** В работе рассматривается предложенная авторами процедура обратимого маркирования белков-мишеней с помощью флуоресцентных меток и зондов. В качестве последних было предложено использовать новые флуорофоры на основе квантовых точек (QDs CdTe), содержащие молекулярный адрес (хелатные комплексы  $Ni^{2+}$  с нитрилотриуксусной кислотой и ее производными), способные образовывать прочные хелаты с гексагистидиновым тегом, локализованным в заданном месте полипептидной цепи белка-мишени. В настоящей работе особое внимание посвящено выбору нужного состава и строения молекулы метки и реализации на практике лабораторной технологии синтеза набора исходных квантовых точек QDs CdTe с заданными оптическими параметрами.

**Ключевые слова:** селективное маркирование белков-мишеней, флуоресцентные метки, квантовые точки, методы получения, нитрилотриуксусная кислота.

При изучении механизмов действия небольших биологически-активных молекул-лигандов (как природного, так и синтетического происхождения) центральное место занимает природа процесса взаимодействия низкомолекулярного лиганда со своим специфичным рецептором-мишенью (ферментом, GPCR, ядерным рецепторами, или определенными сайтами последовательностей нуклеиновых кислот). Неоценимую помощь при определении как места связывания, так и степени его эффективности оказывает ставший на сегодняшний день стандартным прием – введение в молекулу лиганда меток или маркеров различного рода и анализ механизмов процесса связывания, с генерированием определенного физического сигнала, пропорционального количеству связанного меченного лиганда. Развитие и совершенствование существующих аналитических систем с использованием разнообразных меченых субстратов позволяют на сегодняшний день проводить надежное определение содержания метки в системе в диапазонах концентраций  $10^{-15}$  –  $10^{-6}$  моль. Основные типы меток и маркеров, применяемых для проведения биомедицинских исследований, можно разделить на 2 большие группы: радиоактивные ( $^3H$ -,  $^{14}C$ - и  $^{32}P$ -изотопы) и нерадиоактивные. Из последней группы можно выделить следующие типы меток: стабильные (нерадиоактивные) изотопы ( $^2H$ -,  $^{13}C$ -,  $^{15}N$ -,  $^{19}F$  и др.); хромогенные, флуоресцентные, спиновые, электроно-плотные и фотохромные [1].

В пост-геномную эру необходимо развивать новые технологии, призванные помочь при анализе белкового состава протеома, идентификации отдельных целевых белков-мишеней и отнесения связи их особенностей структуры с конкретным типом функциональной активности. Особые перспективы подобные системы маркирования имеют при замене пока еще широко применяемых радиоактивных меток на более безопасные флуоресцентные или фотохромные; а также при разработке целого ряда прототипов технических smart-устройств на основе меченых белков в бионанопотонике и сенсорных технологиях; средств визуализации различных бионанообъектов в реальном времени и в многопараметрических (многоцветных) системах; фотоуправляемых средств контроля строения и функции бионанообъектов, фотоуправляемых средств адресной доставки биологически активных соединений и др. [2-4].

Разработанные ранее протоколы маркирования белков-мишеней в живых клетках с помощью флуоресцентных меток и зондов позволяют облегчить процедуры зондирования, визуализации, определения их точной локализации и оценить возможные взаимодействия лиганд-мишень в норме и патологии. Наиболее перспективными среди большого количества известных методов и технологий при изучении процессов взаимодействия белков с друг другом, с фрагментами нуклеиновых кислот, или низкомолекулярными лигандами, как в живых объектах, так и в системах высокоэффективного скрининга (HTS) с выделенными и очищенными образцами препаратов белков, являются методы, основанные на использовании явления флуоресценции, особенно варианты резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

Уже известные протоколы селективного маркирования белков-мишеней включают: либо введение целевых флуорофоров в состав мишени производных модифицированных аминокислот с помощью технологии сайт-специфичного мутагенеза; либо обратимое или необратимое сайт-специфичное взаимодействие определенного



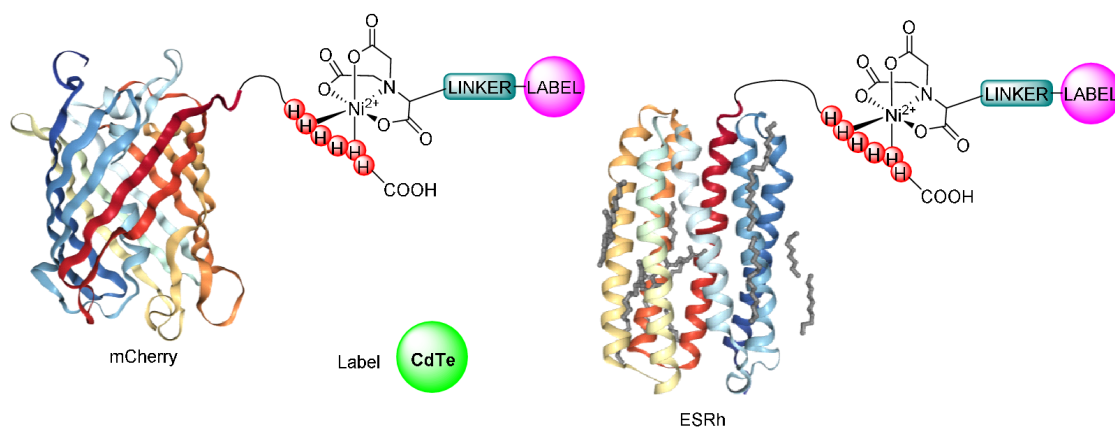
аминокислотного остатка или сайта узнавания аминокислотной последовательности белка-мишени с флуорофором, содержащим молекулярный адрес или реакционноспособную группу с определенным типом специфичности.

Разрабатываемая нами технология маркирования заключается в селективном взаимодействии новых фотоактивных меток на основе флуорофоров, содержащих молекулярный адрес (хелатные комплексы  $\text{Ni}^{2+}$  с нитрилотриуксусной кислотой и ее производными NTA), с гексагистидиновым тегом (6 His), локализованном в заданном месте полипептидной цепи белка-мишени. Гексагистидиновый тег образует прочные хелатные комплексы с переходными металлами и нитрилотриуксусной кислотой ( $\text{Ni}^{2+}$  : NTA). NTA – тетрадентантный хелатор, занимающий 4 из 6 сайтов связывания в координационной сфере иона  $\text{Ni}^{2+}$ , оставшиеся свободные сайты реагируют с имидазольными фрагментами гексагистидинового тега. Анализ данных литературных источников показал, что, подходы, включающие обратимое сайт-специфическое взаимодействие флуорофоров с белками-мишенями за счет образования прочных и обратимых хелатов с комплексами металлов являются одними из наиболее актуальных и перспективных, и поэтому эта технология была нами выбрана для практической реализации в рамках настоящей работы.

Преимущества указанного хелатного варианта связывания над системами, реализующими процесс биоспецифического распознавания лиганд-рецептор (антитела, пара «биотин-стрептавидин») заключаются в следующем: 1) белки-мишени с гексагистидиновым тегом, меченные по С- или N-концам или внутренним сайтам коммерчески доступны; 2) *in situ* процедура прямого мечения образца хелатным комплексом  $\text{Ni}^{2+}$ -нитрилотриуксусная кислота ( $\text{Ni}^{2+}$  : NTA) по типу “mix and read” проста и происходит быстро, без последующих процедур очистки или выделения или дополнительной дериватизации; 3) данный вариант процедуры селективного химического маркирования белков-мишеней низкомолекулярными флуорофорами обратим, и целевой исходный белок-мишень можно достаточно просто регенерировать под действием избытка более сильного хелатора (этилендиаминтетрауксусной кислоты) или конкурентных лигандов (имидазол); 4) пространственно заданное положение гексагистидинового тега в мишенях позволяет контролировать иммобилизацию с нужной регио- и стереоселективностью [5-8]. Хелатные комплексы  $\text{Ni}^{2+}$  – нитрилотриуксусная кислота ( $\text{Ni}^{2+}$  : NTA) в составе хроматографических сорбентов широко применяются в настоящее время при очистке и выделении рекомбинантных белков с гексагистидиновым тегом. Метод получил широкое применение под названием металло-хелатная аффинная хроматография (IMAC) и использует ( $\text{Ni}^{2+}$  : NTA)-агарозные гели и материалы для иммобилизации (( $\text{Ni}^{2+}$  : NTA)-содержащих носителей и наночастиц) [6-8].

Среди недостатков указанного хелатного варианта связывания пока остаются полностью нерешенные проблемы неспецифического связывания метки с другими нецелевыми сайтами молекулы белка-мишени; сложность молекул гибридных лигандов флуорофор-NTA- $\text{Ni}^{2+}$ , что обуславливает дальнейший поиск более совершенных методов их получения и/или внедрения в практику новых еще неизвестных структур.

В 2021 г. исполняется 16 лет с начала «эры оптогенетики» (нейробиофотоники) – использования генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток человека и животных. Особенности предлагаемой в настоящей работе технологии открывают новое направление для получения фотопереключаемых, фотоактивных компонентов для оптогенетики на основе микробных родопсинов и других фоточувствительных белков с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами [9-11]. В качестве рекомбинантных фотоактивных белков-мишеней будут использованы: мембранный белок – протейродопсин ESRh из бактерии *Exiguobacterium sibiricum* и водорастворимый белок – красный флуоресцентный белок mCherry, содержащие гексагистидиновый тег по С-концу полипептидной цепи белка. Первый объект, ретиналь-содержащий микробный протейродопсин (ESRh), из психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из образцов почвы вечной мерзлоты возрастом 3 млн. лет. Установлено, что ESRh обладает структурой, типичной для семейства ретиналь-содержащих белков, включая наличие семи альфа-спиральных сегментов и молекулы ретиналя в *all-E*-конфигурации ковалентно связанного с остатком K225 посредством протонированной альдиминной связи. Это фоточувствительный мембранный белок, функционирующий, как светуправляемый протонный насос. Уникальными особенностями ESRh являются: 1) наличие нестандартного донора протонов для альдиминной связи основания Шиффа его хромофора с эпсилон-аминофункцией остатка лизина K96 и его расположение в гидрофобной полости близко к поверхности белка, которое может облегчать доступ протонов из цитоплазмы; 2) нарушение альфа-спиральной структуры в средней части спирали F; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85. H57 в молекуле ESRh обладает конфигурацией, существенно отличающейся от положения гомологичного остатка в молекуле ксантородопсина, и связан с поверхностью белка системой водородных связей. В отличие от бактериородопсина, остаток R82 в молекуле ESRh удален от основания Шиффа и не образует водородной связи с акцептором протонов D85, соответственно не оказывая существенного воздействия на его свойства. Установлено наличие ряда специфических особенностей фотоцикла ESRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование М-интермедиата и сдвиг его рК в щелочную область рН [12-13]. Для очистки белка, содержащего С-концевую гексагистидиновую последовательность, будет использован метод металло-аффинной хроматографии на никель-содержащей смоле. Пространственная 3D-структура ESRh с разрешением 2,3 Å (PDB код структуры 4huj) была впервые установлена в работах [14-18]. Второй объект-мишень – водорастворимый красный флуоресцентный белок mCherry, который был получен на основе белка DsRed из кораллов рода *Discosoma*. mCherry представляет собой водорастворимый мономерный белок с максимумом флуоресценции 610 нм, быстрым созреванием и высокой фотостабильностью [19].



**Рисунок 1.** Пути модификации целевых белков-мишеней при помощи новых флуорофоров на основе QDs CdTe

Предлагаемые в настоящей работе пути и методы модификации белков-мишеней открывают новое направление для получения новых фотопереключаемых, фотоактивных компонентов для оптогенетики на основе ESRh и других микробных родопсинов.

Необходимо учитывать ряд требований, важных для реализации на практике эффективных флуоресцентных методов и протоколов анализа природы взаимодействия низкомолекулярного лиганда со своим специфичным рецептором-мишенью. Основными из них являются поиск и доступность новых флуорофоров с высокой фотостабильностью, что должно обеспечивать достоверность и надежность данных спектров флуоресценции при количественной оценке эффективности процессов маркирования мишеней и их взаимодействия с различными целевыми лигандами. Это требование очень важно при дизайне молекул новых биологически активных соединений, в том числе и прототипов лекарственных препаратов. Однако, большинство известных флуорофоров на основе органических красителей или флуоресцентных белков (FPs) под действием различных факторов часто испытывают проблемы с гашением флуоресценции и/или фотостабильностью молекул исходных меток.

В качестве флуоресцентных меток нами были выбраны флуорофоры на основе ковалентных конъюгатов квантовых точек QDs. Для успешного решения основной задачи первого этапа настоящего исследования необходимо было создать надежную и воспроизводимую технологию получения исходного набора QDs CdTe с заданными оптическими характеристиками и различными по структуре гидрофильными якорными группами на их поверхности.

Ниже в настоящей публикации представлены полученные нами на начальном этапе работы результаты, описывающие способы получения исходного набора флуоресцентных меток на основе неорганических наноразмерных кристаллов – квантовых точек CdTe.

#### **Дизайн молекул и разработка способов получения флуоресцентных меток на основе неорганических наноразмерных кристаллов – квантовых точек (QDs).**

Среди известных на сегодняшний день семейств флуорофоров наиболее перспективными для применения в различных областях являются полупроводниковые нанокристаллы (“квантовые точки”, quantum dots, QDs). Они обладают уникальными оптическими и химическими характеристиками, выгодно отличающими их от органических и от биологических флуорофоров.

Уникальные флуоресцентные свойства QDs имеют целый ряд преимуществ над обычно используемыми в биологии и медицине органическими флуорофорами:

- 1) узкие и симметричные полосы флуоресценции (ширина полосы на полувысоте спектра (FWHM) 20–35 нм);
- 2) возможность создания на основе образцов QDs одного состава, но отличающихся размерами наночастиц, широкой спектральной линейки флуоресцентных зондов и меток от УФ-области до ближнего ИК-диапазона;
- 3) более высокая фотостабильность;
- 4) сравнимые величины квантового выхода и более высокие значения молярного коэффициента экстинкции, что позволило получить системы для визуализации единичных молекул с хорошей чувствительностью и яркостью изображения;
- 5) возможность реализации методов модификации поверхности с помощью дополнительных покрытий или оболочек (ZnS и др.) или способов посадки на нее различных реакционноспособных групп, молекулярных адресов или бионанообъектов, позволяет использовать данные системы в наномедицине при диагностике как в *in vitro*, так и в *in vivo* вариантах, а в перспективе – для лечения пациентов [1-4,20,21].

QDs разных размеров, формы и состава поглощают свет в широком диапазоне оптического спектра от УФ-до ближней ИК-области, тогда как их спектр испускания крайне узок (FWHM составляет 20-25 нм), идеально симметричен, а положение максимума испускания флуоресценции QDs определяется их диаметром. Таким образом, QDs диаметром от 3 нм до 6 нм могут быть возбуждены источником света одной и той же длины волны, испуская при этом флуоресценцию в диапазоне от голубой до ближней ИК области в зависимости от своего размера. Кроме того, QDs являются более фотостабильными (на много порядков), чем лучшие органические

флуорофоры, обеспечивая возможность многократного увеличения как мощности возбуждающего излучения, так и длительного (в течение дней до месяцев) отслеживания поведения метки в реальном времени.

Решение основной задачи настоящего исследования – реализации возможности использования QDs в качестве меток и зондов в биологических системах требует направленного изменения свойств поверхности QDs, ее модификации с формированием на поверхности частиц достаточного количества гидрофильных полярных групп, часть из которых могла бы быть якорными группами для присоединения к ним биологических молекул-мишеней. Возможны 2 основных подхода: (1) использование бифункциональных модификаторов, способных замещать молекулы триоктилфосфиноксида и содержащих терминальные гидрофильные якорные группы, которые после присоединения к QDs оказываются экспонированными в водный раствор, и таким образом, обеспечивают растворимость в воде; (2) внедрение QDs в полимерные матрицы, золь-гели, дендромеры. Хотя поверхностные гидрофобные лиганды (триоктилфосфиноксид и стабилизатор) можно заменить на целевые гидрофильные лиганды путем их обмена в слабополярном растворителе, данный подход не является оптимальным: как правило, такая замена лиганда приводит к существенному снижению квантового выхода флуоресценции и стабильности препаратов QDs.

#### **Выбор состава QDs.**

Проанализировав сведения по доступности, стоимости исходных предшественников на отечественном и зарубежных рынках, потенциальной опасности в обращении с указанными реагентами и их стабильности к воздействию различных факторов в процессе синтеза, сравнив данные по двум возможным кандидатам 1) классические гидрофобные препараты QDs CdSe и 2) модифицированные 3-меркаптопропионовой кислотой (МПА) гидрофильные препараты QDs CdTe, мы установили, что синтез CdSe QDs оказался почти в 8 раз более затратным. Таким образом, в настоящей работе мы остановили свой выбор на гидрофильном кандидате (2) – QDs CdTe, модифицированными МПА, для получения которых нами была разработана технология гидротермального синтеза целевых QDs CdTe в водных растворах.

Как, хорошо известно, из литературы для образования прочных ковалентных комплексов QD CdSe или CdTe с органическими лигандами необходимо введение в состав органической молекулы линкера с терминальной меркапто-группой [2,20].

За прошедшие 30 лет после открытия QDs были разработаны несколько вариантов их получения:

- 1) высокотемпературный коллоидный синтез (ВТКС);
- 2) гидротермальный синтез в водных растворах;
- 3) методы замены типа покрытия на поверхности QDs;
- 4) смешанные варианты модификации поверхности и комбинации упомянутых в п.п. 1-3 методов.

#### **Высокотемпературный коллоидный синтез (ВТКС) [2,20,22-25].**

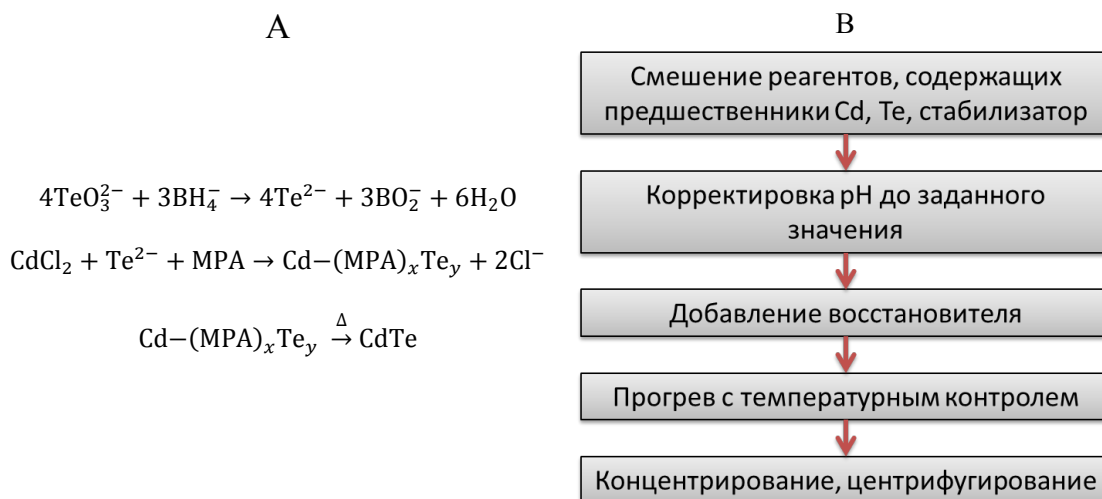
Этот способ нашел широкое применение для получения разнообразных гидрофобных QDs состава CdTe, CdSe, InP, InAs, CdSe/ZnS и др. [2,20,22-25]. Метод заключается в том, что холодный раствор селена (Te или других органо-металлических предшественников) в триоктилфосфине (20°C) вводится в горячий (270-300 °C) раствор оксида кадмия (или других источников Cd) в смеси триоктилфосфиноксида (ТОФО) и гидрофобного стабилизатора, например, гексадециламина, а рост QDs происходит при контролируемом изменении температуры процесса. Поверхность гидрофобных QDs покрыта фрагментами ТОФО и гидрофобного стабилизатора. Они растворимы только в малополярных органических растворителях (хлороформ, толуол, гептан, гексан). QDs имеют совершенную кристаллическую структуру, малый разброс по размерам (<5%), но квантовый выход флуоресценции оставался относительно низким (~10%). Существенного увеличения квантового выхода (до 70%) удалось добиться формированием дополнительной оболочки ZnS или CdS вокруг основного ядра QDs.

#### **Гидротермальный синтез QDs CdTe в водных растворах.**

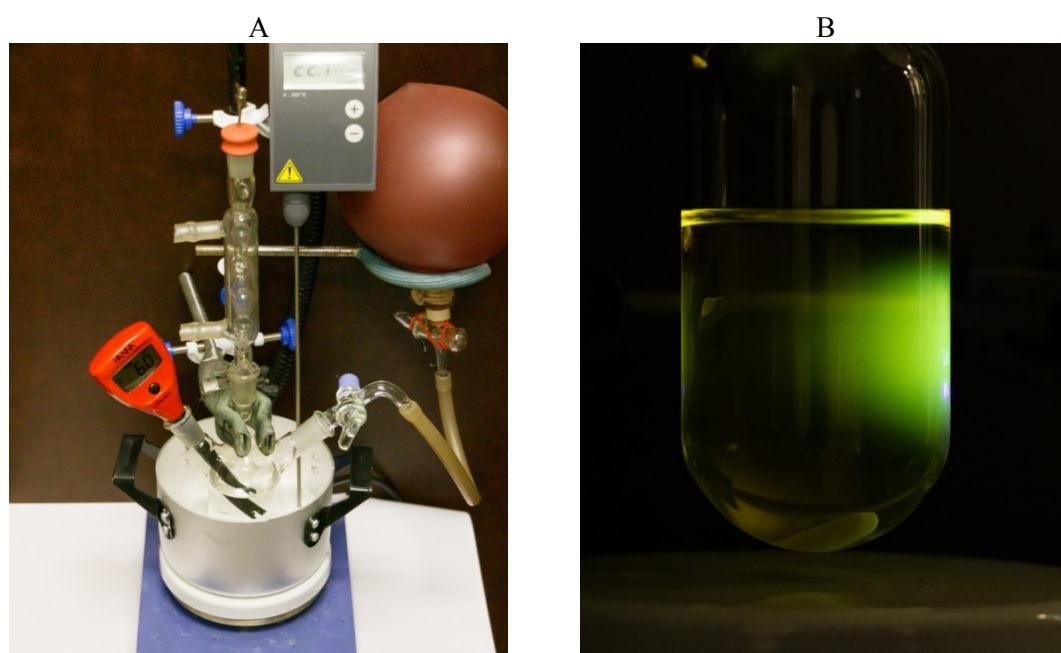
В литературе известен ряд вариантов проведения процесса синтеза высококачественных препаратов CdTe QDs в водных растворах [26-34]. Их условно можно классифицировать на три группы: 1) генерация предшественника ( $\text{Te}^{2-}$ ) – раствора теллуридоворода ( $\text{H}_2\text{Te}$ ) *in situ* из системы  $\text{Al}_2\text{Te}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$ , 2) генерация предшественника ( $\text{Te}^{2-}$ ) – раствора  $\text{NaHTe}$  *in situ* из системы  $\text{Te} / \text{NaBH}_4$ , 3) генерация предшественника ( $\text{Te}^{2-}$ ) *in situ* из  $\text{Me}_2\text{TeO}_3$  восстановлением  $\text{NaBH}_4$ .

Дополнительные процедуры, призванные улучшить конечные оптические характеристики и стабильность препаратов CdTe QDs, заключаются в рефлюксинге промежуточной реакционной массы в определенном диапазоне температуры и времени [26-29,33,34]. Вместо обычной процедуры прогрева часто используют нагрев при помощи микроволновой технологии или сочетание нагрева с ультразвуковым облучением. Общим недостатком упомянутых выше технологий является высокая стоимость оборудования, но она обеспечивает ускорение процесса по времени и снижение температуры прогрева [30-32] при сохранении высоких оптических характеристик препаратов. Также общим недостатком (1-й и 2-й) групп технологий получения препаратов CdTe QDs является необходимость работы в инертной атмосфере Ar или  $\text{N}_2$  для предотвращения окисления предшественника ( $\text{Te}^{2-}$ ).

Для конечной обработки сырого продукта была разработана процедура размер-селективного осаждения с центрифугированием, позволяющая получить набор фракций препаратов наночастиц CdTe QDs с узким интервалом дисперсии распределения их размеров и программировать положение максимумов флуоресценции с более узкой FWHM и величину квантового выхода флуоресценции.



**Рисунок 2.** А – Основные химические реакции в технологии получения CdTe QDs, стабилизированных 3-меркаптопропионовой кислотой (MPA), В – Основные технологические стадии процесса синтеза CdTe QDs



**Рисунок 3.** А – Общий вид установки для получения препаратов CdTe QDs, стабилизированных 3-меркаптопропионовой кислотой, В – флуоресценция препарата CdTe QDs после рефлюсинга до стадии выделения  $\lambda_{\text{max}}$  п 520 нм

Проведя анализ результатов ранних публикаций, мы остановили свой выбор на использовании следующей модифицированной технологии синтеза коллоидной системы CdTe QDs, изображенной на рисунках 2, 3. В качестве исходных предшественников нами были выбраны наиболее доступные соли Cd и Te ( $\text{CdCl}_2 \times 2.5 \text{H}_2\text{O}$  и  $\text{K}_2\text{TeO}_3$ ). Проведенные пилотные эксперименты позволили подобрать и оптимизировать ряд параметров процесса: порядок смешения реагентов, их соотношение, температуру основной реакции, pH основной реакции (значения диапазона pH от 9 до 12).

Был протестирован ряд различных серу-содержащих лигандов с терминальной полярной карбоксильной группой: 3-меркаптопропионовая, тиогликолевая, 3,3'-дитиодипропионовая кислоты (среди них наиболее оптимальным лигандом оказалась 3-меркаптопропионовая кислота), тип восстановителя ( $\text{KBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$ ), температурные параметры и длительность рефлюсинга реакционной массы, растворитель для процедуры размер-селективного осаждения, скорость и длительность центрифугирования.

Средний диаметр частиц  $D$  и коэффициент молярной экстинкции  $\varepsilon$  были определены по эмпирическим формулам, где  $\lambda$  – длина волны максимума полосы поглощения первого экситона [35].

$$D = (9.8127 \times 10^{-7}) \times \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \times \lambda^2 + 1.0064 \times \lambda - 194.84 \text{ (нм)}$$

$$\varepsilon = 10043 \times D^{2.12} \text{ (л·моль}^{-1}\text{·см}^{-1}\text{)}$$

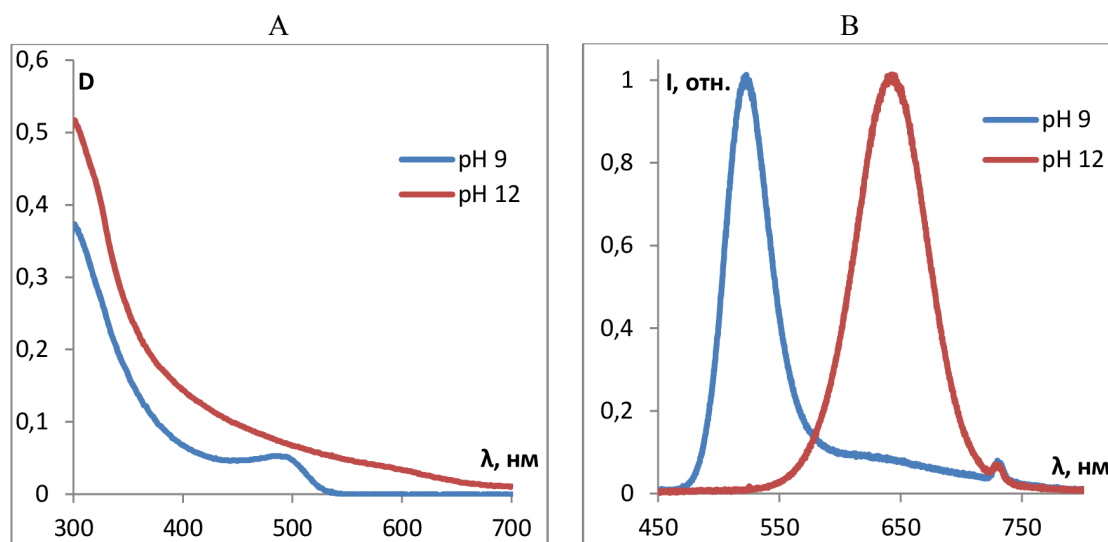


Рисунок 4. Электронные спектры препаратов CdTe QDs (А) и их спектры флуоресценции (В)

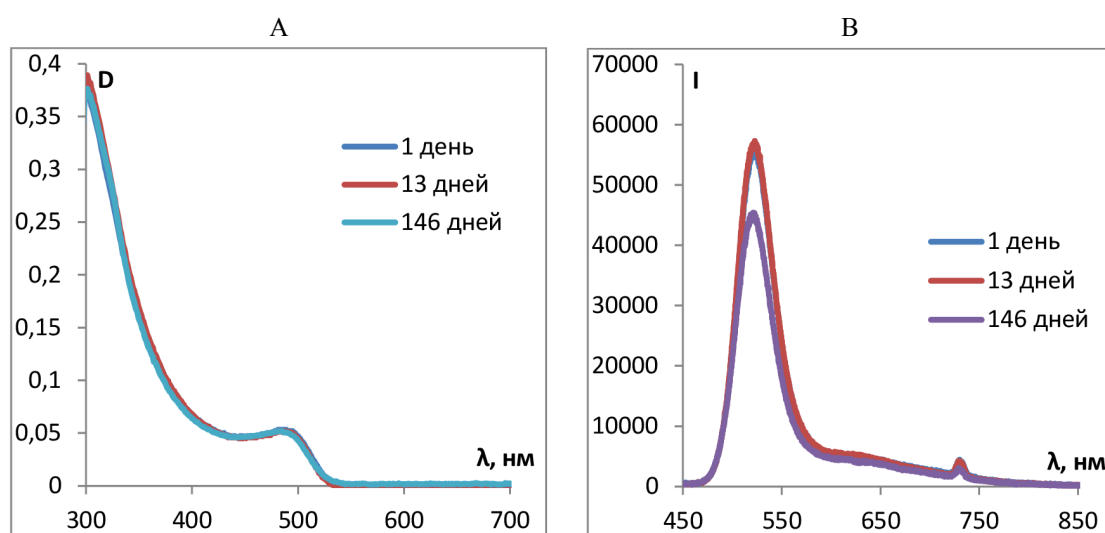


Рисунок 5. Контроль оптических характеристик (А – спектры поглощения, В – спектры флуоресценции) CdTe QDs при различных сроках хранения препаратов при 4°C

Хранение реакционной массы CdTe осуществляли при 4°C в атмосфере аргона. Синтезированные препараты CdTe QDs при хранении при 4°C в растворе или в твердом состоянии практически не изменяли своих спектральных параметров и характеристик в течение длительного времени (рис. 5 и табл. 1).

Таким образом, нами была разработана технология получения линейки препаратов коллоидной системы CdTe QDs с запрограммированными оптическими параметрами флуоресценции от 520 до 642 нм.

В дальнейшем указанные промежуточные CdTe QDs после введения молекулярного адреса – фрагмента NTA по имеющейся якорной карбоксильной функции, будут использованы для разработки протоколов селективного мечения целевых белков-мишеней.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00139.*

Таблица 1. Физико-химические характеристики препаратов CdTe QDs

	pH 9	pH 12
Максимум основного пика в спектре флуоресценции, нм	520	642
Ширина полосы флуоресценции при половине высоты FWHM, нм	45	70
Максимум длины волны поглощения первого экситона, нм	488 (±3)	610 (±10)
Диаметр частиц, нм	1,9 (±0,2)	3,7 (±0,2)
Коэффициент молярной экстинкции, $\epsilon$ (л·моль <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup> )	4,3(±0,9)·10 <sup>4</sup>	1,6(±0,2)·10 <sup>5</sup>

## Список литературы / References:

1. 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. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1990793119060162.
2. Звездин К.В., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Демина О.В., Левин П.П., Бричкин С.Б., Спиринов М.Г., Разумов В.Ф., Швецов 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. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1995078012030172.
3. Chambers J.J., Kramer R.H. Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function. *Neuromethods*, Springer, 2011, vol. 55. DOI 10.1007/978-1-61779-031-71.
4. Papazoglou E.S., Parthasarathy A. *Bionanotechnology*. Morgan&Claypool, 2007. DOI: 10.2200/S00051ED1V01Y200610BME007.
5. Wingren C., Borrebaeck C.A. High-throughput proteomics using antibody microarrays. *Expert Rev. Proteomics*, 2004, vol. 1, no. 3, pp. 355-364. DOI: 10.1586/14789450.1.3.355.
6. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1975, vol. 258, no. 5536, pp. 598-599. DOI: 10.1038/258598a0.
7. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression Purif.*, 1992, vol. 3, no. 4, pp. 263-281. DOI: 10.1016/1046-5928(92)90001-D.
8. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnol.*, 1988, vol. 6, no. 11, pp. 1321-1325. DOI: 10.1038/nbt1188-1321.
9. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1213-1225. DOI: 10.1038/nn.4091.
10. Boyden E.S. Optogenetics and the future of neuroscience. *Nature Neurosci.*, 2015, vol. 18, pp. 1200-1201. DOI: 10.1038/nn.4094.
11. Говорунова Е.Г., Коппель Л.А. Путь к оптогенетике: родопсиновые белки микроорганизмов. *Биохимия*, 2016, т. 81, № 9, с. 1172-1186. [Govorunova E.G., Koppel L.A. The road to optogenetics. Microbial Rhodopsins. *Biokhimiya*, 2016, vol. 81, no. 9, pp. 1172-1186. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S0006297916090029.
12. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Letters*, 2010, vol. 584, no. 19, pp. 4193-4196. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.09.005.
13. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Aspartate-Histidine Interaction in the Retinal Schiff Base Counterion of the Light-Driven Proton Pump of *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 29, pp. 5748-5762. DOI: 10.1021/bi300409m.
14. Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, vol. 110, no. 31, pp. 12631-12636. DOI: 10.1073/pnas.1221629110.
15. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the Carboxyl Rule - Lysine 96 facilitates protonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 29, pp. 21254- 21265. DOI: 10.1074/jbc.M113.465138.
16. Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J.M., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Photocycle of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin Characterized by Low-Temperature Trapping in the IR and Time-Resolved Studies. *J. Phys. Chem. B*, 2013, vol. 117, no. 24, pp. 7235-7253. DOI: 10.1021/jp402430w.
17. Belikov N.E., Demina O.V., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Lukin A.Yu., Shumsky A.N., Chizhov I., Levin P.P., Kirpichnikov M.P., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. The influence of the chromophoric group modification on the optical properties of retinal proteins. *Mendeleev Communications*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 406-408. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.07.022.
18. Smitienko O.A., Feldman T.B., Petrovskaya L.E., Nekrasova O.V., Yakovleva M.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Cherepanov D.A., Kolchugina I.B., Dolgikh D.A., Nadochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. Comparative Femtosecond Spectroscopy of Primary Photoreactions of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin and *Halobacterium salinarum* Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. B*, 2021, vol. 125, no. 4, pp. 995-1008. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c07763.
19. Shaner N.C., Campbell R.E., Steibach P.A., Gierpmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnol.*, 2004, vol. 22, pp. 1567-1572. DOI: 10.1038/nbt1037.



20. Разумов В.Ф. *Фотоника коллоидных квантовых точек*. Под ред. Ключева М.Б. Иваново: Ивановский гос. ун-т, 2017, 272 с. [Razumov V.F. *Photonics of colloid quantum dots*. Klyuev M.B. Ed. Ivanovo Ivanovo State University, 2017, 272 p. (In Russ.)]
21. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. *Российские нанотехнологии*, 2007, т. 2, № 1-2, с. 160-173. [Oleynikov V.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R. Fluorescent semiconductor nanocrystals in biology and medicine. *Nanotechnologies in Russia*, 2007, vol. 2, no. 1-2, pp. 160-173. (In Russ.)]
22. Николенко Д.Ю., Бричкин С.Б., Разумов В.Ф. Неизотермический высокотемпературный коллоидный синтез наночастиц CdSe. *Российские нанотехнологии*, 2009, т. 4, no. 11-12, с. 92-95. [Nikolenko D.Yu., Brichkin S.B., Razumov V.F. Nonisothermal High-Temperature Colloidal Synthesis of Cd Se Nanocrystals. *Nanotechnologies in Russia*, 2009, vol. 4, no. 5-6, pp. 790-794. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1995078009110044.
23. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, no. 19, pp. 8706-8715. DOI: 10.1021/ja00072a025.
24. Peng Z.A., Peng X.G. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, no. 1, pp. 183-184. DOI: 10.1021/ja003633m.
25. Talapin D.V., Rogach A.L., Kornowski A., Haase M., Weller H. Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture. *NanoLett.*, 2001, vol. 1, no. 4, pp. 207-211. DOI: 10.1021/nl0155126.
26. Gaponik N., Talapin D.V., Rogach A.L., Hoppe K., Shevchenko E.V., Kornowski A., Eychmuller A., Weller H. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. *J. Phys. Chem. B*, 2002, vol. 106, no. 29, pp. 7177-7185. DOI: 10.1021/jp025541k.
27. Mandal A., Tamai N. Luminescence enhancement of water soluble CdTe quantum dots by proper surface modification with ethylene diamine. *Chem. Phys. Lett.*, 2011, vol. 507, pp. 248-252. DOI: 10.1016/j.cplett.2011.03.086.
28. Park J.C., Choi S.Y., Yang M.Y., Nan L., Na H., Lee H.N., Chung H.J., Hong C.A., Nam Y.S. Subnanomolar FRET-Based DNA Assay Using Thermally Stable Phosphorothioated DNA-Functionalized Quantum Dots. *ACS Appl. Mater. Interface*, 2019, vol. 11, no. 37, pp. 33525-33534. DOI: 10.1021/acsami.9b07717.
29. Xua N., Piao M., Arkina K., Rena L., Zhanga J., Hao J., Zhenga Y., Shanga Q. Imaging of water soluble CdTe/CdS core-shell quantum dots in inhibiting multidrug resistance of cancer cells. *Talanta*, 2019, vol. 201, pp. 309-316. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.021.
30. Li L., Qian H., Ren J. Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature. *Chem. Comm.*, 2005, vol. 36, no. 4, pp. 528-530. DOI: 10.1039/b412686f.
31. He Y., Sai L.-M., Lu H.-T., Hu M., Lai W.-Y., Fan Q.-L., Wang L.-H., Huang W. Microwave-Assisted Synthesis of Water-Dispersed CdTe Nanocrystals with High Luminescent Efficiency and Narrow Size Distribution. *Chem. Mater.*, 2007, vol. 19, no. 3, pp. 359-365. DOI: 10.1021/cm061863f.
32. Duan J., Song L., Zhan J. One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg<sup>2+</sup>-Sensitive Properties. *NanoRes.*, 2009, vol. 2, no. 1, pp. 61-68. DOI: 10.1007/s12274-009-9004-0.
33. Bao H., Wang E., Dong S. One-Pot Synthesis of CdTe Nanocrystals and Shape Control of Luminescent CdTe-Cystine Nanocomposites. *Small*, 2006, vol. 2, no. 4, pp. 476-480. DOI: 10.1002/smll.200500346.
34. Kinia S., Kulkarnia S.D., Ganigaa V., Nagarakhish T.K., Chidangila S. Dual functionalized, stable and water dispersible CdTe quantum dots: Facile, one-pot aqueous synthesis, optical tuning and energy transfer applications. *Mater. Res. Bulletin*, 2019, vol. 110, pp. 57-66. DOI: 10.1016/j.materresbull.2018.10.013.
35. Yu W.W., Qu L., Guo W., Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.*, 2003, vol. 15, no. 14, pp. 2854-2860. DOI: 10.1021/cm034081k.

STUDY OF THE TECHNOLOGY OF THE RECOMBINATE TARGET PROTEIN SELECTIVE LABELING  
AND DEVELOPMENT OF THE SYNTHETIC ROUTES FOR THE MODIFIED CdTe QUANTUM DOTS  
SYNTHESIS IN AQUEOUS SOLUTIONS

Belikov N.E.<sup>1</sup>, Demina O.V.<sup>1</sup>, Lukin A.Yu.<sup>2</sup>, Petrovskaya L.E.<sup>3</sup>, Skladnev D.A.<sup>4</sup>, Varfolomeev S.D.<sup>1</sup>,  
Khodonov A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS  
Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: khodonov@gmail.com

<sup>2</sup> MIREA – Russian Technological University  
Vernadsky ave., 78, Moscow, 119454, Russia

<sup>3</sup> M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS  
Miklukho-Maclay str., 16/10, Moscow, 117997, Russia

<sup>4</sup> Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», RAS  
Leninsky ave., 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia

**Abstract.** This paper considers the proposed procedure for reversible labeling of target proteins using fluorescent labels and probes. New fluorophores based on quantum dots (QDs CdTe) containing a molecular address (chelate complexes of Ni<sup>2+</sup> with nitrilotriacetic acid and its derivatives) were proposed, capable of forming strong chelates with a hexahistidine tag localized at a given site of the polypeptide chain of the target protein. In this work, special attention is devoted to the selection of the required composition and structure of the label molecule and the practical implementation of the laboratory technology for the synthesis of a set of initial QDs CdTe quantum dots samples with specified optical parameters.

**Key words:** selective labeling of target proteins, fluorescent labels, quantum dots, production methods, nitrilotriacetic acid.



## УСЛОВИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ОДИНОЧНЫХ ПОЛИЕНОВЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТНОГО ОКРУЖЕНИЯ МЕМБРАН

Бехбудова Г.М.

Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана,  
Патамдартское шоссе, 40, г. Баку, AZ-1004, Азербайджан; e-mail: gunel2581@mail.ru  
Поступила в редакцию: 13.06.2021

**Аннотация.** Описаны экспериментальные условия возникновения одиночных ионных каналов в липидных мембранах, модифицированных полиеновыми антибиотиками. В присутствии полиенов нарастание мембранного тока сопровождается дискретными скачками. Величина проводимости и концентрация антибиотика, необходимая для получения одиночного канала, зависят от вида и концентрации электролита, омывающего мембрану. От электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и время сборка каналов. В растворах хлоридов щелочных металлов при одинаковой активности этих солей проводимость канала увеличивается в ряду:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , а в растворах галогенидов калия в ряду:  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Проводимость канала возрастает с увеличением кристаллического радиуса катиона. Показано, что амфотерициновый канал имеет проводимость 3,5 пСм в растворе  $10^{-1}$  М КСl. Нистатиновый канал имеет проводимость 1,4 пСм. Каналы совершают обратимые переходы из открытого состояния в закрытое состояние. Частота этих переходов зависит от вида электролита. Минимальная проводимость у микогептинового и леворинового каналов (0,2-0,3 пСм). Из изученных антибиотиков только ароматический антибиотик леворин  $\text{A}_2$  чувствителен к колебаниям мембранного потенциала.

**Ключевые слова:** полиеновые антибиотики, химическая структура, липидные мембраны, ионные каналы, дискретная проводимость, состояния канала.

Использование полиеновых антибиотиков (ПА) в медицинской практике базируется на детальном изучении молекулярно-биологических механизмов их взаимодействия с клеткой. Показано, что антибиотики полиеновой структуры эффективно подавляют грибковые клетки и препятствуют росту злокачественных образований [1, 2]. Некоторые ПА способны инактивировать инфекционные вирусы, препятствовать их проникновению в клетку и ингибировать их репродукцию [3]. Однако молекулярный механизм действия ПА на клетки остается до сих пор не раскрытым. Основная информация о механизме действия ПА была получена на бислойных липидных мембранах (БЛМ) [4]. Одной из основных предпосылок, позволившей приблизиться к пониманию молекулярного механизма действия полиенов на бислой, было обнаружение резкого увеличения интегральной проводимости БЛМ в присутствии некоторых ПА [5].

Данные о действии амфотерицина В и нистатина с одной и с двух сторон мембран позволили многим авторам выдвинуть предположение о том, что эти антибиотики, взаимодействуя с холестерином, образуют на обеих сторонах мембраны полупоры определенного размера [6]. Две полупоры, располагаясь вдоль их общей оси поперек мембраны, могут образовывать водную пору (трубу), которая пронизывает мембрану насквозь. Такая пора может индуцировать в мембранах проницаемость для воды, ионов и не электролитов.

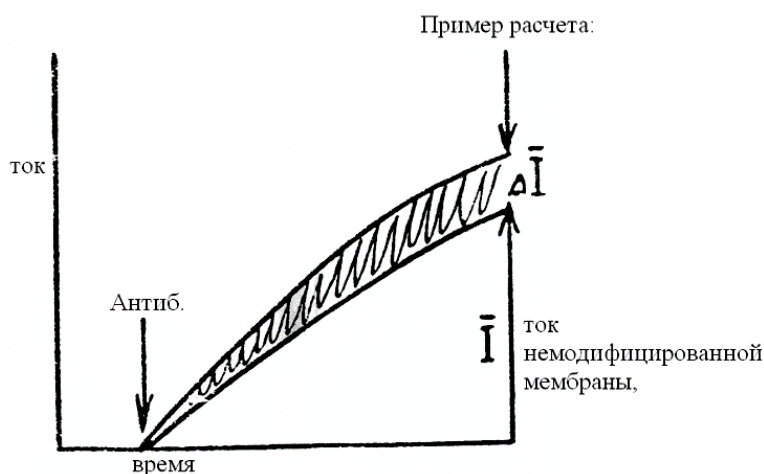
Молекулы амфотерицина В и фосфолипида имеют приблизительно одинаковую длину (около 24 Å). В молекуле амфотерицина В содержится длинная жесткая полиеновая цепь  $\text{C}_{20}\text{-C}_{33}$  и гидрофильная цепочка  $\text{C}_1\text{-C}_{15}$ , состоящая из нескольких гидроксильных групп. Гидрофобная и гидрофильная цепи располагаются параллельно друг другу. Кроме того, в молекуле амфотерицина В имеется карбоксильная группа при  $\text{C}_{16}$ , аминоксахар, содержащий положительно заряженный азот, и гидроксильную группу при  $\text{C}_{35}$  в гидрофобной части молекулы [7]. Общая длина молекулы холестерина составляет 19 Å. Наиболее упакованной структурой в этом случае является полный цилиндр (полупора), состоящая из 8 молекул амфотерицина В и 8 молекул холестерина. В рамках предложенной модели не было возможности рассмотреть механизм функционирования такого канала, ввиду отсутствия экспериментальных данных, подтверждающих и непосредственно отражающих работу одиночных каналов в липидных мембранах. Экспериментально подтвердить существование таких структур в мембранах долгое время никому не удавалось, хотя в этом отношении и велся интенсивный поиск. Исследование свойств единичной проводящей структуры дало бы несравненно большую информацию о молекулярных механизмах функционирования ПА в липидных мембранах.

Изучение только интегральных свойств мембран принципиально не может дать исчерпывающего ответа о молекулярном механизме функционирования ПА в мембране. Принципиально важной задачей представляется выход на более адекватный уровень исследований — изучение свойств и поведения единичного функционирующего канала в липидной мембране. В этом направлении многими исследователями предпринимались интенсивные попытки обнаружить работу одиночно функционирующей поры в присутствии ПА. Именно здесь при попытках обнаружения и записи полиеновых каналов зарубежных исследователей постигает неудача. Хладки и Хейдон в 1970 году пытались зарегистрировать одиночную пору на мембране с нистатином [8]. Однако попытка оказалась безуспешной. Авторы в то время предполагали, что канал проводит ток слишком короткое время. Такой довод кажется убедительным, тем более, что авторы резко увеличили

чувствительность своей установки. В течение последующих лет, несмотря на широкое развитие метода регистрации одиночных ионных каналов, с одной стороны, и детальное исследование проницаемости БЛМ в присутствии ПА, с другой, не было сообщений об успешных попытках обнаружения одиночных ионных каналов на БЛМ. Следует здесь отметить, что примерно в это же время в 1977 году в журнале *Biophysical J.* была опубликована статья о невозможности обнаружения одиночных ионных каналов в присутствии нистатина [9]. Статья так и называлась “Доказательство того, что нистатин не может образовывать каналы в тонких липидных мембранах”! Неспособность нистатина образовывать каналы в бислойных мембранах основывалась на измерении шумов тока в диапазоне частот  $1 \div 10^3$  Гц. Исходя из свойств одиночного нистатинового канала, шум тока должен был наблюдаться в диапазоне  $10^{-3} \div 10^{-2}$  Гц. Группе сотрудников в Институте Биологической Физики Российской Академии Наук в содружестве с автором данной статьи удалось впервые экспериментально обнаружить и зарегистрировать одиночные ионные каналы, образуемые амфотерицином В, нистатином и микогептином [10]. Авторами были теоретически обоснованы экспериментальные условия для обнаружения одиночного полиенового канала. Входной ток усилителя не превышал  $10^{-14}$  ампера (А). Ток, протекающий через один ионный канал имеет величину  $10^{-13} \div 10^{-12}$  А в 2 М КСl. Напряжение шума на выходе усилителя при коэффициенте усиления 1 было не более  $1,5 \cdot 10^{-5}$  В (подробные условия описаны в разделе методика). Физико-химические характеристики полиеновых каналов в растворах различных электролитов, окружающих мембрану, изучены не достаточно полно. Данная статья посвящена открытию одиночных полиеновых каналов и изучению их свойств в зависимости от субстратного окружения мембран.

БЛМ получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга [11] путем нанесения капли фосфолипидов на отверстие в тefлоновой ячейке. Фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при  $0^\circ\text{C}$  в хлороформ-метанольном растворе в объемном соотношении (2:1). Концентрация фосфолипидов в хлороформ-метанольном растворе была 20 мг/мл. Затем к этим липидам добавляли необходимое количество холестерина и эргостерина в соответствующих концентрациях. В работе были использованы ПА, любезно предоставленные нам проф. Вайнштейном В.А. из Санкт-Петербургского Государственного Химико-фармацевтического Университета. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец “Endim” (Германия). Мембраноформирующие растворы готовились из разных соотношений фосфолипидов с холестерином и эргостерином. В работе использовался перекристаллизованный холестерин и эргостерин фирмы Sigma, Saint Louis, США. Для стабилизации pH водных растворов использовали буферные системы в концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Проводимость не модифицированной мембраны составляла величину 2-3 пСм в 2 М КСl. Исходные ПА практически в воде нерастворимы. Основным растворителем ПА является ДМСО с брутто формулой  $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ . Все ПА в индивидуальном порядке растворялись в ДМСО из расчета 1 мг/мл, что являлось основным маточным раствором, из которых затем с помощью микрошприца антибиотики вводились в водные растворы. Маточный раствор антибиотика хранили в течение недели.

В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ КСl, pH 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранной проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембраны с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени ( $>1$  ч). При внимательном рассмотрении начального участка измеряемого мембранного тока обнаружилось, что нарастание сопровождается характерным низкочастотным шумом на фоне увеличивающейся во времени постоянной составляющей тока. При этом амплитуда шума была приблизительно пропорциональна корню квадратному из абсолютной величины мембранного тока. Предположив, что наличие шума связано с дискретной работой слабо проводящих единиц, ориентировочно была подсчитана проводимость одной единицы (рис. 1).



**Рисунок 1.** Характерная картина нарастания мембранного тока после добавки антибиотика ( $\bar{I}$  — средняя величина мембранного тока в момент времени  $t$ ,  $\Delta\bar{I}$  — средняя величина шума в тот же момент времени  $t$ )

Для этого случая можно записать два уравнения:

$$\bar{I} = N \cdot I_k \quad (1)$$

$$\Delta \bar{I} = \sqrt{N} \cdot I_k, \quad (2)$$

где  $N$  – число токопроводящих дискретных единиц;  $I_k$  – ток, протекающий через одну проводящую единицу.

Возведем обе части уравнений в квадрат и, поделив уравнение (1) на уравнение (2), получим число проводящих единиц в любой точке кривой нарастания мембранного тока:

$$N = \bar{I}^2 / \Delta \bar{I}^2 \quad (3)$$

Поставив значение  $N$  из (3) в уравнение (1), получим:

$$I_k = \Delta \bar{I}^2 / \bar{I} \quad (4)$$

но поскольку проводимость  $g = I / E_m$ , то

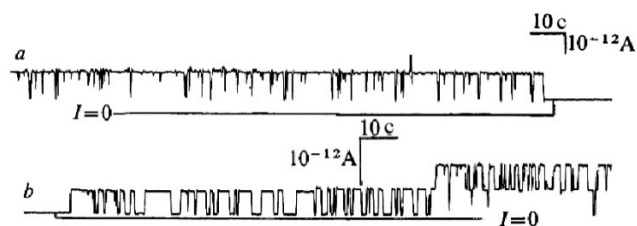
$$g_k = \Delta g^2 / g, \quad (5)$$

где  $g_k$  – проводимость одной дискретной единицы.

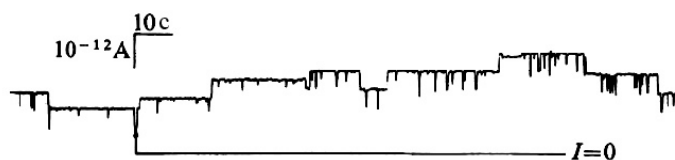
Приближенный расчет для этого случая показал, что проводимость одиночного канала составляет 0,3 пСм в растворе электролита 100 мМ KCl. Проводимость же не модифицированной мембраны с площадью  $s_m = 3 \cdot 10^{-2}$  мм<sup>2</sup> составляет 5 пСм. Это означает, что качественное и количественное изучение функционирующего одиночного канала сильно затруднено в связи с тем, что вклад проводимости канала в общую проводимость мембраны составляет меньше 10 %. Казалось, что увеличить этот вклад можно за счет уменьшения площади мембраны ( $g_{\text{мембр.}} = g_{\text{удельн.}} \cdot s_{\text{мембр.}}$ ), однако работать с мембранами, площадь которых меньше  $10^{-3}$  мм<sup>2</sup>, практически невозможно. Такие по площади маленькие мембраны затекают липидами с краев отверстия (там они находятся в избытке) и становятся уже не бислойными. С целью увеличения полезного сигнала (ионного тока через одну проводящую единицу) необходимо повысить концентрацию примембранного электролита от 100 мМ KCl до 2 М KCl. Только в этих условиях удалось обнаружить дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В. В пользу доказательства того, что дискретные изменения тока есть результат работы одиночных ионных каналов, а не артефактное явление свидетельствуют следующие полученные экспериментальные данные. Во-первых, немодифицированная мембрана (без антибиотика) не дает вообще никаких скачкообразных изменений тока. Во-вторых, введение антибиотиков в концентрации ниже определенного порога также не приводит к изменению тока и только при достижении удельной пороговой концентрации наблюдается хорошо воспроизводимые скачки мембранного тока. В-третьих, вероятность появления дискретных уровней тока резко зависит как от концентрации антибиотиков в примембранном растворе, так и от концентрации холестерина в мембране. В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ KCl, pH 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранной проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембраны с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени ( $> 1$  ч).

При особенно тщательном подборе концентрации антибиотика и хорошем разрешении по оси времени удалось получить воспроизводимые изменения мембранного тока. После введения в водные растворы низких концентраций ПА происходит скачок проводимости. Предполагается, что каналы находятся в единственном проводящем состоянии несколько минут и за это время совершают множество попыток перейти в непроводящее состояние. Среднее время жизни канала в проводящем состоянии вычислялось из общего времени нахождения канала в проводящем состоянии деленное на число кратковременных переходов в непроводящее состояние. На записи каналов видны кратковременные отключения с верхнего проводящего уровня на уровень ( $I=0$ ), либо на предыдущий уровень. Через некоторое время после включения канала можно видеть переход такой дискретно-проводящей единицы на более продолжительный непроводящий уровень. Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях формирования канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов, образуемых амфотерицином В, примерно на порядок ниже проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита.

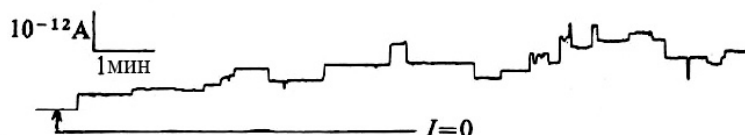
На рисунках 2-5 показана работа одиночных каналов в зависимости от различных электролитов, окружающих мембрану.



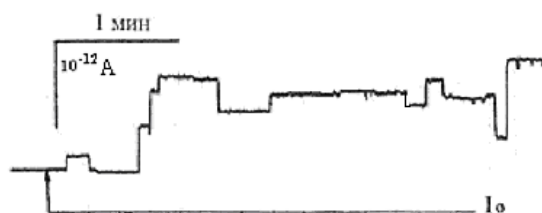
**Рисунок 2.** Дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В  $2 \cdot 10^{-8}$  М. Мембранный Потенциал равен 100 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 5 М CsCl – *a*, 2 М KNO<sub>3</sub> – *b*, pH 7,0,  $t=23^\circ\text{C}$ .



**Рисунок 3.** Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина В  $1 \cdot 10^{-7}$  М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 3 М КСl, pH 7,0,  $t=23^\circ\text{C}$ .



**Рисунок 4.** Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина  $1 \cdot 10^{-7}$  М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М КСl, pH 7,0,  $t=23^\circ\text{C}$ .



**Рисунок 5.** Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина  $1 \cdot 10^{-7}$  М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М КСl, pH 7,0,  $t=23^\circ\text{C}$ .

Амфотерициновый канал имеет наибольшую проводимость (3,5 пСм) и совершает частые переходы из открытого состояния в закрытое состояние (рис. 2а). Нистатиновый канал имеет меньшую проводимость (1,4 пСм) (рис. 3). Переключения нистатинового канала зависят от вида электролита. В растворах КСl практически не наблюдается переключений, однако в растворах  $\text{KNO}_3$  видны короткие переключения из проводящего состояния в непроводящее состояние (рис. 2б). Минимальная проводимость у микогептинового и леворинового каналов (0,2-0,3 пСм). Практически не наблюдается переключения микогептинового канала.

Ни формирование каналов, ни переходы между состояниями каналов не чувствительны к изменению напряжения в присутствии неароматических антибиотиков. Ароматический антибиотик леворин  $\text{A}_2$  чувствителен к колебаниям мембранного потенциала. Свойства каналов, образуемых амфотерицином В, сильно зависят от вида и концентрации электролита в водных растворах. Следует отметить, что от вида электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и формирование каналов, и время переключения канала между состояниями. Селективность амфотерициновых одиночных каналов такая же, как и у мембран с большим числом каналов.

Число амфотерициновых каналов не зависит от величины приложенного к мембране потенциала, т.е. сборка амфотерициновых каналов не является потенциал зависимой и, поэтому, измерения электрических характеристик мембран проводились как при 100, так и при 200 мВ. На рисунках 2-5 видны кратковременные отключения с верхнего уровня на уровень ( $I=0$ ), либо на предыдущий уровень. Через некоторое время наблюдается выключение такой дискретно-проводящей единицы (справа в конце рисунка 2 а). Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях сборки и разборки канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов слабо зависит от величины приложенного к мембране потенциала.

Чтобы исследовать физико-химические свойства одиночного ионного канала, необходимо было сначала доказать следующее:

1. Дискретные изменения проводимости такого рода есть результат работы только одного ионного канала, для которого характерно наличие двух его состояний (открытого –  $g=6,5$  пСм при 200 мВ и закрытого  $g=0$ ), а также вполне определенной частоты кратковременных отключений (рис. 2 а);

2. Показать, что одиночные ионные каналы выступают как самостоятельные, независимые друг для друга дискретные единицы проводимости.

Для доказательства этих двух положений было сделано следующее: повышая концентрацию антибиотика в растворе электролита, окружающего мембрану, можно наблюдать ступенчатые изменения проводимости, связанные с включением и выключением одиночных проводящих единиц. На одной из таких записей, сделанной в растворе электролита 2 М  $C_5Cl$ , наблюдалось в течение длительного времени от двух до семи уровней проводимости, кратных одной и той же величине. Статистическая обработка таких записей показала, что частота кратковременных отключений со второго, третьего и так далее уровней на предыдущий уровень были равны соответственно, 0,76; 1,65; 1,9; 2,3; 3,3  $сек^{-1}$ . Легко видеть, что эти частоты примерно пропорциональны номерам уровней. Такое поведение должно наблюдаться, если в мембрану встроены одинаковые, независимо работающие каналы с двумя состояниями.

На качество регистрируемого процесса сильно влияет величина шума собственной липидной мембраны. Мембраны малой площади (по отношению к большим мембранам) обладают низким уровнем собственного шума, поскольку:

$$g_{\text{общ.шума}} = g_{\text{удельн.шума}} \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (6)$$

Изменяя площадь мембраны, можно в определенной мере регулировать число одновременно работающих ионных каналов.

Общее количество каналов в мембране описывается формулой:

$$N_{\text{общ.}} = N_{\text{удельн.}} \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (7)$$

где  $N_{\text{удельн.}}$  – количество каналов на единицу площади;  $S_{\text{мембр.}}$  – площадь мембраны.

Показано, что удельная проводимость мембраны ( $g_{\text{удельн. мембр.}}$ ) пропорциональна степенной функции концентрации антибиотика в растворе электролита ( $C_A$ ) с показателем степени  $n$  для амфотерицина В, равным 7-10.

$g_{\text{удельн. мембр.}} \sim (C_A)^n$ , так как  $g_{\text{удельн. мембр.}} = N_{\text{удельн.}} \cdot g_k$ , где  $g_k$  – проводимость одного канала = const., то можно записать, что  $N_{\text{удельн.}} \sim (C_A)^n$ .

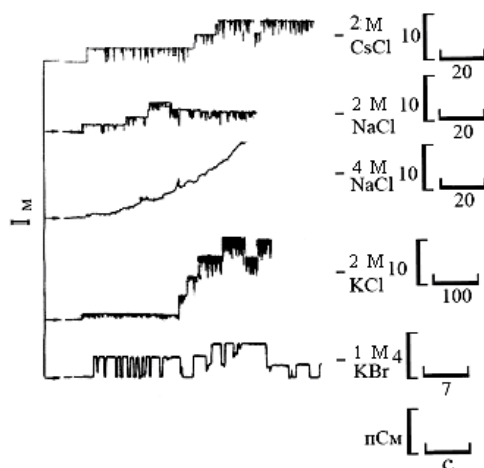
Подставив последнее выражение в формулу (7), получим

$$N_{\text{общ.}} \sim (C_A)^n \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (8)$$

Из последней формулы следует, что получить на мембране одиночно работающий канал только подбором концентрации антибиотика практически невозможно, поскольку в этом случае работает показатель степени  $n$ . В эксперименте же это делается следующим образом: для мембраны с максимальной площадью аккуратно подбирается такая концентрация антибиотика, при которой наблюдается работа 2-3 одиночных каналов. Затем, образуя мембраны с меньшей площадью, можно добиться продолжительной работы только одного ионного канала по всей мембране.

Таким образом, из всего сказанного выше следует, что площадь бислойной мембраны является важной при изучении одиночных полиионных каналов, так как с ее помощью можно в определенных пределах регулировать емкость мембраны, величину проводимости шума мембраны, а также число одновременно работающих каналов. Все эти параметры прямо пропорциональны величине площади мембраны.

Анализируя записи работы амфотерициновых одиночных ионных каналов можно видеть, что в основном наблюдаются дискретные скачки величиной 6,4 пСм в 2 М KCl, однако реже можно наблюдать скачки проводимости другой величины. При анализе большого числа записей одиночных каналов было обнаружено, что ионный канал не всегда имеет одинаковую величину проводимости при постоянных условиях эксперимента. При изучении проводящих свойств открытого канала было видно, что изредка наблюдаются скачки проводимости разной величины. Чтобы исключить ошибки измерений за счет наличия флуктуаций, проводились усреднения проводимости для каждого отдельного эксперимента не менее, чем по 10 одиночным каналам. Набрав большое количество записей работы одиночных каналов, и проведя статистический анализ, была построена гистограмма распределения частоты проводимости одиночных амфотерициновых каналов при постоянных условиях эксперимента. Результаты проведенных экспериментов показали, что в основном образуются каналы с проводимостью в 6,5 пСм в 2 М KCl. Однако с меньшей вероятностью образуются каналы почти с любой другой меньшей проводимостью. Из функции распределения проводимости каналов вытекает, что существует резкий максимум в области 6 – 6,5 пСм, но возможны и скачки любой другой меньшей величины. Статистический анализ поведения нескольких, одновременно работающих в мембране каналов, показал, что они функционируют независимо друг от друга. Кроме того, подавляющее большинство каналов характеризуются одинаковой величиной проводимости. Поведение канала во времени более сложно, чем можно судить по записи, приведенной на рисунках 2-5. Кроме быстрых переключений, существует другой, более медленный процесс с характеристическим временем в несколько минут. Определение времени жизни по записям одиночных каналов дает величину  $\sim 280$  с (среднее по 30 каналам). Концентрация антибиотика, необходимая для получения одного канала (за 10-30 мин наблюдения), сильно зависит от концентрации стерина в мембраноформирующем растворе.



**Рисунок 6.** Одиночные амфотерициновые каналы в растворах различных электролитов. Потенциал на мембране 200 мВ, рН 6,5; 23°С, фосфолипид:холестерин 20:1. Концентрация амфотерицина В: CsCl- $5 \cdot 10^{-8}$  М; NaCl- $1 \cdot 10^{-7}$  М; KCl- $3 \cdot 10^{-8}$  М; KBr- $1 \cdot 10^{-7}$  М.

С увеличением концентрации холестерина вдвое необходимо уменьшить примерно вдвое концентрацию антибиотика. Это наблюдение подтверждает предположение о том, что образуется канал из молекул стерина и амфотерицина В, взятых в стехиометрическом соотношении 1:1

По-видимому, для открытого ионного канала характерно наличие наиболее вероятного его физико-химического состояния (например, число молекул антибиотика, составляющего канал, определенное расположение его структурно-активных групп и т.д.), которое определяет его проводимость. Величина проводимости канала не зависит от концентрации холестерина и от концентрации антибиотика. Эти данные подтверждают постоянство стехиометрии полиен-холестеринового комплекса. Одиночные каналы в присутствии амфотерицина В могут образовываться в растворах различных электролитов. Для иллюстрации на рисунке 6 показаны экспериментальные записи таких каналов.

Свойства каналов, образуемых амфотерицином В, не зависят от мембранного потенциала. Ни сборка каналов, ни переходы между состояниями канала не чувствительны к изменению напряжения мембраны. Свойства амфотерициновых каналов сильно зависят от вида и концентрации электролита в водных растворах. Причем от электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и сборка каналов, и время переключения канала между состояниями.

В результате исследования каналов были обнаружены интересные свойства: величина проводимости и концентрация антибиотика, необходимая для получения одиночного канала, зависят от вида и концентрации электролита, омывающего мембрану.

Для наглядной иллюстрации в таблице приведена величина проводимости каналов, полученных в растворах разных солей в присутствии амфотерицина В. Проводимость каналов в растворах различных электролитов несколько отличается друг от друга. В растворах хлоридов щелочных металлов при одинаковой активности этих солей проводимость канала увеличивается в ряду:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , а в растворах галогенидов калия в ряду:  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Проводимость канала возрастает с увеличением кристаллического радиуса катиона. Однако для галогенидов калия проводимость канала определяется не только размером гидратных оболочек ионов, но и их кристаллическим радиусом.

Для каналов, образуемых амфотерицином В, проводимость канала зависит как от вида катиона, так и от вида аниона. Величина предельной проводимости зависит от вида и аниона, и катиона. Проводимость канала в растворах хлоридов щелочных металлов возрастает с ростом кристаллического радиуса катиона. В растворах

**Таблица 1.** Зависимость проводимости одиночных каналов от вида электролита в присутствии амфотерицина В. Потенциал на мембране 200 мВ. Фосфолипид:холестерин 20:1, рН 6,5;  $t=24^\circ\text{C}$

Вид электролита 2 М	гм, пСм	Вид электролита 2 М	гм, пСм	Вид электролита 1 М	гм, пСм
LiCl	$1,4 \pm 0,2$	KF	$3 \pm 0,25$	MgCl <sub>2</sub>	$3,5 \pm 0,3$
NaCl	$3 \pm 0,25$	KCl	$6,5 \pm 0,65$	CaCl <sub>2</sub>	$3,25 \pm 0,3$
KCl	$6,5 \pm 0,5$	KBr	$3,5 \pm 0,3$	BaCl <sub>2</sub>	$3,25 \pm 0,3$
CsCl	$7 \pm 0,5$	KI	$0,5 \pm 0,1$		
		KNO <sub>3</sub>	$3 \pm 0,25$		

гм – проводимость одиночного канала.

галогенидов калия максимальная проводимость при любой активности соли наблюдается для хлорида. Заметим, что, несмотря на большой диаметр поры, канал довольно хорошо различает сходные ионы – галогениды. Так, отношение величин проводимостей канала в растворах KCl и KF достигает ~3, а в растворах KCl и KI >10. Изменение величины проводимости полиеновых каналов в зависимости от структуры антибиотика и от вида электролита, окружающих мембрану, можно объяснить двумя причинами. Предполагается, что внутри мембраны формируются каналы с разной стехиометрией, что влияет на проводимость самого канала. С другой стороны, ионы, входящие в канал, обладают сложным характером взаимодействия с гидрофильными участками внутри самого канала.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность член-корр. Национальной Академии Наук Азербайджана, проф. Касумову Халил Мамедовичу за ценные замечания при обсуждении результатов проделанной работы и помощь при подготовке материалов работы к публикации.

Работа выполнена при поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EYF\_BGM\_3\_BRFTF\_2+/2017\_15/12).

#### Список литературы / References:

1. Grela E., Zdybicka-Barabas A., Pawlikowska-Pawlega B., Cytrynska M., Wlodarczyk M., Grudzinski W., Luchowski R., Gruszecki W.I. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, (IF 3. 998). 17029, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
2. Vainshtein V.A., Nikolayevic L.N., Sultanova G.H., Baghirova A.A., Pashazade T.J., Gasimova V.Kh., Tagizade T.P., Kasumov Kh.M. The action of chemically transformed macrocyclic polyene antibiotics on tumor cells. *J. Experimental biology and medicine*, Moscow, 2019, vol. 166, no. 6, pp. 735-738. doi: 10.1007/s10517-019-04429-9.
3. Xu F., Zhao X., Hu S., Li J., Yin L., Mei S. et al. Amphotericin B Inhibits Enterovirus 71 Replication by Impeding Viral Entry. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 9, no. 6, p. 33150. doi: 10.1038/srep33150.
4. Kamiński D. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur. Biophys. J.*, 2014, vol. 43, pp. 453-467. doi: 10.1007/s00249-014-0983-8.
5. Samedova A.A., Tagizade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 337-345. doi: 10.1134/S1068162018030135.
6. Boukari Kh., Paris G., Gharbi T., Balme S., Janot J-M., Picaud F. Confined Nystatin Polyenes in Nanopore Induce Biologic Ionic Selectivity. *Journal of Nanomaterials*, 2016, Article ID 2671383, <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01455011>.
7. Borowski E. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco*, 2000, vol. 55, pp. 206-208. doi: 10.1016/s0014-827x(00)00024-0.
8. Hladky S., Haydon D. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature*, 197, vol. 225, pp. 451-453. doi: 10.1038/225451a0.
9. Romine W.O., Sherette G.R., Brown G.B., Bradley R.J. Evidence that nystatin may not form channels in thin lipid membranes. *Biophys. J.*, 1977, vol. 17, no. 3, pp. 269-274. doi: 10.1016/S0006-3495(77)85655-5.
10. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluyev V.M. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. *Nature*, 1976, vol. 262, no. 5570, p. 698-699. PMID: 958440 doi: 10.1038/262698a0.
11. Kates M. Techniques of lipidology. In R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg (ed.), Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Elsevier. Amsterdam. The Netherlands*, 1986, vol. 3, pp. 100-110, 163-164, 251-253, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.002.

**THE CONDITION FOR THE FORMATION OF SINGLE POLYENE ION CHANNELS AND STUDY OF THEIR PROPERTIES DEPENDING ON THE SUBSTRATE ENVIRONMENT OF THE MEMBRANES****Behbudova G.M.**

Institute of Botany of the Azerbaijan National Academy of Sciences

Patamdart Highway, 40, Baku, AZ1004, Azerbaijan; e-mail: gunel2581@mail.ru

**Abstract.** Experimental conditions for the discovery of single ion channels in lipid membranes modified by polyene antibiotics are described for the first time. In the presence of polyenes, the increase in the membrane current is accompanied by discrete jumps. The amount of conductivity and concentration of the antibiotic required to obtain a single channel depend on the type and concentration of the electrolyte washing the membrane. The properties of the channel in the conducting state depend on the electrolyte and also on the time assembly of the channels. In solutions of alkali metal chlorides with the same activity of these salts, the channel conductivity increases in a row:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , and in solutions of potassium chloride in the row:  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . The channel conductivity increases with the crystal radius of the cation. It is showed that the amphotericin channel has a conductivity of 3.5 pS in a solution of  $10^{-1}$  M KCl. The nystatin channel has a conductivity of 1.4 pS. The channels make reversible transitions from the open state to the closed state. The frequency of these transitions depends on the type of electrolyte. The minimum conductivity had been a mycoheptin and levorin channels (0.2-0.3 pS). Of the studied antibiotics, only the aromatic antibiotic levorin  $\text{A}_2$  is sensitive to fluctuations in the membrane potential.

**Key words:** polyene antibiotics, chemical structure, lipid membrane, ion channel, discrete conductivity, channel states.



## ИНГИБИТОРЫ ЛИПОКСИГЕНАЗ ПОДАВЛЯЮТ $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ТРИФЛУОПЕРАЗИНОМ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ

Миленина Л.С.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Крутецкая Н.И.<sup>1</sup>, Бадюлина В.И.<sup>1</sup>, Симонян А.О.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ  
e-mail: l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

<sup>2</sup> Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова  
ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ

Поступила в редакцию: 23.06.2021

**Аннотация.** Нейролептик первого поколения трифлуоперазин (ТФП), широко применяемый в терапии шизофрении и других психических заболеваний, оказывает многогранное влияние на внутриклеточные процессы. Так, ранее нами было показано, что ТФП вызывает увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , в перитонеальных макрофагах крыс, связанное с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующим депозависимым входом  $\text{Ca}^{2+}$  из наружной среды. Однако, механизмы, посредством которых ТФП вызывает  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы в макрофагах, до конца не изучены. В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты. В макрофагах арахидоновая кислота окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии нейролептика фенотиазинового ряда ТФП на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах. С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2АМ обнаружено, что селективные блокаторы 5-липоксигеназ (каффеиновая кислота и zileuton) и 12-липоксигеназ (байкалейн) значительно подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые ТФП в перитонеальных макрофагах крысы. Нордигидрогуаретиковая кислота, ингибирующая все изоформы липоксигеназ, практически полностью подавляет вызываемые ТФП  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы. Полученные данные свидетельствуют об участии липоксигеназ и (или) продуктов липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии ТФП на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах. Участие ферментов каскада метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии ТФП на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  может быть объяснено моделью встраивания амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Это может приводить к изменению жидкости мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза  $\text{A}_2$ , запускающая каскад метаболизма арахидоновой кислоты. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма арахидоновой кислоты участвуют в формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП.

**Ключевые слова:** трифлуоперазин, липоксигеназы, внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , перитонеальные макрофаги.

### ВВЕДЕНИЕ

Трифлуоперазин (трифтазин, стелазин, ТФП) относится к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда, широко применяемых в терапии шизофрении и других психических заболеваний [1]. Выявлено многогранное влияние ТФП на внутриклеточные процессы [2].

Множественность эффектов ТФП, как и других фенотиазинов, может быть связана с его амфифильной природой. Будучи амфифильным соединением, он хорошо проникает через мембраны. Предложен механизм встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды, в первую очередь фосфоинозитиды [3]. Благодаря этому, ТФП может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт.

Ранее нами было впервые показано, что ТФП и другой нейролептик фенотиазинового ряда – хлорпромазин – увеличивают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы [4-6]. Однако механизмы, посредством которых фенотиазины вызывают увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах, до конца не изучены.

В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты (АК) [7]. АК высвобождается из мембранных липидов под действием фосфолипазы  $\text{A}_2$  (ФЛА<sub>2</sub>) и далее окисляется в клетке по трём основным ферментативным путям с образованием биологически активных продуктов – эйкозаноидов [7]. В макрофагах АК окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ [8]. На тромбоцитах человека было ранее установлено, что психотропные соединения могут модулировать активность ФЛА<sub>2</sub> и продукцию метаболитов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК [9, 10].

Основной изоформой липоксигеназ, экспрессированной в макрофагах и других иммунных клетках, является 5-липоксигеназа, которая окисляет АК с образованием лейкотриенов – ключевых медиаторов, участвующих в запуске и развитии воспалительных и аллергических реакций [11]. Важную роль в макрофагах играют также 12/15-липоксигеназы, продукты которых (в том числе липоксин A<sub>4</sub>), напротив, выполняют противовоспалительную и цитопротекторную функцию [12].

Поскольку запуск липоксигеназного пути окисления АК играет важную роль в активации макрофагов, представлялось целесообразным исследовать возможное участие липоксигеназного пути метаболизма АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  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 и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ , на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны нами ранее [5]. Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотоблеширования измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[Ca^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [13]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

На рисунках 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  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках в зависимости от времени измерения [14].

Для выявления участия липоксигеназного пути окисления АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах использовали селективные ингибиторы 5-липоксигеназ кофеиновую (3,4-дигидроксипинамовую) кислоту [15] и противоастматический агент zileuton (N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина, Zyflo®) [16], селективный ингибитор 12/15-липоксигеназ флавоноид байкалейн [17], а также неселективный ингибитор всех изоформ липоксигеназ (5-, 12- и 15-липоксигеназ) нордигидрогуаретиковую кислоту [7, 18].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 4 мкг/мл ТФП к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, приводит к быстрому повышению  $[Ca^{2+}]_i$  от базального уровня, равного  $92 \pm 17$  нМ, до  $221 \pm 25$  нМ ( $n=14$ ), после чего наблюдается длительная фаза «плато»  $Ca^{2+}$ -ответа (рисунки 1а, 2а), отражающая депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в клетки.

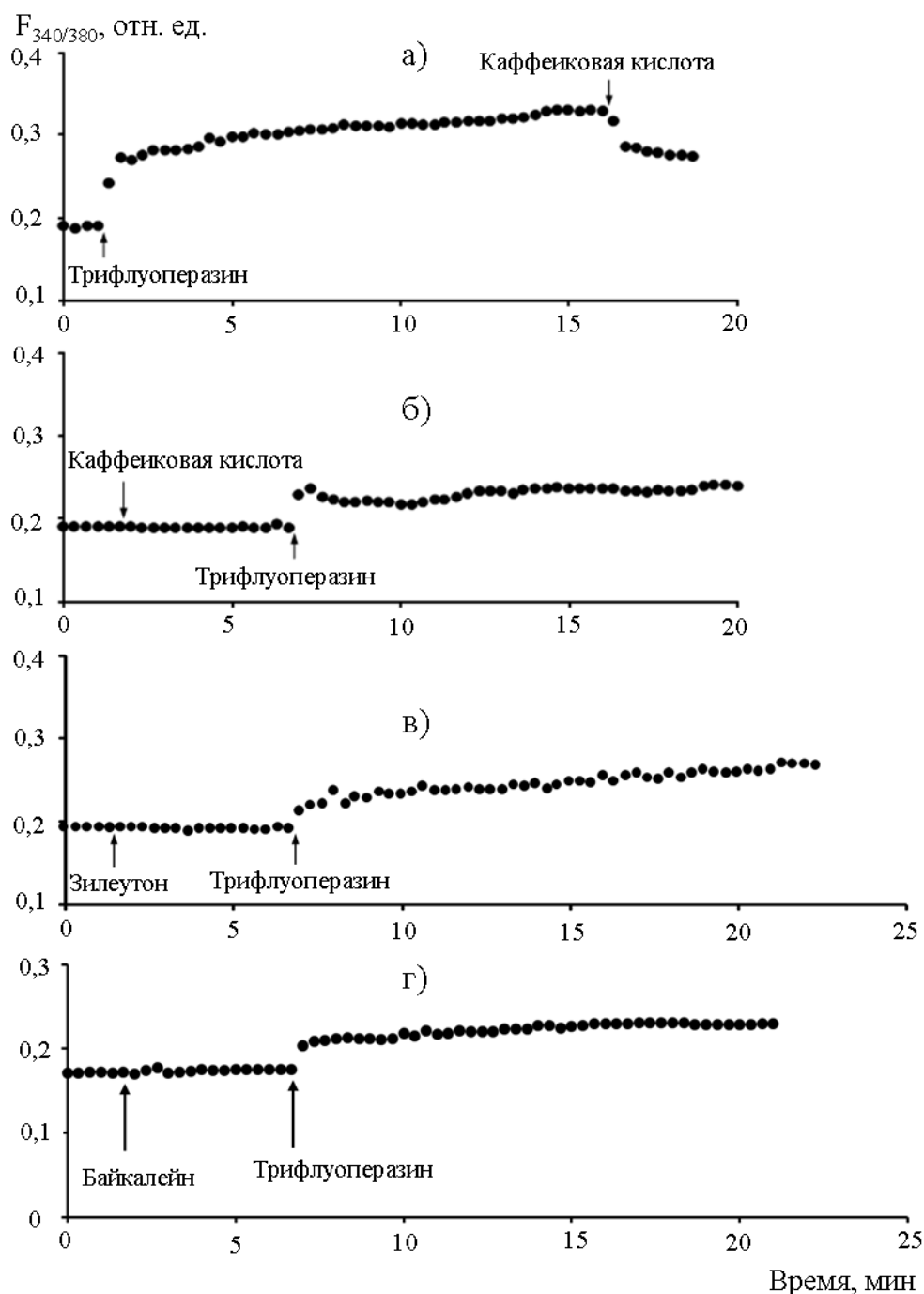
Показано, что преинкубация макрофагов с 10 мкМ кофеиновой кислоты в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл ТФП приводит к существенному (на  $61,4 \pm 14,2$  %,  $n=7$ ) подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП (рисунок 1 б). Аналогичные результаты были получены при использовании 2 мкМ zileutona (рисунок 1 в) или 10 мкМ байкалейна (рис. 1 г). Подавление  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП, при воздействии zileutona составило  $34,6 \pm 10,5$  % ( $n=7$ ), а при воздействии байкалейна –  $58,8 \pm 7,6$  % ( $n=6$ ).

Обнаружено также, что введение 20 мкМ кофеиновой кислоты (рис. 1 а), 4 мкМ zileutona или 20 мкМ байкалейна (не показано) на фоне развившегося плато  $Ca^{2+}$ -ответа, индуцированного ТФП, вызывает уменьшение  $[Ca^{2+}]_i$  на  $46,3 \pm 12,4$ ,  $33,5 \pm 8,2$  или  $52,9 \pm 3,0$  % соответственно ( $n=7$  для каждого из агентов).

Представлялось интересным исследовать влияние на  $Ca^{2+}$ -ответы, вызываемые ТФП, нордигидрогуаретиковой кислоты, которая ингибирует все изоформы липоксигеназ (5-, 12- и 15-липоксигеназы). Показано, что введение 30 мкМ нордигидрогуаретиковой кислоты (рисунок 2 а) на фоне развившегося плато  $Ca^{2+}$ -ответа, индуцированного ТФП, приводит к практически полному (на  $76,9 \pm 8,9$  %,  $n=7$ ) подавлению фазы плато и возвращению  $[Ca^{2+}]_i$  к базальному уровню. Обнаружено также, что преинкубация макрофагов с 20 мкМ нордигидрогуаретиковой кислоты в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл ТФП приводит к полному подавлению фазы плато  $Ca^{2+}$ -ответа, обусловленной депозависимым входом  $Ca^{2+}$  из наружной среды, и уменьшению (на  $58,9 \pm 8,0$  %,  $n=7$ ) амплитуды пика  $Ca^{2+}$ -ответа, отражающего мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо (рис. 2 б). Это согласуется с полученными ранее данными о том, что нордигидрогуаретиковая кислота в концентрации 20–50 мкМ предотвращает активацию депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в лейкоцитарных базофилах крысы линии RBL-1 [19].

Полученные нами результаты свидетельствуют об участии 5- и 12/15- липоксигеназ и/или продуктов окисления АК с участием этих ферментов во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах.

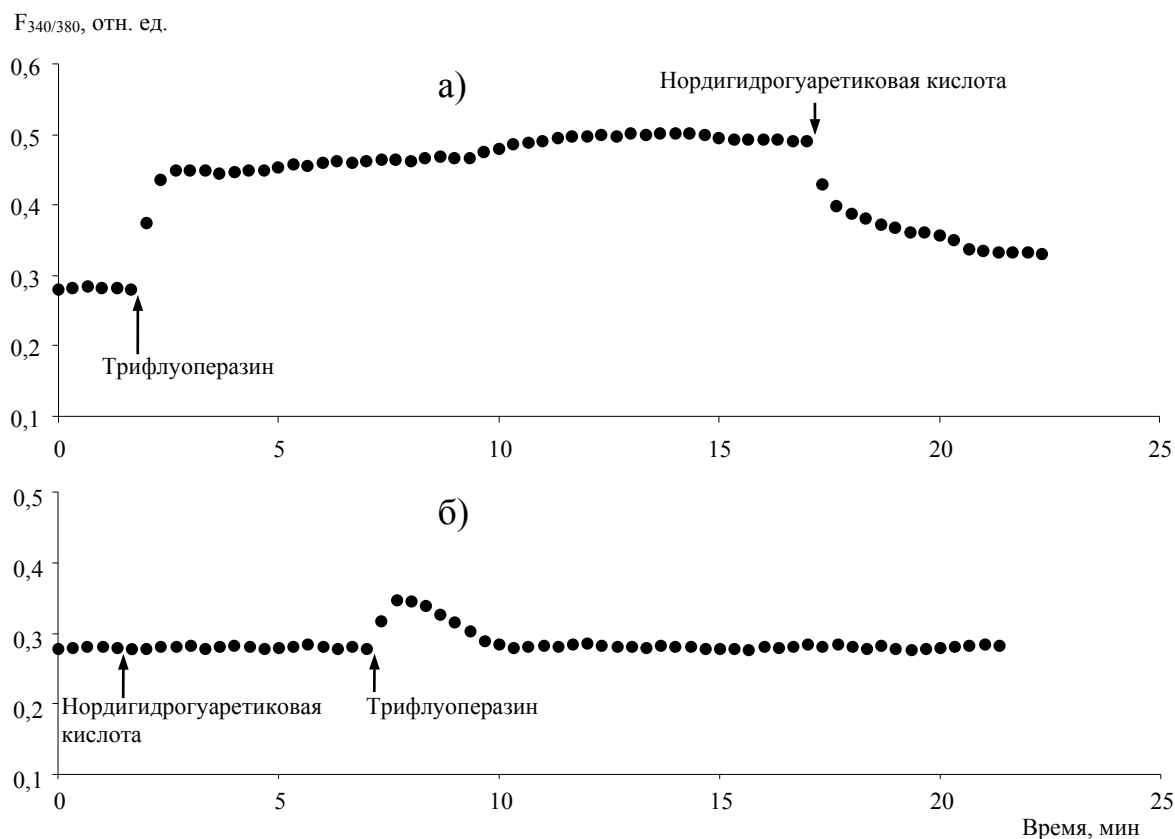
Участие ферментов каскада метаболизма АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  может быть объяснено моделью встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Трициклическое гидрофобное кольцо молекулы ТФП встраивается в гидрофобную фазу мембраны, в то время как алкильный фрагмент с терминальной аминогруппой взаимодействует с полярными головками кислот



**Рисунок 1.** Влияние ингибиторов липоксигеназ на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые трифлуоперазином в перитонеальных макрофагах крысы. Здесь и на рисунке 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции  $F_{340}/F_{380}$  при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 4 мкг/мл трифлуоперазина; на фоне развившегося  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа вводили 20 мкМ каффеиковой кислоты. б, в, г – макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 5 мин с 10 мкМ каффеиковой кислоты (б), 2 мкМ зилеутон (в) или 10 мкМ байкалейна (г), затем добавляли 4 мкг/мл трифлуоперазина. Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов

липидов [3,20]. Это может приводить к изменению жидкости мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза  $\text{A}_2$ , запускающая каскад метаболизма АК. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма АК участвуют в формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП.

В настоящее время многие фармакологические агенты, ингибирующие метаболизм АК, активно используются в медицине в терапии целого ряда воспалительных, аллергических и инфекционных заболеваний [21]. Так, давно известно, что продукты 5-липоксигеназного пути окисления АК (лейкотриены) играют важную роль в патогенезе бронхиальной астмы [22]. Первым специфическим ингибитором 5-липоксигеназ,



**Рисунок 2.** Влияние нордигидрогуаретиковой кислоты на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые трифлуоперазином в макрофагах а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 4 мкг/мл трифлуоперазина. На фоне развившегося  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа вводили 30 мкМ нордигидрогуаретиковой кислоты; б – клетки инкубировали с 20 мкМ нордигидрогуаретиковой кислоты в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл трифлуоперазина

используемым для терапии хронической астмы, был препарат zileuton (N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина, Zylflo®) [16]. Зилеутон уменьшает образование сульфидопептидных лейкотриенов и лейкотриена  $\text{B}_4$ , оказывает бронхорасширяющее действие и предупреждает развитие спазма бронхов, вызванного холодным воздухом и аспирином [23]. Кроме того, существуют данные об эффективности этого антилейкотриенового препарата в лечении угревой болезни (акне) [24].

Другие ингибиторы липоксигеназ нордигидрогуаретиковая кислота, каффеиковая кислота и байкалейн также являются фармакологическими агентами, перспективными для использования в медицине. В настоящее время активно исследуются их противовоспалительный, противоопухолевый и антиоксидантный эффекты [25-27]. Полученные нами результаты о подавлении ингибиторами липоксигеназ  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП в макрофагах, свидетельствуют о нежелательности совместного клинического применения противоастматического агента зилеутона, каффеиковой кислоты, нордигидрогуаретиковой кислоты или байкалейна с нейролептиком трифлуоперазином

#### Список литературы / References:

1. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: a review. *Am. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
2. Sudeshna G., Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Europ. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 648, pp. 6-14. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.08.045
3. Oruch R., Lund A., Pryme I.F., Holmsen H. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.*, 2010, vol. 3, pp. 67-88. DOI: 10.1007/s12154-009-0034-6
4. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г. Влияние трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. В сб.: «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 2017, т. 1, 451 с., с. 188-192. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. The effect of trifluoperazine on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. In: *Receptors and Intracellular Signaling*, Pushchino, 2017, vol. 1, 451 p., pp. 188-192. (In Russ.)]
5. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 315-322. (In Russ.)]

6. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Влияние хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Докл. Акад. Наук, 2017, т. 474, № 1, с. 116-118. [Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The effect of chlorpromazine on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. *Dokl. Bioch. Biophys.*, 2017, vol. 474, pp. 162-164. (In Russ.)]

7. Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, vol. 55, pp. 69-102.

8. Brown G.P., Monick M.M., Hunninghake G.W. Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1988, vol. 254, pp. C809-C815.

9. Walenga R.W., Opas E.E., Feinstein M. B. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases  $\text{A}_2$  and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, pp. 12523-12528.

10. Oruch R., Pryme I.F., Holmsen H. Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets. *Saudi Med. J.*, 2008, vol. 29, pp. 1397-1407.

11. Kuhn H., Banthiya S., van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, vol. 1851, pp. 308-330. DOI: 10.1016/j.bbailip.2014.10.002.

12. Krönke G., Katzenbeisser J., Uderhardt S., Zaiss M.M., Scholtyssek C., Schabbauer G., Zarbock A., Koenders C., Axmann R., Zwerina J., Baenckler H.W., van den Berg W., Voll R.E., Kuhn H., Joosten L.A.B., Schett G. 12/15-Lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, pp. 3383-3389. DOI: 10.4049/jimmunol.0900327

13. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.

14. 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

15. Chung T.-W., Moon S.-K., Chang Y.-C., Ko J.-H., Lee Y.-C., Cho G., Kim S.-H., Kim J.-G., Kim C.-H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 2004, vol. 18, pp. 1670-1681. DOI: 10.1096/fj.04-2126com

16. Wenzel S. E., Kamada A. K. Zileuton – the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann. Pharmacother.*, 1996, vol. 30, pp. 858-864. DOI: 10.1177/106002809603000725

17. Van Leyen K., Kim H.Y., Lee S.-R., Jin G., Arai K., Lo E.H. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*, 2006, vol. 37, pp. 3014-3018. DOI: 10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5

18. Salary H., Braquet P., Borgeat P. Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets. *Prostaglandins and Leukotrienes, and Medicine*, 1984, vol. 13, pp. 53-60. DOI: 10.1016/0262-1746(84)90102-1

19. Glitsch M.D., Bakowski D., Parekh A.B. Effects of inhibitors of the lipo-oxygenase family of enzymes on the store-operated calcium current  $I_{\text{CRAC}}$  in rat basophilic leukaemia cells. *J. Physiol.*, 2002, vol. 539.1, pp. 93-106. DOI: 10.1013/jphysiol.2001.012826

20. Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusiewicz B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 16-23.

21. Khanapure S.P., Garvey D.S., Janero D.R., Letts G.L. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2007, vol. 7, pp. 311-340. DOI: 10.2174/156802607779941314

22. Montuschi P. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma. *Pharmaceuticals*, 2010, vol. 3, pp. 1792-1811. DOI: 10.3390/ph3061792

23. Berger W., De Chandt M.T.M., Cairns C.B. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int. J. Clin. Pract.*, 2007, vol. 61, pp. 663-676. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01320.x

24. Zouboulis C.C. Zileuton, a new efficient and safe systemic anti-acne drug. *Dermato-Endocrinol.*, 2009, vol. 1, pp. 188-192. DOI: 10.4161/derm.1.3.8368

25. Manda G., Rojo A.I., Martínez-Klimova E., Pedraza-Chaverri J., Cuadrado A. Nordihydroguaiaretic acid: from herbal medicine to clinical development for cancer and chronic diseases. *Front. Pharmacol.*, 2020, vol. 11, 151. DOI: 10.3389/fphar.2020.00151

26. Donald G., Kathleen Hertzer K., Eibl G. Baicalein – an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. *Curr Drug Targets*, 2012, vol. 13, pp. 1772-1776. DOI: 10.2174/138945012804545470

27. Espindola K.M.M., Ferreira G.R., Narvaez L.E.M., Rosario A.C.R.S., da Silva A.H.M., Silva A.G.B., Vieira A.P.O., Monteiro M.C. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Front. Oncol.*, 2019, vol. 9, 541. DOI: 10.3389/fonc.2019.00541

LIPOXYGENASE INHIBITORS ATTENUATE  $\text{Ca}^{2+}$  RESPONSES INDUCED BY TRIFLUOPERAZINE IN PERITONEAL MACROPHAGESMilenina L.S.<sup>1</sup>, Krutetskaya Z.I.<sup>1</sup>, Antonov V.G.<sup>2</sup>, Krutetskaya N.I.<sup>1</sup>, Badulina V.I.<sup>1</sup>, Simonyan A.O.<sup>1</sup><sup>1</sup> Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

<sup>2</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy

ul. Akademika Lebedeva 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia

**Abstract.** Trifluoperazine (TFP) belongs to the first antipsychotics generation widely used in treatment of mental diseases. A multifaceted influence of TFP on intracellular processes has been revealed. Earlier we have shown that TFP increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , causing  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and subsequent store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry from external medium, in rat peritoneal macrophages. However, the mechanisms by which TFP causes  $\text{Ca}^{2+}$  responses are not fully understood. In activation and functioning of immune cells, including macrophages, the arachidonic acid metabolism cascade plays an important role. In macrophages arachidonic acid is oxidized predominantly by cyclooxygenases and lipoxygenases. Therefore, it was useful to investigate the involvement of lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in TFP effect on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry, we have found that selective blockers of 5-lipoxygenases (caffeic acid and zileuton) and 12-lipoxygenases (baicalein) significantly suppress TFP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses in rat peritoneal macrophages. Nordihydroguaretic acid, which inhibits all isoforms of lipoxygenases, almost completely suppresses TFP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses. The data obtained suggest the involvement of lipoxygenases and (or) lipoxygenase pathway products in TFP effect on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in macrophages. The participation of arachidonic acid cascade enzymes in TFP effect on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  can be explained by the model of embedding of amphiphilic antipsychotic agents, including phenothiazine neuroleptics, in the membrane inner monolayer. This can lead to a change in membrane fluidity and functioning of membrane-bound enzymes, such as phospholipase  $\text{A}_2$ , which triggers arachidonic acid cascade. In turn, the enzymes and/or products of arachidonic acid metabolism are involved in the formation of TFP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses.

**Key words:** trifluoperazine, lipoxygenases, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, peritoneal macrophages.

## РЕОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВЫХ ФРАКЦИЙ (ПВП) ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА

Масимов Э.А., Багирова С.Р., Гасанова Х.Т.

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: masimovspektr@rambler.ru

Поступила в редакцию: 25.06.2021

**Аннотация.** В данной работе исследовалось температурная зависимость характеристической вязкости, постоянная Хаггинса ( $k'$ ), характеризующая сопротивляемость макромолекулярных клубков к проникновению в них молекул растворителя и второго вириального коэффициента ( $A_2$ ). Как известно, константа Хаггинса  $K$  является ещё одной константой, которая наряду с характеристической вязкостью  $[\eta]$  характеризует реологические свойства разбавленного раствора, причем определяется размерам, формой и свойствами сегментов молекул полимера и молекул растворителя. В конечном итоге  $K$  определяет (характеризует) стремление растворителя в клубок, или сопротивляемость полимера проникновению растворителя в клубок. Для сильно разбавленных растворов длинные упругие макромолекулы сворачиваются в клубок и увеличение вязкости вызванные отворачивания отдельные макромолекула по действиям пары, возникающую трением её с растворителя из-за различия скорости течения в разных участках раствора выражается характеристикой вязкости  $[\eta]$ . Действительно изменение характеристической вязкости от температуры находится в прямой связи зависимостью термодинамического качества растворителя. Если качество растворителя улучшается с ростом температуры ( $A_2$  возрастает), клубок разбухает больше, сопротивление к потоку увеличивается,  $[\eta]$  возрастает. А если качество растворителя ухудшается с ростом температуры ( $A_2$  уменьшается) взаимодействие сегментов макромолекулы между собой превалирует над взаимодействием молекул воды с сегментами, тогда проникновение воды в клубок ухудшается (постоянная Хаггинса растёт), клубок сжимается,  $[\eta]$  уменьшается.

**Ключевые слова:** поливинилпирролидон, постоянная Хаггинса, вязкость.

Как известно, растворы высокомолекулярных соединений (ВМС) в отличии от растворов низкомолекулярных соединений сильно зависят от температуры и концентрации, обладают аномально большими значениями вязкости.

По имеющимся в настоящее время представлениям в разбавленных растворах ВМС длинные гибкие макромолекулы сворачиваются в клубок разной степени проницаемый для растворителя.

В ламинарном потоке при определенном градиенте скорости различные части макромолекулы передвигаются различными скоростями и в результате этого макромолекула подвергается воздействию пары сил, которая заставляет её вращаться в потоке. При вращении макромолекул в потоке происходит трение сегментов макромолекул о молекула растворителя, что макроскопически проявляются в увеличении вязкости раствора по сравнению с вязкостью растворителя. Увеличение вязкости, вызванное вращением отдельных молекул оценивается характеристической вязкостью  $[\eta]$ .

Как известно, константа Хаггинса  $K$  является ещё одной константой, которая наряду с характеристической вязкостью  $[\eta]$  характеризует реологические свойства разбавленного раствора, причем определяется размерам, формой и свойствами сегментов молекул полимера и молекул растворителя.

В конечном итоге  $K$  определяет (характеризует) стремление растворителя в клубок, или сопротивляемость полимера проникновению растворителя в клубок.

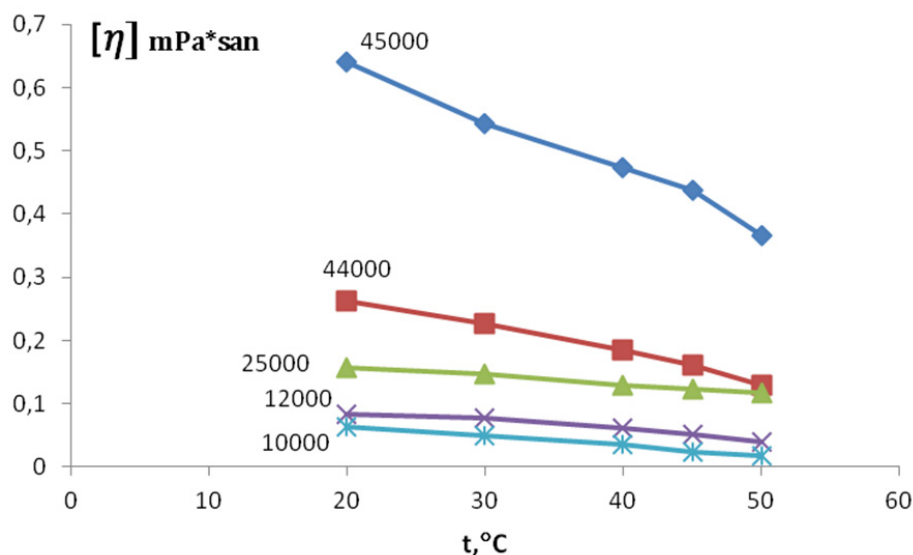
Для сильно разбавленных растворов длинные упругие макромолекулы сворачиваются в клубок и увеличение вязкости вызванные отворачивания отдельные макромолекула по действиям пары, возникающую трением её с растворителя из-за различия скорости течения в разных участках раствора выражается характеристикой вязкости  $[\eta]$ .

В работе исследовалось температурная зависимость характеристической вязкости, постоянная Хаггинса ( $k'$ ), характеризующая сопротивляемость макромолекулярных клубков к проникновению в них молекул растворителя и второго вириального коэффициента ( $A_2$ ) определяющий термодинамическое качество растворителя т.е. сродства растворителя к полимеру. Использовали поливинилпирролидон (ПВП) различных молекулярно-массовых фракций (10000, 12000, 25000, 44000, 45000) немецкой фирмы Alfa Aesar, которые широко применяются в медицине, фармакологии и т.д.

Характеристическая вязкость разбавленных водных растворов ПВП определяли из концентрационной зависимости приведенной вязкости ( $\eta_{уд}/C$ ) предложенной Хаггинсом эмпирическим уравнением:

$$\frac{\eta_{int}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (1)$$

где  $c$  – концентрация полимера в г/100 мл;  $k'$  – постоянная Хаггинса;  $[\eta]$  – характеристическая вязкость которая определялось выражением



**Рисунок 1.** Температурная зависимость характеристической вязкости водных растворов ПВП различных молекулярных масс

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{int}}}{c} \quad (2)$$

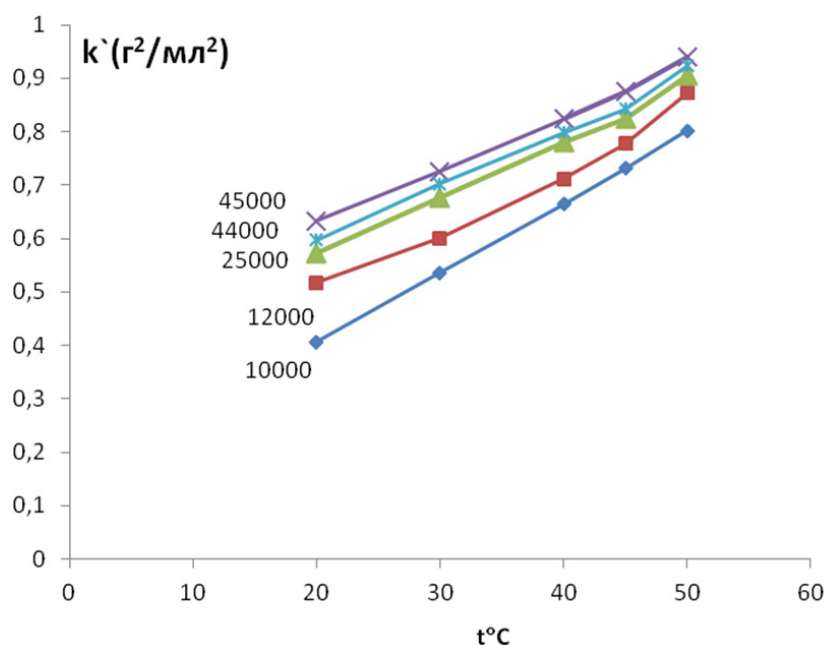
Для определения  $[\eta]$  использовали вискозиметр Убеллоде.

На рисунке 1 представлена температурная зависимость характеристической вязкости водных растворов ПВП.

Как видно из рисунка  $[\eta]$  монотонно уменьшается с ростом температуры для всех исследованных фракций ПВП.

Характер этой зависимости свидетельствует о том, что система ПВП-вода обладает нужной критической температурой расслоения (НКТР). Об этом свидетельствует также монотонное увеличение постоянной Хаггинса характеризующий как уже было отмечено выше сопротивляемость проникновению воды в клубок с ростом температуры (рис. 2).

В пользу вышесделанных рассуждений говорит и температурная зависимость второго вириального коэффициента (рис. 3).



**Рисунок 2.** Зависимость постоянной Хаггинса от температуры различных молекулярных массах ПВП



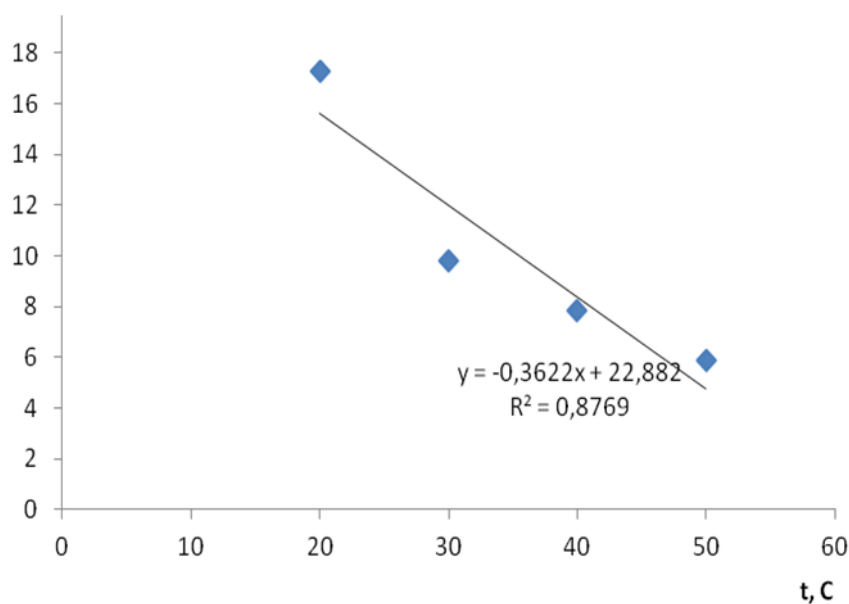


Рисунок 3. Температурная зависимость второго вириального коэффициента

Действительно изменение характеристической вязкости от температуры находится в прямой связи зависимостью термодинамического качества растворителя. Если качество растворителя улучшается с ростом температуры ( $A_2$  возрастает), клубок разбухает больше, сопротивление к потоку увеличивается,  $[\eta]$  возрастает. А если качество растворителя ухудшается с ростом температуры ( $A_2$  уменьшается) взаимодействие сегментов макромолекулы между собой превалирует над взаимодействием молекул воды с сегментами, тогда проникновение воды в клубок ухудшается (постоянная Хаггинса растет), клубок сжимается,  $[\eta]$  уменьшается. Необходимо отметить, что величина второго вириального коэффициента  $A_2$  определяли с использованием полуэмпирического уравнения, предложенного Кригбаумом [3] о зависимости характеристической вязкости от молекулярной массы полувинилпирролидона:

$$[\eta] = [\eta]_{\theta} + 0,50A_2 \cdot M \quad (3)$$

Здесь  $[\eta]_{\theta}$  – характеристическая вязкость система в  $\theta$  растворители. Значение второго вириального коэффициента находилась из наклона угла прямолинейной зависимости  $[\eta] \sim M$ .

#### Список литературы / References:

1. Тагер А.А., Вишнеков С.А., Андреев В.М., Секарева Т.В. *II журнал ВМС*, 1994, т. 16 А, № 1, с. 9. [Tager A.A., Vishnekov S.A., Andreev V.M., Sekareva T.V. *II journal of the Navy*, 1994, vol. 16 A, no. 1, p. 9. (In Russ.)]
2. Усков П.А., Уиллева А.М., Кленин В.П., Раевский В.С. *II журнал ВМС*, 1976, т. 18 А, № 1, с. 243. [Uskov P.A., Uilleva A.M., Klenin V.P., Raevsky V.S. *II journal of the Navy*, 1976, vol. 18 A, no. 1, p. 243. (In Russ.)]
3. Kriqbaum W.R. *Z. polymer Scii*, 1958, vol. 28, no. 116, pp. 213-221.

## RHEOLOGICAL STUDY OF WATER SOLUTIONS MOLECULAR MASS FRACTIONS (PVP) OF POLYVINYLPIRROLIDONE

Masimov E.A., Bagirova S.R., Hasanova Kh.T.

Z. Khalilov str.23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: masimovspektr@rambler.ru

**Abstract.** In this work, we studied the temperature dependence of the intrinsic viscosity, the Huggins constant, which characterizes the resistance of macromolecular coils to the penetration of solvent molecules and the second virial coefficient ( $A_2$ ) into them. As is known, the Huggins constant  $\bar{K}$  is another constant that, along with the intrinsic viscosity  $[\eta]$ , characterizes the rheological properties of a diluted solution, and is determined by the size, shape and properties of segments of polymer molecules and solvent molecules. Ultimately,  $\bar{K}$  determines (characterizes) the tendency of the solvent into the coil, or the resistance of the polymer when the solvent penetrates into the coil. For highly dilute solutions, long elastic micromolecules curl up into a ball and an increase in viscosity caused by the disgust of a separate macromolecule by the action of a pair arising from friction with a solvent due to the difference in the flow rate in different parts of the solution is expressed by the viscosity characteristic  $[\eta]$ . Indeed, the change in intrinsic viscosity with temperature is directly related to the dependence of the thermodynamic quality of the solvent. If the quality of the solvent improves with increasing temperature ( $A_2$  increases), the coil swells more, the resistance to flow increases,  $[\eta]$  increases. And if the quality of the solvent deteriorates with increasing temperature ( $A_2$  decreases), the interaction of the segments of the macromolecule with each other prevails over the interaction of water molecules with the segments, then the penetration of water into the coil worsens (Huggins constant increases), the coil shrinks,  $[\eta]$  decreases.

**Key words:** polyvinylpyrrolidone, Huggins constant, viscosity.

## ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Федорова Н.Д.<sup>1,2</sup>, Сумбатян Д.А.<sup>1</sup>, Стукова М.А.<sup>3</sup>, Иванов А.В.<sup>4</sup>, Семенова Е.В.<sup>1</sup>,  
Филатов М.В.<sup>1</sup>, Варфоломеева Е.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

мкр. Орлова роща, 1, г. Гатчина, 188300, РФ

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

<sup>3</sup> ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

ул. Проф. Попова, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ

<sup>4</sup> Клиника высоких медицинских технологий СПбГУ им. Н.И. Пирогова

наб. р. Фонтанки, 154, г. Санкт-Петербург, 198103, РФ

Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Нейтрофилы – основные клетки врожденного иммунитета. Уничтожение патогенных микроорганизмов осуществляется нейтрофилами посредством фагоцитоза и последующей реализации механизмов генерации активных форм кислорода. Цель настоящей работы – изучение влияния вирусных инфекций на функциональную активность (интенсивность реакции респираторного взрыва) нейтрофилов периферической крови. Исследование проводилось на цельной крови человека методом проточной цитометрии. Проанализированы изменения интенсивности реакции респираторного взрыва при развитии ОРВИ и при бактериальных осложнениях. Определен компонент плазмы крови, предположительно праймирующий нейтрофилы при вирусных инфекциях (белок острой фазы фибриноген). Показано, что нейтрофилы здоровых доноров по-разному реагируют на вакцинацию инактивированными и “живыми” вакцинами против гриппа. Выявлена корреляция между способностью нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и титром антител IgA и IgG к SARS-CoV-2 у пациентов с бессимптомным или легким Covid-19. Полученные данные подтверждают влияние вирусных инфекций на функциональную активность нейтрофилов. Кроме того, предложен белок, который может быть ответственным за это влияние.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, окислительный стресс, респираторные вирусные инфекции, проточная цитометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – крайне важные клетки врожденного иммунитета, представляя собой его первую линию защиты. Они уничтожают различные патогены, захватывая их фагоцитозом и используя реакцию респираторного взрыва (РРВ) для выработки активных форм кислорода (АФК), разрушающих захваченный патоген [1-3].

В течение длительного времени преобладало упрощенное представление о роли нейтрофилов в функционировании врожденного иммунитета [4,5]. Было четко установлено, что нейтрофилы – чрезвычайно важные участники ответа врожденного иммунитета на бактериальные и грибковые патогены, но их роль в противовирусной активности и формировании адаптивного иммунитета оставалась недооцененной [6-8]. Тем не менее, в 2013 году была опубликована работа, описывающая нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETы), образование которых инициируется вирусом гриппа человека 1-го типа [9]. Кроме того, было подтверждено, что вирусы способствуют образованию новых сетей и стимулируют NETоз нейтрофилов [10-12].

Ряд вирусных инфекций, включая вирусы гриппа и коронавирусную инфекцию, вызывают окислительный стресс [13-16]. Перепроизводство АФК и нарушение антиоксидантных механизмов может иметь решающее значение для репликации вируса и последующего заболевания, вызванного вирусной инфекцией [17].

Предполагается, что окислительный стресс играет ключевую роль в тяжелом повреждении легких, вызванном респираторными вирусами [18]. Судя по всему, супероксидные радикалы, генерируемые нейтрофилами в крови при острой вирусной инфекции, вызывают каскад воспалительных реакций. Эти реакции приводят к разрушению окружающих тканей и ускоряют развитие микротромбоза [19,20].

Множество факторов, используемых нейтрофилами для прямого уничтожения патогена, оказывают регуляторное влияние и на другие иммунные клетки [8]. Оно может осуществляться как в виде прямого межклеточного контакта, так и посредством продукции цитокинов и других биологически активных медиаторов [21,22]. Одним из важнейших механизмов воздействия нейтрофилов на клетки иммунитета является генерация АФК [23,24]. Расширение знаний о противовирусной активности нейтрофилов – чрезвычайно важная задача. Несмотря на вышеприведенные данные, до сих пор недостаточно информации об этом виде активности нейтрофилов и его механизмах.

В нашем исследовании было изучено влияние вирусных заболеваний (ОРВИ) на способность нейтрофилов к РРВ в цельной периферической крови. Также были проанализированы изменения РРВ в динамике развития вирусной инфекции. Образцы крови здоровых и больных доноров исследовали оригинальным цитометрическим

методом с применением гидроэтидина в качестве красителя [25]. Этот метод позволяет количественно оценить способность нейтрофилов генерировать АФК и имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, используемыми для изучения функциональной активности нейтрофилов. Прежде всего, это нативность условий, обеспечиваемая отсутствием необходимости выделения нейтрофилов. Во-вторых, высокая точность и воспроизводимость результатов, обусловленные способностью гидроэтидина окисляться исключительно супероксидными радикалами.

Мы предполагаем, что во время вирусной инфекции в плазме крови присутствует некоторое количество праймирующего нейтрофилов агента (или агентов), поэтому было изучено влияние компонентов плазмы крови на РРВ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Пациенты.*

Всего в проекте приняли участие 83 человека, проживающих в Северо-Западном регионе России. Из них 56 человек (35 мужчин и 21 женщина разных возрастных групп) были обследованы на предмет подтверждения заражения новым коронавирусом (SARS-CoV2) и других острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в больнице Санкт-Петербургского государственного университета.

Кровь 14 человек с ОРВИ была проверена на интенсивность РРВ (8 из них - с последующим бактериальным осложнением) и 42 человек, обратившихся за подтверждением заражения новым коронавирусом (SARS-CoV2).

Исследование проводилось на цельной крови здоровых доноров и доноров с ОРВИ, а также с ОРВИ и последующими бактериальными осложнениями (обострение хронического тонзиллита, бронхита) и COVID-19. Кровь брали из вены (3-4 мл) в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (Estonia).

В контрольную группу вошли 15 здоровых людей, в анамнезе которых не было жалоб на вирусные заболевания.

В проекте также приняли участие 12 человек (две группы по 6 человек в каждой, 4 мужчины и 8 женщин разных возрастных групп), которые были вакцинированы против гриппа в "Научно-исследовательском институте гриппа имени А. А. Смородинцева" (Санкт-Петербург, Россия). Были использованы следующие вакцины: инактивированная вакцина Ultrix (Форт, Россия), живая вакцина против гриппа, адаптированная к холоду (ЖГВ) (Россия).

### *Этическое соглашение.*

Использование биологического материала человека (крови) было одобрено Советом по биомедицинской этике больницы Санкт-Петербургского государственного университета (Россия), протокол №07/20 от 16.07.2020. Все измерения проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Письменное информированное согласие было получено от всех участвующих доноров. Все клинические данные были обезличены. Все доноры дали согласие на проведение исследования.

### *Проточноцитометрическая методика регистрации реакции респираторного взрыва в нейтрофилах.*

Реакцию респираторного взрыва (РРВ) измеряли на проточном цитометре, как в [26,27]. В контрольные образцы не добавлялся фторболовый эфир (РМА).

В экспериментах с участием фибриногена (Cloud-CloneCorp, США) его добавляли в образцы крови до концентрации 35 мкг/мл и оставляли на 30 мин при комнатной температуре перед разведением фосфатным солевым буфером (PBS).

Интенсивность флуоресценции измеряли после инкубации методом проточной цитометрии как в экспериментальных, так и в контрольных образцах крови. Для измерений использовался цитометр Cell Lab Quanta Beckman Coulter (США).

Количественным показателем интенсивности РРВ служила усредненная интенсивность флуоресценции (MFI), производимой стимулированными нейтрофилами.

### *Оценка концентрации С-реактивного белка с использованием иммуноферментного анализа (ИФА).*

Тест ИФА для определения концентрации С-реактивного белка (СРБ) основан на принципе твердофазного непрямого иммуноферментного анализа. В тесте использовались моноклональные антитела, сорбированные в лунках стандартной микропластинки. В этом случае конъюгат фермента представляет собой козье антитело к СРБ, меченное ферментом (пероксидаза хрена). При добавлении контрольных и разбавленных тестовых сывороток в лунки SRB, присутствующий в них, одновременно связывается как с иммобилизованными антителами, так и с конъюгатом фермента, образуя "сэндвич". После 45 минут инкубации несвязанные меченые антитела удаляли промыванием. Добавляли субстрат тетраметилбензидина (ТМВ) и инкубировали 20 минут, что приводило к развитию синей окраски, прекращаемого добавлением 1N HCl, при этом цвет менялся. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации СРБ в образце и может быть измерена фотометрически при длине волны 450 нм.

### *Серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2.*

Забор крови проводили с помощью вакуумных пробирок с активатором свертывания крови и гелем Lind-Vac (Эстония). Сыворотку крови получали центрифугированием в течение 15 мин при 2500 об / мин.

Определение антител в крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения количества иммуноглобулинов IgA и IgG использовались тест-системы ELISA против SARS-CoV-2 производства Euroimmun (Германия). Измерения проводились полуколичественным методом в соответствии с инструкциями

производителя. Соотношение Ig измерялось как экстинкция образца пациента/экстинкция калибратора. Использовались термостат PST-60 HL plus (Thermo Scientific), шейкер производства АО "Вектор-бест" (Новосибирск, Россия), автоматическая мойка Hydroflex производства Тесан и считыватель Infinite F50 (Тесан, Швейцария). Измерения присутствия IgM в крови проводили качественным методом с использованием набора для тестирования ИФА SARS-CoV-2-IDM-IFA-BEST производства АО "Вектор-бест" (Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

#### Статистический анализ.

Эксперименты были повторены три раза ( $n = 3$ ), и средние значения были рассчитаны как  $X_m = (1/n)X_i$ , где  $X_i$  является значением каждой последующей выборки. Стандартная ошибка была выражена как  $S^*/n$ , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{(n - 1)}}$$

и доверительный интервал был рассчитан как  $X_m \pm (S^*/n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$ , где  $t$  было найдено в таблице значений при условии, что в наших экспериментах  $\alpha = 0.05$ . Различия между средними значениями более чем двух групп были проанализированы с помощью ANOVA с последующим тестом Даннета. Коэффициент детерминации ( $R^2$ ) нормированный от 0 до 1, использовался для оценки соответствия между наблюдаемыми и рассчитанными линейными зависимостями.

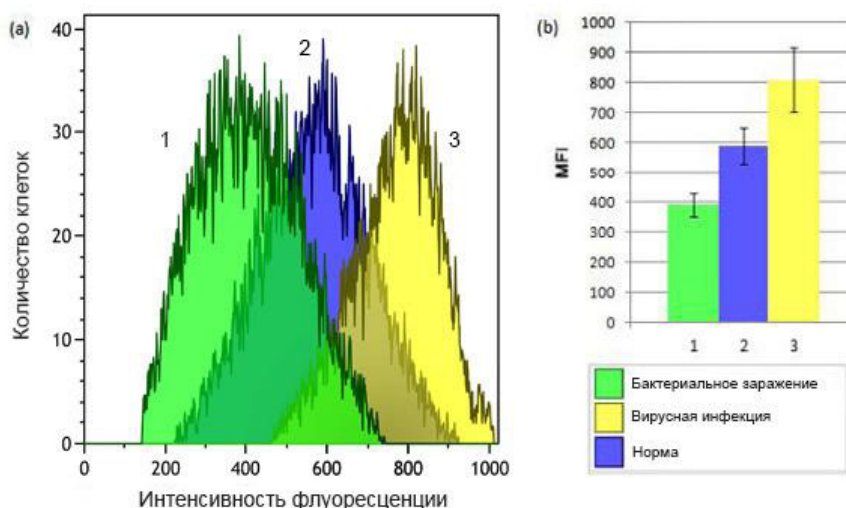
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее [24] мы установили наличие стандартного распределения нейтрофилов по их способности генерировать активные формы кислорода для здоровых доноров [28,29]. Разница между средними значениями составила не более 8,4%.

В то же время заболевание, сопровождающееся тяжелыми воспалительными процессами, приводило к изменению способности нейтрофилов к РРВ в ответ на стимуляцию РМА. На цитометрической гистограмме это выглядит как смещение распределения относительно нормы. Для большинства патологий имел место сдвиг к началу координат [28].

В представленном исследовании показано повышение интенсивности РРВ в нейтрофилах периферической крови во время ОРВИ (сдвиг распределения интенсивности вправо относительно нормы). Этот факт позволяет предположить наличие праймированного состояния нейтрофилов, индуцированного вирусной инфекцией. Эффект праймированности нейтрофилов наблюдался у доноров с ОРВИ, первые симптомы которого появились примерно за два дня до взятия крови (рис. 1(3)).

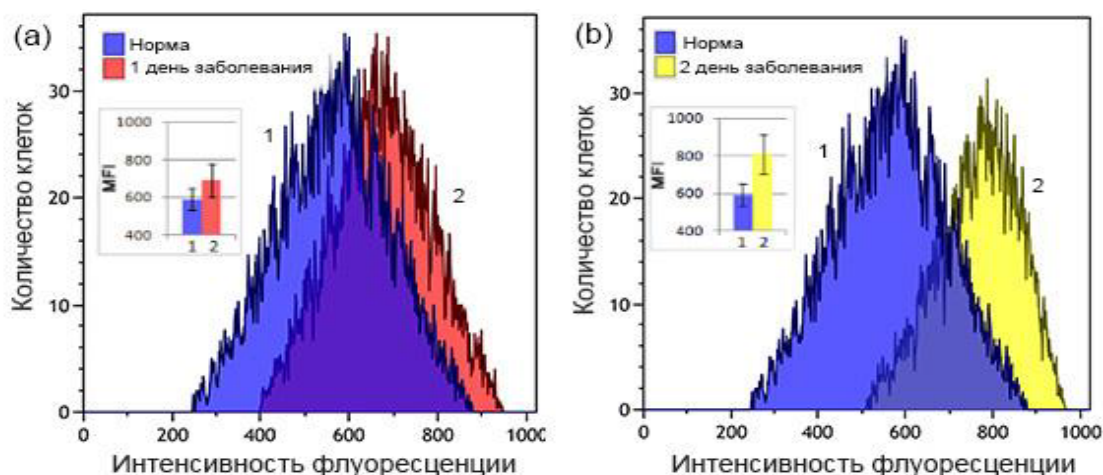
На основании исследования динамики ОРВИ можно сделать вывод, что способность нейтрофилов к РРВ увеличивается в первые 48 часов заболевания, а затем возвращается к норме в случае выздоровления (рис. 2). Данные, полученные на 3-й день, не представлены, так как пик совпадает с нормальным распределением.



**Рисунок 1** – Интенсивность реакции респираторного взрыва нейтрофилов у здоровых доноров и пациентов с вирусными и бактериальными заболеваниями

(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ для: 1 - пациентов с бактериальной контаминацией, 2 - здоровых доноров, 3 - пациентов с вирусными инфекциями;

(б) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для образцов, полученных от здоровых доноров ( $n=14$ ), пациентов с бактериальной контаминацией ( $n=8$ ), пациентов с вирусной инфекцией ( $n=6$ )



**Рисунок 2** – Динамика распределения интенсивности РРВ нейтрофилов у доноров с ОРВИ в первые 2 дня заболевания

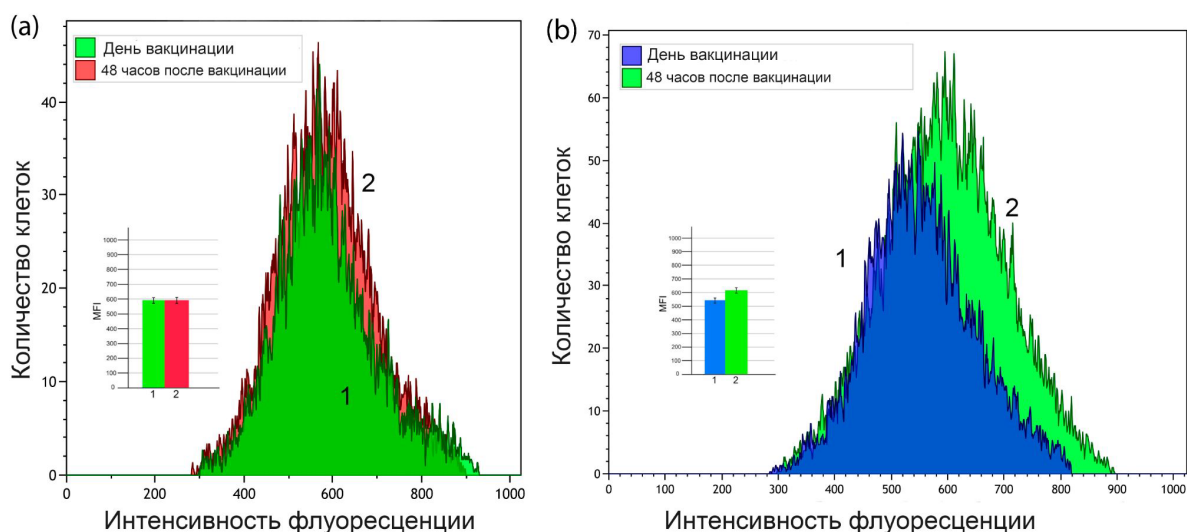
(а) Гистограмма распределения флуоресценции для 1 – нормального состояния, 2 – 1-го дня заболевания;  
(б) Гистограмма распределения флуоресценции на 2-й день заболевания

При возникновении бактериальных осложнений наблюдалось снижение способности нейтрофилов к РРВ вместо возврата к норме (рис. 1(1)).

Для дальнейшего изучения наблюдаемого эффекта измеряли функциональную активность нейтрофилов здоровых доноров после вакцинации против гриппа. Основываясь на результатах описанных выше экспериментов, измерения были проведены в день вакцинации и через 48 часов после нее. Исследование показало, что инактивированная вакцина против гриппа (ИГВ) не влияла на функциональную активность нейтрофилов (рис. 3а). Между тем, треть доноров, вакцинированных “живой” вакциной против гриппа (ЖГВ), продемонстрировали изменения интенсивности РРВ нейтрофилов, аналогичные эксперименту с пациентами с ОРВИ (рис. 1,2) (увеличение интенсивности РРВ в первые 48 часов после вакцинации) (рис. 3б). Следует отметить, что при оценке влияния вакцинации на способность нейтрофилов продуцировать АФК были проведены стандартные тесты ИФА для определения содержания С-реактивного белка в образцах. Концентрация С-реактивного белка во всех образцах соответствовала норме (5,0 г/л ( $\pm 0,05$  г/л) при верхней границе нормы 6,0 г/л).

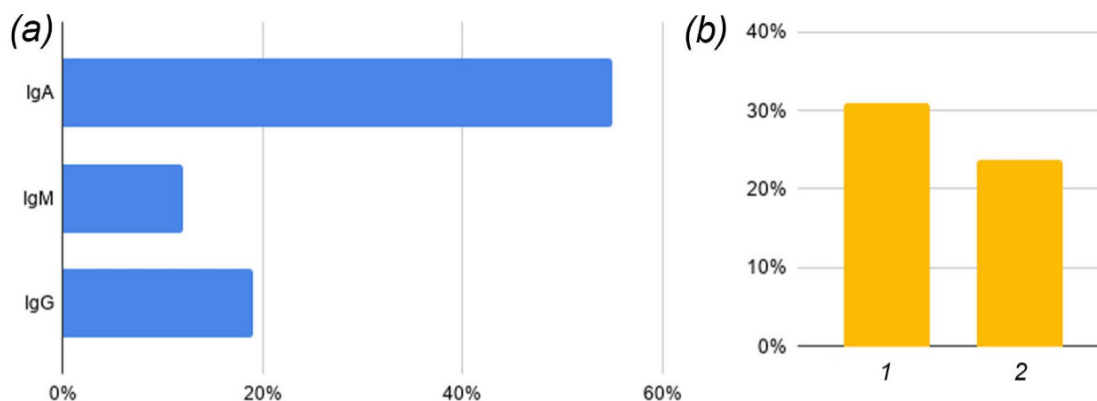
Кроме того, мы проанализировали 42 образца крови, взятых у доноров, которые прошли исследование на наличие антител (IgA, IgM, IgG) к SARS-CoV-2 (рис.4(а)).

Из 13 образцов крови, которые характеризовались высоким уровнем IgA (соотношение  $>0,8$ ) и низким уровнем IgG (соотношение  $<0,3$ ), у 9 (69,2%) наблюдалось увеличение интенсивности РРВ на 10-15% (рис. 5) (3 образца также показали наличие IgM к SARS-CoV-2). Еще один пациент из этой группы (7,7%)



**Рисунок 3** – Оценка способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва в день вакцинации и через 48 часов

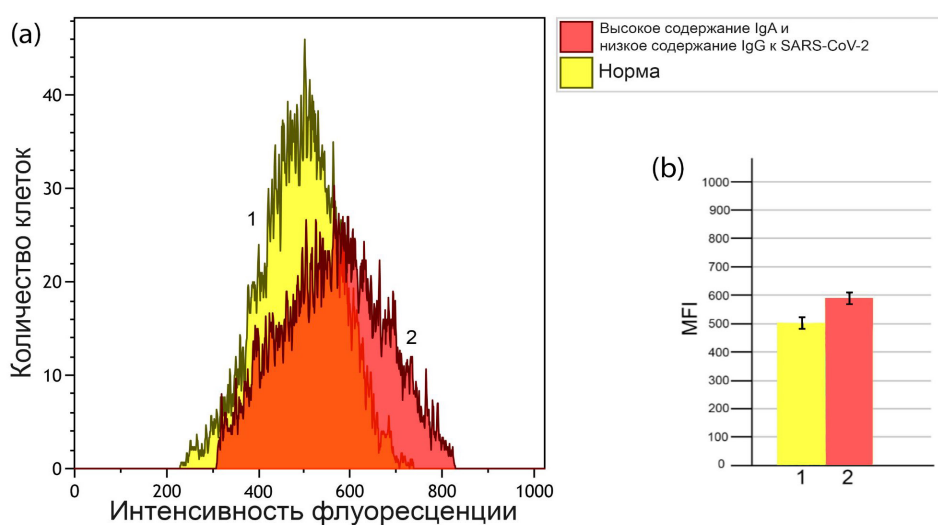
(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ после вакцинации инактивированной вакциной “Ультрикс”;  
(б) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ после вакцинации “живой” вакциной ЖГВ



**Рисунок 4** – Серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2 (обследовано 42 пациента)

(a) Процент пациентов, у которых были выявлены высокие уровни IgA, IgM и IgG;

(b) Процент пациентов, у которых наблюдался: 1 – высокий уровень IgA и низкий уровень IgG, 2 – увеличение интенсивности РРВ на 8-15%



**Рисунок 5** – Распределение способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва в образцах с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG (анти-SARS-CoV-2) у пациентов с подозрением на Covid-19

(a) Распределение способности нейтрофилов к РРВ в образцах с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG – красное, нормальное распределение – желтое;

(b) Среднее значение интенсивности РРВ у здоровых доноров и у пациентов с подозрением на Covid-19: 1 – распределение у здоровых доноров; 2 – распределение у пациентов с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG

продемонстрировал увеличение интенсивности РРВ на 8%. Образцы крови, характеризующиеся другими комбинациями концентраций антител, показали нормальную способность нейтрофилов к РРВ. Таким образом, в 23,8% проанализированных образцов крови выявлено увеличение интенсивности РРВ на 8-15%, и в крови этих пациентов наблюдался высокий уровень IgA и низкий уровень IgG к SARS-CoV-2 (рис. 4(б)).

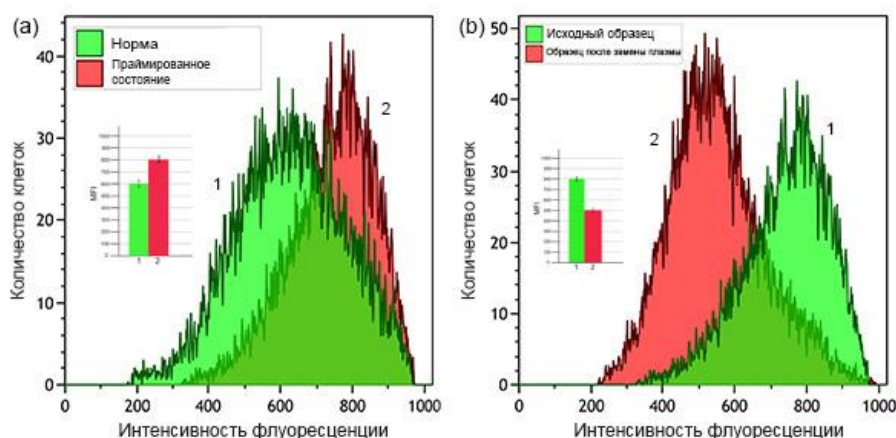
Чтобы определить, является ли праймирующий агент элементом плазмы крови, полученную от здорового донора плазму добавляли к образцам крови, собранным в 1-й день ОРВИ. В результате распределение интенсивности РРВ вернулось к нормальному (рис. 6).

Основываясь на временных изменениях концентраций белков острой фазы воспаления (БОФ), мы предположили, что фибриноген может участвовать в изменениях интенсивности РРВ. Добавление фибриногена в образцы крови в концентрациях, характерных для воспалительного процесса, привело к распределению интенсивности флуоресценции, соответствующему праймированным нейтрофилам (рис. 7).

## ДИСКУССИЯ

В последнее время роль нейтрофилов в противовирусной реакции организма привлекает все больше внимания. Результаты, представленные в этой статье, подтверждают участие механизмов окислительного

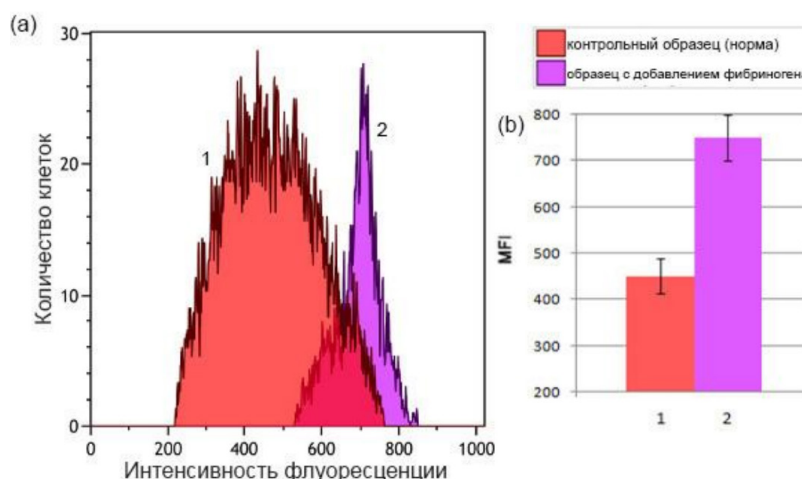




**Рисунок 6** – Оценка способности плазмы крови к праймированию нейтрофилов

(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ в крови с исходной плазмой: 1 – нормальное состояние, 2 – исходное состояние;

(б) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ в крови с замещенной плазмой: 1 – исходная кровь, 2 – кровь с замещенной плазмой



**Рисунок 7** – Распределение способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва с добавлением фибриногена

(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ для: 1 – нормы, 2 – образцов с добавлением фибриногена;

(б) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для: 1 – нормы, 2 – образцов с добавлением фибриногена

стресса, связанных с врожденным иммунитетом, в раннем противовирусном ответе и дополняют эту область знаний.

Перепроизводство АФК и дефекты антиоксидантной системы играют значительную роль в патогенезе ОРВИ, а также в прогрессировании и тяжести сопутствующих респираторных заболеваний [30]. Наши результаты демонстрируют влияние вирусной инфекции на интенсивность РРВ. Как показано на рисунках 1 и 2, на первых стадиях развития заболевания наблюдается повышение уровня генерации АФК в нейтрофилах периферической крови. Такое перепроизводство АФК может привести к необратимому повреждению органов легочной, сердечно-сосудистой и почечной систем. Стоит отметить, что именно эти три системы органов наиболее подвержены тяжелому течению Covid-19, вызванному новым вирусом SARS-CoV-2 [31,32,33].

Известно, что функциональная активность нейтрофилов периферической крови и интенсивность РРВ модулируются *in vivo* некоторыми белками провоспалительной и острой фазы [13,26,29,34]. При вирусных инфекциях и острых воспалениях нейтрофилы, мигрирующие к месту повреждения тканей, переходят в праймированное состояние, и их способность к РРВ возрастает [13,28,29,34]. С другой стороны, снижение интенсивности РРВ во время беременности обусловлено наличием в крови белка острой фазы церулоплазмينا [29].

В настоящем исследовании показано, что при добавлении плазмы здорового донора к плазме пациента, инфицированного вирусом, способность нейтрофилов генерировать АФК возвращается к норме (рис.6). Эти результаты подтверждают наличие агента/агентов в плазме крови, стимулирующих нейтрофилы во время вирусной инфекции. Белок фибриноген острой фазы воспаления оказался одним из компонентов крови, существенно влияющих на интенсивность РРВ. Добавление фибриногена в концентрации, характерных для



воспалительного процесса при ОРВИ, вызывает повышение способности нейтрофилов генерировать АФК. В этом случае интенсивность РРВ совпадает с интенсивностью РРВ праймированных нейтрофилов периферической крови при ОРВИ (рис. 7).

В этом исследовании была проведена оценка функциональной активности нейтрофилов, взятых у пациентов с бессимптомными или легкими заболеваниями, вызванными новым коронавирусом SARS-CoV-2. Анализ РРВ таких пациентов выявил корреляцию способности нейтрофилов генерировать АФК от титра антител к SARS-CoV-2 (рис. 4).

Кинетика для IgA, IgM и IgG хорошо изучена на большом количестве серологических тестов [30,35-37].

Из 42 обследованных нами пациентов с подозрением на Covid-19 почти у четверти (24%) наблюдалось увеличение интенсивности РРВ на 8-15% относительно нормы (рис. 5), и эти пациенты продемонстрировали высокое содержание IgA и низкое содержание IgG. Принимая во внимание существующие данные о кинетике антител, представляется, что мы имеем дело с началом поздней фазы заболевания (примерно через 2-3 недели после появления первых симптомов) (рис. 4), вызванной вирусной инфекцией, и легкой формой Covid-19 (без бактериальных осложнений и острой воспалительной реакции). Вероятно, в случае инфекции SARS-CoV-2, даже если заболевание протекает бессимптомно, окислительный стресс отличается от реакций нейтрофилов при других респираторных вирусных инфекциях. Таким образом, мы наблюдаем увеличение интенсивности РРВ относительно нормы даже по прошествии достаточно большого периода с момента начала инфекции. Однако эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Повышенная концентрация фибриногена, характерная для пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, также может способствовать повышению функциональной активности нейтрофилов [38,39]. Увеличение интенсивности РРВ в ответ на стимуляцию фибриногеном (рис. 7) является косвенным подтверждением этого предположения.

Другой представленный результат связан с анализом реакции нейтрофилов у здоровых людей на вакцинацию инактивированными или “живыми” противогриппозными вакцинами. Различие в их влиянии на функциональную активность нейтрофилов следует учитывать при вакцинации людей с иммунной дисфункцией вследствие различных заболеваний.

Подводя итог, можно сказать, что результаты нашего исследования не только позволяют лучше понять механизмы влияния вирусов на функциональную активность нейтрофилов, но и расширяют поле деятельности при изучении противовирусного ответа врожденного иммунитета.

*Работа поддержана Благотворительным Фондом им. В.Н. Фомичева.*

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

1. Schonrich G., Raftery M.J. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7, p. 366.
2. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 90, pp. 271-284.
3. Soehnlein O. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J. Mol. Med.*, 2009, vol. 87, pp. 1157-1164.
4. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, vol. 6, pp. 173-182.
5. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, pp. 519-531.
6. Essin K.M., Gollasch M., Rolle S., Weissgerber P., Sausbier M., Bohn E. et al. BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages. *Blood*, 2009, vol. 113, pp. 1326-1331.
7. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N.V., Zbytnuik L.D. et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.*, 2012, vol. 18, pp. 1386-1393.
8. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.*, 2012, vol. 188, pp. 3150-3159.
9. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 13, pp. 169-180.
10. Hiroki C.H., Toller J.E., Fumagalli M.J., Colon D.F., Figueireo L.T.M., Fonseca B. Neutrophil Extracellular Traps effectively control acute Chikungunya virus infection. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 10, p. 3108.
11. Muraro S.P., De Souza G.F., Gallo S.W., De Silva B.K. Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, p. 14166.
12. Mozzini C., Girelli D. The role of neutrophil extracellular traps in Covid-19: only a hypothesis or a potential new field of research? *Thromb Res.*, 2020, vol. 191, pp. 26-27.
13. White M.R., Crouch E., Vesona J., Tacke P.J., Batenburg J.J., Leth-Larsen R. et al. Respiratory innate immune proteins differentially modulate the neutrophil respiratory burst response to influenza A virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2005, vol. 289, pp. L606-L616.
14. Zhang Z., Rong L., Li Y.P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.
15. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Ivanova O.N., Kotchetkov S.N., Starodubova E.S. et al. Oxidative Stress

during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev.*, 2016.

16. Ntyonga-Pono M.-P. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? *Pan Afr Med J.*, 2020, vol. 35, p. 12.

17. Khomich O.A., Kochetkov S.N., Bartosch B. Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses*, 2018.

18. Imai Y., Kuba K., Neely G.G. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, 2008, vol. 133, pp. 235-249.

19. Jorch S.K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.*, 2017, vol. 23, pp. 279-287.

20. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 18, pp. 134-147.

21. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, vol. 17, pp. 298-306.

22. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9, p. 113.

23. Klemke M., Wabnitz G.H., Funke F., Funk B., Kirchgessner H., Samstag Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, 2008, vol. 29, pp. 404-413.

24. Hock B.D., Taylor K.G., Cross N.B., Kettle A.J., Hampton M.B., McKenzie J.L. Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology*, 2012, vol. 137, pp. 249-258.

25. Filatov M., Varfolomeeva E., Ivanov E. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochem. Mol. Med.*, 1995, vol. 55, pp. 116-121.

26. Thomas G., Rogues B. Proton magnetic resonance studies of ethidium bromide and its sodium borohydride reduced derivative. *FEBS Lett.*, 1972, vol. 26, pp. 169-175.

27. Himmelfarb J., Hakim R.M., Holbrook D.G., LEEBER D.A., Ault K.A. Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. *Cytometry*, 1992, vol. 13, pp. 83-89.

28. Varfolomeeva E.Yu., Ivanov E.I., Drobchenko E.A., Semenova E.V., Filatov M.V. Detection of inflammatory processes during various diseases by the method of flow cytofluorometry. *Bull Exp Biol Med.*, 2010, vol. 149, pp. 485-489.

29. Varfolomeeva E.Y., Semenova E.V., Sokolov A.V., Aplin K.D., Timofeeva K.E. et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res.*, 2016, vol. 50, pp. 909-919.

30. Delgado-Roche L., Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res.*, 2020, vol. 51, pp. 384-387.

31. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2020.

32. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol.*, 2020.

33. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, vol. 395, pp. 507-513.

34. Hartshorn K.L., Sastry K., Brown D., White M.R., Okarma T.B. et al. Conglutinin acts as an opsonin for influenza A viruses. *J Immunol.*, 1993a, vol. 151, pp. 1-9.

35. Jaaskelainen A.J., Kekalainen E., Kallio-Kokko H., Mannonen L., Kortela E., Vapalahti O. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Euro Surveill.*, 2020.

36. Padoan A., Sciacovelli L., Basso D., Negrini D., Zuin S., Cosma C. et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta.*, 2020, vol. 507, pp. 164-166.

37. Haveri A., Smura T., Kuivanen S., Osterlund P., Hepojoki J., Ikonen N. et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill.*, 2020.

38. Connors J.M., Levy J.H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, 2020, vol. 135, pp. 2033-2040.

39. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.*, 2020, vol. 18, pp. 844-847.

**VIRAL INFECTIONS AFFECT THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD  
NEUTROPHILS****Fedorova N.<sup>1,2</sup>, Sumbatian D.<sup>1</sup>, Stukova M.<sup>3</sup>, Ivanov A.<sup>4</sup>, Semenova E.<sup>1</sup>, Filatov M.<sup>1</sup>, Varfolomeeva E.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»,  
188300, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Russia<sup>2</sup> National Research Center “Kurchatov Institute”

Akademika Kurchatova pl. 1, 123182, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health  
197376, Prof. Popov str. 15/17, St. Petersburg, Russia<sup>4</sup> Saint-Petersburg State University Hospital  
Fontanka river emb., 154, St. Petersburg, 198103, Russia

**Abstract.** Neutrophils are the primary cells of the innate immune system. They destroy pathogenic microorganisms carrying out the oxidative stress mechanism through phagocytosis and extracellular traps (NETs). The aim of the present work is the study of the influence of the viral infection on functional activity (respiratory burst reaction intensity) of peripheral blood neutrophils. The study was conducted on the whole human blood using the flow cytometry technique. The changes in respiratory burst reaction intensity during ARVI development and in case of bacterial complications appearance were analyzed. The blood plasma component priming neutrophils in viral infections was determined (acute phase protein fibrinogen). It was shown that healthy donors' neutrophils react differently to vaccination with inactivated and “alive” influenza vaccines. The fact that neutrophils' capacity to generate reactive oxygen species correlates with the titer of IgA and IgG antibodies to SARS-CoV-2 in patients with asymptomatic or mild Covid-19 was revealed. The obtained data confirm the influence of viral infections on the neutrophils' functional activity. Also, the protein that might be responsible for this influence was suggested.

**Key words:** *neutrophils, oxidative stress, respiratory viral infection, flow cytometry.*

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК НОСИТЕЛИ ХОЛЕСТЕРИНА, НЕ СВЯЗАННОГО С ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Ланда С.Б.<sup>1,2</sup>, Верлов Н.А.<sup>1</sup>, Филатов М.В.<sup>1</sup>, Бурдаков В.С.<sup>1</sup>, Эмануэль В.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики им Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский Институт»  
мкр. Орлова роща, д. 1, г. Гатчина Ленинградская обл. 188300, РФ,

<sup>2</sup> ПСПБГМУ им И.П. Павлова

ул. Льва Толстого 9, г. Санкт-Петербург, 197022, РФ

Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Внеклеточные везикулы (ВВ) – Микрочастицы размером от десятка нанометров до микрона, обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях. К микрочастицам относятся внеклеточные везикулы (ВВ) – частицы размером менее 120 нм, микровезикулы – частицы от 100 до 250 нм и апоптотические тела – частицы крупнее 200 нм. Значительный интерес представляют ВВ, включающие в себя экзосомы и экзомы, поскольку являются биологическими маркерами состояния клеток, что может быть использовано для диагностики, выполняют регуляторные функции и могут участвовать в межклеточной сигнализации. Номенклатура экзосом остается недостаточно разработанной. Большинство исследователей пытаются классифицировать их, основываясь на способе образования, физико-химических характеристиках (размеру, плотности и т.п.) и наличию тетраспориновых маркеров CD9, CD63 и CD81. Хотя нами еще 2010 году с помощью метода динамического светорассеяния, было показано, что гистограмма распределения экзосом по размерам (PSD) бимодальна: ВВ делятся на две фракции, имеющие средние размеры порядка 25 и 90 нм, только в 2018 г. методом фракционирования в силовом поле (*asymmetric flow field-flow fractionation – a4f*) было выявлено два подтипа экзосом, а также частицы, с размером менее 50 нм, которым дали название «экзомы», отличаются от экзосом по белковому и липидному составу. Однако, до настоящего времени продолжают споры продуцируются ли экзомы клетками, или являются продуктом клеточной гибели. Данные изложенные в настоящей работе показывают, что экзомы хотя и несут биомаркеры, характерные для ВВ, сильно отличаются от экзосом по липидному составу, особенно по содержанию холестерина. Продуцирование экзосом клетками, как в культуре, так и *in vitro*, связано с синтезом холестерина в клетках и экспрессируется или супрессируется регуляторами синтеза мевалоната – промежуточного продукта метаболизма холестерина. Кроме того, в работе показано, что концентрация ВВ в организме коррелирует с концентрацией холестерина в плазме, но слабо коррелирует концентрацией холестерина в липопротеинах. Это свидетельствует, о том, что не весь холестерин в плазме связан с липопротеинами, как считалось до настоящего момента. Таким образом, экзомы не являются продуктом клеточной гибели и играют существенную роль в транспорте холестерина в плазме крови.

**Ключевые слова:** Внеклеточные везикулы, экзосомы, экзомы, тетраспорины, холестерин, липопротеины, метод динамического светорассеяния.

### ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) плазмы крови были открыты в 1967 году английским исследователем Питером Вульфом и названы исходно “тромбоцитарной пылью” [1]. Позднее было показано, что при культивировании ретикулоцитов в среду выделяются везикулы, названные экзосомами, мембрана которых по своему составу и присутствующим на ней рецепторам близка к мембране продуцирующих клеток. Авторы предположили, что основная роль этих частиц заключается в удалении лишних мембранных белков в ходе созревания ретикулоцитов [2].

В настоящее время ВВ охарактеризованы гораздо более подробно. Эти частицы отличаются крайней гетерогенностью и разнообразным происхождением. В настоящее время ВВ, обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях, а также в средах, в которых культивируются клеточные культуры. Клетки млекопитающих способны секретировать два типа ВВ: экзосомы (отщепляемые от мембран внутриклеточных компартментов, 20–100 нм в диаметре) и эктосомы (также называемые микрочастицами, или микровезикулами, отщепляемые от плазматической мембраны, 100–1000 нм в диаметре). [3].

Номенклатура экзосом остается недостаточно разработанной. Большинство исследователей пытаются классифицировать их, основываясь на способе образования, физико-химических характеристиках (размеру, плотности и т.п.) и маркерах [4] В настоящее время к экзосомам относят везикулы, образующиеся внутри мультивезикулярных эндосомальных тел (диаметром от 30–120 нм, несущие тетраспорины CD9, CD63, CD81 [5] и содержащие внутреннюю полость, обнаруживаемую, методами электронной [6] или атомно-силовой микроскопии [7,8].

Однако, еще в 2010 году нами, с помощью метода динамического светорассеяния, было показано, что гистограмма распределения экзосом по размерам (PSD) бимодальна: микровезикулы делятся на две фракции,

имеющие средние размеры порядка 25 и 90 нм. Каждая фракция гомогенна что подтверждено с помощью атомной силовой микроскопии. Иммуноаффинным методом продемонстрировано, что все микровезикулы несут антигенные детерминанты, узнаваемые антителами к главному комплексу гистосовместимости первого типа (HLA-ABC) и экзосомные маркеры CD9 и CD63 [9].

В 2018 г. методом фракционирования в силовом поле (*asymmetric flow field-flow fractionation – a4f*) было выявлено два подтипа экзосом, а также частицы, с размером менее 50 нм, которым дали название «экзомеры» [10]. Кроме того, было показано, что, экзосомы демонстрируют чашевидную морфологию, с диапазоном размеров 50–150 нм, экзомеры же имеют размер менее 50 нм и «точечную» морфологию [11,12]. Наши исследования, выполненные методом атомно-силовой микроскопии, показали, во-первых, наличие центральной полости у экзосом и ее отсутствие у экзомеров, а во-вторых, существенные различия в биомеханических свойствах центральной части экзосом и экзомеров. Центральная часть экзомеров оказалась существенно более жесткой, чем у экзосом. Это косвенно указывает на отсутствие внутренней полости у экзомеров [13].

Экзомеры сильно отличаются от экзосом по белковому и липидному составу. Экзомеры были значительно обогащены белками, участвующими в метаболизме (например, гексокиназой1 [HK1], глюкозо-6-фосфатизомеразой [GPI], альдолазой A [ALDOA], глутамино-щавелевоуксусной трансаминазой1 [GOT1], GOT2, фуматгидрогеназой [FH]), а также некоторыми белками теплового шока из семейства HSP90. Кроме того, было показано, что среди липидов экзомеров преобладают фосфолипиды и сфинголипиды. Экзомеры по отношению к экзосомам гораздо сильнее обогащены холестерином. Соотношение холестерина в экзомерах к экзосомам составляло приблизительно 4 к 1. Отмечено так же, что экзомеры, в отличие от экзосом, содержат большое количество этерифицированного холестерина [14]. На это указывают и наши данные о различии в биомеханических свойствах мембран экзосом и экзомеров.

Целью настоящей работы являлось выяснение вопроса: являются ли экзомеры продуктами гибели клеток, или целенаправленно продуцируются клетками, и, если да, то каким образом высокое содержание холестерина в ВВ связано с липидным профилем организма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биологические жидкости.** В случаях исследований *in vivo* источником ВВ служила сыворотка крови, полученная от 41 донора. Доноры отбирались среди пациентов поликлиники СПбГМУ им. И.П. Павлова, получивших направление лечащего врача на анализ липидного профиля. Все доноры дали информированное согласие на участие в научных исследованиях. Им была разъяснена цель и значимость результатов, которые будут получены в ходе исследований. Исследования были одобрены этическим комитетом ПИЯФ НИЦ Курчатовский институт (протокол № 05-2020/ЛЭК от 30.04.2020). Группа доноров специально была сформирована неоднородной для того, чтобы получить максимальный разброс исследуемых параметров. Единственным условием не включения в группу был прием донором статинов на момент начала исследований. При назначении лечащим врачом донору статинотерапии (Розувастатин, Rosuvastatin 10 мг/сутки) через 21 день донор сдавал кровь на повторный анализ. Таких оказалось 21 случай.

Взятие крови из вены и проводили в вакуумные пробирки с активатором свертываемости по стандартному алгоритму [15]. Определение содержания в плазме липопротеинов проводили по стандартной методике, для этого, из супернатанта отбирали 0.5 мл для анализа на ДСР.

Перед анализом образцы плазмы центрифугировались в режиме 10000g в течение 30 мин и фильтровалась через одноразовый фильтр Minisart High Flow с полиэфирсульфоновой мембраной с диаметром пор 0,1 мкм (Sartorius, Germany, Кат № 16553K) для удаления мертвых клеток и их обломков.

**Реактивы, антитела и лекарственные формы.** В работе использовались реактивы следующих производителей: поликлональные антитела – Cloud-Cline Corp. (USA) и Abcam ab5690, Кембридж, Массачусетс, США.

**Метод динамического светорассеяния.** Измерения проводились на лазерном корреляционном спектрометре DLS (ООО «ИНТОКС МЕД», Санкт-Петербург, Россия) с гетерогенной схемой измерения [16]. Спектральная плотность мощности измерялась в диапазоне 16 кГц, накапливалось 2500 копий. Реально получаемой из эксперимента по динамическому светорассеянию информацией является распределение  $A(\Gamma)$  интенсивности рассеяния объектов по диффузионным уширениям спектра рассеяния. Однако нас интересует не само это распределение, а связанное с ним распределение интенсивности рассеяния по размерам  $I(R_h)$ . Это распределение представлено в виде гистограммы распределения частиц по размерам  $I(R_h)$ , где абсцисса – гидродинамический радиус ( $R_h$ ), а ордината представляет собой вклад в общее рассеяние частиц заданного размера  $I\%$ . При этом общее рассеяние всех частиц образца принималось за 100%. Математическая обработка полученных данных проводилась с использованием алгоритма [16] с использованием программного пакета QELSpec 3.2, Гатчина, Россия.

**Идентификация поверхностных биомаркеров внеклеточных везикул.** Для определения наличия специфических поверхностных маркеров на частицах различного размера использовали комбинацию иммуносорбции и DLS, как описано ранее [17]. Вкратце: мы использовали протеин А иммобилизованный на гранулах сефарозы (PrA/S) (Институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия). После этого суспензию микросфер с иммобилизованным на них протеином А разводили в 20 раз фосфатным буфером (PBS) и инкубировали с поликлональными антителами к биомаркерам экзосом, такие как Anti-CD9, Anti-CD63, Anti-CD81 и экзомерам

анти-HSP90 (Cloud-Clone Corp., Хьюстон, Техас, США) в соотношении 1 к 100. После 10 мин инкубации при комнатной температуре к конденсированной КС добавляли PrA/S со связанными антителами в соотношении 1 к 10, и инкубировали в течение 20 мин, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Супернатант собирали и использовали для измерений методом DLS (пять раз для каждого образца). В контрольных образцах использовали без антител и PrA / S с Anti-CD3 (Abcam ab5690, Кембридж, Массачусетс, США).

**Статистическая обработка результатов измерений.** Статистический анализ проводился в R : язык и среда для статистических вычислений (v. 4.0.4; R Core Team, Австрия) с использованием пакетов: rstatix (v. 0.7.0.; Alboukadel Kassambara, 2021), ggpubr (v. 0.4.0.; Alboukadel Kassambara, 2020), tidyverse (Wickham et al., 2019), PerformanceAnalytics (Brian G. Peterson., 2020). Различия в средних значениях для соседних групп анализировали с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент частной корреляции Пирсона [18] для оценки статистической значимости взаимосвязи между двумя непрерывными переменными. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

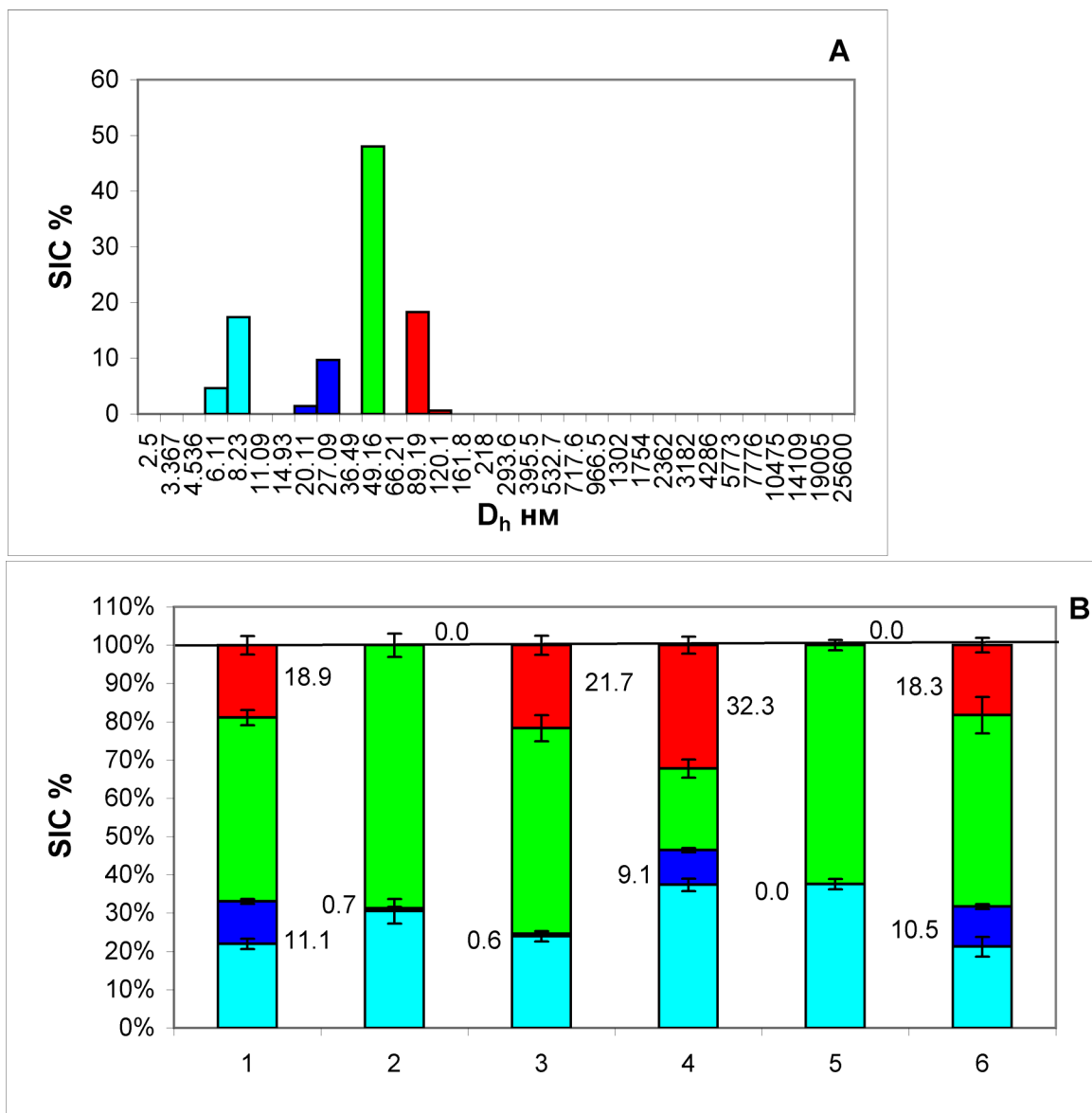
**ВВ и холестерин in vivo.** Ранее нами методом атомно-силовой микроскопии, были обнаружены существенные отличия в биомеханических свойствах мембраны экзосом и экзомеров от клеточной мембраны. Это может быть связано с различиями в липидном составе мембран экзомеров и экзосом и клеточной мембраны [13]. Тот факт, что существенную часть липидов мембраны экзосом и особенно экзомеров составляет холестерин, позволяет предположить, что эти ВВ, помимо прочего, могут выполнять функцию экскреции избыточного холестерина из клеток. Для подтверждения этого положения нами были исследованы корреляции количества экзосом и экзомеров в плазме крови с концентрацией общего холестерина и холестерина, связанного липопротеинами очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности.

Мы исследовали методом ДСР плазму 41 донора. Доноры отбирались среди пациентов поликлиники СПбГМУ им. И.П. Павлова, получивших направление лечащего врача на анализ липидного профиля. Группа доноров специально была сформирована неоднородной для того, чтобы получить максимальный разброс исследуемых параметров. Данные статистической обработки приведены в таблице 1.

В фильтрованной плазме методом ДСР мы зарегистрировали 4 типоразмера рассеивателей (рис. 1А). Частицы наименьшего размера ( $D_h = 7,8 \pm 0,14$  нм) могут быть ассоциированы с альбумином. Рассеиватели, имеющие средний  $D_h 26,2 \pm 0,63$  нм могут состоять из смеси экзомеров ( $D_h 26,4 \pm 0,13$  нм) и липопротеинов низкой плотности ( $19,1 \pm 0,18$  нм). Ранее было показано, что эти частицы несут на поверхности биомаркеры CD9, CD63, CD81 и маркер экзомеров HSP90 [13;]. О гетерогенности этого типа рассеивателей свидетельствует тот факт, что хотя большинство частиц этого типа (синий цвет на гистограмме рис. 1В) удаляются микросферами с PrA/S, несущими антитела к биомаркерам CD63 и HSP90 (экзомеры) (рис. 1В-2 и рис. 1В-3), другая часть удаляется антителами к биомаркеру липопротеинов низкой и очень низкой плотности – ApoB100 (рис. 1В-4). Полностью же эта группа рассеивателей удаляется смесью маркеров CD63 и ApoB100 (рис. 1В-5). Частицы с  $D_h 90,2 \pm 2,38$  нм идентифицируются как экзосомы, так как ранее было показано [13], что эти частицы несут на поверхности биомаркеры CD9, CD63, CD81 и не несут маркер экзомеров HSP90. Они не удаляются антителами к маркеру ApoB100, а удаляются только антителами к маркеру CD63 и смесью антител к маркерам CD63 и ApoB100 (рис. 1В-2 и рис. 1В-5) (красный цвет на гистограмме Рис. 1В). И, наконец, в плазме присутствуют частицы неизвестной природы, имеющие  $D_h 49,2 \pm 2,13$  нм. Они частично удаляются исключительно антителами к маркеру ApoB100, следовательно, содержит в себе липопротеины очень низкой плотности, имеющие близкий размер ( $D_h \approx 36$  нм) и несущие на поверхности этот маркер.

**Таблица 1.** Групповая статистика результатов измерения методом ДСР экзомеров и экзосом из образцов плазмы и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследованиях (N=41)

Group	Mean	SD	m %	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Экзомеры $D_h$ нм	25,85	0,64	2,48	24,29	25,41	26,00	26,3	26,89
Экзомеры SIC %	13,85	7,1	51,26	2,85	7,79	12,74	18,19	29,57
Экзосомы $D_h$ нм	91,07	2,25	2,47	89,66	89,75	90,07	90,42	96,91
Экзосомы SIC %	20,15	1,87	9,28	15,88	19,06	20,06	21,8	23,94
Общий холестерин ммоль/л	6,48	1,26	19,44	4,23	5,44	6,54	7,45	9,23
ЛПНП ммоль/л	3,44	0,89	25,87	1,71	2,66	3,51	3,98	6,14
ЛПОНП ммоль/л	0,64	0,3	46,88	0,21	0,35	0,57	0,82	1,34
ЛПВП ммоль/л	2,4	0,57	23,75	1,4	2,03	2,29	2,69	3,9



**Рисунок 1.** Гистограмма распределения частиц по размерам в фильтрованной плазме здорового добровольца (А). Справа те же данные в табулированном виде. Гистограмма распределения вкладов в суммарное рассеяние 4 фракций частиц (В), соответствующих пикам гистограммы (А). 1 – фильтрованный образец исходной плазмы, 2 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру CD63, 3 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру HSP90, 4 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру ApoB100, 5 – он же, после добавления PrA/S со смесью антител к маркерам CD63 и ApoB100, 6 – он же, после добавления PrA/S с без антител. Голубой цвет – альбумин, Синий цвет – экзосомы, Зеленый цвет – частицы неизвестной этиологии, Красный цвет – экзосомы. Цифры на гистограмме – SIC фракций экзосомов и экзосом в %.

Известно, что вклад в рассеяние (SIC) пропорционален 6 степени размера [19], а концентрация рассеивателей пропорциональна кубу SIC, а концентрация рассеивателей пропорциональна  $\sqrt[6]{SIC}$ . Отсюда можно оценить соотношение экзосомов и ЛПНП в суммарной концентрации рассеивателей данного размера. Приняв вклад в рассеяние «синей фракции» составляет 11.1 %, а вклад в рассеяние ЛПНП – 0,7 % (то, что остается после удаления части рассеивателей антителами к CD63), и рассчитав отношение квадратных корней этих величин, получаем, что для ЛПНП в суммарной концентрации «синих рассеивателей» составляет около 25 %. Эту величину можно принять как верхний предел концентрации ЛПНП по отношению к экзосомам.

В таблицах 2 и 3 представлены матрицы пар корреляций параметров экзосомов и экзосом. Сильной корреляцией будем считать корреляцию с  $R \geq 0,45$ , средней, если  $0,25 \leq R < 0,45$ , и слабой корреляцией если  $R < 0,25$ . Наиболее сильная положительная парная корреляция наблюдается для SIC экзосомов с содержанием общего холестерина –  $R = 0,91$   $p = 0,001$  (табл. 2) В то же время частная корреляция между этими параметрами слабее, хотя и остается сильной ( $R = 0,56$   $p = 0,001$ ). Учитывая, что в данном случае, мы имеем не чистые экзосомы, смесь экзосомов с ЛПНП в соотношении 3:1 можно предположить, что снижение  $R$  с величины 0.91 до 0.56 связано именно с этим фактом.

**Таблица 2.** Матрица парных и частных корреляций вклада в рассеяния экзомеров и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании (N=41)

		1	2	3	4	5
		ExoM	Cholesterol	LDL	VLDL	HDL
1	ExoM	1,00	0,91	0,82	0,12	0,41
2	Cholesterol	0,56	1,00	0,84	0,25	0,45
3	LDL	0,16	0,59	1,00	0,28	0,08
4	VLDL	-0,21	0,47	-0,17	1,00	-0,33
5	HDL	-0,02	0,63	-0,64	-0,50	1,00

Парные корреляции  
Частные корреляции  
0.56 Сильная корреляция  
0.25 Корреляция средней степени  
0.08 Слабая корреляция

**Таблица 3.** Матрица парных и частных корреляций вклада в рассеяния экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании (N=41)

		1	2	3	4	5
		ExoS	Cholesterol	LDL	VLDL	HDL
1	ExoS	1,00	-0,65	-0,62	0,01	-0,35
2	Cholesterol	0,25	1,00	0,84	0,25	0,45
3	LDL	-0,13	0,59	1,00	0,28	0,08
4	VLDL	0,01	0,47	-0,17	1,00	-0,33
5	HDL	-0,14	0,63	-0,64	-0,50	1,00

Для экзосом парная корреляция этих параметров остается сильной (табл. 3)  $R = -0,65$ ,  $p = 0,001$ , а частная корреляция уже корреляция средней степени –  $R = 0,25$ ,  $p = 0,01$ . Отметим, что у этой пары параметров, в отличие от экзомеров, парная корреляция отрицательная, а частная корреляция – положительная. Отрицательные значения коэффициента парной корреляции экзосом можно объяснить тем, что значения SIC для экзомеров и экзосом являются взаимосвязанными величинами, и увеличение одной из них автоматически ведет к уменьшению другой. В частной же корреляции Влияние связи SIC экзосом и экзомеров нивелированы. Поэтому, как в данном, так и других подобных случаях применение частных корреляций более оправдано.

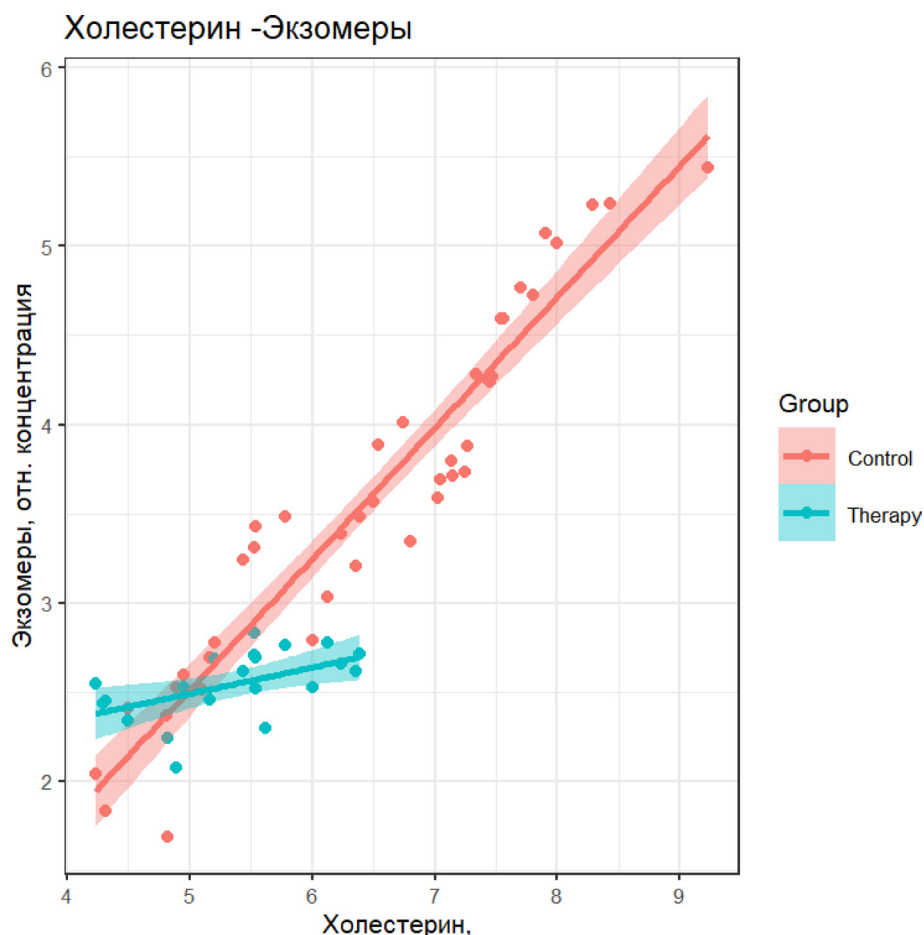
Сильные частные корреляции между общим холестерином и всеми типами липопротеинов ожидаемы и служат подтверждением корректности метода. Несколько необычен факт отрицательной корреляции между липопротеинами высокой плотности и низкой плотности и липопротеинами высокой плотности и липопротеинами очень низкой плотности, но обсуждение данного феномена выходит за рамки данного исследования.

На рисунке 2 приведена кривая линейной регрессии пары общий холестерин –  $\sqrt{SIC}$  экзомеров (оранжевая прямая). Поскольку, как ранее указывалось, SIC пропорционален квадрату концентрации экзомеров, данная прямая отражает корреляцию концентрации экзомеров с концентрацией общего холестерина. В этом случае коэффициент регрессии –  $R^2 = 0,84$ ,  $p = 0,001$ , что указывает на наличие сильной зависимости динамики холестерина и экзомеров в плазме крови. Через 21 сутки после приема препарата коэффициент регрессии падает до  $R^2 = 0,30$ ,  $p = 0,01$ . Уменьшение  $R^2$  для группы терапия указывает на уменьшение связи между концентрацией холестерина и экзомеров в плазме крови, что в сравнении с данными, полученными для группы контроль позволяет говорить об изменении ответа систем организма на изменение концентрации холестерина на фоне проведения терапии.

Среди обследованных доноров 21 человеку по результатам анализа липидного профиля была назначена статиновая терапия. Эти пациенты принимали розувостатин в дозе 10 мг/сутки. Через 21 день эти пациенты повторно сдавали анализ на липидный профиль и исследование методом DLS. Данные статистической обработки приведены в таблице 4 и на рисунке 3.

Особый интерес представляет индивидуальная динамика терапевтического воздействия. Как видно из данных рисунка, в случаях общего холестерина, экзомеров и, в несколько меньшей степени экзосом и ЛПНП вектора «до-после» однонаправлены, и либо практически параллельны, либо сходящиеся. В случае экзосом имеет место та же тенденция, но направление векторов противоположное (если в случае экзомеров и холестерина имеет место уменьшение величины параметра, то в случае экзосом – увеличение).





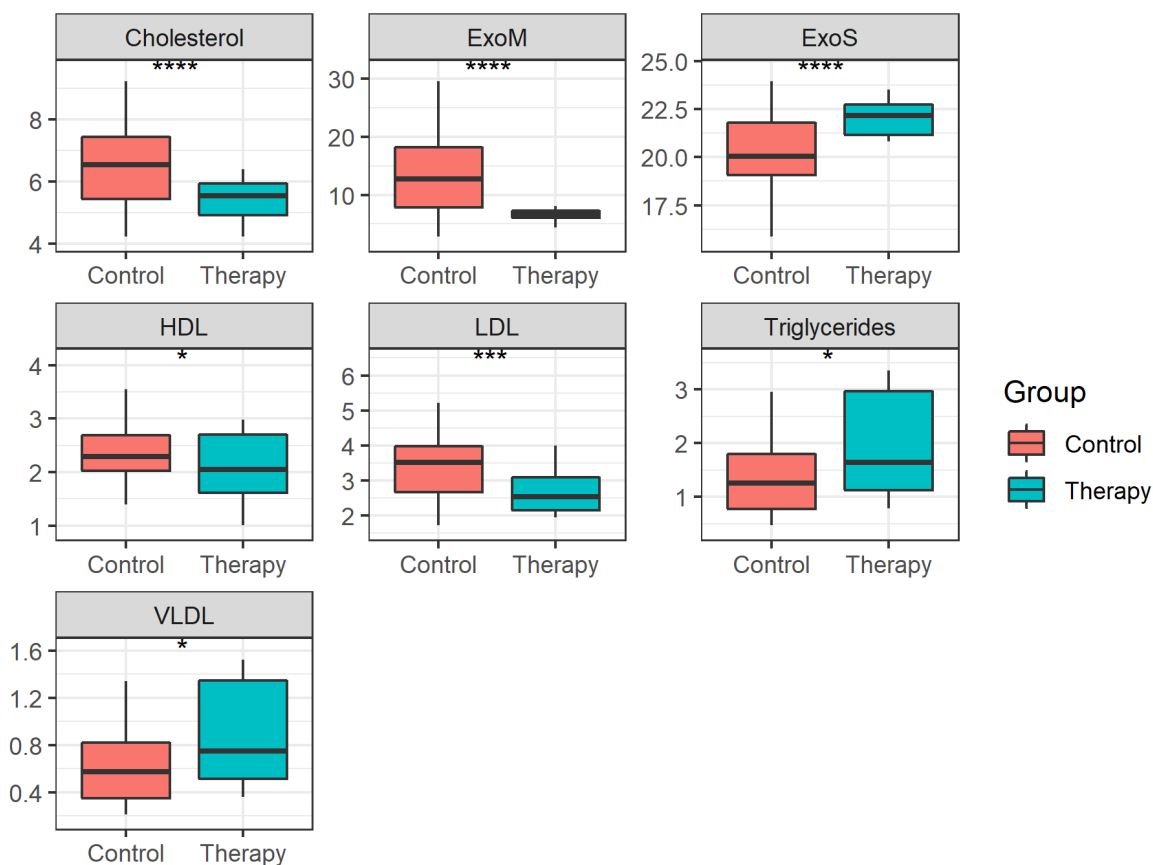
**Рисунок 2.** Кривая линейной регрессии концентрации общего холестерина (Ось X в mM/l) и относительной концентрации экзомеров (Ось Y в отн. ед.  $\sim \sqrt{SIC}$ ) в плазме крови добровольцев, участвовавших в исследовании до (Оранжевая прямая N=41) и после приема розувостатина (Голубая прямая N=21)

**Таблица 4.** Групповая статистика результатов измерения методом ДСР экзомеров и экзосом из образцов плазмы и данных липидного профиля у добровольцев, после статиновой терапии (N=21)

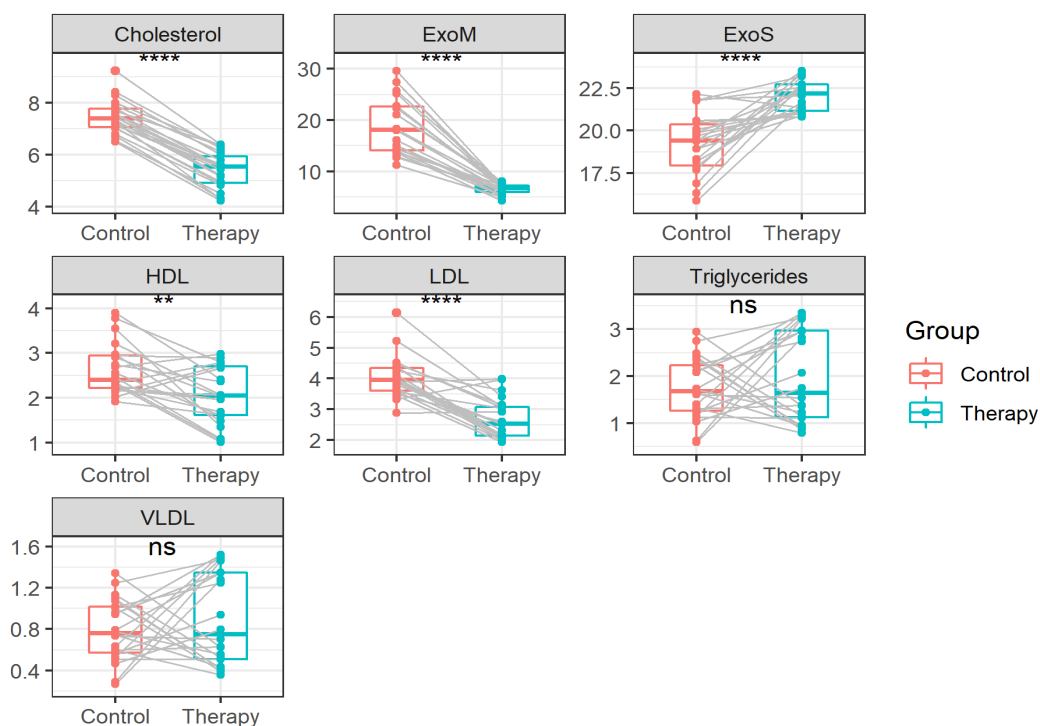
Group	Mean	SD	m %	Min.	Q1	Median	Q3	Макс.
Экзомеры D <sub>h</sub>								
Экзомеры SIC	6,54	0,94	14,37	4,32	6,01	6,66	7,25	8,03
Экзосомы D <sub>h</sub>								
Экзосомы SIC	22,08	0,95	4,30	20,8	21,14	22,17	22,73	23,5
Общий холестерин	5,4	0,7	12,96	4,23	4,9	5,53	5,94	6,39
ЛПНП	2,68	0,65	24,25	1,93	2,14	2,53	3,08	4,00
ЛПОНП	0,91	0,45	49,45	0,36	0,51	0,75	1,35	1,52
ЛПВП	2,06	0,64	31,07	1,01	1,61	2,05	2,71	2,99

Как мы отмечали ранее, это можно объяснить тем фактом, что экзомеры и экзосом не являются независимыми параметрами, и уменьшение SIC экзомеров закономерно приводит к увеличению SIC экзосом. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что в случае экзосом имеются 1, а в случае ЛПНП три пациента, у которых терапия дала отрицательный результат (в двух случаях после терапии концентрация ЛПНП не изменилась, а в одном – увеличилась).

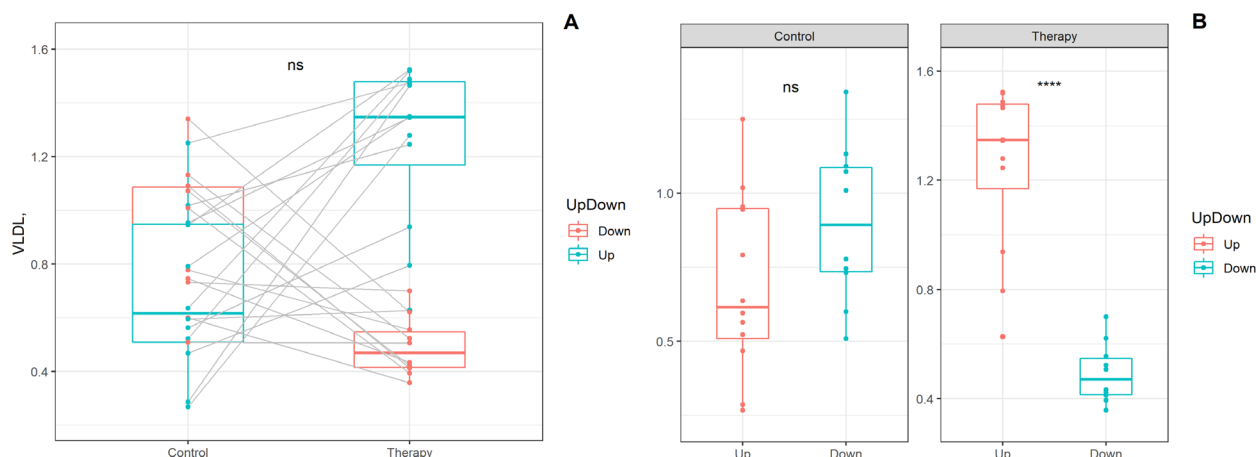
В случаях ЛПВП и ЛПОНП вектора в значительной степени разнонаправлены, особенно в случае ЛПОНП (рис. 5А). Создается впечатление, что в этом случае, мы имеем дело с двумя субпопуляциями: у одной, из которых терапия дает положительный, а у другой, либо не дает результата, либо дает отрицательный результат рисунке 5.



**Рисунок 3.** Описательная статистика вкладов в рассеяние экзосом, экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=41) и после (голубой цвет, N=21) приема розувастатина. (ns:  $p > 0,05$ , \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )



**Рисунок 4.** Динамика изменения вкладов в рассеяние экзосом, экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=41) и после (голубой цвет, N=21) приема розувастатина



**Рисунок 5.** Динамика изменения ЛПОНП у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=21) и после (голубой цвет, N=21) приема розувостатина (А), и описательная статистика влияния приема розувостатина на концентрацию ЛПОНП у добровольцев, участвовавших в исследовании после приема розувостатина (N=21) (ns:  $p > 0,05$ , \*:  $p \leq 0,0001$ )

Таким образом, можно заключить, что экзосомы и в гораздо большей степени экзомы, играют существенную роль в транспорте холестерина в плазме крови. Об этом свидетельствует супрессирующее действие розувостатина на содержание экзосом в плазме *in vivo*. При этом эти процессы слабо связаны с потоками липопротеинов, о чем свидетельствуют сильная корреляция содержания экзосом и концентрации общего холестерина при относительно слабых корреляциях содержания ВВ и холестерина, связанного с липопротеинами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00011.

#### Список литературы / References:

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol*, 1967, vol. 13, pp. 269-288.
2. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 1987, vol. 262, no. 19, pp. 9412-9420.
3. Cocucci E., Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.*, 2015, vol. 25, pp. 364-372.
4. van der Pol E., Boing A.N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.*, 2012, vol. 64, no. 3, pp. 676-705.
5. Doyle, L. Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 2019, vol. 8, p. 727.
6. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles*, 2016, vol. 5, p. 32945.
7. Needham D., Nunn R.S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys J*, 1990, vol. 58, no. 4, pp. 997-1009. Parisse P., Rago I., Ulloa Severino L., Perissinotto F., Ambrosetti E., Paoletti P., Ricci M., Beltrami A.P., Cesselli D., Casalis L. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *Eur. Biophys. J.*, 2017, vol. 46, pp. 813-820.
8. Sharma S., LeClaire M., Gimzewski J.K. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology*, 2018, vol. 29, p. 132001.
9. Filatov M.V., Landa S.B., Pantina R.A., Garma Iu.P. Investigation of exosomes secreted by different normal and malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *Klin. Lab. Diagn.*, 2010, vol. 12, pp. 35-43.
10. Zhang H., Freitas D., Kim H.S., Fabijanic K., Li Z., Chen H., Mark M.T., Molina H., Martin A.B., Lyden D. *et al.* Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.*, 2018, vol. 20, pp. 332-343.
11. Tkach M., Kowal J., Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2018 vol. 373, p. 20160479.
12. Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P., Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*, 2015, vol. 65, no. 8, pp. 783-797.
13. Viktor Bairamukov, Anton Bukatin, Sergey Landa, Vladimir Burdakov, Irina Chelnokova, Natalia Fedorova, Michael Filatov, Tatiana Shtam, Maria Starodubtseva Biomechanical Properties of Blood Plasma Extracellular Vesicles Revealed by Atomic-Force Microscopy. *Biology*, 2021, vol. 10, no. 1, p. 4.

14. Zhang Q., Higginbotham J.N., Jeppesen D.K., Yang Y.P., Li W., McKinley E.T., Graves-Deal R., Ping J., Britain C.M., Coffey R.J. et al. Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Rep.*, 2019, vol. 27, pp. 940-954.
15. ГОСТ Р 52623.4 - 2015 Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств. Издание официальное. 2015, Москва, Стандартинформ, с. 53- 67 [GOST R 52623-4 - 2015 Technologies for performing simple medical services of invasive interventions. Official edition. 2015, Moscow, Standartinform, pp. 53-67. (In Russ.)]
16. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.*, 1997, vol. 36, pp. 7518-7522.
17. Landa S.B., Korabliov P.V., Semenova E.V., Filatov M.V. Peculiarities of the formation and subsequent removal of the circulating immune complexes from the bloodstream during the process of digestion. *F1000Research* 2018, vol. 7, p. 618.
18. Kim S. ppcor: An R Package for a Fast Calculation to Semi-partial Correlation Coefficients. *Commun. Stat. Appl. Methods*, 2015, vol. 22, no. 6, pp. 665-674.
19. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н. Ломакин А.В. Носкин В.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии*, Киев, Наукова думка, 1987, 256 с. [Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A.V., Noskin V.A. *Laser correlation spectroscopy in biology*. Kiev, Naukova Dumka, 1987, 256 p. (In Russ.)]

## EXTRACELLULAR VESICLES AS CARRIERS OF CHOLESTEROL NOT ASSOCIATED WITH LIPOPROTEINS

Landa S.B.<sup>1,2</sup>, Verlov N.A.<sup>1</sup>, Filatov M.V.<sup>1</sup>, Burdakov V.S.<sup>1</sup>, Emmanuel V.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute»,  
I, Orlova Roshcha, 188300 Gatchina, Russia; e-mail: sergey.landa@gmail.com

<sup>2</sup> St. Petersburg State Medical University. I.P. Pavlova of the Ministry of Health of the Russian Federation.  
9, Lev Tolstoy st, 197022, Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** Extracellular vesicles (EVs) are microparticles, ranging in size from tens of nanometers to microns, found in almost all biological fluids. Extracellular vesicles (EVs) include exosomes and exomeres (particles less than 120 nm in size), microvesicles (from 100 to 250 nm), and apoptotic bodies – particles larger than 200 nm. Exosomes and exomeres are of considerable interest since they are biological markers of the state of cells, which can be used for diagnostics, regulatory functions, and can be involved in intercellular signaling. The nomenclature of exosomes remains poorly developed. Most researchers try to classify them based on the mode of formation, physicochemical characteristics (size, density, etc.), and the presence of tetrasporin markers CD9, CD63, and CD81. It was shown in 2010 using the dynamic light scattering method that the histogram of the size distribution of exosomes (PSD) is bimodal: EVs are divided into two fractions with average sizes of about 25 and 90 nm. Despite this fact, only in 2018 by the method of fractionation in a force field (*asymmetric flow field-flow fractionation - a4f*) two subtypes of exosomes were identified, as well as particles which were called "exomeres", with a size less than 50 nm, differ from exosomes in protein and lipid composition. However, to date, the debate continues whether exomeres are produced by cells, or are the product of cell death. The data presented in this work show that although exomeres carry biomarkers characteristic of EVs, they differ from exosomes strongly in lipid composition, especially in cholesterol content. The production of exomeres by cells, both in culture and in vitro, is associated with the synthesis of cholesterol in cells and is expressed or suppressed by regulators of the synthesis of mevalonate, an intermediate product of cholesterol metabolism. In addition, the work shows that the concentration of explosives in the body correlates with the concentration of cholesterol in the plasma, but weakly correlates with the concentration of cholesterol in lipoproteins. This suggests that not all plasma cholesterol is associated with lipoproteins, as previously thought. Thus, exomeres are not a product of cell death and play an essential role in the transport of cholesterol in blood plasma.

**Key words:** *Extracellular vesicles, exosomes, exomers, tetrasporins, cholesterol, lipoproteins, dynamic light scattering method.*

## ДИКЛОФЕНАК МОДУЛИРУЕТ ТРАНСЭПИТЕЛИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

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

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

<sup>2</sup> Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова  
ул. Академика Лебедева, 6, 194044, г. Санкт-Петербург, РФ.  
Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Арахидоновая кислота (АК) и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов. В почках и других реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи лягушки, АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В экспериментах использовали неселективный ингибитор циклооксигеназы – производное фенилуксусной кислоты – диклофенак, широко применяющийся в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства. С использованием метода фиксации потенциала впервые на эпителии кожи лягушки показано, что диклофенак (25 мкг/мл) подавляет транспорт  $\text{Na}^+$ . Степень ингибирующего действия диклофенака на транспорт  $\text{Na}^+$  различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Результаты, полученные нами в настоящей работе и ранее, свидетельствуют об участии циклооксигеназы и/или продуктов циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки.

**Ключевые слова:** кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ , диклофенак, циклооксигеназы.

### ВВЕДЕНИЕ

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Транспорт  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Арахидоновая кислота (АК) и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов [2]. Выделяют три основных пути метаболизма арахидоновой кислоты: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый). Известно, что в почках и других реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи лягушки, АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [3]. В коже лягушки простагландины стимулируют трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ , усиливают секрецию ионов  $\text{K}^+$  и увеличивают проницаемость апикальной мембраны для воды [3]. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов [4-6]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В экспериментах использовали неселективный ингибитор циклооксигеназы – производное фенилуксусной кислоты – диклофенак, широко применяющийся в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства.

## МЕТОДИКА

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

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик 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 вольт-амперных характеристик 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  $I_{SC}$ . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). Известно, что в концентрациях 20 – 100 мкМ амилорид избирательно блокирует ENaC [7].

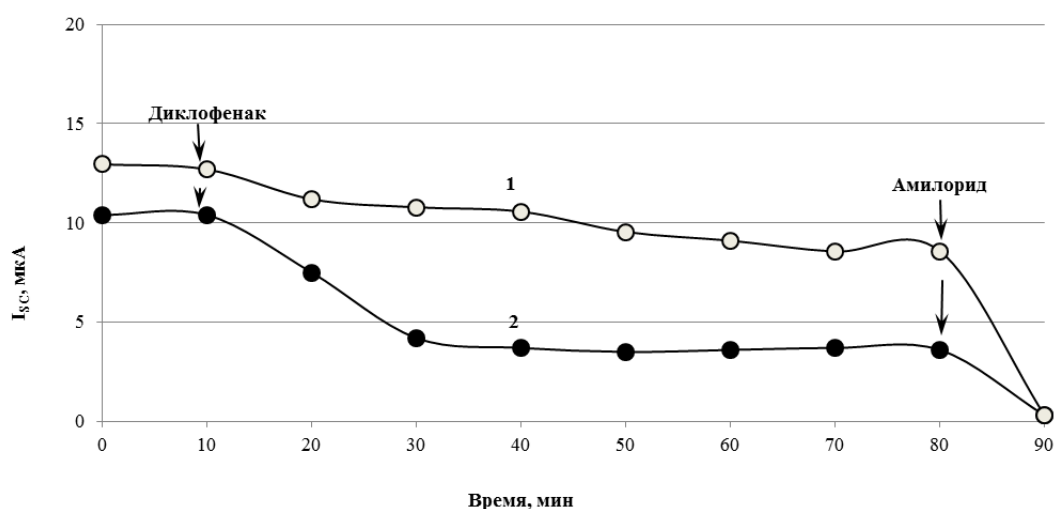
Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют:  $I_{SC} = 13,18 \pm 2,14$  мкА;  $V_{OC} = -28,35 \pm 4,94$  мВ;  $g_T = 0,51 \pm 0,08$  мСм.

Впервые показано, что диклофенак подавляет транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. Обнаружено также, что ингибирующее влияние диклофенака на транспорт  $Na^+$  больше выражено при приложении агента со стороны базолатеральной поверхности кожи. В среднем (по результатам 10 экспериментов), после обработки кожи лягушки диклофенаком (25 мкг/мл) в течение  $70 \pm 10$  мин  $I_{SC}$  уменьшается на  $25,34 \pm 4,92$  или на  $53,45 \pm 8,35$  %,  $V_{OC}$  уменьшается на  $12,13 \pm 2,98$  или на  $58,34 \pm 11,25$  %, а  $g_T$  уменьшается на  $15,05 \pm 2,09$  или увеличивается на  $15,41 \pm 4,32$  %, при приложении диклофенака со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Известно, что в почках и других реабсорбирующих эпителиях, АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. Так, в культуре клеток кортикальных собирательных трубочек почки мыши показано, что ингибиторы циклооксигеназ диклофенак и ибупрофен подавляют  $I_{SC}$  и модулируют активность ENaC [6]. Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются также с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании влияния на транспорт  $Na^+$  в коже лягушки трех структурно различных ингибиторов циклооксигеназ. Ранее нами было показано, что обработка кожи мелоксикамом, индометацином или ацетилсалициловой кислотой (аспирином) существенно снижает базальный уровень транспорта  $Na^+$  в эпителии кожи лягушки [8].



**Рисунок 1.** Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на действие диклофенака. (1) –  $I_{SC}$  после добавления 25 мкг/мл диклофенака к апикальной поверхности кожи; (2) –  $I_{SC}$  после добавления 25 мкг/мл диклофенака к базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных  $Na^+$ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

Полученные нами результаты свидетельствуют также о том, что степень ингибирующего действия диклофенака на транспорт  $\text{Na}^+$  различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рисунок 1). Можно предположить, что влияние ингибитора циклооксигеназ диклофенака на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Известно, что транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки (ENaC,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -обменники), локализованные в различных мембранах клетки. Добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта  $\text{Na}^+$ , что указывает на то, что влияние диклофенака на транспорт  $\text{Na}^+$  связано, в основном, с модуляцией активности ENaC.

Полученные нами результаты могут представлять интерес в связи с данными литературы о способности ингибиторов циклооксигеназ модулировать активность протонактивируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC, играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  в реабсорбирующих эпителиях. Недавно было обнаружено, что нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), помимо их хорошо известной способности ингибировать синтез простагландинов, снижают экспрессию ASIC и подавляют их активность [9,10]. В экспериментах на изолированных интернейронах гиппокампа и на рекомбинантных ASIC, экспрессируемых в клетках яичника китайского хомячка (CHO), было показано, что диклофенак и ибупрофен аллостерически подавляли ASIC-каналы, уменьшая максимальный индуцированный протонами ток и замедляя десенситилизацию [10]. Таким образом, результаты подобных экспериментов свидетельствуют о том, что НПВП могут служить нейротропными средствами при патологических состояниях, связанных с подкислением.

Таким образом, результаты, полученные нами в настоящей работе и ранее, свидетельствуют об участии циклооксигеназ и/или продуктов циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Полученные нами данные о влиянии диклофенака на трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенилуксусной кислоты, широко применяемых в клинической практике в качестве противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих средств.

*Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург), а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20.*

#### Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin, Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. *Механизмы внутриклеточной сигнализации*. СПб.: Изд. СПбГУ, 2003, 208 с. [Krutetskaya, Z.I., Lebedev, O.E., Kurilova, L.S. *Mechanisms of intracellular signalling*, SPb.: Saint-Petersburg State University, 2003, 208 p. (In Russ.)]
3. Els W.J., Helman S.H. Dual role of prostaglandins ( $\text{PGE}_2$ ) in regulation of channel density and open probability of epithelial  $\text{Na}^+$  channels in frog skin (R. pipiens). *J. Membr. Biol.*, 1997, vol. 155, pp. 75-87.
4. Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V., Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.*, 1991, vol. 14, pp. 96-100. DOI: 10.1016/0166-2236(91)90069-7
5. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, vol. 155, pp. 4-16. DOI: 10.1038/bjp.2008.216.
6. Pavlov T.S., Ilatovskaya D., Levchenko V., Mattson D.L., Roman R.J., Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). *Am. J. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. F672-F681. DOI: 10.1152/ajprenal.00597.2010
7. Bentley P.J. Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J. Physiol.*, 1968, vol. 195, pp. 317-330. DOI: 10.1113/jphysiol.1968.sp008460
8. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesic meloxicam modulates the effect of glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. In: *«Translation approaches to cause-oriented treatment of pain symptoms»*, St. Petersburg, 2012, pp. 20-21.
9. Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci.*, 2001, vol. 21, pp. 8026-33. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-08026.2001.
10. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A., Bolshakov K.V., Magazanik L.G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J. Neurochem.*, 2008, vol. 106, pp. 429-441. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05412.x

DICLOFENAC MODULATES TRANSEPITHELIAL Na<sup>+</sup> TRANSPORT IN FROG SKINMelnitskaya A.V.<sup>1</sup>, Krutetskaya Z.I.<sup>1</sup>, Antonov V.G.<sup>2</sup>, Krutetskaya N.I.<sup>1</sup>, Badulina V.I.<sup>1</sup><sup>1</sup> Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

<sup>2</sup> Kirov Medical Academy

Lebedeva str., 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

**Abstract.** The skin of amphibians and other isolated epithelial systems are classical model objects for studying transepithelial ion transport mechanisms. In terms of their ability to transport electrolytes and their response to certain hormones, the skin and bladder of amphibians are similar to the distal renal tubules, which makes it possible to use the data obtained on these objects to elucidate the mechanisms of water and ion transport in kidney cells. Arachidonic acid (AA) and its metabolites act as signaling molecules involved in the processes of intra- and intercellular signaling, and have a wide range of physiological and pathological effects. In the kidneys and other reabsorbing epithelium, including the frog skin epithelium, AA and its derivatives are involved in ion and water transport regulation. In this regard, it seemed appropriate to investigate the possible role of the cyclooxygenase pathway of AA oxidation in Na<sup>+</sup> transport regulation in frog skin. In experiments we used a non-selective cyclooxygenase inhibitor diclofenac, a derivative of phenylacetic acid, which is widely used in clinical practice as a non-steroidal anti-inflammatory drug. Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time on the frog skin epithelium that diclofenac (25 µg/ml) inhibits Na<sup>+</sup> transport. The degree of diclofenac inhibitory effect on Na<sup>+</sup> transport differs depending on the application of the agent from the apical or basolateral skin surface. The results obtained in this work and earlier indicate the involvement of cyclooxygenases and / or products of the cyclooxygenase pathway of AA oxidation in Na<sup>+</sup> transport regulation in frog skin epithelium.

**Key words:** frog skin, transepithelial Na<sup>+</sup> transport, cyclooxygenase, diclofenac.



## ИЗУЧЕНИЕ РАДИКАЛ-ГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ МИКРОВОЛНОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Казаринов К.Д.<sup>1</sup>, Полников И.Г.<sup>1</sup>, Власова И.И.<sup>1,2</sup>, Михальчик Е.В.<sup>2</sup>, Гусев А.А.<sup>2</sup>, Баранова О.А.<sup>1,4</sup>, Щелконогов В.А.<sup>1,3,4</sup>, Чеканов А.В.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН

ул. Введенского, 4, г. Фрязино, Московская обл., 141190, РФ; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

<sup>2</sup> ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА

ул. М. Пироговская, 1а, г. Москва, 119435, РФ

<sup>3</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (ИТХТ)

просп. Вернадского, 86, г. Москва, 119571, РФ

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** Свободно-радикальные реакции играют важную роль в защите организма от инфекций, в частности, в ответе клеток иммунной системы – нейтрофилов и макрофагов на патогены. Результаты наших исследований показали, что ответ нейтрофилов на различные активаторы усиливался в результате воздействия микроволнового излучения. Облучение изменяло кинетику хемилюминесценции (ХЛ) цельной крови, к которой были добавлены активаторы, так что ХЛ проб крови, подвергшихся облучению, была значительно выше. Сравнение результатов нагревания образцов крови при воздействии микроволнового излучения и в термостате показало одинаковое увеличение ответа ХЛ активированных нейтрофилов. Измерение ХЛ изолированных нейтрофилов, ресуспендированных в плазме, доказало, что усиление активации нейтрофилов при облучении не опосредовано другими клетками крови или тромбоцитами. Морфологический анализ показал, что микроволновое излучение активирует нейтрофилы, т.е. повышает процент активированных клеток в суспензии. Было показано также, что излучение может слабо, но достоверно усиливать функциональный ответ миелопероксидазы – важного белка нейтрофилов, который способен продуцировать активные формы кислорода (АФК). Таким образом, наши исследования показали, что микроволновое излучение усиливает ответ нейтрофилов на индуктор активации в цельной крови, увеличивая продукцию АФК в крови.

**Ключевые слова:** микроволновое излучение, нейтрофилы крови человека, оксидативный стресс, хемилюминесценция, активные формы кислорода, миелопероксидаза, КВЧ-диапазон.

Микроволновое излучение КВЧ диапазона до сих пор незначительно использовалось в бытовых приборах и технике. Теперь же ситуация начинает кардинально меняться. Это вызвано тем, что из-за огромного роста мобильного трафика во всем мире руководства многих стран и частных компаний привлекают значительные ресурсы для развития системы связи пятого поколения (5G), в которой, наряду с сантиметровым предполагается использование частот миллиметрового диапазона [1]. Однако и этот стандарт уже рассматривается как промежуточный на пути к системе связи шестого поколения (6G), в котором будут задействованы частоты коротковолновой части миллиметрового диапазона, или, как часто ее называют, субтерагерцового диапазона. Возникшая ситуация ставит вопрос о дополнительных мерах по защите здоровья населения, и особенно, специалистов, занятых в производстве и внедрении этой техники. Известен также положительный опыт использования КВЧ излучения в медицинской практике [2]. Зискин М.С. с сотрудниками при локальном КВЧ воздействии низкой интенсивности на кожу человека продемонстрировали высвобождение эндогенных опиоидных пептидов и предположили, что перенос этих агентов кровотоком по всему телу может приводить к обезболиванию и многим другим полезным эффектам.

Считается, что воздействие на организм человека происходит при интенсивностях облучения, которые вызывают слабое нагревание ткани, но биохимические механизмы эффектов облучения до конца не изучены. Известно, что окислительный стресс играет существенную роль при патологических процессах (ишемии, воспалении), токсических воздействиях и т.п. В тканях окислительный стресс приводит к гибели клеток, основным механизмом которой является апоптоз (генетически запрограммированный процесс гибели клетки. Авторы работы [3] считают, что воздействия микроволнового излучения на клетки человека могут вызывать апоптоз. Образование свободных радикалов в организме или окислительный (оксидативный) стресс, стимулированный воздействием микроволнового излучения рассматривается многими специалистами как один из основных механизмов биологической активности данного вида излучения [4,5]. В ряде исследований показано, что микроволны могут влиять на различные процессы, связанные с развитием окислительного стресса: изменение структуры и функции ферментов, в частности, усиление активности пероксидаз, интенсивность свободно-

радикальных процессов в клетках и тканях и усиление активации клеток, изменение ответа клеток иммунной системы и модуляцию иммунного ответа организма в целом [6].

Результаты наших предшествующих экспериментов следует отнести к изучению влияния микроволнового излучения на клетки человека, которые находились в стрессовом состоянии [7]. Так, в частности, было показано, что активация комплекса кардиолипид-цитохром *c* (КЦ) микроволновым излучением в клетках может повысить чувствительность клеток к апоптотическим (в том числе, противораковым, агентам) и позволит модулировать ответ клеток на различные воздействия.

В работе [8] представлены экспериментальные результаты по изучению влияния микроволнового излучения на активацию нейтрофилов в образцах цельной крови. Следует отметить, что к настоящему времени выполнено слишком мало работ, которые посвящены изучению влияния микроволнового излучения на функциональную активность нейтрофилов, причем, данные этих работ противоречивы [9].

Мы изучали влияние микроволн в КВЧ диапазоне с длиной волны 7,7 мм (37 ГГц) на активацию нейтрофилов. Для характеристики продукции свободных радикалов и оксидантов активированными нейтрофилами мы выбрали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ), который позволяет оценивать степень активации нейтрофилов немедленно после прекращения облучения образца крови. Для активации нейтрофилов к образцам цельной крови добавляли ОЗ (опсонизированный зимозан) (0,6 мг/мл) или лабораторный штамм *E. coli* (25 или 50 млн клеток в мл), после чего сравнивали активность нейтрофилов в контрольных пробах крови и образцах, подвергшихся воздействию микроволнового облучения в течение 5, 15 и 30 мин. По окончании инкубации брали пробы для измерения кинетики люминол-зависимой ХЛ крови. Кинетику люминол-зависимой ХЛ измеряли после добавления крови в раствор Кребса Рингера, содержащий 300 мкМ люминола. В 4-х независимых экспериментах было показано, что радикал-генерирующая активность нейтрофилов выше на 20-30% в пробах крови, которые были подвергнуты облучению в течение 15 мин. В тоже время КВЧ не вызывало активации нейтрофилов в крови, не содержащей индуктор активации нейтрофилов. Наши эксперименты показали, что излучение длиной волны 7,7 мм усиливает радикально-генерирующую способность активированных нейтрофилов, когда агонист добавляли к крови до облучения.

На основании экспериментальных данных было установлено, что уровень ХЛ был гораздо выше в случае КВЧ облучения образца по сравнению с контрольным образцом. Разница была более очевидной в течение первых нескольких минут ХЛ-замера. В отсутствие активаторов нейтрофилов (ОЗ или бактерий) параметры ХЛ контрольного образца и облученного были одинаковыми и практически не отличались от исходного значения ХЛ. Поэтому облучение цельной крови не вызывает активации нейтрофилов в крови, но усиливает радикально-генерирующую способность активированных нейтрофилов, когда агонист добавляли к крови до облучения.

В дальнейшей работе, чтобы подтвердить, что увеличение выработки АФК в крови было вызвано прямой активацией нейтрофилов при КВЧ облучении, а не опосредовано активацией других клеток или белков, мы провели эксперименты с изолированными нейтрофилами и измерили активность миелопероксидазы (МПО) – основным ферментом нейтрофилов, секретируемым при активации.

Опсонизированный зимозан (ОЗ) или бактерии были добавлены к суспензии изолированных нейтрофилов в плазме. Подобно нашим экспериментам с цельной кровью, мы сравнили кинетику ХЛ контрольного образца и образца, подвергнутого КВЧ воздействию в течение 15 минут. Для обоих агонистов в виде частиц величина ХЛ облученных образцов была выше в течение первых нескольких минут измерений по сравнению с контрольными образцами. Это различие показало достоверное увеличение продукции АФК в суспензии облученных нейтрофилов.

Активность МПО в плазме измеряли двумя независимыми методами: окисление OD (o-dianisidine) субстрата пероксидазы и контроль свободных тиолов в разбавленной плазме, инкубированной с МПО и глюкозо-глюкозооксидазой, которая является источником перекиси водорода. Окисление SH-групп или OD не было обнаружено без добавления МПО и / или глюкозооксидазы в плазму.

Временной ход окисления ОД регистрировали путем измерения накопления в растворе продукта окисления с максимумом поглощения при 450 нм. В плазме, дополненной ферментами, после 1-минутного латентного периода продукты окисления начинали накапливаться, и поглощение раствора увеличивалось. В случае облучения скорость накопления продукта была выше. Значимость различий между контрольным окислением ( $p < 0,05$ ).

Глюкоза или глюкозооксидаза, добавленные одновременно, вызывали уменьшение количества свободных тиолов в разбавленной плазме. Если плазму подвергали воздействию КВЧ излучения, концентрация групп SH уменьшалась быстрее. Концентрация свободных SH-групп в экспонированных образцах составляла  $(110 \pm 2)\%$  от концентрации в контрольных образцах после 45-минутной инкубации, как было измерено в 6 независимых экспериментах. Критерий Уилкоксона со знаком ранга выявил разницу между контрольными и экспонированными образцами как в течение 20, так и 45 мин инкубации.

Активационное состояние нейтрофилов в начале воздействия может иметь решающее значение для регистрации эффектов КВЧ излучения. Сафронова с сотрудниками ранее показали, что начальный функциональный статус биообъектов определил их чувствительность к КВЧ облучению низкой интенсивности [10]. Ряд исследований, касающихся биологической чувствительности к микроволновому облучению в широком диапазоне длин волн также показал, что излучение само по себе может не влиять на лейкоциты, но усиливает реакцию клеток на индуктор. Исследования *in vitro* мононуклеарных клеток периферической крови, подвергнутые воздействию СВЧ-сигналов, не выявили статистически значимых изменений параметров

функциональной активности лимфоцитов, моноцитов и других иммунных клеток, измеренных после воздействия [11,12]. Тем не менее, иммунная активность лимфоцитов и моноцитов может быть дополнительно усилена микроволнами 900 МГц: микрокультуры моноядерных клеток, подвергнутых воздействию микроволн, показали значительно более высокий ответ на митогены [13]. Было показано, что низкочастотная ЭМИ (<200 Гц) усиливает активацию нейтрофилов только в том случае, если клетки были инкубированы с низкими дозами миристатацетата, но не в случае нестимулированных клеток [13].

Было продемонстрировано, что основным механизмом, лежащим в основе воздействия ЭМИ на биологические объекты, является нагрев, при котором из кожи выделяются регуляторы, оказывающие влияние на весь организм. Как тепловое воздействие окружающей среды, так и воздействие КВЧ облучения 35 ГГц вызывают высвобождение медиаторов, активирующих макрофаги в плазме крыс, приводящих к последующим ответам в клетках и тканях [14]. Хотя мы не исключаем нетепловых эффектов, наше исследование ясно показало, что нагрев крови, вызванный КВЧ облучением, является основным механизмом усиления реакции нейтрофилов на агонисты в наших экспериментальных условиях.

Чтобы выяснить источник повышенной продукции АФК в крови при КВЧ воздействии, мы провели исследование влияния КВЧ излучения на изолированные нейтрофилы и на функциональную активность МРО - основного фермента, секретируемого нейтрофилами в местах воспаления. КВЧ воздействие на неочищенные изолированные нейтрофилы в плазме крови не вызывало активации клеток. Если в суспензию нейтрофилов добавляли агонист, КВЧ-излучение усиливало генерацию АФК клетками, о чем свидетельствует повышенный уровень люминол-зависимой ХЛ. Облучение плазмы, содержащей МРО и глюкозооксидазу (в качестве источника  $H_2O_2$ ), привело к небольшому (10-15%), но статистически значимому увеличению окислительной активности МРО. Как было показано ранее, воздействие на растворы белка КВЧ излучения может вызвать изменения в структуре и функциях фермента и повысить активность пероксидаз [15].

Мы оценивали влияние КВЧ на клетки крови, характеризуя морфологические изменения клеток при концентрации бактерий 50 миллионов на мл. Световые микрофотографии свидетельствуют о том, что добавление бактерий в кровь вызывало активацию нейтрофилов и, в меньшей степени, моноцитов. Морфологически нормальный нейтрофил представляет собой сферическую клетку с сегментированным ядром и равномерно распределенную цитоплазматическую нейтрофильную грануляцию. При активации нейтрофилы подвергаются изменению формы клеток, становясь более аморфными, образуются цитоплазматические вакуоли и наблюдается набухание ядер с потерей ядерной сегментации. Мы считали нейтрофилы высокоактивными, если они содержали 2-3 крупных вакуоли диаметром 3-5 мкм в цитоплазме или во многих вакуолях диаметром 1-3 мкм (так что вакуоли покрывали 10-40% клеточной цитоплазмы). Слабо активированные нейтрофилы содержат 2-4 вакуолей в цитоплазме диаметром 1-2 мкм (так что вакуоли покрывают 1-10% клеточную цитоплазму). Интактные нейтрофилы не имеют вакуолей в цитоплазме или содержат одну небольшую вакуоль диаметром менее 1 мкм (менее 1% клеточной цитоплазмы). Без добавления нейтрофилов *E. coli* как контрольные, так и облученные образцы были неповрежденными (> 99%). Через 15 мин после добавления бактерий в обоих образцах наблюдались морфологические изменения, характерные для активированных нейтрофилов, но количество интактных нейтрофилов и нейтрофилов с морфологическими признаками легкой и сильной активации различалось по двум образцам. Более половины нейтрофилов были неповрежденными ( $55 \pm 2,5\%$ ) в контрольном образце, а процент сильно активированных клеток был низким ( $6,5 \pm 1,1\%$ ). Напротив, в облученных образцах активированные нейтрофилы содержали более 80% клеток ( $40,5 \pm 2,2\%$  слабоактивированных и  $41,6 \pm 2,5\%$  высокоактивных нейтрофилов), а количество интактных клеток было низким ( $17,9 \pm 1,7\%$ ).

Известно, что КВЧ излучение плохо проникает в биологические ткани, поэтому прогрев тканей может происходить на глубине не более нескольких миллиметров. Повышение температуры происходит медленно и незначительно. Неглубокое проникновение КВЧ в биологические ткани открывает возможности использования его использования для целевой локальной терапии с минимальными побочными эффектами и повреждением окружающих тканей.

Наша работа показывает возможность применения КВЧ излучения для направленной регуляции локальных воспалительных процессов на небольших участках кожи без повреждения здоровых тканей. КВЧ облучение зараженной области может способствовать активации нейтрофилов в ране, что приведет к локальному усилению противомикробной активности нейтрофилов. С другой стороны, наши результаты показывают необходимость осторожного использования КВЧ излучения для терапии пациентов с инфекционными заболеваниями.

*Работа выполнена в рамках госзадания ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН.*

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

1. Agiwal M., Roy A., Saxena N. Next generation 5G wireless networks: a comprehensive survey. *IEEE Commun Surveys Tuts*, 2016, vol. 18, pp. 1617-1655.
2. Ziskin M.C. Millimeter waves: Acoustic and electromagnetic. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 3-14.
3. Szabo I., Kappelmayer J., Alekseev S.I., Ziskin M.C. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 27, pp. 233-244.
4. Meena R., Kajal, K., Kumar, J., Rajamani P., Verma H. N., Kesari K.K. Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations induced oxidative stress mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. *Electromagnetic Biology Medicine*, 2014, vol. 33, pp. 81-91.

5. Yakymenko I., Tsybulin O., Sidorik E., Henshel D., Kyrylenko O., Kyrylenko S. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. *Electromagn Biol Med.*, 2016, vol. 35, pp. 186-202.
6. Koyama S., Narita E., Suzuki Y., Taki M., Shinohara N., Miyakoshi J. Effect of a 2.45- GHz radiofrequency electromagnetic field on neutrophil chemotaxis and phagocytosis in differentiated human HL-60 cells. *Journal of Radiation Research*, 2015, vol. 56, pp. 30-36.
7. Казаринов К.Д., Борисенко Г.Г., Полников И.Г. Влияние ЭМИ низкой интенсивности микроволнового диапазона на окислительные процессы в клетках. *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ – техника*, 2018, вып. 1, № 536, с. 60-68. [Kazarinov K.D., Borisenko G.G., Polnikov I.G. Influence of low-intensity EMR in the microwave range on oxidative processes in cells. *Electronic equipment. Ser. 1. Microwave - technology*, 2018, vol. 1, no. 536, pp. 60-68. (In Russ.)]
8. Казаринов К.Д., Власова И.И., Михальчик Е.В. Хемилюминесцентные исследования влияния микроволнового излучения на активацию нейтрофилов. *VI съезд биофизиков России. Сборник научных трудов*, 2019, т. 2, с. 37. [Kazarinov K.D., Vlasova I.I., Mikhalechik E.V. Chemiluminescent studies of the effect of microwave radiation on the activation of neutrophils. *VI Congress of Biophysicists of Russia. Collection of scientific papers*, 2019, vol. 2, p. 37. (In Russ.)]
9. Poniedzialek B., Rzymiski P., Nawrocka-Bogusz H., Jaroszyk F., Wiktorowicz K. The effect of electromagnetic field on reactive oxygen species production in human neutrophils in vitro. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2013, vol. 32, no. 3, pp. 333-341.
10. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Santalov B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 2002, vol. 23, no. 8, pp. 599-606.
11. Tuschl H., Novak W., Molla-Djafari H. In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 27, no. 3, pp. 188-196.
12. Lantow M., Lupke M., Frahm J., Mattsson M.O., Kuster N., Simko M. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation Environmental Biophysics*, 2006, vol. 45, no. 1, pp.55-62.
13. Stankiewicz W., Dabrowski M.P., Kubacki R., Sobiczewska E., Szmigielski S. Immunotropic influence of 900MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2006, vol. 25, no. 1, pp. 45-51.
14. Synniewska R.K., Millenbaugh N.J., Kiel J.L., Blystone R.V., Ringham H.N., Mason P.A., Witzmann F.A. Protein changes in macrophages induced by plasma from rats exposed to 35 GHz millimeter waves. *Bioelectromagnetics*, 2010, vol. 31, no. 8, pp. 656-663.
15. Barteri M., De Carolis R., Marinelli F., Tomassetti G., Montemiglio L.C. 2016. Effects of microwaves (900MHz) on peroxidase systems: A comparison between lactoperoxidase and horseradish peroxidase. *Electromagn Biol Med.*, 2016, vol. 35, pp.126-133.

## STUDY OF THE RADICAL-GENERATING CAPACITY OF ACTIVATED NEUTROPHILS IN THE IN VITRO EXPERIMENT UNDER MICROWAVE IRRADIATION

Kazarinov K.D.<sup>1</sup>, Polnikov I.G.<sup>1</sup>, Vlasova I.I.<sup>1,2</sup>, Mikhalechik E.V.<sup>2</sup>, Gusev A.A.<sup>2</sup>, Baranova O.A.<sup>1,3</sup>, Shchelkonogov V.A.<sup>1,3,4</sup>, Chekanov A.V.<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics (Fryasino branch)*Vvedensky sq., 4, Fryazino, Moscow region, 141190, Russia; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru*<sup>2</sup> Research Institute for Physico-Chemical Medicine*M. Pirogovskaya Str., 1a, Moscow, 119435, Russia*<sup>3</sup> MIREA-Russian technological University (ITHT)*Vernadsky prospectus, 86, Moscow, 119571, Russia*<sup>4</sup> Russian National Research Medical University (RNRMU),*Ostrovitianov str., 1, Moscow, 117997, Russia*

**Abstract.** Free radical reactions play an important role in protecting the body from infections, in particular, in the response of cells of the immune system - neutrophils and macrophages to pathogens. The results of our studies showed that the response of neutrophils to various activators was enhanced as a result of exposure to microwave radiation. Irradiation changed the chemiluminescence (CL) kinetics of whole blood, to which activators were added, so that the CL of the irradiated blood samples was significantly higher. Comparison of the results of heating blood samples under the influence of microwave radiation and in a thermostat showed the same increase in the CL response of activated neutrophils. Measurement of CL of isolated neutrophils resuspended in plasma proved that the enhancement of neutrophil activation during irradiation is not mediated by other blood cells or platelets. Morphological analysis showed that microwave radiation activates neutrophils, i.e. increases the percentage of activated cells in suspension. It was also shown that radiation can weakly but reliably enhance the functional response of myeloperoxidase, an important neutrophil protein that is capable of producing reactive oxygen species (ROS). Thus, our studies have shown that microwave radiation enhances the response of neutrophils to the activation inducer in whole blood, increasing the production of ROS in the blood.

**Key words:** microwave radiation, human blood neutrophils, oxidative stress, chemiluminescence, reactive oxygen species, myeloperoxidase, EHF range.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ХИРАЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ БИОАКТИВНОСТИ

Семенова Е.В., Малышко Е.В., Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: k.semenova99@gmail.com  
Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** Несмотря на то, что энантиомеры лекарственных препаратов обладают идентичными физико-химическими свойствами в изотропной среде, они могут проявлять совершенно разную биологическую активность. Особенности взаимодействия изомеров с асимметричными соединениями организма важно учитывать при создании лекарственных препаратов, так как может оказаться, что одна форма лекарственного средства обладает терапевтическим эффектом, а другая не усваивается, является менее активной или даже вызывает серьезные осложнения, являясь для организма токсичной. Биоактивность энантиомеров, их фармакодинамика и фармакокинетика, процесс хиральной инверсии оптических изомеров в живых системах интенсивно исследуются в настоящее время. Различия в фармакодинамических и фармакокинетических свойствах энантиомеров определяются их специфическими взаимодействиями с хиральными биомакромолекулами. Выяснение природы хирально-иерархической структуры биомакромолекул-мишеней и симметричной структуры лекарственных препаратов направлено на установление системности и хиральных соответствий лекарств и мишеней.

**Ключевые слова:** хиральность, энантиомеры, хиральные лекарства, стереоспецифичность, структурные иерархии.

Симметричность как явление, связанное с гомохиральностью мономеров, составляющих важнейшие классы биомакромолекул, имеет фундаментальное значение не только для всей молекулярной биологии как системный фактор ее организации, но, по-видимому, и для фармакологии, также как системный фактор стереоспецифичности лекарств. Хиральность – свойство объекта быть несовместимым со своим зеркальным отображением при любых комбинациях перемещений и вращений в трехмерном пространстве [1] – играет важную роль и в фармакологии, так как больше половины используемых в настоящее время лекарственных средств являются хиральными препаратами, а, в свою очередь, большая часть этих хиральных лекарств представляет собой рацемат [2]. Хиральное вещество, проникая в живой организм, вступает во взаимодействие с его асимметричными молекулами. Данные взаимодействия определяют действие препарата на организм: одна форма лекарственного средства может обладать терапевтическим эффектом, а другая может не усваиваться, быть менее активной или оказывать совершенно другое действие, которое может быть как желательным, так и нежелательным для организма.

Фармакодинамика и фармакокинетика энантиомеров интенсивно исследуются в настоящее время [3-6]. Мы полагаем, что ключом к пониманию взаимодействия хирального лекарственного средства с хиральной мишенью может являться выявленная нами системная молекулярно-биологическая закономерность: прослеживается системная тенденция чередования знака хиральности структурных и функциональных уровней для ДНК, белков и цитоскелета клетки [7-9].

### ХИРАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА И ФАРМАКОЛОГИЯ

На основании литературных источников нами подготовлена выборка хиральных лекарственных препаратов. Рассматриваемые препараты были разделены на три группы в соответствии со знаком хиральности биоактивного энантиомера: лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами. Группа «левых» лекарственных средств была дополнительно разделена на две подгруппы: препараты, у которых R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и препараты, у которых R-энантиомер менее активен или неактивен. Аналогичным образом группа «правых» лекарственных средств была также разделена на две подгруппы (рис. 1).

#### 1. Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером.

Препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером составляют большую часть выборки. Среди них можно выделить две подгруппы: лекарственные препараты, у которых «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и лекарственные препараты, у которых «правый» R-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или терапевтический эффект не наблюдается.

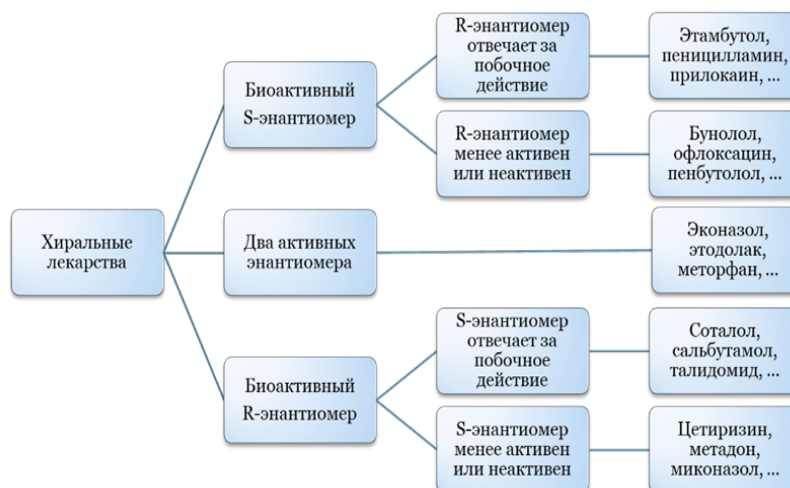


Рисунок 1. Классификация хиральных лекарственных средств по биоактивности энантиомеров

### 1.1 Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, у которых «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты.

Примером «левого» лекарственного препарата, у которого «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, является бупивакаин. S-энантиомер бупивакаина обладает более продолжительным анестезирующим эффектом и меньшей токсичностью для сердечно-сосудистой и центральной нервной систем по сравнению с R-энантиомером [10]. Различие в токсичности объясняется, по крайней мере частично, фармакокинетическими различиями между энантиомерами. Более длительный анестезирующий эффект S-бупивакаина объясняется сосудосуживающим эффектом, вызванным этим препаратом.

Энантиомеры пенициллина являются важными тиоловыми соединениями, обладающими различными биологическими эффектами. S-пеницилламин может действовать как противоядие при отравлениях некоторыми тяжелыми металлами, и его можно использовать для лечения болезни Вильсона [11]. Кроме того, S-пеницилламин применяется при лечении ревматоидного артрита. В свою очередь, R-пеницилламин ингибирует действие пиридоксина, что может вызвать такие побочные реакции, как остеомиелит и неврит.

Этамбутол – противотуберкулезный препарат, который проникает в клетки *Mycobacterium* и действует путем ингибирования фермента арабинозилтрансферазы, тем самым нарушая синтез комплексов клеточной стенки и приводя к повышению проницаемости клеточной стенки бактерий. Молекула этамбутола содержит два хиральных центра и существует в виде трех стереоизомеров: S,S- и R,R-этамбутол и оптически неактивная мезоформа диастереомеров [12]. Этамбутол поступил в продажу в 1960-х годах. Первоначально препарат продавался в виде рацемата, но вскоре было установлено, что R,R-форма препарата ответственна за токсичность и может вызывать слепоту, в свою очередь, S,S-форма проявляется терапевтическое действие. В результате сейчас в медицине используется только S,S-энантиомер препарата.

### 1.2 Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, у которых «правый» R-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается.

К лекарствам данной подгруппы можно, например, отнести амлодипин. S-энантиомер амлодипина имеет почти в 1000 раз большее сродство к сайту рецептора [13,14]. S-амлодипин одинаково эффективен при приеме половины дозы с лучшей переносимостью и меньшей частотой периферических отеков, чем рацемический амлодипин.

Левобунолол – это фармакологически активный S-изомер бунолола, который является мощным неселективным антагонистом  $\beta$ -адренорецепторов. S-бунолол не обладает внутренней симпатомиметической или местной анестезирующей активностью и не вызывает прямой депрессии миокарда в дозах, вызывающих клинически значимую  $\beta$ -блокаду [15]. Известно, что левобунолол обладает в 60 раз большей  $\beta$ -блокирующей активностью по сравнению с R-бунолом [16]. В настоящее время бунолол представлен на рынке в своей энантиомерно чистой форме, как левобунолол, и используется при лечении глазной гипертензии и открытоугольной глаукомы.

Зопиклон – соединение класса циклопирролонов, применяемое в качестве снотворного при лечении бессонницы. Данный препарат обладает противосудорожными, анксиолитическими и миорелаксантами свойствами и сильным седативным действием [17]. Зопиклон используется в виде рацемата, хотя известно, что S-энантиомер лекарственного средства является фармакологически более активным и проявляет в 50 раз более высокое сродство к сайту связывания бензодиазепиновых рецепторов, чем R-энантиомер [18].

## 2. Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером.

Рассмотрим по отдельности две подгруппы: лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер отвечает за побочные эффекты; лекарственные препараты с

биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или терапевтический эффект не наблюдается.

### **2.1 Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер отвечает за побочные эффекты.**

Самым известным примером биоактивного «правого» лекарственного препарата, у которого «левый» энантиомер отвечает за побочные эффекты, является талидомид. Талидомид поступил в продажу как рацемат, и тот факт, что терапевтическим эффектом обладает только R-изомер талидомида, в то время как S-изомер оказывает тератогенное действие, в начале не был известен [19-22]. В последующие несколько лет после начала продаж препарата около 10 000 детей во всем мире родились с фокимелией или пороком развития конечностей, из них выжила только половина младенцев [19]. Согласно недавним исследованиям, S-энантиомер талидомида демонстрирует в 10 раз более сильное связывание с цереблном (CRBN) и ингибирование самоубиквитинирования по сравнению с R-изомером [22]. Таким образом, тератогенные эффекты индуцируются S-энантиомером талидомида.

R-изомер тербуталина избирательно возбуждает  $\beta_2$ -адренорецепторы, в то время как S-изомер практически не имеет сродства к  $\beta_2$ -адренорецепторам и вызывает такие побочные эффекты, как гиперреактивность дыхательных путей и сердечные расстройства [23]. S-энантиомер тербуталина может активировать мускариновые рецепторы, которые могут генерировать гиперреактивность дыхательных путей при приеме рацемического тербуталина.

Сальбутамол является селективным агонистом  $\beta_2$ -адренорецепторов короткого действия, применяемым для лечения астмы и хронического обструктивного заболевания легких. R-изомер сальбутамола имеет в 150 раз большее сродство к  $\beta_2$ -рецептору по сравнению с S-изомером [24]. S-изомер сальбутамола ассоциируется с токсичностью: он косвенно антагонизирует положительные эффекты R-сальбутамола и может давать воспалительные эффекты.

R-энантиомер соталола в 14-50 раз эффективнее блокирует рецепторы, чем его рацемическая форма, в то время как его S-энантиомер практически неактивен [4,25]. В то же время, использование S-энантиомера оправдано одинаково эффективной для обоих энантиомеров блокировкой калиевых каналов. Однако известно, что применение S-энантиомера соталола влечет повышение смертности пациентов с нарушением функции желудочков и последующим инфарктом миокарда [26].

### **2.2 Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается.**

Одним из представителей данной подгруппы является аценокумарол. R-энантиомер аценокумарола имеет в несколько раз более высокую антикоагулянтную активность, чем S-энантиомер [27,28].

Генаконазол является мощным триазольным противогрибковым средством. Данный препарат является активным и при пероральном, и при местном применении. В некоторых случаях генаконазол превосходит другие противогрибковые средства, например, флуконазол. Генаконазол представляет собой рацемат – смесь R,R- и S,S-энантиомеров. На основании результатов серии экспериментов *in vitro* и *in vivo* был сделан вывод о том, что R,R-энантиомер является активным и ответственным за противогрибковое действие препарата [29].

Еще одним противогрибковым средством, обладающим терапевтически более активным R-энантиомером, является миконазол. Данный препарат повреждают грибковые организмы, препятствуя биосинтезу эргостерола. Установлено, что в отношении роста *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus niger* биологическую активность проявляет R-энантиомер миконазола [30,31].

### **3. Лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами.**

Примером лекарственного средства данной группы является меторфан. Данный препарат является производным морфина, энантиомеры которого проявляют различные фармакологические и токсикологические эффекты [32]. Декстрометорфан широко используется в качестве ненаркотического противокашлевого средства, он не оказывает обезболивающего эффекта в терапевтической дозе. Левовращающий энантиомер, левометорфан, является сильным анальгетиком, и его применение строго контролируется в мире как наркотического средства.

Оба энантиомера эконазола обладают значительной биологической активностью. R-энантиомер эконазола показал более высокие значения ингибирования в отношении *Candida krusei*, тогда как для S-энантиомера эконазола более высокие значения ингибирования наблюдались в отношении *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus niger* [31].

S-этодолак проявляет противовоспалительные эффекты, опосредованные ингибированием циклооксигеназы-2, и антиаллодинические эффекты, которые не зависели от ингибирования циклооксигеназы-2 [33]. В то же время R-этодолак демонстрирует гастропротекторные эффекты, которые могут способствовать низкой желудочно-кишечной токсичности рацемического этодолака. Оба энантиомера играют роль в эффективности и желудочно-кишечной безопасности этодолака.

Кроме того, произведена схожая классификация данных лекарственных средств по биоактивности их (+)- и (-)-изомеров (за исключением энантиомеров бенazeприла, валсартана, фенибута и эналаприла).

### **4. Анализ данных по биоактивности энантиомеров лекарств.**

На основании систематизированных данных было установлено, что большая часть лекарственных средств (55 препаратов из 100) из нашей выборки – это лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-



энантиомером. Терапевтическим эффектом у 31 лекарственного препарата обладают «правые» R-энантиомеры, у 14 лекарственных препаратов оба энантиомера обладают терапевтической эффективностью.

При анализе активности каждого энантиомера было установлено, что большинство S-форм лекарственных препаратов (69 из 100) обладает терапевтическим эффектом, в свою очередь, R-энантиомеры лекарственных средств почти в равных долях обладают терапевтическим эффектом (45 из 100) или являются неактивными или менее активными (43 из 100). Среди изомеров, вызывающих побочные действия, чаще встречаются R-формы лекарственных средств (12 из 100 R-форм и 4 из 100 S-форм).

В данной работе также была произведена классификация хиральных лекарств подборки по типу лекарственного средства. Лекарственные средства с активным «левым» S-энантиомером чаще являются гипотензивными, антиангинальными, антиаритмическими и анальгезирующими препаратами. В свою очередь, среди «правых» лекарственных средств чаще встречаются бронхолитические и противогрибковые средства.

На основании баз данных лекарственных препаратов [34-36] для лекарств подборки были установлены их мишени воздействия. Для 94 препаратов мишенями воздействия являются белки, для 3 лекарств мишень – ДНК, для 2 препаратов мишенями являются небольшие молекулы (протопорфирин IX, молекула меди). К сожалению, в использованных в данной работе базах данных нет информации о мишенях воздействия индакринона. Данный препарат является петлевым диуретиком, представляет собой рацемат [37]. R-энантиомер индакринона обладает мочегонной активностью, а S-энантиомер индуцирует секрецию мочевой кислоты [38].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые была целенаправленно составлена и проанализирована подборка из ста хиральных лекарственных средств. Была произведена классификация препаратов по биоактивности R- и S-форм, типу лекарственного средства, мишени воздействия. Проведенный анализ лекарственных препаратов с позиции хиральности позволил установить, какая из форм лекарственных средств чаще оказывает терапевтическое воздействие. Также в работе были определены наиболее часто встречающиеся типы лекарственных средств для «правых» и «левых» препаратов. Кроме этого, для рассматриваемых препаратов были определены их мишени воздействия.

Настоящая работа является поисковой и феноменологический уровень исследования предполагает дальнейшее понимание симметричных основ молекулярных машин: ферментов, рецепторов аллостерической регуляции, так как именно лекарства являются одними из регуляторов молекулярных машин с точки зрения биофизики. В перспективе, нам предстоит выяснить соответствие между активными формами хиральных лекарств и знаками хиральности структур разного уровня биомакромолекул, являющихся непосредственными мишенями препаратов. Систематизированные в данной работе по знаку хиральности данные по сотне лекарств дают возможность развивать данное направление биофизической фармакологии для несравненно более успешного конструирования лекарственных препаратов.

### Список литературы / References:

1. Реутов О.А., Курц А.Л., Бутин К.П. *Органическая химия: учебник*. М.: Бином, 2005, 455 с. [Reutov O.A., Kurtz A.L., Butin K.P. *Organic chemistry: textbook*. Moskva: Binom 2005, 455 p. (In Russ.)]
2. Nguyen L.A., He H., Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2006, vol. 2, no. 2, pp. 85-100.
3. Budau M., Hancu G., Rusu A., Carcu-Dobrin M., Muntean D.L. Chirality of Modern Antidepressants: An Overview. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 495-500. DOI: 10.1517/apb.2017.061
4. Cizmarikova R., Habala L., Valentova J., Markuliak M. Survey of Pharmacological Activity and Pharmacokinetics of Selected  $\beta$ -Adrenergic Blockers in Regard to Their Stereochemistry. *Applied Sciences*, 2019, vol. 9, p. 625. DOI: 10.3390/app9040625
5. Raikar P., Gurupadaya B., Koganti V.S. Recent Advances in Chiral Separation of Antihistamine Drugs: Analytical and Bioanalytical Methods. *Current drug delivery*, 2018, vol. 15, no. 10, pp. 1393-1410. DOI: 10.2174/1567201815666180830100015
6. Qin F., Wang X., Jing L., Pan L., Cheng M., Sun G., Li F. Bidirectional chiral inversion of tranterol enantiomers after separate doses to rats. *Chirality*, 2013, vol. 25, no. 12, pp. 934-938. DOI: 10.1002/chir.22236
7. Tverdislov V.A. Chirality as a Primary Switch of Hierarchical Levels in Molecular Biological Systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 128-132. DOI: 10.1134/S0006350913010156
8. Tverdislov V.A., Malyshko E.V. On regularities in the spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of nonliving and living matter. *Physics Uspekhi*, 2019, vol. 62, no. 4, pp. 354-363. DOI: 10.3367/UFNe.2018.08.038401
9. Tverdislov V.A., Malyshko E.V. Chiral Dualism as an Instrument of Hierarchical Structure Formation in Molecular Biology. *Symmetry*, 2020, vol. 12, p. 587. DOI: 10.3390/sym12040587
10. Souza M., Marques M.P., Duarte G., Lanchote V.L. Analysis of bupivacaine enantiomers in plasma as total and unbound concentrations using LC-MS/MS: Application in a pharmacokinetic study of a parturient with placental transfer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2019, vol. 164, pp. 268-275. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.10.040
11. Wang Y., Zhou J., Han Q., Chen Q., Guo L., Fu Y. Chiral Recognition of Penicillamine Enantiomers Based on DNA-MWNT Complex Modified Electrode. *Electroanalysis*, 2012, vol. 24, no. 7, pp. 1561-1566. DOI: 10.1002/elan.201200010

12. Van Wart S.A., Mager D.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of stereoisomeric drugs. *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*. New York: CRC Press, 2012, 322 p.
13. Hancu G., Budau M., Kantor L.K., Carje A. Cyclodextrine screening for the chiral separation of amlodipine enantiomers by capillary electrophoresis. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2015, vol. 5, no. 1, p. 35-40. DOI: 10.5681/apb.2015.005
14. Dalal J., Mohan J.C., Iyengar S.S., Hiremath J., Sathyamurthy I., Bansal S., Kahali D., Dasbiswas A. S-Amlodipine: An Isomer with Difference-Time to Shift from Racemic Amlodipine. *International journal of hypertension*, 2018, article ID 8681792. DOI: 10.1155/2018/8681792
15. Gonzalez J.P., Clissold S.P. Ocular levobunolol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1987, vol. 34, no. 6, pp. 648-661. DOI: 10.2165/00003495-198734060-00002
16. Shrivastav P.S., Buha S.M., Sanyal M. Detection and quantitation of  $\beta$ -blockers in plasma and urine. *Bioanalysis*, 2010, vol. 2, no. 2, pp. 263-276. DOI: 10.4155/bio.09.184
17. Fernandez C., Martin C., Gimenez F., Farinotti R. Clinical Pharmacokinetics of Zopiclone. *Clinical Pharmacokinetics*, 1995, vol. 29, pp. 431-441. DOI: 10.2165/00003088-199529060-00004
18. Zaazaa H.E., Salama N.N., Abd El Halim L.M., Salem M.Y., Abd El Fattah L.E. Thin-Layer Chromatographic Enantioseparation of Ofloxacin and Zopiclone using Hydroxy-Propyl-Beta-Cyclodextrin as Chiral Selector and Thermodynamic Studies of Complexation. *JPC-J Planar Chromat*, 2014, vol. 27, pp. 166-173. DOI: 10.1002/chir.22536
19. Franks M.E., Macpherson G.R., Figg W.D. Thalidomide. *Lancet*, 2004, vol. 363, no. 9423, pp. 1802-1811. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16308-3
20. Knobloch J., Jungck D., Koch A. The Molecular Mechanisms of Thalidomide Teratogenicity and Implications for Modern Medicine. *Current molecular medicine*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 108-117. DOI: 10.2174/1566524017666170331162315
21. Tokunaga E., Yamamoto T., Ito E., Shibata N. Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 17131. DOI: 10.1038/s41598-018-35457-6
22. Mori T., Ito T., Liu S., Ando H., Sakamoto S., Yamaguchi Y., Tokunaga E., Shibata N., Handa H., Hakoshima T. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 1294. DOI: 10.1038/s41598-018-19202-7
23. Beng H., Zhang H., Jayachandra R., Li J., Wu J., Tan W. Enantioselective resolution of Rac-terbutaline and evaluation of optically pure R-terbutaline hydrochloride as an efficient anti-asthmatic drug. *Chirality*, 2018, vol. 30, no. 6, pp. 759-768. DOI: 10.1002/chir.22846
24. Jacobson G.A., Raidal S., Robson K., Narkowicz C.K., Nichols D.S., Haydn Walters E. Bronchopulmonary pharmacokinetics of (R)-salbutamol and (S)-salbutamol enantiomers in pulmonary epithelial lining fluid and lung tissue of horses. *British journal of clinical pharmacology*, 2017, vol. 83, no. 7, pp. 1436-1445. DOI: 10.1111/bcp.13228
25. Funck-Brentano C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of d-sotalol and d,l-sotalol. *European heart journal*, 1993, vol. 14 (Supplement H), pp. 30-35. DOI: 10.1093/eurheartj/14.suppl\_h.30
26. Waldo A.L., Camm A.J., deRuyter H., Friedman P.L., MacNeil D.J., Pauls J.F., Pitt B., Pratt C.M., Schwartz P.J., Veltri E.P. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival with Oral d-Sotalol. *Lancet*, 1996, vol. 348, no. 9019, pp. 7-12. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)02149-6
27. Godbillon J., Richard J., Gerardin A., Meinertz T., Kasper W., Jähnchen E. Pharmacokinetics of the enantiomers of acenocoumarol in man. *British journal of clinical pharmacology*, 1981, vol. 12, no. 5, pp. 621-629. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1981.tb01280.x
28. Meinertz T., Kasper W., Kahl C., Jähnchen E. Anticoagulant activity of the enantiomers of acenocoumarol. *British journal of clinical pharmacology*, 1978, vol. 5, no. 2, pp. 187-188. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1978.tb01622.x
29. Kim H., Radwanski E., Lovey R., Lin C.C., Nomeir A.A. Pharmacokinetics of the active antifungal enantiomer, SCH 42427 (RR), and evaluation of its chiral inversion in animals following its oral administration and the oral administration of its racemate genaconazole (RR/SS). *Chirality*, 2002, vol. 14, no. 5, pp. 436-441. DOI: 10.1002/chir.10114
30. Cai X.J., Xu X.Z., Pan C.X. Study of Optical Isomer Separation of Chiral Antifungal Drugs Tetramisole, Miconazole, and Paclitaxel on Two Chiral Stationary Phases. *Analytical Letters*, 2005, vol. 38, no. 7, pp. 1149-1157. DOI: 10.1081/AL-200057224
31. Mangas-Sanchez J., Busto E., Gotor-Fernandez V., Malpartida F., Gotor V. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of miconazole and econazole enantiomers. The importance of chirality in their biological evaluation. *The Journal of organic chemistry*, 2011, vol. 76, no. 7, pp. 2115-2122. DOI: 10.1021/jo102459w
32. Tedesco D., Di Pietra A.M., Rossi F., Garagnani M., Del Borrello E., Bertucci C., Andrisano V. Determination of dextromethorphan and levomethorphan in seized heroin samples by enantioselective HPLC and electronic CD. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2013, vol. 81-82, pp. 76-79. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.03.024
33. Inoue N., Nogawa M., Ito S., Tajima K., Kume S., Kyo T. The enantiomers of etodolac, a racemic anti-inflammatory agent, play different roles in efficacy and gastrointestinal safety. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2011, vol. 34, no. 5, pp. 655-659. DOI: 10.1248/bpb.34.655
34. Wishart D.S., Feunang Y.D., Guo A.C., Lo E.J., Marcu A., Grant J.R., Sajed T., Johnson D., Li C., Sayeeda Z., Assempour N., Iynkkaran I., Liu Y., Maciejewski A., Gale N., Wilson A., Chin L., Cummings R., Le D., Pon A.,

Knox C., Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 2017, vol. 46, pp. D1074-D1082. DOI: 10.1093/nar/gkx1037

35. Tang J., Tanoli Z.U., Ravikumar B., Alam Z., Rebane A., Vaha-Koskela M., Peddinti G., van Adrichem A.J., Wakkinen J., Jaiswal A., Karjalainen E., Gautam P., He L., Parri E., Khan S., Gupta A., Ali M., Yetukuri L., Gustavsson A.L., Seashore-Ludlow B., Hersey A., Leach A.R., Overington J.P., Repasky G., Wennerberg K., Aittokallio T. Drug Target Commons: A Community Effort to Build a Consensus Knowledge Base for Drug-Target Interactions. *Cell chemical biology*, 2018, vol. 25, no. 2, pp. 224-229. e2, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.11.009

36. Wang Y., Zhang S., Li F., Zhou Y., Zhang Y., Wang Z., Zhang R., Zhu J., Ren Y., Tan Y., Qin C., Li Y., Li X., Chen Y., Zhu F. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics. *Nucleic acids research*, 2020, vol. 48, no. D1, pp. D1031-D1041. DOI: 10.1093/nar/gkz981

37. Vlasses P.H., Rotmensch H.H., Swanson B.N., Irvin J.D., Johnson C.L., Ferguson R.K. Indacrinone: natriuretic and uricosuric effects of various ratios of its enantiomers in healthy men. *Pharmacotherapy*, 1984, vol. 4, no. 5, pp. 272-277. DOI: 10.1002/j.1875-9114.1984.tb03374.x

38. Davies N.M., Teng X.W. Importance of chirality in drug therapy and pharmacy practice: Implications for psychiatry. *Advances in Pharmacy*, 2003, vol. 1, no. 3, pp. 242-252.

## RELATIONSHIP BETWEEN CHIRALITY AND BIOACTIVITY OF DRUGS

Semenova E.V., Malyshko E.V., Tverdislov V.A.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory 1, bld.2, Moscow, 119234 Russia; e-mail: k.semenova99@gmail.com

**Abstract.** Although enantiomers of drugs have identical physicochemical properties in an isotropic medium, they can exhibit completely different biological activities. It is crucial to take into account the peculiarities of the interaction of isomers with asymmetric compounds of the body when creating drugs, since it may turn out that one form of a drug has a therapeutic effect, while the other is not absorbed, is less active, or even causes serious complications, being toxic to the body. The bioactivity of enantiomers, their pharmacodynamics and pharmacokinetics, the process of chiral inversion of optical isomers in living systems are being intensively studied at present. Differences in the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of enantiomers are determined by their specific interactions with chiral biomacromolecules. Elucidation of the nature of the chiral-hierarchical structure of target biomacromolecules and the symmetry structure of drugs is aimed at establishing the consistency and chiral correspondences of drugs and targets.

**Key words:** chirality; enantiomers, chiral drugs, stereospecificity, structure hierarchies.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ С СОСТАВОМ ЛИПИДОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ И СОКА АЛОЭ ДРЕВОВИДНОГО

Шишкина Л.Н., Смирнова А.Н., Мазалецкая Л.И., Дубовик А.С., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию: 08.07.2021

**Аннотация.** Изучены состав и физико-химические свойства липидов, выделенных из листьев и сока алоэ древовидного, (возраст 2 года), наличие биологически активных веществ (БАВ) в составе липидов и способности липидов к самоагрегации в полярной среде. Выявлено высокое содержание стерина в составе общих липидов исследованных объектов. Обнаружено, что доля фосфолипидов (ФЛ) в составе общих липидов из листьев в 1.5 раза больше, чем из сока алоэ, в то время как способность липидов из листьев и сока алоэ к окислению достоверно не различаются. Методом УФ-спектрометрии в сочетании с математической обработкой спектров по методу Гаусса выявлен более широкий набор БАВ в составе липидов из листьев по сравнению с липидами из сока алоэ. Низкая ингибирующая эффективность липидов из листьев алоэ в реакции низкотемпературного автоокисления метилолеата в тонком слое обусловлена высокой долей более легкоокисляемых фракций в составе их ФЛ. Показано, что размер и дзета-потенциал наночастиц, сформированных липидами из листьев и сока алоэ в дистиллированной воде, взаимосвязан с мольным отношением [стерина]/[ФЛ] в их составе.

**Ключевые слова:** *A. arborescens*, листья, сок, липиды, состав, УФ-спектрометрия, динамическое светорассеяние, антиоксидантные свойства.

Листья и сок разных видов Алоэ широко применяются на практике, поскольку обладают широким спектром фармакологической активности [1]. Одним из наиболее используемых является алоэ древовидный (*A. arborescens* Mill.). Однако механизм проявления экстрактами растений биологической активности до сих пор является предметом исследований. Предполагают, что наличие фенольных метаболитов, в том числе флавоноидов, обуславливает фармакологические свойства растений семейства *Aloe*, поскольку содержащиеся в них фенольные соединения обладают антиоксидантными свойствами [2-5].

Установлено, что биологическая активность антиоксидантов обусловлена, с одной стороны, их способностью модифицировать интенсивность перекисного окисления липидов, а, с другой, влиять на структурное состояние клеточных мембран за счет взаимодействия с основными компонентами мембран фосфолипидами (ФЛ) [6]. При этом необходимо отметить, что флавоноиды образуют комплексы с ФЛ, что существенно уменьшает их ингибирующую эффективность [7,8].

В связи с изложенным целью работы явилось изучение состава и физико-химических свойств липидов, их способности к самоагрегации в полярной среде и выявление взаимосвязи между составом и физико-химическими свойствами липидов, выделенных из листьев и сока алоэ древовидного.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

После предварительной биостимуляции [1] липиды выделяли из срединных листьев и сока алоэ древовидного 2-х летнего возраста по методу Фолча в модификации Кейтса [9]. Качественный состав липидов анализировали методом ТСХ, используя стеклянные пластинки размером 9×12 см, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в объемном соотношении 12.5 : 7.5 : 2 : 1 в качестве мобильной фазы [10]. Хроматограммы проявляли в парах йода. После удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их хлорной кислотой до неорганического фосфора (Р) количественный анализ состава ФЛ проводили спектрофотометрически по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты при длине волны 815 нм (ПЭ 5400ВИ, Россия). Для каждой пробы анализировали 5 хроматографических дорожек. Содержание стерина определяли спектрофотометрически при длине волны 625 нм по методу [11].

Помимо количественного соотношения фракций ФЛ оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доли (%) ФЛ и стерина в составе общих липидов; отношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ( $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ ), характеризующее способность липидов к окислению [12], а также соотношение содержания фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭ) и мольное отношение [стерина]/[ФЛ], обуславливающие структурное состояние мембранной системы биообъектов [12]. Отношение  $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$  вычисляли по формуле:  $(\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ})$ , где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, КЛ – кардиолипид, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы ФЛ, СЛ – сфинголипиды.

УФ-спектры хлороформных растворов липидов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 240 до 400 нм. Полученные УФ-спектры подвергали

математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver при условии совпадения контура исходного спектра с расчетным после аппроксимации на уровне  $10^{-3}$ .

Антиоксидантные свойства липидов из листьев алоэ определяли по их способности тормозить автоокисление метилолеата (RH) при 323 К в тонком слое, когда скорость окисления определяется скоростью диффузии кислорода воздуха в слой метилолеата. Эта модель позволяет наиболее адекватно оценить ингибирующую эффективность биологически активных веществ (БАВ) в биологических системах [13]. Липиды после отгонки хлороформа растворяли в метилолеате в концентрациях  $7,1 \times 10^{-4}$  и  $1,43 \times 10^{-3}$  М (0,5 и 1,0 мг/мл). За ходом окисления следили по накоплению гидропероксидов, концентрацию которых определяли методом йодометрического титрования (ошибка измерения не превышала 5%). За период индукции ( $\tau$ ) принимали время накопления пероксидов в концентрации 0,03 ммоль/г. Ингибирующую эффективность рассчитывали из разности величин периодов индукции окисления RH в присутствии и отсутствие добавки, отнесенной к периоду индукции окисления метилолеата ( $\Delta\tau/\tau_{RH}$ ).

Размер и дзета-потенциал ( $\zeta$ -потенциал) наночастиц липидов из листьев и сока алоэ в дистиллированной воде определяли методом динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при температуре 25°C и угле рассеяния 173°. Источником света являлся гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Исследуемый раствор объемом около 1 мл помещали в предварительно обеспыленную квадратную кювету толщиной 1 см. Концентрация липидов составляла  $4,3 \times 10^{-5}$  М. Сбор данных и первичную обработку осуществляли программой Zetasizer Software 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Каждое измерение повторяли 8 раз.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [14]. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы явился сравнительный анализ обобщенных показателей состава липидов из листьев и сока алоэ, которые приведены в таблице 1.

Из анализа представленных данных следует, что доля ФЛ в составе общих липидов из листьев и сока алоэ достаточно близка к аналогичным величинам показателя в составе липидов из цветков календулы и плодов облепихи [15]. При этом доля ФЛ в составе липидов из листьев алоэ приблизительно в 1,5 раза выше, чем в липидах из сока алоэ, а отношения ФХ/ФЭ и соотношения сумм более легко- и более трудноокисляемых фракций ФЛ в исследуемых объектах достоверно не различаются. Необходимо отметить чрезвычайно высокое содержание стерина в составе общих липидов алоэ (табл. 1) по сравнению с их долей в составе липидов из цветков календулы и особенно из плодов облепихи [15]. Это обуславливает и высокие значения мольного отношения [стерины]/[ФЛ] в липидах алоэ древовидного, что позволяет сделать вывод о большей структурированности липидного компонента в листьях и соке алоэ древовидного, чем в липидах ряда других растительных объектов.

Как и обобщенные показатели состава липидов из листьев и сока алоэ древовидного 2-х летнего возраста различаются не во всех случаях, существенные достоверные различия в количественном соотношении фракций ФЛ исследованных объектов выявлены только в относительном содержании ФИ и ФС, что четко следует из данных таблицы 2.

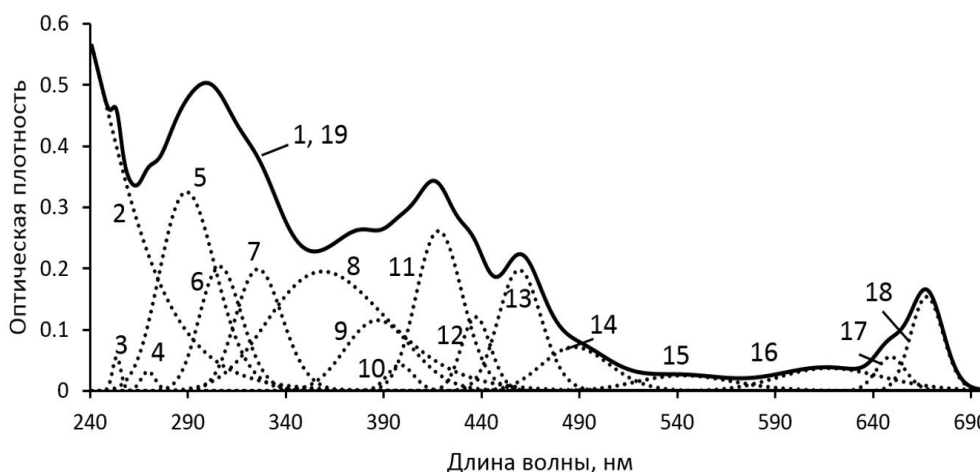
**Таблица 1.** Обобщенные показатели состава липидов из листьев и сока *A. Arborescens* (возраст растения 2 года)

Источник выделения липидов	ФЛ, %	Стерины, %	ФХ/ФЭ	$\frac{\sum \text{ЛОФЛ}}{\sum \text{ТОФЛ}}$	$\frac{[\text{стерины}]}{[\text{ФЛ}]}$
Листья	$15,0 \pm 0,6$ $n^* = 8$	69,2	$0,88 \pm 0,05$ $n = 5$	$2,20 \pm 0,16$ $n = 5$	6,9
Сок	$10,15 \pm 0,5$ $n = 7$	35,6	$0,82 \pm 0,10$ $n = 5$	$2,28 \pm 0,30$ $n = -5$	5,35

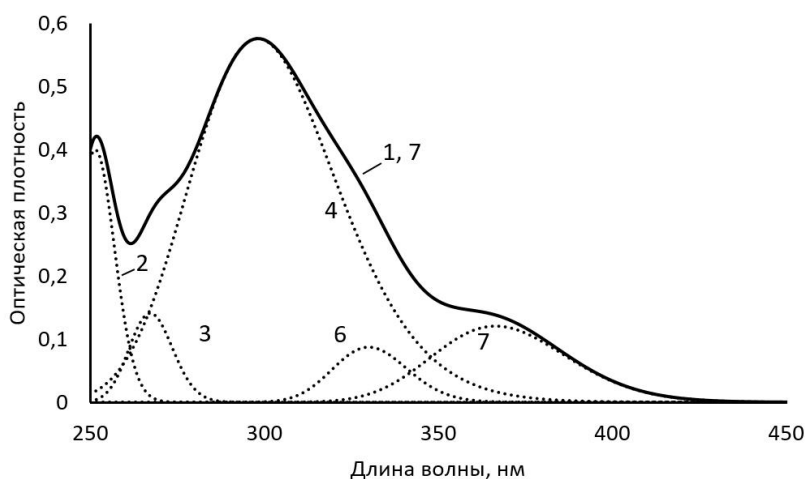
$n^*$  - количество измерений

**Таблица 2.** Количественное содержание фракций фосфолипидов (%P) в составе липидов, выделенных из листьев и сока *A. arborescens* (возраст 2 года)

Фракция	ЛФХ	СЛ	ФХ	ФИ	ФС	ФЭ	КЛ	ФК
Листья алоэ	$2,04 \pm 0,18$	$10,3 \pm 2,7$	$19,2 \pm 1,7$	$13,37 \pm 0,29$	$17,86 \pm 0,45$	$21,9 \pm 1,9$	$10,96 \pm 0,27$	$4,4 \pm 1,8$
Сок алоэ	$1,9 \pm 0,8$	$13,8 \pm 3,6$	$16,0 \pm 4,0$	$25,2 \pm 2,9$	$8,75 \pm 0,80$	$19,8 \pm 2,7$	$14,5 \pm 1,6$	



**Рисунок 1.** УФ-спектр хлороформного раствора липидов, выделенных из листьев *A. arborescens* (возраст 2 года), и их гауссианы: 1, 19 – исходный и расчетный спектры, 2 – 221,2 нм, 3 – 253,7 нм, 4 – 269,7 нм, 5 – 289,4 нм, 6 – 306,4 нм, 7 – 325,9 нм, 8 – 359 нм, 9 – 386,9 нм, 10 – 398,5 нм, 11 – 418,1 нм, 12 – 437,1 нм, 13 – 459,3 нм, 14 – 487,4 нм, 15 – 542,9 нм, 16 – 617,3 нм, 17 – 648,9 нм, 18 – 667,3 нм. Концентрация липидов  $3,29 \times 10^{-4}$  М.



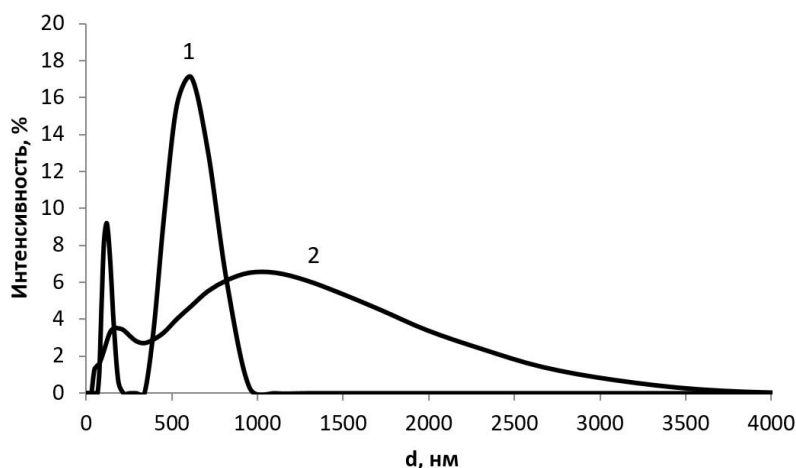
**Рисунок 2.** УФ-спектры хлороформных растворов липидов, выделенных из сока *A. arborescens* (возраст 2 года), и их гауссианы: 1, 7 – исходный и расчетный спектры, 2 – 251,5 нм, 3 – 257,3 нм, 4 – 298,2 нм, 5 – 330 нм, 6 – 366,5 нм. Концентрация липидов  $1,8 \times 10^{-5}$  М.

Необходимо отметить, что ФИ и ФС играют важную роль в регуляции метаболизма в биологических объектах, так как являются сигнальными молекулами [16,17].

Как известно, в УФ-спектрометрии использование хлороформа как растворителя позволяет выявить в анализируемой пробе компоненты с максимумами полос поглощения  $\lambda \geq 240$  нм. Для анализа природы БАВ, извлекаемых вместе с липидами в процессе их выделения, были исследованы УФ-спектры хлороформных растворов липидов и проведена их математическая обработка по методу Гаусса. Полученные УФ-спектры и их гауссианы приведены на рисунках 1 и 2.

Сравнительный анализ результатов, представленных на рисунках 1 и 2, позволяет заключить, что в липидах из листьев содержится более широкий набор БАВ по сравнению с липидами из сока алоэ. Полосы поглощения с максимумами от 240 до 380 нм обычно характерны для флавоноидов и ряда фенольных соединений [2,18], максимумы полос поглощения каротиноидов в хлороформе расположены в области  $\lambda > 400$  нм [19], а полосы поглощения с максимумами  $\lambda > 500$  нм характерны для хлорофиллов. Действительно, раствор липидов из листьев алоэ имеет ярко зеленую окраску, а раствор липидов из сока алоэ светло-желтый.

Анализ антиоксидантных свойств липидов из листьев алоэ 2-х летнего возраста выявил, что они очень слабо тормозят автоокисление метилолеата в тонком слое: ингибирующая эффективность липидов равна  $\Delta\tau/\tau_{RH} = 0,05$  и не зависит от концентрации добавки. Это значение близко к величине ингибирующей эффективности липидов из цветков календулы, выделенных после предварительной экстракции растительного сырья 50%-ным водным раствором пропиленгликоля [15]. Слабые антиоксидантные свойства липидов из листьев алоэ 2-х летнего возраста, очевидно, обусловлены тем, что сами липиды участвуют в процессе как субстраты окисления. Это предположение вытекает из высокой способности липидов из листьев алоэ к окислению, поскольку более 2/3 в составе их ФЛ составляют более легкоокисляемые фракции (табл. 2), и отсутствия линейной зависимости периода индукции окисления от концентрации добавки.



**Рисунок 3.** Средний динамический диаметр наночастиц, образованных липидами из сока (1) и листьев (2) *A. arborescens* (возраст 2 года) в дистиллированной воде

Ранее было показано, что полярность среды и способность природных липидов к мицеллообразованию влияют на реакционную способность фенольных соединений [20], а наличие стероидов в составе синтетических ФЛ достоверно изменяет дзета-потенциал их наночастиц [21]. Методом динамического рассеяния света нами было обнаружено, что липиды из исследованных объектов образуют в дистиллированной воде наночастицы двух размеров (рис. 3).

Средний динамический диаметр более крупных образованных липидами наночастиц составляет  $1100 \pm 130$  нм ( $58,6 \pm 2,1\%$ ) и  $585 \pm 80$  нм ( $63,2 \pm 4,4\%$ ) из листьев и сока алоэ соответственно. Средний динамический диаметр более мелких наночастиц равен  $180 \pm 18$  нм ( $34,1 \pm 1,9\%$ ) и  $123 \pm 12$  нм ( $35,8 \pm 3,0\%$ ) для липидов из листьев и сока алоэ соответственно. Следовательно, размер наночастиц, образованных липидами из листьев алоэ в полярной среде, в 1,5–1,9 раза превышает средний динамический диаметр наночастиц, образованных липидами из сока алоэ. При этом липиды из листьев алоэ характеризуются и более высоким молярным соотношением [стероиды]/[ФЛ] (табл. 1), что предполагает большую структурированность их липидного компонента по сравнению с липидами из сока алоэ. Выявлены и достоверные различия дзета-потенциала:  $-46,2 \pm 0,9$  мВ (липиды из листьев алоэ) и  $-53,4 \pm 1,2$  мВ (липиды из сока алоэ). Таким образом, увеличение содержания стероидов в составе общих липидов из растительных объектов (табл. 1) вызывает рост дзета-потенциала наночастиц, сформированных их липидами в полярной среде.

#### Список литературы / References:

1. Зилфикаров И.Н., Оленников Д.Н., Ибрагимов Т.А., Челомбитко В.А., Вандышев В.В. *Современные аспекты фармакогнозического и биохимического изучения суккулентного сырья алоэ древовидного и каллизии душистой*. МО, Щёлково: Издатель Мархотин П.Ю., 2013, 192 с. [Zilfikarov I.N., Olennikov D.N., Ibragimov T.A., Chelombit'ko, V.A., Vandyshov V.V. *Modern aspects of pharmacognostic and biochemical study of succulent raw material of aloe arborescens and callisia fragrans*. Publisher: Moscow Region, Schyolkovo: Publisher Marchotin P.Yu., 2013, 192 p. (In Russ.)]
2. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Торопова А.А., Танхаева Н.Л. Химический состав сока алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и его антиоксидантная активность (in vitro). *Химия растительного сырья*, 2010, № 3, с. 83-90. [Olennikov D.N., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A., Toropova A.A., Tankhaeva N.L. The chemical composition of *Aloe arborescens* juice and its antioxidant activity in vitro. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2010, no. 3, pp. 83-90. (In Russ.)]
3. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А. Исследование химического состава алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.). *Химия растительного сырья*, 2010, № 3, с. 77-82. [Olennikov D.N., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A. Investigation of the chemical composition of *Aloe arborescens*. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2010, no. 3, pp. 77-82. (In Russ.)]
4. Сажина Н.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В., Мисин В.М. Сравнительное изучение антиоксидантных свойств экстрактов различных видов Алоэ. *Химия растительного сырья*, 2015, № 2, с. 169-176. [Sazhina N.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V., Misin V.M. Comparative study of the antioxidant properties of extracts of various Aloe species. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2015, no. 2, pp. 169-176. (In Russ.)]
5. Сажина Н.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В., Пальмина Н.П. Ингибирование окисления липосом фосфатидилхолина фенольными соединениями экстрактов *Aloe*: *A. arborescens*, *A. pillansii*, *A. squarrosa*. *Химия растительного сырья*, 2019, № 2, с. 83-90. [Sazhina N.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V., Palmyna N.P. Inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposomes by phenolic compounds of Aloe extracts: *A. arborescens*, *A. pillansii*, and *A. squarrosa*. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 83-90. (In Russ.)]

6. Burlakova E.B. Antioxidants: Yesterday, Today, Tomorrow. In: *Chemical and Biological Kinetics. New Horizons. Volume 2: Biological Kinetics*. ed. Burlakova E.B. and Varfolomeev S.D. VSP, Leiden, Boston, 2005, pp. 1-33.
7. Xu K., Liu B., Ma Y., Du J., Li G., Gao H., Zhang W., Ning G. Physicochemical properties and antioxidant activity of luteolin-phospholipid complex. *Molecules*, 2009, vol. 14, pp. 3486-3493.
8. Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N. Lecithin influence on the effectiveness of the antioxidant effect of flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 2, pp.135-139.
9. Кейтс М. *Техника липидологии*. М.: Мир, 1975, 322 с. [Keyts M. *Tekhnika lipidologii*. Moscow, 1975, 322 p. (In Russ.)]
10. *Биологические мембраны: методы*. Под ред. Дж.Б.С. Финдлея В.Х. Эванза. М.: Мир, 1990, 423 с. [*Biologicheskiye membrany: metody*, ed. J.B.C. Findley, W.H. Evanz. Moscow, 1990, 423 p. (In Russ.)]
11. Sperry W.M., Webb M. A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, vol. 187, pp. 97-106.
12. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2004, том 44, № 3, с. 289-295. [Shishkina L.N., Kushnireva Ye. V., Smotryaeva M.A. A new approach to assessment of biological consequences of exposure to low-dose radiation. *Radiat. Biologiya. Radioekologiya*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 189-295. (In Russ.)]
13. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Мазалецкая Л.И., Повх А.Ю., Швыдкий В. О. Шелудченко Н.И. Система регуляции перекисного окисления липидов как основа экологического тестирования. *Химическая физика*, 2020, том 39, № 6, с. 52-58. [Shishkina L.N., Kozlov M.V., Mazaletskaia L.I., Povkh A. Yu., Shvydkiy V.O., Sheludchenko N.I. Regulatory System of Lipid Peroxidation as a Basis for Ecological Testing. *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2020, vol. 14, no. 3, pp. 498-503. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1990793120030240
14. Брин Э.Ф., Травин С.О. Моделирование механизмов химических реакций. *Хим. Физика*, 1991, т. 10, № 6, с. 830-837. [Brin E.F., Travin S.O. *Khimicheskaya fizika*, 1991, vol. 10, no. 6, pp. 830-837. (In Russ.)]
15. Шишкина Л.Н., Мазалецкая Л.И., Смирнова А.Н., Швыдкий В.О. Ингибирующая эффективность липидного компонента растительных объектов зависимости от полярности элюента. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 3, с. 482-499. [Shishkina L.N., Mazaletskaia L.I., Smirnova A.N., Shvydkiy V.O. Inhibitory efficiency of the lipid component of the plant object in dependence on the eluent polarity. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 482-488. (In Russ.)]
16. Kagan V.E., Fabisiak J.P., Shvedova A.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Schor N.F., Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.*, 2000, vol. 477, pp. 1-7.
17. Colin L.A., Jaillais Y. Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2020, vol. 53. pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.pbi.2019.08.007
18. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрашилов Б.С., Музафаров Е.Н. *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина*. Пушино, Synchronobook, 2013, 310 с. [Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. *Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine*. Pushchino, Synchronobook, 2013, 310 p. (In Russ.)]
19. Курегян А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов. *Фундаментальные исследования*, 2015, № 2 (23), с. 5166-5172. Kuregyan A.G. The spectrophotometry in analysis of carotenoids. *Fundamental research*, 2015, no. 2 (23), pp. 5166-5172. (In Russ.)]
20. Shishkina L.N., Mazaletskaia L.I., Marakulina K.M., Lukanina Yu.K., Plazhchina I.G., Sheludchenko N.I. Effect of complexation of phospholipids and polarity of medium on the reactivity of phenolic antioxidants. In: *Chemistry and Technology of Plant Substances*, AAP, CRC Press, Toronto, 2017. pp. 93-110.
21. Mosca M., Ceglie A., Ambrosone L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2011, vol. 164, pp. 158-165.



**INTERRELATION OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES WITH COMPOSITION OF LIPIDS FROM LEAVES AND JUICE OF *ALOE ARBORESCENS* MILL.****Shishkina L.N., Smirnova A.N., Mazaletskaya L.I., Dubobik A.S., Shvydkiy V.O.**

Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

Kosygin str, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

**Abstract.** The composition and physicochemical properties of lipids isolated from leaves and juice of *A. arborescens* (2 years ago), presence of the biologically active substances (BAS) in the lipid composition and the ability of lipids to self-aggregation in the polar medium were studied. A high content of sterols is revealed in the total lipid composition of the investigated objects, It is obtained that the phospholipid (PL) share in the total lipid composition from leaves is 1.5 times more than that from juice of Aloe, while the ability of lipids to oxidation is certain not differ for leaves and juice of *A. arborescens*. The more wide set of BAS in lipids from leaves compared with juice of Aloe is revealed by the UV-spectrometry method using the Gauss decomposition of spectra. The low inhibitory efficiency of lipids from leaves of *A. arborescens* in reaction of the low temperature autoxidation of methyl oleate in the thin layer is due to a high share of the more easily oxidizable fractions in their PL composition. Size and  $\zeta$ -potential of nanoparticles formed lipids from leaves and juice of Aloe are shown to relate the molar ratio of [sterols]/[PL] in their composition.

**Key words:** *A. arborescens*, leaves, juice, lipids, composition, UV-spectrophotometry, dynamic light scattering, antioxidant properties.

## ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ САХАРИДОВ НА ФУРЬЕ-СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Нечипоренко А.П.<sup>1</sup>, Везо О.С.<sup>2</sup>, Нечипоренко У.Ю.<sup>3</sup>, Плотникова Л.В.<sup>2</sup>,  
Ситникова В.Е.<sup>1</sup>, Плотников П.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики  
Кронверкский пр., 49, г. Санкт-Петербург, 197101, РФ

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
Университетская набережная, 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: ljusja@mail.ru

<sup>3</sup> Независимая лаборатория «ИНВИТРО СПб.»  
ул. Благодатная, 18, г. Санкт-Петербург, 196106, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2021

**Аннотация.** Методами ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения и биохимического анализа исследовано влияние меда разного ботанического вида, пищевых сахаров и растительного подсластителя "Стевиозид" (в качестве провоцирующей нагрузки) на толерантность организма к глюкозе и скорость вывода ее из кровотока. Исследование плазмы крови на содержание глюкозы проводилось методом гликемических (сахарных) кривых по 4 точкам забора крови у женщины-пациента, прошедшей медикаментозный курс лечения на начальной стадии заболевания диабетом второго типа. Предварительное исследование методами рефрактометрии и биохимического анализа препаратов моносахаридов (глюкоза, фруктоза), пищевых дисахаридов (свекловичный и тростниковый сахара) и медов с разным соотношением моносахаридов (степной, гречишный, каштановый, акации белой) позволило идентифицировать проявление в ИК-спектрах плазмы крови полос, обусловленных глюкозой и фруктозой, и проявление метаболической памяти человеческого организма на состав пищевой диеты.

**Ключевые слова:** плазма крови человека, мед, сахараиды, Фурье ИК- спектроскопия

Как известно, глюкоза играет важнейшую роль в обеспечении энергией всех тканей организма человека и в клеточном дыхании. Клетки скелетных мышц, нервной системы, сердца и головного мозга, больше всего нуждающихся в энергии, в первую очередь страдают при ее длительном понижении (гипогликемия) или повышении (гипергликемия), что приводит к серьезным последствиям. Для человеческого организма крайне важно, чтобы количество глюкозы поддерживалось на постоянном нормальном уровне. Поэтому медики придают большое значение контролю уровня глюкозы в крови, являющегося основным интегральным показателем состояния углеводного обмена. Это важно для диагностики и лечения таких эндокринных заболеваний как сахарный диабет, функции печени, надпочечников и др. [1-3].

Сахарный диабет второго типа обусловлен нарушением восприимчивости клеток организма к гормону инсулину, который вырабатывается поджелудочной железой, и неспособностью клеток использовать глюкозу. В результате инсулин не может доставлять в клетки основной источник энергии – глюкозу, что приводит к повышению ее концентрации в крови [4-7]. В медицинской терминологии это называется инсулинорезистентностью. Сегодня диабет второго типа стал проблемой мирового масштаба, которая занимает третье место среди причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. По данным Всемирной организации здравоохранения в последние годы тенденции к регрессу заболеваемости не только не наблюдается, но есть немало свидетельств того, что болезнь помолодела и уже не редкость встретить сахарный диабет у детей и подростков [8–10]. Многие специалисты занимаются ей на протяжении десятилетий, но на сегодняшний день нет метода, позволяющего излечить его полностью. Из-за чего возникает сахарный диабет второго типа ученым еще неизвестно, нередко имеет место не одна предпосылка, а целый комплекс причин. Тактика лечения направлена на медикаментозное восстановление чувствительности клеток к инсулину и снижение уровня глюкозы безуглеводной диетой. В качестве заменителя сахарозы при сахарном диабете второго типа рекомендуют фруктозу, которая не зависит от инсулина и медленно выводится из кровотока, природные и синтетические подсластители, а также мед с повышенным содержанием фруктозы [6, 11-14].

Мёд – естественный природный продукт растительно-животного происхождения, еще не до конца изученный и понятый, содержит микро- и макроэлементы, витамины, аминокислоты, органические кислоты, ароматические вещества, которые легко усваиваются организмом и обеспечивают его энергией. На протяжении многих столетий единственным сладким продуктом, который употреблял человек, был мёд. Сахар – "голый" углевод научились производить всего лишь пару столетия назад. Химический состав меда весьма сложный (содержит до 300–400 различных компонентов), непостоянен и зависит от вида растений, с каких собирался нектар, структуры и состава почвы, на которой растут медоносы, района их произрастания, времени сбора нектара пчелами и их породы, погодных и климатических условий, срока хранения, зрелости меда и пр. [15, 16].

Основную часть меда составляют сахара (глюкоза, фруктоза, мальтоза, трегалоза, сахароза и др.), общее содержание которых может достигать 80%. Но основную долю составляют глюкоза и фруктоза – до 80-90% от суммы всех сахаров, их доля зависит от активности ферментов и вида растительного источника нектара. Сахароза гидролизруется под действием фермента инвертазы, расщепляясь на глюкозу и фруктозу, которые в итоге

представляют сумму инвертированных моносахаров. Два абсолютно разных по своим свойствам углевода и усваиваются организмом по-разному. Безусловное преимущество фруктозы состоит в том, что она усваивается медленно, не вызывает быстрых выбросов сахара в кровь, служит источником так называемой «медленной энергии» и не требует участия инсулина вообще. Это свойство используют при создании сладкой пищевой продукции для больных сахарным диабетом. Глюкоза, в отличие от фруктозы, усваивается моментально и гликемический индекс продуктов определяется по содержанию в них глюкозы.

Именно глюкоза и фруктоза и их соотношение в составе разных видов меда определяют их свойства. Больше фруктозы – слаще мед. Больше глюкозы – продукт быстрее кристаллизуется. Большая концентрация этих основных компонентов – свидетельство пищевой ценности меда. От содержания фруктозы зависит гликемический индекс меда. Чем фруктозы больше, тем он ниже. Фруктоза перерабатывается организмом без участия инсулина и является оптимальным решением для людей с сахарным диабетом. Так, химический состав меда белой акации, считающегося самым жидким видом меда, и процентное соотношение этих сахаров, делают его предпочтительным для диабетиков. Больным с гипергликемией рекомендуется откорректировать режим питания, ограничив поступление углеводов с пищей (сахаросодержащие продукты, белый хлеб, макароны, картофель и пр.). Следует отметить, многие авторы считают, что низкоуглеводная диета – первое лекарство при диабете [17, 18]. Хорошо известно, что до изобретения современных препаратов, случаи диабета лечили только диетой и голоданием.

Обзор литературных данных показал, что публикаций по применению метода Фурье-ИК-спектроскопии (ИКС НПВО) к исследованию одноразовой пробы сыворотки крови людей и животных, больных диабетом второго типа, взятой натощак, крайне мало [18, 20]. Следует отметить, что в медицинских лабораториях для диагностики инструментальные методы практически не используются. Основными методами лабораторного тестирования заболевания к настоящему времени являются биохимические [21-23], среди которых наиболее информативным считается расширенный тест на толерантность к глюкозе – метод гликемических (сахарных) кривых по трем-четырем контрольным точкам забора крови, как ответ организма на провоцирующую нагрузку глюкозой. Метод дает представление о скорости выхода ее из кровотока, что важно при курировании процесса лечения данного заболевания.

В связи с этим, целью работы являлось: выявление потенциальных возможностей метода ИКС НПВО в исследовании проявлений глюкозы и фруктозы в спектрах плазмы крови, полученной методом сахарных кривых, с использованием в качестве провоцирующей нагрузки медов с разным соотношением моносахаридов; влияние сезонного состава пищевой диеты на характер и динамику изменения оптических характеристик плазмы крови.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись:

1. Плазма крови женщины-пациента, прошедшей в течение года курс медикаментозного лечения на начальной стадии заболевания диабетом второго типа на фоне безуглеводной диеты [24]. В исследовании забор венозной крови осуществлялся 4 раза (4 контрольные точки). Первый забор крови делался натощак (контрольная точка 1). После этого пациент сразу выпивал сладкий напиток, и с интервалом 40 мин делались последующие заборы крови (контрольные точки 2–4). При этом анализировалось изменение уровня глюкозы в плазме. До начала программы исследования получена «холодная» сахарная кривая – плазма крови пациента без провоцирующей нагрузки (сахарная кривая № 1). Уровень глюкозы измерялся для 4 контрольных точек сахарных кривых плазмы крови с провоцирующей нагрузкой чашкой кофе (150 мл) с 2 чайными ложками различных углеводов (сахарные кривые №№ 2–9).

В качестве провоцирующей нагрузки использованы 4 вида меда, свекловичный и тростниковый сахара и порошок экстракта растительного подсластителя "Стевиозид". Плазму получали сепарированием цельной венозной крови – отделением центрифугированием жидкой части от форменных элементов в вакуумных пробирках (вакутейнерах) с антикоагулянтным покрытием (калиевая соль этилендиаминтерауксусной кислоты – ЭДТА) [5, 21]. Плазма исследовалась на общее содержание белка, осажденного трехкратным избытком этанола (96 %). Разделение глобулинов и альбуминов плазмы проводилось последовательным высаливанием сульфатом натрия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [25].

2. Меды разного ботанического вида: монофлерные – гречишный (Оренбургская обл.), каштановый, акации белой (Краснодарский край) и полифлерный – степной (Саратовская обл.).

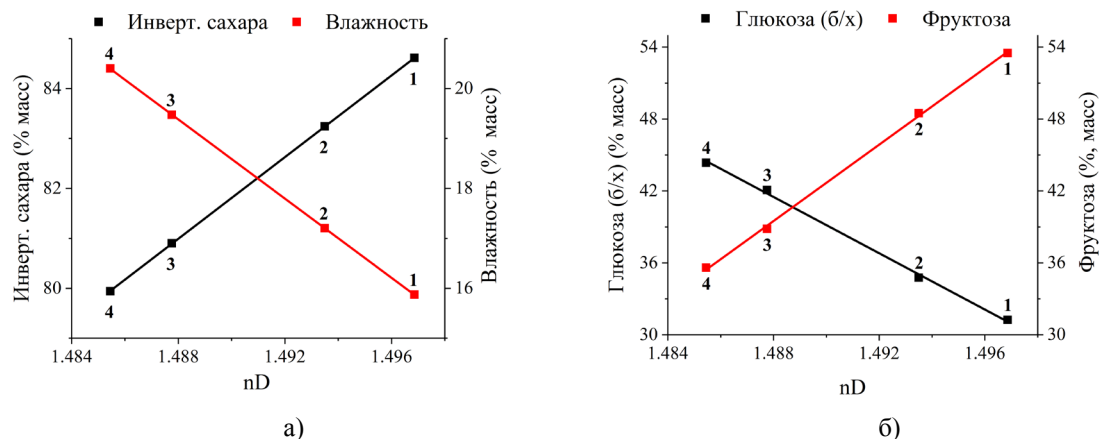
3. Вспомогательные объекты – сухие препараты моносахаридов: глюкоза (Химреактив Моск. обл.), фруктоза ("Sigma"); пищевые дисахариды – свекловичный (Россия) и тростниковый (Канада) сахара, а также "Стевиозид" (Малайзия), зарегистрированный в качестве пищевой добавки E960 как безуглеводный подсластитель.

Содержание глюкозы в образцах плазмы крови и меда определялось в медицинском центре «ИНВИТРО СПб.» на биохимическом анализаторе ВА-400 (Испания) глюкозооксидазным методом с реактивами Biosystems. Данные по результатам биохимического анализа на содержание глюкозы в четырех медах приведены в таблице 1. Содержание глюкозы в плазме крови для 9 сахарных кривых представляет таблица 2.

Колебательные спектры (32 скана) образцов получали на Фурье-спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия) с алмазным НПВО элементом в диапазоне волновых чисел  $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$  [26, 27]. Сушку образцов плазмы крови и выделенных из нее белков для получения ИК-спектров проводили на предметных стеклах воздушным путем при

Таблица 1. Измеренные биохимические и рефрактометрические показатели мёдов

№	Мед	Глюкоза (б/х), % масс	nD	Инвертир. сахара, % масс	Фруктоза %, масс	Влажность % масс
1	Степной	44,35	1,48545	79,94	35,59	20,40
2	Гречишный	42,07	1,48776	80,90	38,83	19,47
3	Каштановый	34,76	1,49350	83,24	48,48	17,20
4	Акации белой	31,24	1,49686	84,61	53,51	15,87



**Рисунок 1.** Зависимости: а) Рефрактометрических показателей: инвертированный сахар и влажность; б) содержания фруктозы и глюкозы от показателя преломления мёда: 1 – степного; 2 – гречишного; 3 – каштанового; 4 – акации белой

20-22°C в течение 4–6 часов. Рефрактометрические показатели образцов мёда (показатель преломления, инвертированные сахара, влажность) снимали на цифровом рефрактометре Abbemat MW/WR (Anton Paar, Австрия) при длине волны 589,3 нм («Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники», Научный парк СПбГУ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральному исследованию плазмы крови пациента с провоцирующими нагрузками предшествовал анализ мёдов рефрактометрическим (определение содержания инвертированных сахаров, показателя преломления – nD, влажности) и биохимическим (определение содержания глюкозы) методами. Содержание фруктозы оценивали по разности содержания инвертированных сахаров и глюкозы. Предварительные исследования серии мёдов (60 образцов) позволили разделить монофлерные мёды на две основные группы по соотношению глюкозы и фруктозы и идентифицировать полосы, обусловленные их поглощением в ИК-спектрах. Для дальнейших исследований выбраны наиболее доступные и используемые монофлерные мёды: гречишный (группа I с повышенным содержанием глюкозы), каштановый и акации белой (группа II с повышенным содержанием фруктозы) и полифлерный степной мёд. Результаты рефрактометрических измерений и биохимического анализа выбранных образцов мёдов приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Полученные данные показали линейные зависимости между тремя рефрактометрическими показателями (рис. 1а) исследуемых мёдов. А также линейную связь содержания в них глюкозы и фруктозы с показателем преломления мёда (рис. 1б).

Результаты исследования плазмы крови методом сахарных кривых с разными провоцирующими нагрузками приведены в таблице 2. Помимо четырех мёдов, разного ботанического вида, для сравнительного исследования были использованы промышленные сахара: свекловичный и тростниковый (дисахариды, представляющие эквимолекулярную композицию  $\alpha$ -глюкозы и  $\beta$ -фруктозы). Кроме того, интерес представляло включение в программу исследования экстракта растительного подсластителя "Стевиозид", полученного из листьев травы стевия и считающегося сегодня одним из лучших заменителей сахарозы для людей с заболеванием диабетом.

Первое, на что следует обратить внимание, – периодический характер изменения содержания нативной глюкозы в кровотоке для "холостой" сахарной кривой № 1 (без провоцирующей нагрузки) в интервале 5,13–5,60 ммоль/л. Это указывает на то, что первый забор крови при снятии серии сахарных кривых должен производиться в одно и то же время. И второе, – нестабильность (5,13–5,68 ммоль/л) показателя уровня глюкозы для первых контрольных точек сахарных кривых, несмотря на то, что забор крови проводился в одно и то же время (7 часов) натощак. Нормой считается концентрация глюкозы в плазме крови 4,0–5,9 ммоль/л. Значения этого показателя в пределах 6,1–7,0 ммоль/л свидетельствуют о преддиабете, а значения выше 7,0 ммоль/л – о сахарном диабете [6]. Таким образом, показатели уровня глюкозы в плазме крови пациента натощак, для первых контрольных точек, полученных в течение 9 месяцев с интервалом 3–5 недель отвечают норме. Однако через два

Таблица 2. Биохимический анализ плазмы крови на содержание глюкозы, ммоль/л

№ кривой	Провоцирующий агент	Контрольные точки сахарных кривых			
		1	2	3	4
1*	—	5,13	5,52	5,60	5,12
2	Сахар свекловичный	5,18	11,75	7,03	6,58
3	Мед степной	5,32	10,65	6,22	5,08
4	Мед гречишный	5,68	10,48	6,58	5,56
5	Мед каштановый	5,46	9,21	5,35	5,22
6	Мед акации белой-1	5,26	8,52	5,20	4,94
7	Тростниковый сахар	5,15	11,47	6,81	5,83
8**	Мед акации белой-2	5,43	12,18	6,82	4,85
9	Стевиозид	5,15	5,84	6,07	6,09

\*без провоцирующей нагрузки, \*\* с двойной провоцирующей нагрузкой

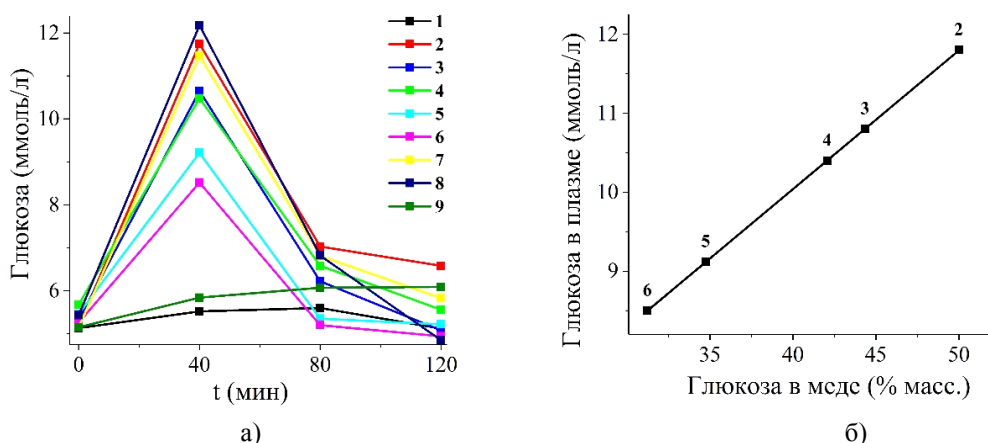


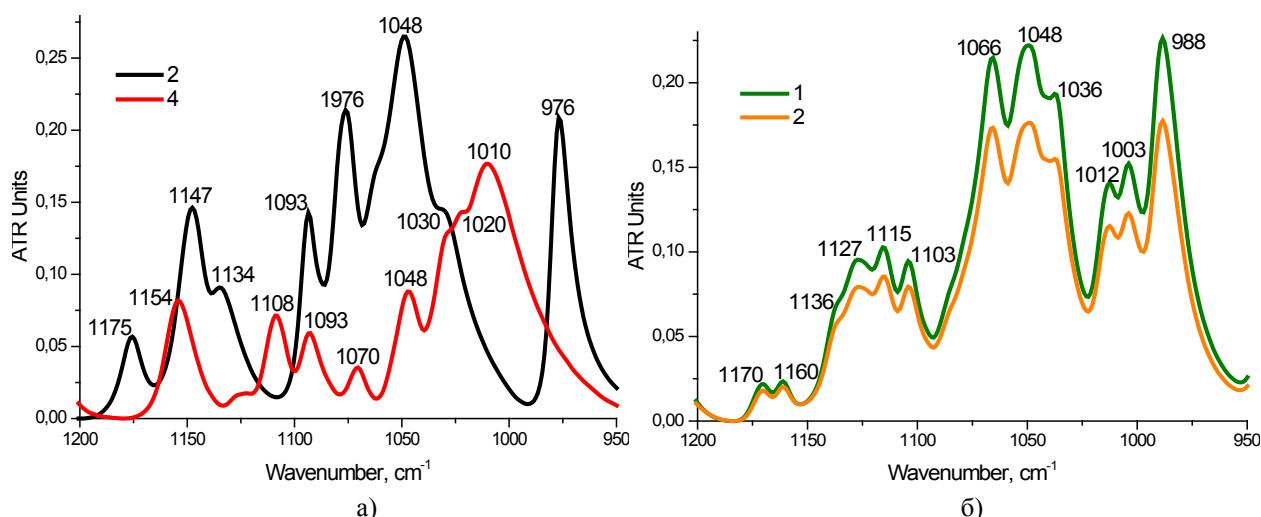
Рисунок 2. Графическое представление: а) сахарных кривых без (1) и с провоцирующей нагрузкой (2-9); б) зависимостей содержания глюкозы в плазме крови от ее содержания в меде (цифрой обозначена нагрузка в соответствии с таблицей 2)

часа (контрольная точка 4) более высокие значения по глюкозе в кровотоке показало применение в качестве провоцирующей нагрузки обоих сахаров (сахарные кривые № 2 и № 7) и гречишного меда (сахарная кривая № 4). При контроле на наличие признаков диабета второго типа большое значение имеет характер сахарной кривой, показывающий скорость выхода глюкозы из кровотока после провоцирующей нагрузки.

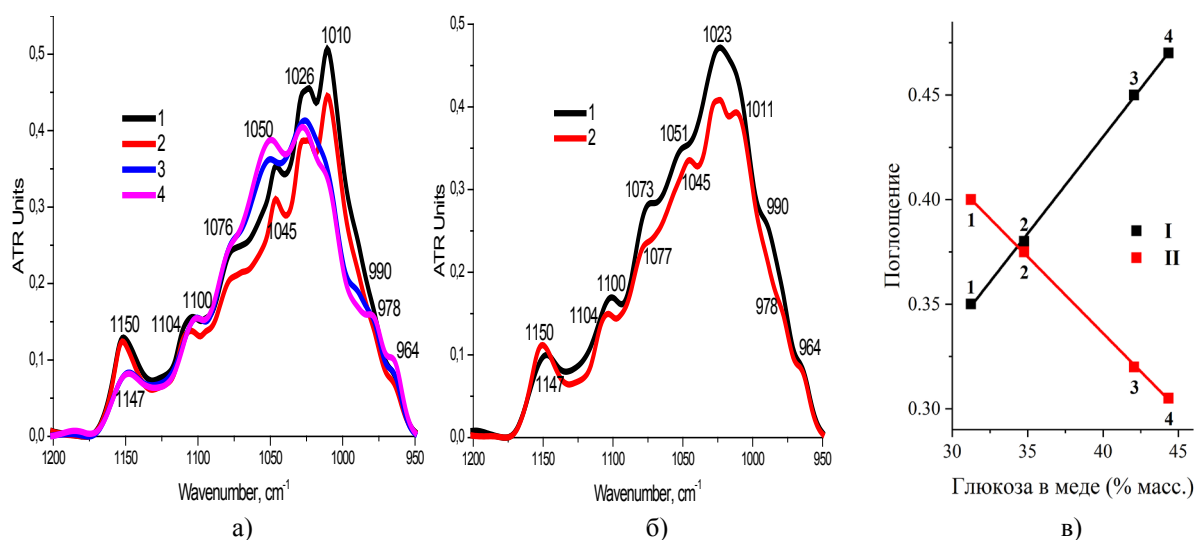
Более наглядное представление о динамике изменении уровня глюкозы в плазме крови дает графическое представление экспериментальных данных (рис. 2). Их анализ позволяет отметить, что через 40 минут после приема меда-провокатора (контрольная точка 2) минимальные значения по уровню глюкозы в кровотоке показало применение в качестве провоцирующей нагрузки монофлерных медов – каштанового (№ 5) и акации белой (№ 6). При их приеме глюкоза быстрее выводится из кровотока (контрольная точка 3), по сравнению с остальными провокаторами. Сахарная кривая № 8, описывающая динамику изменения глюкозы в плазме для удвоенной дозы меда акации, несмотря на существенно более высокое значение в точке 2 (40 мин) по сравнению с сахарной кривой № 6, через два часа показывает даже несколько более низкое значение, что говорит о ее быстром выходе из кровотока по сравнению с глюкозой из сахаров (№ 2, № 7) и гречишного меда (№ 4).

Совершенно иную картину представляет сахарная кривая №9 с натуральным подсластителем несахарной природы "Стевиозид" в качестве провоцирующей нагрузки. Она близка к сахарной кривой № 1 в первых двух контрольных точках, но в последующих третьей и четвертой показывает небольшой прирост показателя уровня глюкозы. Самое высокое содержание глюкозы в плазме регистрируется при приеме равнозначного количества свекловичного сахара (№ 2). Глюкоза при его приеме дольше задерживается в кровотоке. Рисунок 2б иллюстрирует изменение уровня глюкозы в плазме крови через 40 минут после приема провоцирующей нагрузки (контрольная точка 2), в зависимости от содержания глюкозы в образце меда. Полученная зависимость показывает повышение уровня глюкозы в кровотоке с увеличением ее содержания в составе меда.

С целью идентификации полос, указывающих на спектральное проявление моносахаридов в медах и плазме крови, методом ИКС НПВО были исследованы сухие химические препараты D-глюкозы, L-фруктозы, свекловичного и тростникового сахаров. На рисунке 3 представлены фрагменты углеводной области их ИК-спектров. Сопоставление ИК-спектров, приведенных на рисунке 3а, показывает, что индивидуальными для глюкозы являются полосы 1154, 1108  $\text{см}^{-1}$  и дублет полос 1020/1010  $\text{см}^{-1}$ . Спектр фруктозы заметно отличается



**Рисунок 3.** Фрагменты углеводной области (1200-950  $\text{cm}^{-1}$ ) ИК-спектров сухих сахаридов: а) 1 – глюкозы; 2 – фруктозы; б) 1 – свекловичного; 2 – тростникового сахаров



**Рисунок 4.** Фрагменты углеводной области ИК-спектров мёдов: а) 1, 2 – гречишный, 3 – каштановый, 4 – акации; б) степной мёд: 1 – жидкий, 2 – закристаллизованный; в) Зависимость интенсивности полос поглощения: I – 1010  $\text{cm}^{-1}$  (глюкозы), II – 1050-1045  $\text{cm}^{-1}$  (фруктозы) от содержания глюкозы в мёде: 1 – акации, 2 – каштановый, 3 – гречишный, 4 – степной

от ее спектра. В спектре фруктозы регистрируются характеристические полосы: 1175, 1076, 976  $\text{cm}^{-1}$  и дублет полос 1147/1134  $\text{cm}^{-1}$ . Остальные полосы в спектрах глюкозы и фруктозы очень близки по положению, либо накладываются друг на друга.

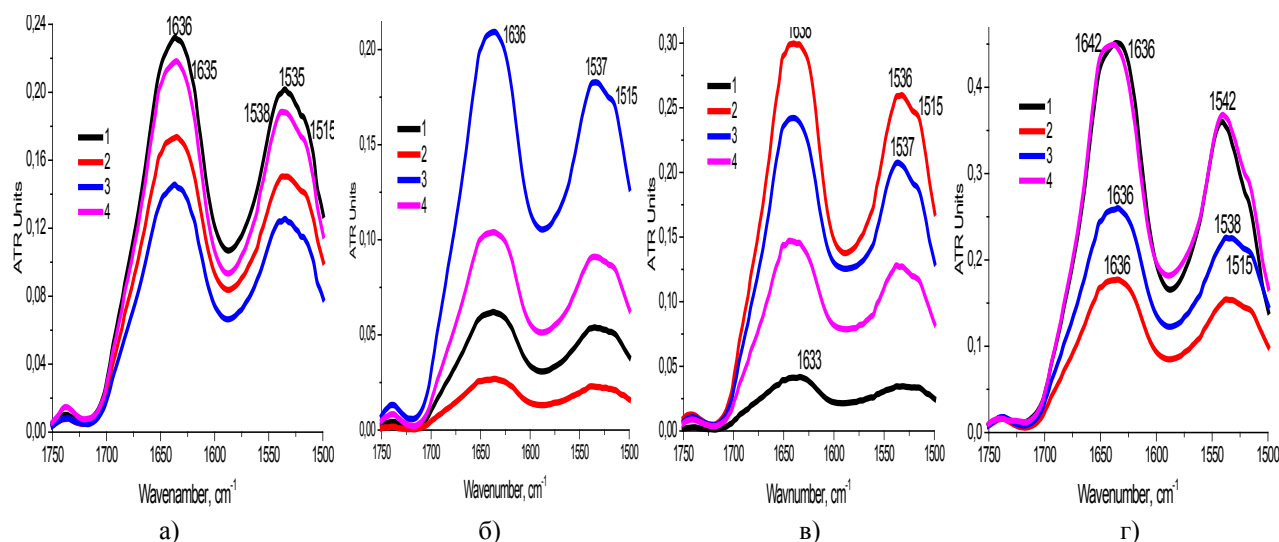
Следует отметить, что в отличие от моносахаридов, ИК-спектры дисахаридов (рис. 3б) очень близки по сложной фактуре рисунка и отличаются, в основном, интенсивностью полос. Формирование структуры дисахарида во многом нивелирует индивидуальность оптических свойств обоих моносахаридов, которые проявляются в основном в составе сложных тройных полос и дублетов.

Для ИК-спектров обоих сахаров характерны два дублета 1170/1160 и 1012/1003  $\text{cm}^{-1}$ , две тройные полосы в области 1125 и 1050  $\text{cm}^{-1}$  и полоса 988  $\text{cm}^{-1}$ . Их анализ показывает, что в ИК-спектрах сахаров полосы глюкозы и фруктозы могут входить как в состав тройных полос в области 1050 и 1125  $\text{cm}^{-1}$ , так и сложной полосы области 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Следует отметить, что полоса 1048–1050  $\text{cm}^{-1}$  является общей для всех сахаридов. Рисунок 4 иллюстрирует фрагменты углеводной области ИК-спектров образцов исследуемых мёдов, представляющих собой сложные многокомпонентные гетерополисахаридные системы растительно-животного происхождения, основу которых на 80–90 % составляют природные комплексы глюкозы и фруктозы.

И, как следует из сопоставления с рисунками 3а и 3б, их ИК-спектры кардинально отличаются от спектров как моно, так и дисахаридов. Однако физическая природа моносахаридов, несмотря на заметные сдвиги полос, адекватно проявляется в спектрах мёдов положением соответствующих им характеристических полос. На рисунке 4а представлены спектры двух основных групп монофлерных мёдов: кривые 1 и 2 – гречишные мёды разного районирования, группа I с повышенным содержанием глюкозы; каштановый (кр. 3) и акации белой (кр. 4), отнесенные к группе II с характерным преобладанием фруктозы в составе.







**Рисунок 6.** Фрагменты протеиновой области (1750–1500  $\text{cm}^{-1}$ ) ИК-спектров общих белков для сахарных кривых: а) свековичный сахар, № 2, б) мед каштановый, № 5, в) медакации, № 8, г) "Стевиозид", № 9 (цифрами 1–4 обозначены номера контрольных точек)

в количественном составе компонентов плазмы крови, взятой натощак, что, возможно, отчасти и проявляется в спектрах последующих точек (2–4), завися, по-видимому, не только от типа провоцирующей нагрузки, но и от состава немного ослабленной пищевой диеты.

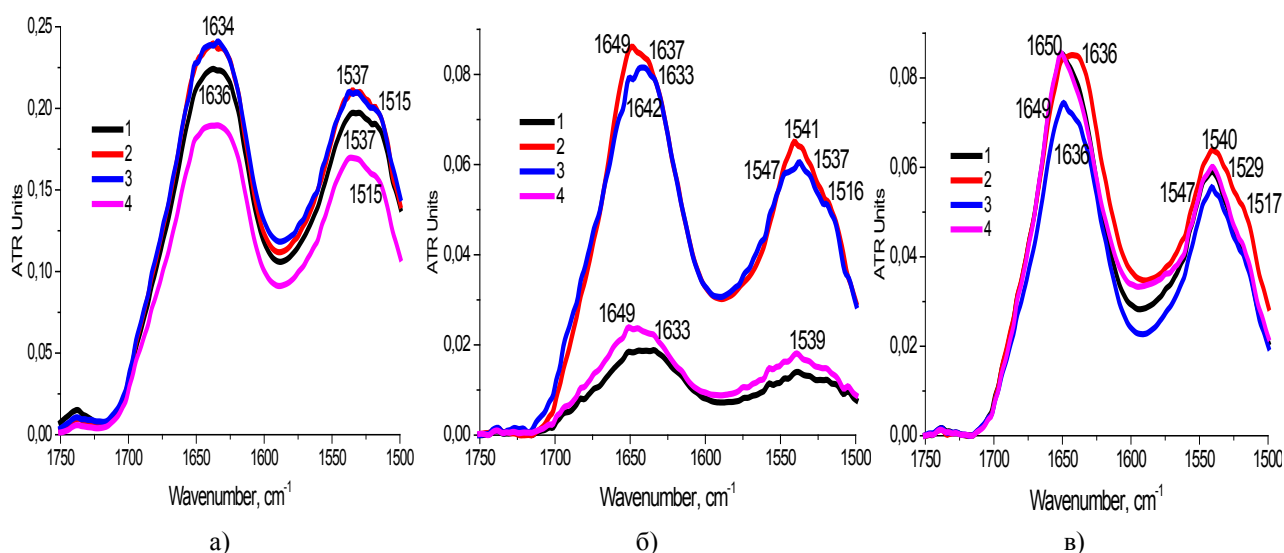
Сахарные кривые с нагрузкой свековичным сахаром (рис. 5а) и полифлерным степным медом (рис. 5б) получены в осенний период (сентябрь–ноябрь), через три месяца после окончания медикаментозного лечения [24] с соблюдением безуглеводной диеты. Несмотря на близость рисунка спектральных кривых и последовательности их расположения, в зависимости от принадлежности к соответствующей контрольной точке, динамика в изменении их интенсивности разная. В обоих случаях прием нагрузки (контрольная точка 2) приводит к изменению формы полосы при  $1125 \text{ cm}^{-1}$  и смещению ее максимума в положение  $1110 \text{ cm}^{-1}$ , отвечающего проявлению глюкозы. В спектрах плазмы крови для последующих контрольных точек 3 и 4 максимум полосы снова смещается в более длинноволновую область –  $1125 \text{ cm}^{-1}$ . Это можно объяснить удалением через 80 минут из кровотока глюкозы и более выраженным проявлением фруктозы. Сахарные кривые при нагрузке монофлерными гречишным (рис. 5в, № 4) и каштановым (рис. 5г, № 5) медами, снятые в период с февраля по апрель на ослабленной безуглеводной диете, более заметно отличаются как от полифлерного меда, так и между собой. Для сахарной кривой № 4 отмечен резкий подъем спектра после приема нагрузки и затем плавное его снижение. Необычную форму имеют и сами спектральные кривые, обусловленные сглаженной полосой глюкозы. Для сахарной кривой № 5 (каштановый мед, рис. 5г) также наблюдался резкий подъем спектра в контрольной точке 2, но с формированием интенсивного максимума при  $1140 \text{ cm}^{-1}$ , который принадлежит фруктозе и сохраняется при последующем снижении интенсивности всей углеводной полосы. Следует отметить, что, в отличие от сахарной кривой № 4 (рис. 5в), все спектры для контрольных точек 1, 3 и 4 сахарной кривой № 5 имели обычную форму.

Сахарная кривая № 8, с медом акации-2 в качестве нагрузки (рис. 5д), была получена на той же диете, но с введением в утренний рацион (за 2 месяца до ее снятия) обязательной чашки кофе с ложкой меда ("метаболический тренинг"), в расчете на метаболическую память организма. Можно полагать, что ожидания в определенной мере оправдались. Прием в качестве провоцирующей нагрузки удвоенной порции меда акации, резким снижением интенсивности углеводной полосы во второй точке сахарной кривой № 8 показал высокую скорость выхода ее из кровотока.

Спектры сахарной кривой без провоцирующей нагрузки № 1 (рис. 5е) также показали периодичность в изменении содержания углеводов в плазме крови, хотя не отвечали периодичности изменения уровня глюкозы, полученной при биохимическом анализе. Структура углеводной полосы, в общем, отвечала рассмотренным ранее кривым с провоцирующими нагрузками. Характер изменения ИК-спектров сахарной кривой № 9 со Стевиозидом (рис. 5ж), близкой по данным биохимического анализа к кривой № 1, указывает на то, что применение безуглеводного подсластителя влияет на обменные процессы, стабилизируя углеводный состав плазмы крови.

Менее наглядно проявляется влияние природы продукта-провокатора и в спектральных характеристиках общего белка, выделенного из плазмы осаждением 96 % этанолом (рис. 6). Отмечено, что экстремальный характер изменения интенсивности полос, обусловленных колебаниями карбонильных групп пептидной связи белков Амид-I ( $1660 \text{ cm}^{-1}$ ) и Амид-II ( $1540 \text{ cm}^{-1}$ ) [27], для рассмотренных сахарных кривых практически не воспроизводится по положению положительных и отрицательных экстремумов в контрольных точках 2–4. Также не замечено связи в динамике изменения интенсивности белковых (рис. 5а, г, д, ж) и углеводных полос в спектре плазмы для этих же сахарных кривых.





**Рисунок 7.** Фрагменты протеиновой области (1750–1500  $\text{cm}^{-1}$ ) ИК-спектров белков сахарной кривой № 1: а) общий белок, б) глобулины, в) альбумины (цифрами 1-4 обозначены номера контрольных точек)

Менее выраженная, чем у углеводов, информативность ИК-спектров суммарных белков в определенной мере может быть связана с разной скоростью обменных процессов для белков разных категорий и их периодичностью, а также соотношением разных белковых фракций в составе плазмы в определенный момент времени, поскольку полосы белков Амид-I и Амид-II спектрально представляют их пул. Так как сахарные кривые снимались в течение 9 месяцев, очевидно не следует забывать и о том, что обновление разных белков, как и других компонентов тканей и органов, происходит постоянно и с разной периодичностью.

Известно [30], что гормон инсулин, вырабатываемый в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, имеет белково-полипептидную природу. Его мономер состоит из двух полипептидных цепей А и В, связанных дисульфидными мостиками. Сродство инсулина к рецептору определяет вторичная структура обеих цепочек. В плазме инсулин находится как в свободном, так и в двух формах связанного с белками состояниях, отличающихся скоростью метаболизма. Свободный инсулин действует на все инсулинчувствительные ткани, связанный – только на жировую и мышечную ткани, увеличивая проницаемость клеточных мембран для глюкозы. Активность обеих форм, обусловленная структурно-конформационными различиями, предопределяет разнообразное участие инсулина в биохимических процессах всех органов и тканей, но главной его функцией является регулирование поглощения глюкозы клетками.

В связи с этим, представляло интерес оценить возможность регистрации спектрального проявления инсулина без мешающего влияния провоцирующей нагрузки. Рисунок 7 иллюстрирует фрагменты протеиновой области ИК-спектров суммарных белков, осажденных этанолом (а), а также глобулинов (б) и альбуминов (в), выделенных последовательным высаливанием  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  из плазмы крови "холостой" сахарной кривой № 1. Анализ фрагмента "а" рисунка показывает максимальное содержание суммарных белков во второй и третьей точке сахарной кривой, что отвечает кинетике изменения уровня глюкозы (табл. 2, рис. 2 сахарная кривая № 1) без изменения положения и формы широкой полосы Амид-I (1634–1636  $\text{cm}^{-1}$ ) и структурированной полосы Амид-II (1537 и 1515  $\text{cm}^{-1}$ ). Разделение глобулинов (б) и альбуминов (в) позволяет отметить различие в динамике изменения их содержания в плазме крови. Более стабильное для альбуминов и резкое изменение для глобулинов в зависимости от времени забора крови, которое также соответствует динамике изменения уровня глюкозы для сахарной кривой № 1, подтверждая известный факт, что основными переносчиками углеводов являются глобулины.

Обращает на себя внимание положение и форма максимумов для спектральных кривых второй точки на обоих фрагментах рисунка (б, в). В спектре глобулинов асимметричный максимум полосы Амид-I смещен в положение 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Поскольку такую форму полоса белков может приобретать в присутствии полипептидных структур [28], есть основания пролагать, что таким образом проявляется пептидная природа инсулина, осаждаемого совместно с глобулинами плазмы. Напротив, в спектре альбуминов (в) для второй точки сахарной кривой, уширенный максимум Амид-I смещен из положения 1650 в положение 1637  $\text{cm}^{-1}$ . Для остальных точек сахарной кривой его положение отвечает 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Уширение максимума, в данном случае, можно объяснить присутствием инсулина, связанного с альбуминами, одной из основных функций которого является транспорт длинноцепочечных жирных кислот. Следует заметить, что профиль действия инсулина подвержен значительным колебаниям как у различных людей, так и у одного и того же человека.

## ВЫВОДЫ

Данные, полученные при проведении параллельных исследований методами рефрактометрии, биохимического анализа и ИКС НПВО серии мёдов разного ботанического вида, препаратов моносахаридов и

природных пищевых дисахаридов, позволило идентифицировать полосы поглощения, обусловленные проявлением глюкозы и фруктозы в ИК-спектрах плазмы крови человека, полученной методом сахарных кривых с использованием в качестве провоцирующей нагрузки моно и полифлерных видов меда и свекловичного сахара. Показано, что регулярное применение в небольших количествах меда с повышенным содержанием фруктозы оказывает эффект "тренировки" поджелудочной железы и клеточных рецепторов на присутствие глюкозы в "мягкой" провоцирующей нагрузке, отражая пролонгированную метаболическую память организма, что важно при диагностировании и постмедикаментозного лечения диабета второго типа.

#### Список литературы / References:

1. Агаджанян Н.А., Тель Л.З., Циркин В.И., Чеснокова С.А. *Физиология человека*. М.: Медицинская книга; Н. Новгород: Издательство НГМА, 2003, 526 с. [Agadzhanian N.A., Tel L.Z., Tsikin V.I., Chesnokova S.A. *Human Physiology*. M.: Meditsinskaya kniga; N. Novgorod: Publishing House of NGMA, 2003, 526 p. (In Russ.)]
2. *Физиологические системы организма человека: справочное пособие*. Под ред. проф. Г.И. Козинца. М.: Триада-Х, 2000, 336 с. [Physiological systems of the human body: a reference guide. Edited by prof. G.I. Kozinets. M.: Triada-X, 2000, 336 p. (In Russ.)]
3. *Патофизиология крови*. Пер. с англ. М.; СПб.: «Издательство БИНОМ»-«Невский Диалект», 2000, 448 с. [Blood pathophysiology. Per. s angl. M.; St. Petersburg: "Publishing House BINOM" - "Nevsky Dialect", 2000, 448 p. (In Russ.)]
4. Фадеев П.А. *Сахарный диабет*. М.: ООО «Издательство Оникс», 2009, 208 с. [Fadeev P.A. *Sakharny diabet*. M.: ООО "Onyx Publishing House", 2009, 208 p. (In Russ.)]
5. Wu S.L. Staging of 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 2118-2120.
6. Дедов И., Шестакова М. *Сахарный диабет. Диагностика. Лечение. Профилактика*. М.: Медицинское информационное агентство, 2011, 808 с. [Dedov I., Shestakova M. *Diabetes mellitus. Diagnostics. Treatment. Prevention*. M.: Medical Information Agency, 2011, 808 p. (In Russ.)]
7. Vlassaua H., Cai W., Tripp E., Pyzik R., Yee K. et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia*, 2016, vol. 59, no. 10, pp. 2181-2192.
8. Дедов И.И. Сахарный диабет опаснейший вызов мировому сообществу. *Вестник Российской академии медицинских наук*, 2012, № 1. с. 7-13. [Dedov I.I. Diabetes mellitus is the most dangerous challenge to the world community. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]
9. Нечипасова Д.И., Зацепина Е.Е., Ивашев М.Н. Сахарный диабет 2-го типа или пандемия XXI века. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2013, № 6, с. 73-74. [Nechipasova D.I., Zatssepina E.E., Ivashev M.N. Type 2 diabetes mellitus or the pandemic of the XXI century. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2013, no. 6, pp. 73-74. (In Russ.)]
10. Сунцов Ю.И., Болотская Л.Л., Маслова О.В. и др. Эпидемиология сахарного диабета и прогноз его распространенности в Российской Федерации. *Сахарный диабет*, 2011, № 1, с. 15-18. [Suntsov Yu.I., Bolotskaya L.L., Maslova O.V., etc. Epidemiology of diabetes mellitus and prognosis of its prevalence in the Russian Federation. *Diabetes mellitus*, 2011, no. 1, pp. 15-18. (In Russ.)]
11. Гурьева И.В. Общее руководство международной диабетической федерации по сахарному диабету 2 типа (краткое изложение). *Сахарный диабет*, 2007, № 4, с. 54-56. [Guryeva I.V. General Guidelines of the International Diabetes Federation on Type 2 Diabetes mellitus (summary). *Diabetes mellitus*, 2007, no. 4, pp. 54-56. (In Russ.)]
12. Бирюкова Е.В. Сахарный диабет 2 типа: от сахароснижающей терапии к редотвращению развития осложнений. *Эффективная фармакотерапия*, 2014, № 46, с. 16-21. [Biryukova E.V. Type 2 diabetes mellitus: from hypoglycemic therapy to prevent the development of complications. *Effective pharmacotherapy*, 2014, no. 46, pp. 16-21. (In Russ.)]
13. Wu S.L. Staging of 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.*, 2015, vol.14, no. 1, pp. 2118-2120.
14. Аметов А. *Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения*. Учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, том 5, 288 с. [Ametov A. *Type 2 diabetes mellitus. Problems and solutions*. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2016, vol. 5, 288 p. (In Russ.)]
15. Унижук В.И., Унижук Н.А. *Лечение мёдом*. М.: Издательский дом МСП, 2006, 128 с. [Unizhuk V.I., Unizhuk N.A. *Treatment with honey*. M.: Publishing House of MSP, 2006, 128 p. (In Russ.)]
16. Хорн Х., Люльманн К. *Всё о мёде: производство, получение, экологическая чистота и сбыт*. М.: АСТ: Астрель; 2011, 316 с. [Horn H., Lullmann K. *All about honey: production, production, ecological purity and sales*. Moscow: AST: Astrel; 2011, 316 p. (In Russ.)]
17. Никонова Л.В., Тишковский С.В., Гулинская О.В., Дорошкевич И.П. *Диетотерапия при сахарном диабете. Пособие для студентов лечебного, медико-психологического, медико-диагностического факультетов и врачей*. Гродно: ГрГМУ, 2011, 96 с. [Nikonova L.V., Tishkovsky S.V., Gulinskaya O.V., Doroshkevich I.P. Diet therapy for diabetes. A manual for students of medical, medical-psychological, medical-diagnostic faculties and doctors. Grodno: GRSMU, 2011, 96 p. (In Russ.)]
18. Sarmiento R.A., Antonio J.P., de Miranda I.L., Nicoletto B.B., de Almeida C.J. Eating patterns and health outcomes in patients with type 2 diabetes. *Endocrins Society*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 42-52.

19. Srividya P., Renuga Devi T.S., Gunasekaran S. FTIR spectral study on diabetic blood samples-mono the rapy and combination therapy. *OJP*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 17-26.
20. Носенко Т.Н., Ситникова В.Е., Олехнович Р.О., Успенская М.В. Выявление сахарного диабета II типа методами инфракрасной спектроскопии и мультивариантного анализа сыворотки крови. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, 2019, т. 19, № 2, с. 202-208. [Nosenko T.N., Sitnikova V.E., Olekhovich R.O., Uspenskaya M.V. Detection of type II diabetes mellitus by methods of infrared spectroscopy and multivariate analysis of blood serum. *Scientific and Technical Bulletin of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 202-208. (In Russ.)]
21. Кишкун А.А. *Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 976 с. [Kishkun A.A. *Clinical laboratory diagnostics: textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 976 p. (In Russ.)]
22. Корякина И.Ю., Эммануэль Ю.В. Лабораторные диагностики и мониторинг сахарного диабета. *Клиническая лабораторная диагностика*. М.: Медицина, 2002, № 5, с. 25-35. [Koryakina I.Yu., Emanuel Yu.V. Laboratory diagnostics and monitoring of diabetes mellitus. *Clinical laboratory diagnostics*, Moscow: Meditsina, 2002, no. 5, pp. 25-35. (In Russ.)]
23. *Клиническая лабораторная диагностика: учебник* Под ред. В.В. Долгова. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016, 668 с. [Clinical laboratory diagnostics: textbook Edited by V. V. Dolgov. M.: FGBOU DPO RMAPO, 2016, 668 p. (In Russ.)]
24. Нечипоренко А.П., Нечипоренко У.Ю., Ситникова В.Е. Фурье-спектроскопия в исследовании плазмы крови с диабетом второго типа. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*, 2021, т. 21, № 1, с. 52-64. [Nechiporenko A.P., Nechiporenko U.Yu., Sitnikova V.E. Fourier spectroscopy in the study of blood plasma with type 2 diabetes. *Scientific and Technical Bulletin of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2021, vol. 21, no. 1, pp. 52-64. (In Russ.)]
25. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. *Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2 Белки. Ферменты. Витамины*. СПб.: Университет ИТМО, 2015, 106 с. [Shleikin A.G., Skvortsova N.N., Blandov A.N. *Biochemistry. Laboratory practice. Part 2 Proteins. Enzymes. Vitamins*. St. Petersburg: ITMO University, 2015, 106 p. (In Russ.)]
26. Тарасевич Б.Н. *Основы ИК спектроскопии с преобразованием Фурье. Подготовка проб в ИК спектроскопии*. М.: МГУ. 2012, 22 с. [Tarasevich B.N. *Fundamentals of IR spectroscopy with Fourier transform. Sample preparation in IR spectroscopy*. Moscow: MSU. 2012, 22 p. (In Russ.)]
27. Тарасевич Б.Н. *ИК спектры основных классов органических соединений*. Справочные материалы. М.: МГУ. 2012, 55 с. [Tarasevich B.N. *IR spectra of the main classes of organic compounds*. Reference materials. Moscow: MSU. 2012, 55 p. (In Russ.)]
28. Нечипоренко А.П., Миневиц И.Э., Нечипорено У.Ю., Ситникова В.Е., Громова Д.А. Пептид-полисахаридные комплексы слизей ламинарии, корня алтея, семян льна. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*, 2020, вып 1 (43), № 1, с. 3-17. [Nechiporenko A.P., Minevich I.E., Nechiporeno U.Yu., Sitnikova V.E., Gromova D.A. Peptide-polysaccharide complexes of kelp slime, marshmallow root, and flax seeds. *Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment*, 2020, iss. 1 (43), no. 1, pp. 3-17. (In Russ.)]
29. Нечипоренко А.П., Миневиц И.Э., Орехова С.М., Ситникова В.Е., Громова Д.А., Успенская М.В. Инфракрасная Фурье-спектроскопия в сравнительном исследовании животных и растительных белков. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020, т. 10, № 4, с. 678-690. [Nechiporenko A.P., Minevich I.E., Orekhova S.M., Sitnikova V.E., Gromova D.A., Uspenskaya M.V. Infrared Fourier spectroscopy in the comparative study of animal and plant proteins. *Izvestiya vuzov. Applied Chemistry and Biotechnology*, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 678-690. (In Russ.)]
30. Балаболкин М.И., Петунина Н.А., Тельнова М.Э., Клебанова Е.М., Антонова К.В. Роль инсулиновой терапии в компенсации сахарного диабета. *РМЖ*. 2007, т. 15, № 27 (308), с. 2072–2077. [Balabolkin M.I., Petunina N.A., Telnova M.E., Klebanova E.M., Antonova K.V. The role of insulin therapy in the compensation of diabetes mellitus. *RMZH*, 2007, vol. 15, no. 27 (308), pp. 2072-2077. (In Russ.)]

## EFFECT OF NATURAL SACCHARIDES ON THE FOURIER SPECTRUM OF HUMAN BLOOD PLASMA

Nechiporenko A.P.<sup>1</sup>, Veso O.S.<sup>2</sup>, Nechiporenko U.Yu.<sup>3</sup>, Plotnikova L.V.<sup>2</sup>, Sitnikova V.E.<sup>1</sup>, Plotnikov P.P.<sup>2</sup><sup>1</sup> National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics

Kronverksky ave., 49, St. Petersburg, 197101, Russia

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

Universitetskaya Embankment, 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: ljusja@mail.ru

<sup>3</sup> Independent Laboratory «INVITRO SPb.»

Blagodatnaya str., 18, St. Petersburg, 196106, Russia

**Abstract.** The effect of honey of various botanical species, food sugars, and the vegetable sweetener Stevioside on glucose tolerance and the rate of its withdrawal from the bloodstream was studied by IR spectroscopy of disturbed total internal reflection and biochemical analysis as a provoking load. The study of blood plasma for glucose content was carried out by the method of glycemic (sugar) curves at 4 points of blood collection in a female donor who underwent a drug course of treatment at the initial stage of prediabetes of the second type. Preliminary research by methods of refractometry and biochemical analysis of preparations of monosaccharides (glucose, fructose), food disaccharides (beet and cane sugar) and honey with different ratios of monosaccharides (steppe, buckwheat, chestnut, white acacia) made it possible to identify the manifestation of bands caused by glucose and fructose in the IR spectra of blood plasma and the manifestation of the metabolic memory of the body on the seasonal composition of the food diet.

**Key words:** human blood plasma, honey, saccharides, Fourier IR spectroscopy.

## ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ НАДЕЖНОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Трушковская Е.И.<sup>1</sup>, Золотавина М.Л.<sup>1</sup>, Братова А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350058, РФ

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1

ул. 1 Мая, 167, г. Краснодар, 350086, РФ; e-mail: trushkovskaya.evgeniya@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2021

**Аннотация.** В ходе работы был проведен расчет основных критериев аналитической надежности, таких как – точность, специфичность, чувствительность, по которым оценивают биохимические методы диагностики новой коронавирусной инфекции. Большее предпочтение в клинической диагностике COVID-19 отдавали методу ПЦР, который признан «золотым стандартом», потому что тестовые наборы для данного метода имели высокие показатели чувствительности и специфичности в определении вируса SARS-CoV-2, что говорит о возможности применения его на ранних стадиях диагностики инфекции и использования как основного метода для обнаружения COVID-19. Из серологических методов исследования сыворотки крови, именно метод ИФА является наиболее эффективным методом, в определении иммунного ответа на перенесенную инфекцию COVID-19. Высокие показатели чувствительности и точности метода позволяют распознать искомое вещество, даже если его концентрация в образце невысока, а высокая специфичность метода говорит о безошибочности диагностики, если тест на определение антител показал «положительный» результат это говорит о том, что найдены именно те антитела или антигены к коронавирусу в крови, что в настоящее время является важным критерием в определении новой коронавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** ПЦР, ИФА, чувствительность, специфичность, точность, коронавирусная инфекция.

В настоящее время, биохимические методы клинических лабораторных исследований очень разнообразны и используются для определения новой коронавирусной инфекции. Важной составляющей качества исследований является аналитическая надежность метода, которая характеризует степень точности лабораторных данных по исследуемому аналиту и тем самым определяет возможность их использования при принятии клинических решений: для установления диагноза, назначения необходимых терапевтических средств, меры, оценивающие степень тяжести заболевания и эффективность лечения.

Существуют определенные критерии аналитической надежности лабораторных результатов, соблюдение которых позволяет снизить процент недостоверной лабораторной информации [1]: чувствительность метода – это вероятность положительного результата диагностического теста в присутствии заболевания; специфичность – это вероятность отрицательного результата в отсутствии болезни; точность – характеризует достоверность метода в определении точного значения концентрации вещества.

Метод ПЦР, который признан «золотым стандартом» в клинической-лабораторной диагностике, для обнаружения вирусов имеет высокие показатели чувствительности и специфичности, что говорит о возможности применения его на ранних стадиях диагностики инфекции и использования как основного метода для обнаружения COVID-19.

Метод ИФА также имеет ряд преимуществ в диагностике коронавирусной инфекции, а именно возможность выявления пациентов с высоким уровнем иммунного ответа. Высокие показатели чувствительности метода позволяют распознать искомое вещество, даже если его концентрация в образце невысока, а высокая специфичность метода говорит о безошибочности диагностики, если тест на определение антител показал «положительный» результат это говорит о том, что найдены именно те антитела или антигены к коронавирусу в крови.

Значительное количество тестов было выполнено методом ПЦР, выделение РНК вируса производилось вручную и на автоматической станции производства НПО «ДНК Технологии ДТстрим». Амплификация выполнялась на аппаратах, детектирующих «ДТ-Прайм» (ДНК-Технология, Россия). В дальнейшем для определения особенностей методов в диагностике SARS-CoV-2 нами был выбран один месяц.

В таблице 1 и 2 представлены данные исследования, полученные методом ПЦР в оценке эффективности по тест-системам Covid-19 Amp (НИИ им.Пастера) и SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК Технология).

**Таблица 1.** Оценка метода ПЦР (тест-система Covid-19 Amp (НИИ им. Пастера))

Тест-система		Пациенты	
		+ (болен)	- (здоров)
Covid-19 Amp (НИИ им.Пастера)	+	194	40
	-	37	301

**Таблица 2.** Оценка метода ПЦР (тест-системе SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК Технология))

Тест-система		Пациенты	
		+ (болен)	- (здоров)
SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК Технология)	+	167	43
	-	89	109

По полученным результатам исследования на коронавирус SARS-CoV-2, было выяснено, что тест-система Covid-19 Amp (НИИ им.Пастера г) обладала высокой чувствительностью, которая составила 83,9 %, специфичность и точность данной тест-системы тоже были высокими и были равны 87,9 % и 86,5 %.

Из данных таблицы 2 было выяснено, что тест-система SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК Технология) имеет критерии аналитической надежности меньше, чем тест-система Covid-19 Amp (НИИ им. Пастера).

Чувствительность данной тест-системы составила 65,2 %, а специфичность и точность были равны 71,7 % и 67,6%, это может быть связано с тем, что чувствительность тест-системы SARS-CoV-2/SARS-CoV (ДНК Технология) составляла 500 копий/мл образца, в то время как значительная часть разрешенных для лабораторной диагностики COVID-19 наборов реагентов имеют аналитическую чувствительность  $10^3$  копий/мл.

В своей статье А. С. Лобанова [2] утверждала, что в основу тест-системы высокого качества закладывался так называемый праймер-шаблон, по которому производился поиск участка генома вируса, высокоспецифичный для SARS-CoV-2. К сожалению, ряд тест-систем, в том числе зарегистрированных в России, предлагали поиск по участкам генома вируса, не столь специфичных к SARS-CoV-2, что также может влиять на получение ложноотрицательного результата.

В своей статье М.А. Романова [3] утверждала, что ПЦР является более показательным анализом в условиях стационара, потому что позволяет более точно определить наличие вируса COVID-19 в организме пациента и отследить требования, которые предъявляются к преаналитическому этапу. Зачастую можно наблюдать классические клинические проявления COVID-19 (на компьютерной томографии поражение легких) и характерную динамику биохимических показателей, при этом получить отрицательный результат. Тогда на помощь приходят серологические методы, которые обладают рядом преимуществ, а именно возможностью выявления пациентов с высоким уровнем иммунного ответа [4].

Анализ сыворотки крови на антитела к вирусу SARS-CoV-2 – это исследование, которое позволяет выявить наличие антител в крови к возбудителю новой коронавирусной инфекции COVID-19. Инфекционный процесс сопровождается выработкой антител двух типов: IgM и IgG.

В данном исследовании было произведено определение антител к коронавирусу IgG и суммарных антител к SARS-CoV-2, которые позволяют быстро узнать, контактировал ли организм с возбудителем COVID-19.

В таблице 3 и 4 представлены результаты исследования новой коронавирусной инфекции, полученные методом ИФА для обнаружения оценки эффективности метода по двум тестам: антитела IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 и суммарные антитела к SARS-CoV-2.

По полученным результатам исследования на коронавирус SARS-CoV-2, было выяснено, что критерии аналитической надежности теста на определение антител IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 составили: чувствительность была равна 83,3 %, специфичность и точность метода были равны 78,4 % и 80,5 %.

По данным результатам исследования было выяснено, что тест на определение суммарных антител к коронавирусу SARS-CoV-2 имели критерии аналитической надежности выше, чем тест на определение антител IgG к коронавирусу SARS-CoV-2.

Чувствительность данного теста составила 92,7 %, а специфичность и точность были равны 69,4 % и 80,1 %, это может быть связано с тем, что тесты, способные распознавать только антитела класса IgG, для клиницистов и врачей приемных отделений практически бесполезны, так как они выявляют людей уже сформировавшимся иммунитетом.

**Таблица 3.** Оценка метода ИФА (тест на антитела IgG к коронавирусу SARS-CoV-2)

Тест		Пациенты	
		+ (болен)	- (здоров)
Антитела IgG к коронавирусу SARS-CoV-2	+	45	16
	-	9	58

**Таблица 4.** Оценка метода ИФА (тест на суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2)

Тест		Пациенты	
		+ (болен)	- (здоров)
Суммарные антитела к коронавирусу SARS-CoV-2	+	166	64
	-	13	145

На этапе начальной диагностики, представляет интерес одновременного определения антител обоих классов, который увеличивает чувствительность тестирования, поскольку хронологический порядок появления антител IgM и IgG индивидуален. Поэтому имеет смысл определять именно суммарные антитела высокоточными методами.

Таким образом, критерий оценки эффективности метода считался высоким, если был равен более 80%. По нашим исследованиям показатели тест-системы Covid-19 Amp (НИИ им.Пастера) соответствовали данным условиям и были равны: чувствительность 83,3 %, специфичность 87,9%, точность 86,5%, что говорило о том, что данный тестовый набор для метода ПЦР являлся весьма надежным и эффективным в определении вируса SARS-CoV-2, что являлось важным критерием.

По данным исследования методом ИФА было выяснено, что критерии оценки эффективности метода по двум тестам составили: чувствительность 90,5 %, специфичность и точность метода составляли 71,7 % и 80,2 %. Это говорило о том, что из серологических методов исследования сыворотки крови, именно метод ИФА является наиболее эффективным методом, в определении иммунного ответа на перенесенную инфекцию COVID-19.

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

- ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность): национальный стандарт Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 555-ст: введен впервые : дата введения 2010-01-01 / подготовлен Московской медицинской академией им. И.М.Сеченова Росздрава, Государственным научно-исследовательским центром профилактической медицины Росмедтехнологий. – Москва: Стандартинформ, 2009. – IV, 28 с.: табл. [GOST R 53022.2-2008. Laboratory clinical technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research. Part 2. Assessment of analytical reliability of research methods (accuracy, sensitivity, specificity): national standard of the Russian Federation: official edition: approved and put into effect by the Order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of December 18, 2008 No. 555-st: introduced for the first time : date of introduction 2010-01-01 / prepared by the Moscow Medical Academy. IM Sechenov, Roszdrav, State Research Center for Preventive Medicine, Rosmedtechnologies. - Moscow: Standartinform, 2009. -- IV, 28 p. : tab. (In Russ.)]
- Лобанова А.С. Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени. *Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*, 2020, том 13, № 1, с. 52-63. [Lobanova A.S. Diagnostics of the virus that causes COVID-19 by real-time PCR. *Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*, 2020, vol. 13, no. 1, pp. 52-63. (In Russ.)]
- Романова М.А. Методы лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции. *Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии*, 2020, № 3, с. 74-77. [Romanova M.A. Methods of laboratory diagnostics of new coronavirus infection. *Physics and radio electronics in medicine and ecology*, 2020, no. 3, pp. 74-77. (In Russ.)]
- Горбунов А.А., Сорокина Л.Е., Чегодарь Д.В. [и др.] Диагностика COVID-19: Современное состояние проблемы и перспективы в отрасли. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*, 2020, том 10, № 2, с. 69-77. [Diagnostics of COVID-19: Current state of the problem and prospects in the industry / A.A. Gorbunov, L.E. Sorokina, D.V. What a gift [and others] *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 69-77. (In Russ.)]

**CRITERIA FOR ASSESSING THE EFFICIENCY OF BIOCHEMICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF NEW CORONAVIRUS INFECTION****Trushkovskaya E.I., Zolotavina M.L., Bratova A.V.**

Kuban State University

*st. Stavropolskaya, 149, Krasnodar, 350058, Russia; e-mail: trushkovskaya.evgeniya@mail.ru*

**Abstract.** In the course of the work, the main criteria of analytical reliability were calculated, such as accuracy, specificity, sensitivity, by which biochemical methods for diagnosing a new coronavirus infection are assessed. More preference in the clinical diagnosis of COVID-19 was given to the PCR method, which is recognized as the "gold standard", because the test kits for this method had high sensitivity and specificity in determining the SARS-CoV-2 virus, which indicates the possibility of its use in the early stages diagnosis of infection and use as the main method for detecting COVID-19. Of the serological methods for examining blood serum, it is the ELISA method that is the most effective method in determining the immune response to the transferred COVID-19 infection. The high sensitivity and accuracy of the method make it possible to recognize the desired substance, even if its concentration in the sample is low, and the high specificity of the method indicates the error-free diagnosis, if the test for the determination of antibodies showed a "positive" result, this indicates that exactly those antibodies or antigens were found to coronavirus in the blood, which is currently an important criterion in determining a new coronavirus infection.

**Key words:** *PCR, ELISA, sensitivity, specificity, accuracy, coronavirus infection*



## ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ СИСТЕМЫ У БЕРЕМЕННЫХ

Васильева А.А., Золотавина М.Л., Комаренко А.А.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: Cat-Pug@yandex.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2021

**Аннотация.** В работе рассматриваются методы определения компонентов антикоагулянтной системы плазмы крови, такие как иммунохимические методы (иммуноферментный анализ, иммунохемолуминесценция, иммунодиффузия, радиоиммунный анализ), антикоагуляционный метод, хромогенный и клоттинговый. Благодаря применению клоттингового и хромогенного методов, показано изменение таких веществ как АТ III, протеин С и протеин S, у женщин в возрасте от 35 до 44 лет при нормально протекающей беременности и при наличии генетических тромботических предрасположенностей в анамнезе на разных сроках беременности. Была выявлена общая тенденция к снижению содержания в плазме крови АТ III и протеина S, и повышению протеина С. Также, было отмечено, что показатели антикоагулянтной системы в плазме крови у беременных с генетической тромботической предрасположенностью изменялись более значительно, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

**Ключевые слова:** ИХА, антикоагуляционный метод, хромогенный метод, клоттинговый метод, АТ III, протеин С, протеин S, плазма крови, беременность, генетические тромботические предрасположенности.

В современном мире, при общем росте благосостояния населения, все чаще проявляется риск невынашивания беременности, связанный с нарушением содержания в крови компонентов антикоагулянтной системы, таких как АТ III, протеин С и протеин S, являющихся наиболее значимыми в диагностическом отношении, что отмечает в своей работе И. А. Михайлиди [1]. Автор, говорит о том, что нарушения в системе гемостаза – это одна из основных причин невынашивания беременности, но многие вопросы из этой области до сих пор остаются открытыми и нет окончательных данных по поводу влияния тех или иных факторов на беременность, задержку роста, её прерывание.

Для определения содержания антикоагулянтов в плазме крови можно применять различные методы. Например, методы иммунохимического анализа позволяют узнать содержание АТ III, при помощи простой радиальной иммунодиффузии, когда образуются преципитационные кольца при прохождении реакции антиген-антитело с соответствующими моноспецифическими и стандартными сыворотками антикоагулянта [2]. При определении антигена протеина С в плазме крови, используют твердофазный иммуноферментный анализ [3], а также иммунохемолуминесценцию, которая сочетает в себе непосредственно хемолуминесценцию и образование иммунного комплекса, сопровождающееся образованием светового излучения [4]. Также методами радиоиммунного и иммуноферментного анализа можно измерять количественное содержание протеина S. Для определения общего протеина применяют поликлональные, а свободного – моноклональные антитела. Данная группа методов обладает своими преимуществами, такими как высокая стандартизация, чувствительность, воспроизводимость, специфичность, возможность автоматизации, и простота в исполнении [3]. Однако, при большом количестве достоинств у иммунохимического анализа есть и свои недостатки, такие как отсутствие возможности оценить антикоагуляционную активность компонента, а также сложность в синтезе готовых конъюгатов.

Для определения содержания АТ III обычно применяют аутокоагуляционный тест, суть которого заключается в исследовании динамики образования и инактивации вещества тромбина в разведенной и гемолизированной крови пациента в которую добавляется раствор кальция хлорида. При использовании метода, осуществляется оценка свертывающая активность полученной смеси при помощи гемоккоагулографа [5]. Достоинство данного метода заключается в том, что он оказывается чувствителен к нарушениям внутреннего механизма свертывания крови, а недостаток – в его низкой стандартизации и большой затрате времени на выполнение [3].

Помимо данных методов, для исследования концентрации компонентов антикоагулянтной системы, возможно применение хромогенного метода, основанного на образовании цветного окрашивания в ходе прохождения реакции, после образования комплекса субстрат-вещество и высвобождения окрашенного продукта. Содержание АТ III, обратно пропорционально количеству красителя, а количество высвобождаемого красителя при определении содержания протеина С, находится в прямой зависимости [6]. Данный метод обладает большим количеством преимуществ, заключающихся в высокой воспроизводимости, стабильности реагентов, легкости автоматизации процесса, чувствительности к мутациям вне активного центра, но отличается высокой стоимостью реагентов [3].

Для определения концентрации антикоагулянтов применим и клоттинговый метод, заключающийся в регистрации временного промежутка между добавлением реактива, вызывающего свертывание плазмы, до

Таблица 1. Контингент обследуемых

Триместр	Экспериментальные группы, n	
	N, n	П, n
I	42	11
	Э(I)	Э(Іп)
II	54	16
	Э(II)	Э(ІІп)
III	36	10
	Э(III)	Э(ІІІп)
Контрольная группа, n		
Небеременные женщины	25	
	К	
Примечания N – нормально протекающая беременность; П – с генетической тромбофобической предрасположенностью; К – контрольная группа.		

образования сгустка фибрина, которое в свою очередь приводит к повышению мутности раствора [6]. В зависимости от присутствия веществ, которые добавляют при исследовании, можно оценить функционирование отдельных звеньев гемостаза. Так определение протеина S происходит в присутствии рекомбинантного тканевого фактора, фосфолипидов, ионов кальция, а также активированного протеина C. Данный метод исследования обладает своими преимуществами – простотой, легкостью, чувствительностью к патологиям определяемого вещества, доступностью и быстротой выполнения, благодаря которым получил широкое распространение при диагностике гемостазной системы [7]. Однако, использование клоттингового метода для определения АТ III дает не стабильные результаты и его, при возможности, для данного компонента его лучше не использовать, а также метод может давать заниженные результаты при высоком FVIIa и резистентности к АПС.

На сегодняшний день, определение содержания АТ III и протеина C преимущественно осуществляется с помощью *хромогенного метода*, а для определения содержания в плазме крови протеина S, чаще всего применяют *клоттинговый метод* [6].

Материалом исследования служила плазма крови женщин в возрасте от 35 до 44 лет, которые находились на поздней фазе репродуктивного периода согласно, классификации И. В. Станоевича [8]. Также внутри возрастной группы плазма крови женщин была разделена на триместры: I триместр (до 12 недель), II триместр (с 13 по 27 неделю) и III триместр (с 28 недели до момента родов) [9], что отмечается в данных таблицы 1. В исследовании были использованы данные гемостазного исследования плазмы крови у женщин в состоянии нормальной физиологической беременности, при наличии генетической тромбофобической предрасположенности, а также для контроля были использованы данные практически здоровых женщин, находящихся вне состояния беременности.

Таблица 2. Показатели антикоагулянтной системы плазмы крови при беременности

Показатель / Референтные значения, %	Группа исследования						
	Э(I)	Э(II)	Э(III)	Э(Іп)	Э(ІІп)	Э(ІІІп)	К
АТ III 83,0-128,0	95,8* # ±11,4	90,1*# ±8,95	88,4* ±10,4	95,6' ±11,4	92,6' ±11,0	83,3* ±12,2	104,0 ±12,1
Протеин С 70,0-140,0	105,5 ±15,3	109,8' ±23,3	110,5 ±15,9	99,0 ±11,4	115,0 ±5,4	109,8 ±12,2	105,0 ±20,2
Протеин S 60,0-135,8	55,8* ±22,8	47,2*± 15,2	40,6* ±8,6	40,8 ±4,0	48,7 ±13,9	42,0 ±9,2	92,8 ±16,1
Примечания * – $p < 0,01$ – значимость различий показателя плазмы крови с показателями соответствующей контрольной группы; ! – $p < 0,05$ – значимость различий показателя плазмы крови с показателями соответствующей контрольной группы; # – $p < 0,01$ – значимость различий показателя плазмы крови между группами сравнения.							

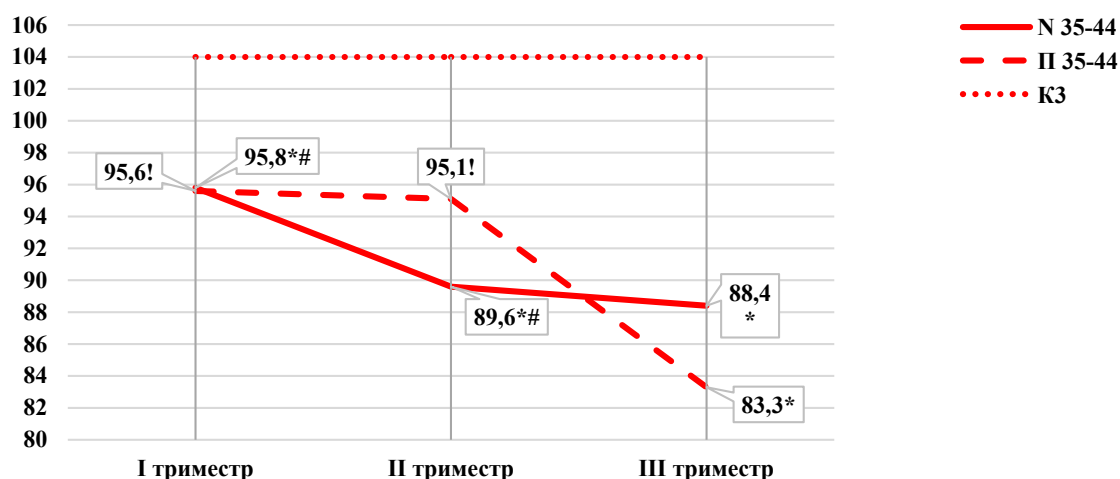


Рисунок 1. Изменение концентрации АТ III в плазме крови беременных

Согласно данным работы В. Е. Радзинского [10], на группу от 30 до 40 лет приходится до 40 процентов риска спонтанного прерывания беременности, одной из причин которого, могут быть нарушения в системе гемостаза [10]. Поэтому, для исследования были взяты данные гемостазного исследования плазмы крови беременных женщин старшего возраста.

При *нормально протекающей беременности* в первом триместре согласно данным таблицы 2, у группы Э(I) содержание АТ III в плазме крови снижалось относительно данных о концентрации антикоагулянта в плазме у контрольной группы в 1,08 раза. Во втором триместре беременности содержание АТ III в плазме крови в группе Э(II) относительно контрольной группы К снижалось в 1,16 раза. В третьем триместре в группе Э(III) отмечалось уменьшение концентрации АТ III в плазме крови относительно контрольной группы К в 1,18 раза. Данные о содержании АТ III в плазме крови во всех трёх триместрах попадали в зону значимости  $p < 0,01$  и являлись достоверными. Таким образом, у женщин с нормально протекающей беременностью на всём ее протяжении концентрация АТ III в плазме крови оказывалась сниженной относительно группы контроля, и по мере увеличения срока, возрастало и уменьшение антикоагулянта.

Снижение содержания АТ III в плазме крови беременных женщин может быть связано с естественным процессом гиперкоагуляции, который развивается при данном состоянии и способствует подготовке и защите организма будущей матери от чрезмерной кровопотери во время родов [11]. В результате нарушения нормальной деятельности свертывающей системы происходит больший расход компонентов антикоагулянтной системы, в частности АТ III, и как следствие снижение его концентрации в плазме крови. В результате этого увеличивается риск развития во время беременности тромбоза сосудов, характеризующийся уменьшением концентрации АТ III в плазме крови [12].

Содержание АТ III в плазме крови беременных женщин с наличием генетических тромбофобических предрасположенностей в первом триместре беременности в группе Э(Iп) концентрация исследуемого антикоагулянта в плазме крови меньше в 1,12 раза по сравнению с контрольной группой, согласно данным таблицы 3, что находилось в зоне значимости  $p < 0,05$ . Содержание АТ III в плазме крови во втором триместре, у группы Э(IIп) оказывалось ниже в 1,09 раза, чем в плазме у группы контроля, при этом данные находились в зоне значимости  $p < 0,05$ . В третьем триместре у группы Э(IIIп) содержание АТ III в плазме крови снижалось в 1,25 раза, по сравнению с контролем, что попадало в зону значимости  $p < 0,01$ , и данные являлись достоверными.

К понижению концентрации АТ III на первых сроках беременности могут привести: гетерозиготный фактор Лейден, протромбиновая мутация, дефицит протеина S [13].

Таким образом, концентрация АТ III в плазме крови у беременных с наличием генетической тромбофобической предрасположенности была сниженной относительно показателей контрольной группы и к концу беременности оказывалась сниженной более значительно, чем у женщин с нормально протекающей беременностью, что и отмечается из рисунка 1.

Концентрация протеина С в плазме крови у женщин с нормально протекающей беременностью при прогрессировании данного состояния, оказывается повышенной относительно группы контроля. Однако в первом триместре беременности у группы Э(I) содержания протеина С в плазме крови практически равно таковым показателям у группы контроля. Во втором триместре у группы Э(II) в плазме крови, наблюдался рост концентрации антикоагулянта в 1,08 раза, по сравнению с группой контроля. В третьем триместре у беременных группы Э(III) содержание протеина С в плазме крови возрастало в 1,05 раза относительно содержания у контрольной группы.

В ходе определения содержания протеина С у экспериментальных групп во время беременности показатели превышали значения контрольной группы сравнения. Возможность увеличения концентрации данного показателя отмечал в своей работе В.В. Долгов [4]. Эти изменения концентрации протеина во время протекания

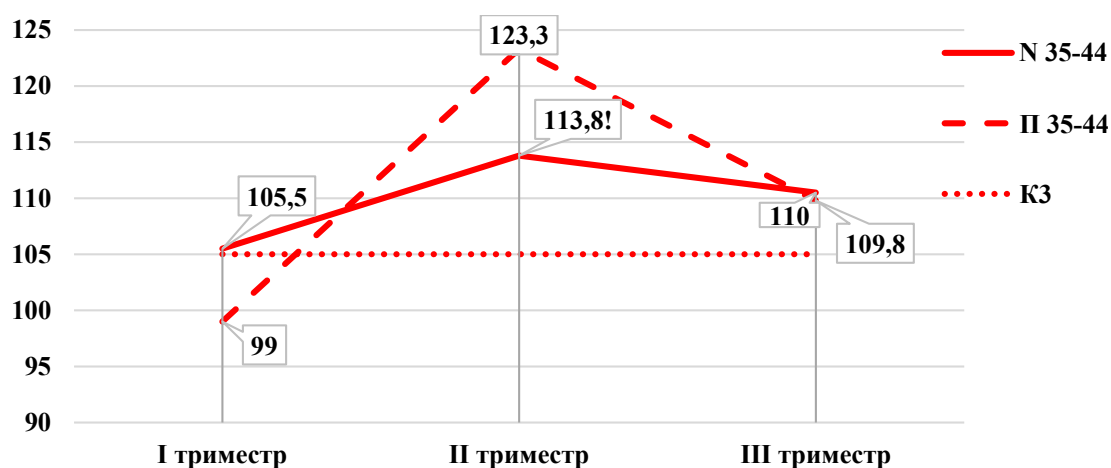


Рисунок 2. Изменение концентрации протеина С в плазме крови беременных

беременности, по мнению автора, могут происходить в связи с увеличением концентрации PAI-1 и угнетением фибринолитической активности крови [14], а также за счёт увеличения концентрации в организме женщины гормонов – эстрогенов, синтезирующихся в плаценте, по мере протекания беременности. Эстрогены стимулируют развитие тканей, участвующих в размножении, увеличивают чувствительность миометрия во время родовой деятельности к действию окситоцина. Они оказывают влияние на компоненты свертывающей системы крови, а также на протеин С [15].

У женщин с *генетической тромбофической предрасположенностью* в первом триместре в плазме крови в экспериментальной группе Э(Іп), концентрация протеина С снижалась в 1,06 раза по сравнению с его содержанием у группы контроля, в то время как у женщин с нормально протекающей беременностью такого изменения не наблюдалось. Во втором триместре у группы Э(ІІп) содержание протеина С в плазме крови возрастало в 1,17 раза по сравнению с контрольной группой. В третьем триместре у Э(ІІІп) концентрация данного антикоагулянта в плазме крови возрастала по сравнению с группой контроля в 1,05 раза. Таким образом у женщин с наличием генетической тромбофической предрасположенностью на этапе первого триместра беременности происходило снижение содержания протеина С в плазме крови, а далее, по мере протекания беременности происходит его волнообразное увеличение, что отмечается из рисунка 2. При этом во втором триместре, увеличение более значимое, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

Такие изменения показателей антикоагулянтной системы, возможны при наличии в генах мутаций, затрагивающих программирование MTHFR, что влечет за собой развитие в организме беременной состояния гипергомо-цистеинемии. Данное состояние будет оказывать большое влияние как отдельно на антикоагулянтную систему, так и на весь гемостаз в целом. Гипергомоцистеинемия осуществляет возрастание коагуляционного процесса за счёт активации протеина С и ингибирования и блокировки АТ III. Помимо этих нарушений возникает торможение фибринолиза, что в совокупности ведет к риску нарушения процесса протекания беременности [16].

Концентрация протеина S у обследуемых с *нормально протекающей беременностью*, в плазме крови в первом и втором триместре у групп Э(І) и Э(ІІ) оказывалась сниженной в 1,7 раза относительно группы контроля, данные являлись достоверными, так как находились в зоне значимости  $p < 0,01$ . В третьем триместре у группы Э(ІІІ) отмечалось, снижение содержания протеина S относительно группы контроля и достигало 2,28 раза, что являлось наиболее значительным отклонением среди всех групп, данные относительно контроля были достоверны, так как попадали в зону значимости  $p < 0,01$ .

При определении концентрации протеина S в крови беременных, мы можем отметить общую тенденцию к снижению концентрации данного показателя. Что объясняется тем, что количество протеина S во время беременности может снижаться более чем в половину, за счёт возрастания в крови количества такого компонента системы комплемента, как – C4b-связывающего белка. Происходит перераспределение в плазме крови в соотношении свободной и связанной формы протеина S. В следствии этого осуществляется уменьшение доли его свободной части, которая и обладает антикоагулянтной активностью [14].

У женщин с *наличием генетической тромбофической предрасположенности* содержание протеина S в плазме крови в первом триместре беременности у группы Э(Іп) снижалось в 2,27 раза относительно контрольной группы К. Во втором триместре беременности концентрация протеина S, у группы Э(ІІп) понижалась в 1,9 раза. В третьем триместре содержание протеина S у группы Э(ІІІп) уменьшалось в 2,21 раза. Также, стоит отметить, что все значения концентрации протеина S на всех этапах беременности значительно выходили за пределы референтных значений, характерных для данного компонента антикоагулянтной системы. Из рисунка 3, отмечается, что снижение протеина S у группы с генетическими отклонениями более значительное, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

При наличии у беременных женщин мутации протромбиновой мутазы развивается дефицит протеина S, который в свою очередь может привести и к снижению концентрации в плазме крови такого антикоагулянта как АТ III.

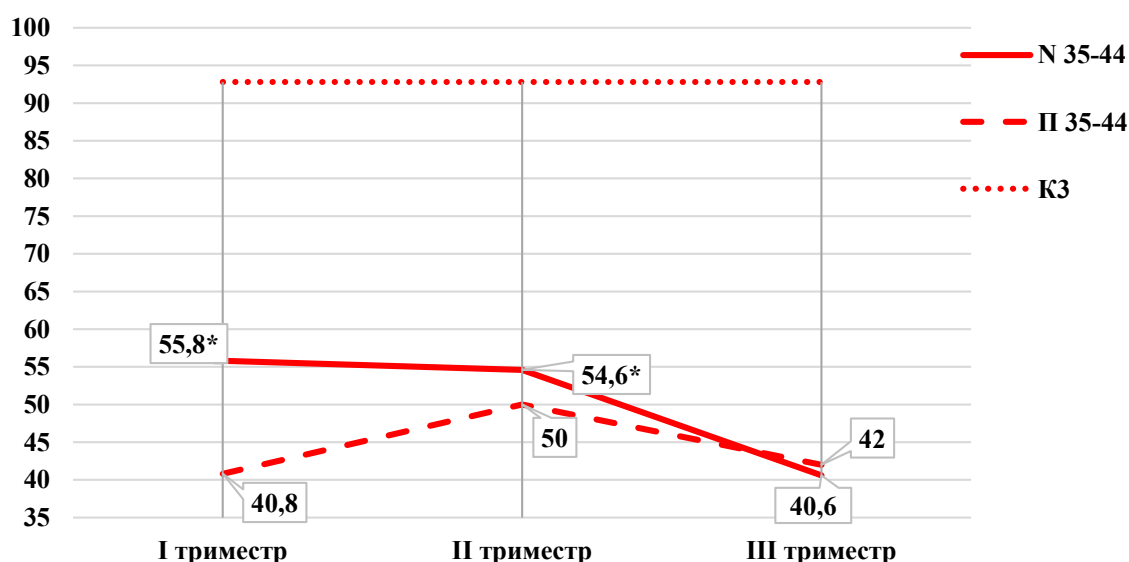


Рисунок 3. Изменение концентрации протеина S в плазме крови беременных

Таким образом, исходя из анализа информации, можно отметить, что благодаря применению хромогенного метода удалось определить, что во время беременности содержание АТ III в плазме крови имеет тенденцию к снижению, причем у группы с генетическими тромботическими предрасположенностями уменьшение концентрации более существенное к концу беременности; при помощи хромогенного метода удалось определить, что при беременности происходит возрастание содержания протеина С, однако отмечалось, что в первом триместре беременности у группы с генетическими тромботическими предрасположенностями, концентрация антикоагулянта уменьшалась, но далее, по мере прогрессирования беременности, она повышалась. Применение клоттингового метода позволило оценить изменение концентрации протеина S в плазме крови, которая к концу беременности снижается более чем в половину. Таким образом, новые методы исследования компонентов антикоагулянтной системы, дают возможность оценить в полной мере их изменение, что в последствии дает возможность своевременной оценки формирования и развития риска прерывания беременности. Однако следует оценивать не отдельные компоненты данной системы, а спектр показателей: АТ III, протеин С, протеин S.

#### Список литературы / References:

1. Михайлиди И.А. К вопросу о нарушениях в системе протеина С с разнообразной акушерской патологией в анамнезе у беременных. *Акушерство, гинекология и репродукция*, 2014, № 3, с. 59-64. [Mikhaylidi I.A. On the issue of protein c system disorders in pregnant women with various obstetric pathology in past history. *Akusherstvo, ginekologiya i reprodukcijaz*, 2014, no. 3, pp. 59-64 (In Russ.)]
2. Волков С.Л. Разработка способа выделения антитромбина-III, получение антисыворотки и некоторые аспекты ее применения: автореферат дис. кандидата медицинских наук: 14.00.17, 14.00.16. Чита, 1999, 19 с. [Volkov S.L. Development of a method for isolating antithrombin-III, obtaining antiserum and some aspects of its application: abstract of the dissertation of the candidate of medical Sciences: 14.00.17, 14.00.16. Chita, 1999, 19 p. (In Russ.)]
3. Ярец Ю.И., Новикова И.А. *Лабораторные методы оценки системы гемостаза: учебно-методическое пособие для студентов 4 курса медико-диагностического факультета медицинских вузов*. Г.: ГомГМУ, 2014, 72 с. [Yarets Yu. I., Novikova I.A. *Laboratory methods for assessing the hemostasis system: an educational and methodological guide for 4th-year students of the medical and diagnostic Faculty of medical universities*. G.: GomGMU, 2014, 72 p. (In Russ.)]
4. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. – Т. 1.* / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012, 928 с. [Clinical laboratory diagnostics: national guidelines: in 2 vol. - Vol. 1. / ed. V.V. Dolgov, V.V. Menshikov. M.: GEOTAR-Media, 2012, 928 p. (In Russ.)]
5. Родионова В.В., Хмель О.С. Нарушение коагуляционного звена гемостаза у больных артериальной гипертензией в сочетании с остеоартрозом. *Запорожский медицинский журнал*, 2016, № 3, с. 20-23. [Rodionova V.V., Khmel' O.S. Violations of coagulation hemostasis in patients with arterial hypertension in combination with osteoarthritis. *Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal*, 2016, no. 3, pp. 20-23. (In Russ.)]
6. *Дифференциальная диагностика нарушений системы гемостаза с использованием инструментов и реагентных систем* / под ред. С.А. Васильева, В.В. Самойленко. М.: Instrumentation Laboratory, 2014, 73 с. [Differential diagnosis of hemostatic system disorders using instruments and reagent systems / ed. S.A. Vasilyev, V.V. Samoylenko. M.: Instrumentation Laboratory, 2014, 73 p. (In Russ.)]
7. Безруков А.В. Новые программируемые анализаторы показателей гемостаза. *Клинико-лабораторный консилдум*, 2007, № 16, с. 94-96. [Bezrukov A.V. New programmable analyzers of hemostasis indicators. *Kliniko-laboratorniy konsilium*, 2007, no. 16, pp. 94-96. (In Russ.)]

8. Станоевич И.В. Дискуссионные аспекты физиологии женской репродуктивной системы: медицинская и демографическая проблемы. *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2012, № 12, с. 73-77. [Stanoevich I.V. Debatable aspects of the physiology of the female reproductive system: a medical and demographic problem. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2012, no. 12, pp. 73-77. (In Russ.)]
9. Сидорова И.С., Макаров И.О. *Течение и ведение беременности по триместрам*. М.: Медицинское информационное агентство, 2009, 298 с. [Sidorova I.S., Makarov I.O. *The course and management of pregnancy by trimester*. М.: Medicinskoe informacionnoe agenstvo, 2009, 298 p. (In Russ.)]
10. Радзинский В.Е. *Неразвивающаяся беременность*. Методические рекомендации МАРС. М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015, 48 с. [Radzinskiy V.E. *Undeveloped pregnancy*. Methodical recommendations of MARS. М.: redakciya jurnala StatusPraesens, 2015, 48 p. (In Russ.)]
11. Мельников А.П., Петрухин В.А., Половинкина И.А. Рациональная антикоагулянтная терапия при беременности. *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2010, № 1, с. 23-28. [Mel'nikov A.P., Petrukhin V.A., Polovinkina I.A. Rational anticoagulant therapy during pregnancy. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2010, no. 1, pp. 23-28. (In Russ.)]
12. Будыкина Т.С., Верхолюмова Ф.Ю., Гурьева В.М. Эффективный инструмент оценки состояния гемостаза во время беременности: тромбодинамика (тромбофотометрия динамическая (тромбодинамика)). *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2015, № 15, том 4, с. 95-100. [Budykina T.S., Verkholomova F.Yu. Guryeva V.M. An effective tool to evaluate the homeostasis during pregnancy: dynamic thrombophotometry (thrombodynamics). *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2015, no. 15, vol. 4, pp. 95-100. (In Russ.)]
13. Рудзевич А.Ю. Изменения гемостаза у беременных с тромбофилией, возможность профилактики осложнений беременности при приобретенной тромбофилии и антифосфолипидном. *Научное обозрение. Медицинские науки*, 2019, № 1, с. 48-54. [Rudzevich A.Yu. Changes in hemostasis in pregnant women with thrombophilia, possibility of prevention of complications of pregnancy in thrombophilia and antifosfolipid syndrome. *Nauchnoe obozrenie. Medicinskie nauki*, 2019, no. 1, pp. 48-54. (In Russ.)]
14. Мурашко А.В. Антикоагулянтная терапия при беременности. *Трудный пациент*, 2009, том 7, № 1-2, с. 5-10. [Murashko A.V. Anticoagulation therapy at pregnancy. *Trudniy pacient*, 2009, vol. 7, no. 1-2, pp. 5-10. (In Russ.)]
15. *Биохимия*, под ред. Е.С. Северина. 5-е изд., исп. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019, 768 с. [Biohimiya, ed. by E.S. Severin. 5th ed., isp. and add. М.: GEOTAR-Media, 2019, 768 p. (In Russ.)]
16. Пестрикова Т.Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А., Ковалева Т.Д. Коррекция гемостазиологических нарушений у пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза. *Гинекология*. 2013, № 5, с. 25-28. [Pestrikova T.Y., Yurasov I.V., Yurasova E.A., Kovaleva T.D. Correction of homeostasis abnormalities in pregnant women with inflammatory diseases pelvic organs. *Gynecology*, 2013, vol. 15, no. 5, pp. 25-28. (In Russ.)]

#### APPLICATION OF MODERN METHODS FOR EVALUATION OF INDICATORS OF ANTI-COAGULANT SYSTEM IN PREGNANT WOMEN

Vasilyeva A.A., Zolotavina M.L.

Kuban State University

st. Stavropolskaya, 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: Cat-Pug@yandex.ru

**Abstract.** This scientific paper considers methods for determining the components of the anticoagulant system of blood plasma, such as immunochemical methods (enzyme immunoassay, immunochemoluminescence, immunodiffusion, radioimmunoassay), anticoagulation method, chromogenic and clotting. With the help of clotting and chromogenic methods, revealed changes in such substances as AT III, protein C and protein S among women aged 35 to 44 years with a normal pregnancy and in the presence of genetic thrombotic predispositions in the anamnesis at different stages of pregnancy. There was a general tendency towards a decrease in the content of AT III and protein S in the blood plasma, and an increase in protein C. It was also noted that the indicators of the anticoagulant system in the blood plasma in pregnant women with a genetic thrombotic predisposition changed more significantly than in women with a normal pregnancy.

**Key words:** ICA, anticoagulation method, chromogenic method, clotting method, AT III, protein C, protein S, blood plasma, pregnancy, genetic thrombotic predispositions.

## ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Даллакян Г.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: honaris@bk.ru

Поступила в редакцию: 18.06.2021

**Аннотация.** В начале наших исследований было выбрано водоросли *Scenedesmus quadricauda* являющимся тест-объекта фитопланктонных организмов в водной токсикологии. Исследовано воздействия водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на численность клеток, эффективность фотосинтеза и долю живых клеток в накопительной культуре. Концентрация 10 мг/л фуллерена C<sub>60</sub> в питательной среде стимулировала эффективность фотосинтеза до 25% по сравнению с контролем, при этом численность клеток водоросли увеличивалась на 27%. Стимулирующий эффект был менее выражен в концентрациях 1 и 5 мг/л фуллерена. Вторым этапом наших исследований, было планктонные ракообразные *ceriodaphnia dubia*, обладающие высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы. Воздействию исследованных концентраций фуллерена 0,1 и 1 мг/л на цериодафний показало увеличение размеров тела до 6% и плодовитости до 144% у особей опытных групп по сравнению с контрольной. При воздействии большей концентрации 1 мг/л эти отличия более значимы. Таким образом в исследуемых организмах наблюдается стимуляция биологических показателей при добавлении в питательную среду фуллерена, при этом более чувствительны ракообразные *ceriodaphnia dubia*.

**Ключевые слова:** фуллерен C<sub>60</sub>, стимуляция, ракообразные, водоросли, фотосинтез, численность.

В связи с возрастающим производством фуллеренов и вероятностью их попадания в окружающую среду особенно актуальной становится задача исследования их воздействия на биологические системы, в частности – на водные организмы. Выбор исследуемых гидробионтов связано с тем, что, водоросли *Scenedesmus quadricauda* являющимся тест-объекта фитопланктонных организмов в водной токсикологии. При этом ракообразные являются важным звеном трофических цепей в водных сообществах и ценным кормовым объектом для рыб. Они обладают высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы, и зачастую первыми реагируют на их присутствие в воде.

Водные организмы, в ходе своей предшествующей эволюции никогда не сталкивались со многими синтезированными человеком веществами, в том числе и с водной дисперсией фуллерена (ВДФ) (в дальнейшем – фуллерены), поэтому не исключена постепенная аккумуляция фуллеренов в водоемах, это может иметь непредсказуемые последствия для всей водной экосистемы в целом [1]. К настоящему времени проведены ряд исследования воздействия ВДФ C<sub>60</sub> на водные микроорганизмы, и ракообразных, однако их результаты носят противоречивый характер. Известны работы, в которых показано наличие токсичных свойств у ВДФ C<sub>60</sub> при их экспонировании с бактериальными культурами [2, 3]. В то же время имеются исследования, в которых показано об отсутствии угнетающего действия фуллеренов на микроорганизмы [4, 5]. Есть данные и о стимулирующем воздействии ВДФ C<sub>60</sub> на микробиоценозы сточных вод [6].

Целью настоящей работы было исследование влияние ВДФ C<sub>60</sub> на гидробионты разных трофических уровней в накопительной культуре. водорослей *Sc. quadricauda*, и ракообразных *Ceriodaphnia dubia* в лабораторной культуре.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВДФ C<sub>60</sub> были получены по методике ультразвуковой замены растворителя из толуола [7]. Содержание толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях фуллеренов контролировали с помощью статического парофазного газохроматографического анализа. Средний диаметр кластеров фуллеренов в ВДФ C<sub>60</sub> составил 130±5 нм. Это часть работы по получению ВДФ C<sub>60</sub> были выполнены на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ. Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры за помощь и консультации при выполнении работы.

Тест-объектом исследования для фитопланктона служила альгологически чистая культура зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (*Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.), широко распространенная в пресных водоемах Южного и Северного полушария и являющаяся их важным звеном в трофических цепях.

Культуру выращивали на среде Успенского № в люминостате при освещенности 3 клк со сменой дня и ночи (12:12 ч), температуре 22±2 °C и перемешивали 2 раза в сутки во избежание оседания клеток.

Действие фуллеренов C<sub>60</sub> на культуру *S. quadricauda* оценивали при концентрациях 1, 5 и 10 мг/л. Опыты проводили в конических колбах емкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трех повторностях для каждой концентрации и контроля длительностью 17 суток.



Основными показателями для оценки состояния культуры служили изменение численности клеток, соотношения живых и мертвых клеток, эффективности фотосинтеза в динамике ее развития. Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом. Определение живых и мертвых клеток в культурах осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FS Plus (Carl Zeiss, Германия).

Кривые эффективности фотосинтеза были построены на основе данных, полученных на приборе «МЕГА-25» [8]. Интенсивность флуоресценции хлорофилла была рассчитана по показателям  $F_0$  и  $F_m$  [8].

Эксперименты с *ceriodaphnia dubia* проводили в соответствии с методическими рекомендациями [9], в течение 8 суток, в полухроническом режиме. Для каждой серии исследований изначально было посажено по 4 новорожденных рачка (возраст <24 часов) в объем раствора 20 мл в 6 повторностях. В течение экспериментов смену растворов не производили. Кормление производили через день суспензией хлореллы до достижения плотности суспензии 500 тыс. кл/мл со вторых суток эксперимента. Ежедневно учитывали выживаемость особей, появление молоди, на 8 сутки измеряли линейные размеры тела рачков при помощи стереоскопического микроскопа с окуляр-микрометром. Во время наблюдения был получен один вымет молоди как в контрольной, так и в опытных выборках. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистического пакета программ STATISTICA-10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

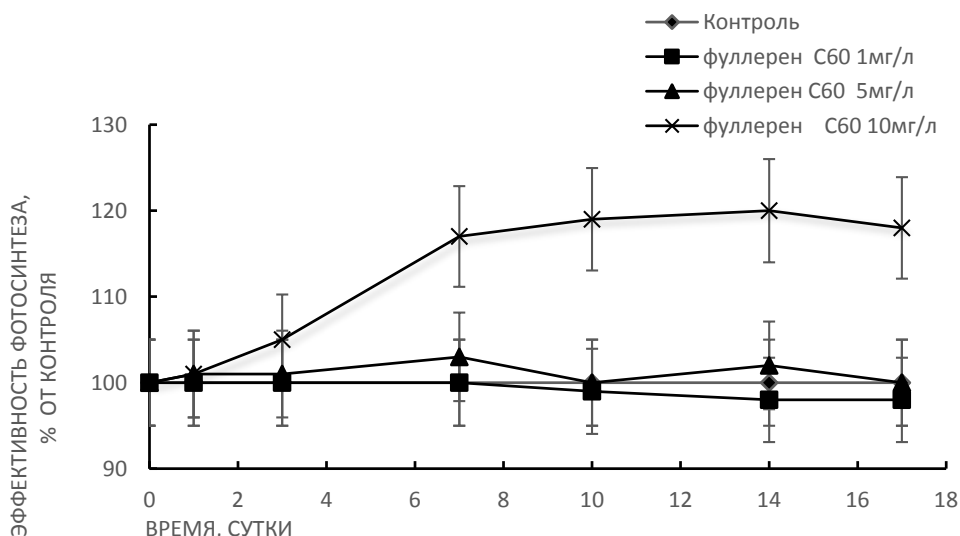
Результаты исследований влияния водных дисперсий  $C_{60}$  на водоросли представлены на рисунках 1 и 2. Как видно из рисунка 1, при концентрации 10 мг/л  $C_{60}$ , начиная с 3-х суток роста культуры, величина эффективности фотосинтеза увеличивалась и достигала максимума на 14 сутки (20% по отношению к контролю), а при концентрациях 1 и 5 мг/л достоверных различий в серии не обнаружено.

Численность клеток *S. quadricauda* во всех пробах с  $C_{60}$  во время роста культуры была на уровне или выше, чем в контроле (рис. 2). Начиная с 10 суток опыта, отмечена достоверная стимуляция роста тест-культуры в пределах 8–12% при 5 мг/л и 12–27% при 10 мг/л  $C_{60}$ . А в присутствии 1 мг/л рост культуры находился на уровне контроля на протяжении всего опыта.

Таким образом, водная дисперсия  $C_{60}$  оказывает стимулирующее действие на изменение численности клеток водоросли, так и на величину эффективности фотосинтеза.

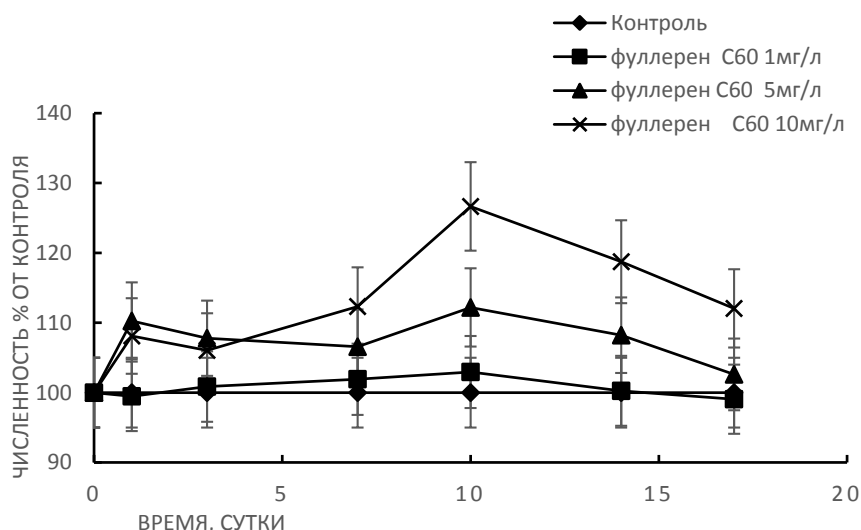
Результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии, при добавлении в среду в диапазоне исследованных концентраций 1–10 мг/л как для  $C_{60}$  показало, что в процессе опыта клетки оставались жизнеспособными, при этом доля живых клеток была на уровне контроля (98–99%). Ране в нашей работе было показано, стимулирующего влияния ВДФ  $C_{60}$  в концентрации 5 мг/л как на численность бактериопланктона в целом, так и на количество бактериальных клеток с активным метаболизмом в его составе [1]

На основании данных литературы можно предположить, что одна из возможных причин стимуляции роста водорослей связана с антиоксидативной активностью фуллеренов [10], которые стабилизируют свободнорадикальные процессы в клетке и инактивируют активные формы кислорода, образующиеся в среде культивирования во время роста культуры. Кроме того, фуллерены, проникая в клетку благодаря своим мембранотропным свойствам [11], по-видимому, влияют на темп деления клеток, способствуя усиленному росту клеток водорослей.



**Рисунок 1.** Влияние водной дисперсии фуллерена  $C_{60}$  на эффективность фотосинтеза ( $F_v/F_m$ , %) в процессе роста культуры *Scenedesmus quadricauda*





**Рисунок 2.** Изменение относительной численности клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в процессе роста в присутствии водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub>

Далее было исследовано влияние фуллерена C<sub>60</sub>, планктонные ракообразные *ceriodaphnia dubia*, обладающие высокой чувствительностью к загрязнению водной среды потенциально токсичными веществами различной химической природы.

Воздействию фуллерена в концентрациях 0,1 и 1 мг/л на цериодафний не наблюдалось снижения выживаемости, напротив опытные выборки сохранили выживаемость на более высоком уровне по сравнению с контролем (92–96% от исходной).

При воздействии исследованных концентраций фуллерена зарегистрировано увеличение размеров тела до 6% и плодовитости до 144% у особей опытных групп по сравнению с контрольной (табл. 1). При воздействии большей концентрации 1 мг/л эти отличия статистически значимы. Стоит отметить, что появление молоди (первый помет) отмечено в контрольной группе особей на 6 сутки, а в присутствии фуллерена в обоих случаях несколько раньше – на 4–5 сутки, что свидетельствует о стимуляции наступления половозрелости у рачков в опытных выборках (таблица 1). Накопления частиц фуллерена в фильтрационном аппарате рачков при микроскопическом исследовании не отмечено. Морфологических изменений у исходно наблюдаемых особей и их потомства не отмечено.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы. Добавка водных дисперсий фуллеренов C<sub>60</sub> в среду культивирования водорослей приводит к лучшему росту культуры, как по интегральному общепроизводственному показателю численности клеток, так и по функциональному показателю увеличению эффективности фотосинтеза, характеризующему физиологическое состояние изучаемого тест-объекта

Воздействию фуллерена в концентрациях 0,1 и 1 мг/л на цериодафний показало, что опытные выборки сохранили выживаемость на более высоком уровне по сравнению с контролем (92–96% от исходной).

Обе концентрации фуллерена увеличивают выживаемость, плодовитость и линейный рост цериодафний. При воздействии концентрации 1 мг/л описанное стимулирующее воздействие статистически более значимо.

**Таблица 1.** Биологические показатели ракообразных *Ceriodaphnia dubia* в присутствии водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub>

Концентрация	Выживаемость на 8 суток, %	Размеры тела на 8 суток, мм			Плодовитость на 1 самку, особи		
		M±m	% от Контроля	Tст	M±m	% от Контроля	Tст
Контроль	70	0,81±0,01			2,5±0,6		
Фуллерен 0,1 мг/л	96	0,84±0,01	<b>103,9*</b>	<b>3,18</b>	2,8±0,4	112,2	0,82
Фуллерен 1 мг/л	92	0,86±0,02	<b>106,1</b>	<b>3,27</b>	3,6±0,6	<b>143,9</b>	<b>3,36</b>

\*Примечание – жирным шрифтом показаны статистически значимые отклонения опытных значений от значений в контрольной выборке

В тоже время результаты наших опытов указывают необходимость дальнейшего эколого-биохимического исследования влияния фуллеренов на рост планктонных организмов для установления возможных причин и молекулярных механизмов на первичное звено водных экосистем.

Проведение биотестирования вновь синтезированных веществ и соединений на стандартных тест-объектах с целью установления их токсичности или стимуляции роста позволит в будущем защитить водные экосистемы от их загрязнения

#### Список литературы / References:

1. Mosharova I.V., Dallakyan G.A., Mikheev I.V., Il'inskii V.V., and Akulova A.Yu. Changes in the quantitative and functional characteristics of bacterioplankton under the influence of aqueous unmodified fullerene C<sub>60</sub> dispersions. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2019, vol. 487, no. 2, pp. 1-4.
2. Aquino A., Chan J., Giolma K., Loh M. The effect of a fullerene atersuspension on the growth, cell iability, and membrane integrity of Escherichia coli B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 2010, vol. 14, pp. 13-20.
3. Chae S.R., Wang S.Y., Hendren Z.D., Wiesner M.R., Watanabe Y., Gunsch C.K. Effects of fullerene nanoparticles on Escherichia coli K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control. *Journal of Membrane Science*, 2009, vol. 329, no. 1-2, p. 68.
4. Hadduck A., Hindagolla V., Contreras A., Li Q., Bakalinsky A.T. Does aqueous fullerene inhibit the growth of Saccharomyces cerevisiae or Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, vol. 76, no. 24, pp. 8239-8242.
5. Tong Zh-H., Bischoff M., Nies L., Carroll N.J., Applegate B., Turco R. Influence of fullerene (C<sub>60</sub>) on soil bacterial communities: aqueous aggregate size and solvent co-introduction effects. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, p. 28069.
6. Huang F., Ge L., Zhang B., Wang Y., Tian H., Zhao L., He Y., Zhang X. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria. *Chemosphere*, 2014, vol. 108, p. 411
7. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T., Volkov D.S., Proskurnin M.A., Korobov M.V. QuasiEquilibrium Distribution of Pristine Fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in a Water-Toluene System. *Carbon*, 2017, vol. 111, p. 191.
8. Pogosyan S.I., Galchuk S.V., Kazimirko Yu.V. Konyukhov I.V., Rubin A.B. The use of a MEGA-25 fluorimeter to determine the number of phytoplankton and assess the state of its photosynthetic apparatus. *Voda: khimiya i ekologiya*, 2009, no. 6, pp. 34-40.
9. Lewis P., Klemm D., Lazorchak J., Norberg-King T., Peltier, W. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms*. Third edition: U.S. Environmental Protection Agency, 1994, pp. 128-173.
10. Dumpis M.A., Nikolaev D.N., Litasova E.V., Ilin V.V., Brusina M.A., Piotrovsky L.B. Biological activity of fullerenes – reality and prospects. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018, vol. 16, no. 1, pp. 4-20.
11. Poletaeva D.A. *Membranoatroannye properties of water-soluble fullerene derivatives*: Author's abstract. dis. .. cand. biol. sciences. Moscow: Moscow State University 2012, 24 p.

## THE EFFECT OF FULLERENE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF AQUATIC ORGANISMS

Dallakyan G.A.

Lomonosov Moscow State University

st. Leninskie Gory, 1, b. 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: honaris@bk.ru

**Abstract.** At the beginning of our research, the algae *Scenedesmus quadricauda* was chosen as a test object for phytoplankton organisms in aquatic toxicology. The effect of an aqueous dispersion of fullerene C<sub>60</sub> at concentrations of 1, 5, and 10 mg / l on the number of cells, the efficiency of photosynthesis and the proportion of living cells in the enrichment culture was studied. The concentration of 10 mg / l of fullerene C<sub>60</sub> in the nutrient medium stimulated the efficiency of photosynthesis up to 25% in comparison with the control, while the number of algal cells increased by 27%. The stimulating effect was less pronounced at concentrations of 1 and 5 mg / l of fullerene. The second stage of our research was planktonic crustaceans *ceriodaphnia dubia*, which are highly sensitive to pollution of the aquatic environment with potentially toxic substances of various chemical nature. The effect of the investigated fullerene concentrations of 0.1 and 1 mg / l on *ceriodaphnia* showed an increase in body size up to 6% and fertility up to 144% in individuals of the experimental groups compared with the control. When exposed to a higher concentration of 1 mg / l, these differences are more significant. Thus, in the studied organisms, the stimulation of biological parameters is observed when fullerene is added to the nutrient medium, while the crustaceans *ceriodaphnia dubia* are more sensitive.

**Key words:** fullerene C<sub>60</sub>, stimulation, crustaceans, algae, photosynthesis, abundance.

# СУПЕРМОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ПРОТЕОМНЫХ АНСАМБЛЕЙ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ХРОМАТИНА РАСТЕНИЙ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Иванова Э.А.

Уфимский институт биологии РАН

пр. Октября, 69, г. Уфа, 450054, РФ; e-mail: fiona\_belobor@mail.ru

Поступила в редакцию: 21.06.2021

**Аннотация.** В ракурсе экологической адаптации растений, с позиции *междисциплинарной науки* – *супрамолекулярной химии*, рассмотрена динамика *супрамолекулярных* топологически ассоциированных структур тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ): Нп-нуклеоплазмы, ХрI-хроматина непрочного и ХрII-прочносвязанного с ядерным матриксом и самого ЯМ. На поверхности раздела которых, представлена протеомная *супермолекулярная* реорганизация негистоновых и гистоновых ансамблей протеома ТХМ, макрокинетика которого имеет важное значение для понимания особенностей биохимических процессов в генетических подсистемах растения (корень→мезокотиль→колеоптиль) переходного периода от гетеротрофного к автотрофному развитию растений. Показан алгоритм динамики протеомных *супермолекулярных* ансамблей на поверхности раздела *супрамолекулярных* структур ТХМ. Выявлена позиционирующая роль «коровых» гистоновых (НЗ+Н4) ансамблей в *супра*-блоках: Нп, Хр-II, ЯМ у озимого фенотипа, в зоне гомеоморфизма (по топологической терминологии Р. Тома) корневой системы, как интегративной стабилизации пространственно-временной, физиолого-генетической стрессоустойчивости организма относительно яровой пшеницы. Приведённые данные могут быть интересны биофизикам и войти в базу данных онтологии стадий роста и развития стрессоустойчивости растений в окружающей среде.

**Ключевые слова:** Протеомика, интерфазная топология хроматина, супрамолекулярная биохимия, пшеница, генетическая стрессоустойчивость.

Расшифровка молекулярно-генетических основ адаптации организма или популяции остаётся фундаментальной темой в поисках подходов к их анализу, и знанию локальных стресс адаптаций в понимании пути от генома, генотипа к фенотипу. Фундаментальной базовой, основой этого направления, бесспорно, является *супрамолекулярная химия-биохимия*, которая развивается как химия ансамблей, удерживаемых нековалентными взаимодействиями. Через понятия распознавания и самопроцессов она пришла к концепции информации (пассивной, активной) и запрограммированных систем, всё более становясь химией молекулярной информации, изучающей хранение информации на молекулярном уровне, а также считывание, передачу и обработку информации на *супрамолекулярном* уровне.

Супрамолекулярная химия – в высшей степени междисциплинарная область науки, включающая химические, физические, биологические аспекты рассмотрения более сложных, чем молекулы, химических систем, связанных в единое целое посредством межмолекулярных (нековалентных) взаимодействий. Она стремительно расширяет границы химической науки до физических и биологических явлений. Три главных: понятий – фиксация (связывание), распознавание и координация – заложили фундамент *супрамолекулярной химии* [1].

Цель данной работы рассмотреть, что происходит с протеомным *супермолекулярным* ансамблем ядерных гистонов в *супра*структурах тотальной хроматиновой матрицы, как ответ структуроустойчивости выживания растительного организма на внешние стресс факторы окружающей среды.

Идеальным модельным объектом в этом случае являются коллекционные семена ВИРа, преобразованные селекционерами, долгосрочным методом многократного отбора, из яровой пшеницы в озимую. Экспериментальный биохимический подход, представленный в таблице 1, заключался: в выделении из клеточных ядер тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ) *супрамолекулярных* структур: Нп-лабильного нуклеоплазменного хроматина, Хр-I, Хр-II хроматинов соответственно непрочного и прочносвязанных с ядерным матриксом (ЯМ) и самого ЯМ, из которых были выделены *супермолекулярные* ансамбли: «линкерных», «коровых» гистонов и негистонов.

Ранее в работах [2-8] подробно были рассмотрены молекулярно-генетические особенности объекта исследования – яровой пшеницы, которая стала удачным донором, адаптационного стресс переходного периода преобразования, в озимую. Подробно обсуждён *супрамолекулярный* подход к анализу темы: онто-формофизиолого интегративной, пространственно-временной системы целостности биологии развития в аспектах эпигенеза и эпигенетики [7].

В данной работе представлен анализ динамики ТХМ в виде топологически ассоциированных *супра*-блоков: Нп-, Хр-I, Хр-II, ЯМ на поверхности раздела которых, происходит реорганизация ядерного *супермолекулярного* протеома – в пространственно-временном интервале: 24ч, 30ч, 36ч (табл. 2) после проклеивания зародыша пшеницы, а также при дальнейшем ростовом морфогенезе генетических организменных подсистем: (корень→колеоптиль→ мезокотиль) во временном интервале (42ч, 48ч) (табл. 3), как возможных конформационно-

локальных зон, способных к восприятию и преобразованию стресс сигналов окружающей среды биологии развития.

В настоящее время, усовершенствуются методические подходы к конформационному анализу *супер*-молекулярных ансамблей, входящих в *супра*молекулярные-блоки, что позволяет не только предсказывать, но и объяснять экспериментальные данные, находящиеся на стыке физики и биохимии, приближаясь к пониманию морфогенетических процессов на уровне жизненных циклов и фаз онтогенетического развития организма. В этом отношении *супра*молекулярная химия может рассматриваться как химическая или молекулярная информатика [9]. Что касается биологической эволюции, то она многократно усиливает, закрепляет и предъявляет исследователям, последствия тех физических принципов, на которых основываются молекулярные взаимодействия отдельно в белке, а далее в её *супер*-молекулярных ансамблях, входящих в *супра*молекулярные-блоки.

Ретроспективный, активный интерес к идеям Р. Тома [10] возник в связи с общеизвестными успехами в области молекулярной биологии и генетики. В настоящее время от биологии требуют более строгой и глубокой разработки понятий и логических схем, с помощью которых можно плодотворно рассматривать важнейшие характеристики жизненных процессов на всех уровнях развития. Автор работы Р. Том [10] детально и точно показал, каким образом закономерности, с которыми сталкивается биология, могут рассматриваться как структуры в многомерном пространстве, провел прямое сравнение топологических структур в четырёхмерном пространстве-времени и физических структур, обнаруживаемых в развивающемся зародыше. Постэмбриональный период, связанный с инициацией ростовых процессов зародыша, характеризуется возникновением механического натяжения клеточно-тканевых масс, которое приводит к поразительным по геометрической сложности формам. Например, у растений это наблюдается в ходе морфогенеза конусов роста побегов [11, 12]. Л. Белоусов [11, 12] проанализировал роль механического натяжения и экспрессии генов, то есть рассмотрел факторы, которые в одно и тоже время могли бы действовать на процессы, как макроскопического уровня (уровня целого зародыша и инициации роста проростка), так и на молекулярные.

Обсуждая клеточный аспект формообразования, следует подчеркнуть также, что клеточные стенки и связанный с ними цитоскелет [13], а значит и ядерный матрикс – полиэдр [10, 12], вместе взятые, являются источником эпигенетической информации для морфогенеза, который определяется как процесс развития органа.

Вопросы самоорганизации биологических систем находятся в центре внимания специалистов по высокомолекулярным соединениям, а именно – биополимерам. ТХМ представляет собой гетерополимер, в котором взаимодействуют различные полимерные молекулы: ДНК, РНК, белки и полисахариды. В настоящее время определенный прогресс достигнут в исследовании структуры хроматина в масштабе целого ядра [14]. Что касается метаболизма белков (протеома) хроматина, то он активно рассматривается с позиции эпигенеза,

**Таблица 1.** Биохимический анализ клеточных ядер, индуцированных к органоспецифическому, координированно-закономерному росту, проклюнувшихся зародышей пшеницы

1.1. Возраст проклюнувшихся зародышей, ч (коллекционные семена из ВИРа)					
24	30	36	42	органы	48
Целый высокодифференцированный зародыш			Колеоптиль Мезокотиль Корень		
1.2. Выделение клеточных ядер					
1.3. Выделение <b>супра</b> -структур-блоков при повышении ионной силы солевого градиента, способствующего ослаблению электростатического взаимодействия					
0,14 М NaCl		0,35 М NaCl		2М NaCl	6М GuHCl
Нуклеоплазма, «Лабильный хроматин»  (Hn)		«Эу»-хроматин, непрочносвязанный с ЯМ (XpI)		«Гетеро»-хроматин, прочносвязанный с ЯМ (Xp II)	Ядерный матрикс  (ЯМ)
1.4. Градиентное элюирование GuHCl-гуанидингидрохлоридом, на поверхности раздела негистоновых и гистоновых – <b>супер</b> -комплексов-ансамблей из <b>супра</b> -структур-блоков, методом ионнообменной хроматографии на IRC-50 (Heidelberg), подготовленной к работе по описанию [6, 10-12]					
Ступенчатые концентрации - GuHCl, %					
6,0 - негистоновые "кислые" белки - (Hгб)					
8,9 - лизинбогатый, линкерный гистон - (Hl)					
10,6 - умеренно-лизинбогатые «коровые» гистоны - (H2A+H2B)					
13,0 - обогащенные аргинином «коровые» гистоны - (H3+H4)'					
40,0 - аргинин-богатые «коровые» гистоны - (H3+H4)"					

эпигенетики и эпигенома [15-17]. И всё же, до настоящего времени молекулярные механизмы адаптационной эволюции морфогенетических признаков находятся в стадии их расшифровки.

Как известно, протеом генетических структур про- и эукариот обогащен белками, богатыми аргинином. По данным [18] отмечается высокая консервативность аргинин-богатого гистона - H4 по аминокислотной последовательности у всех 3-х представителей эукариотических царств, что свидетельствует о его важной роли в сохранении и реализации генетической информации в процессах структурирующих упаковку ДНК.

К тому самым интересным было сообщение М. С. Гельфанда, что из всех аминокислот только аргинин способен связываться с ДНК [19]. Интересной особенностью эукариотического аргинин-богатого гистона H4 является наличие определённых повторяющихся последовательностей, значение которых находится в стадии расшифровки. Есть мнение, что H4 образуется из коротких пептидов [18]. В интерфазной хроматиновой организации эукариот боковые группы гистона H4 выходят на функциональную поверхность нуклеосом. Особо отмечено, что боковые группы колеблются заметно сильнее, чем главная цепь [20]. Все эти данные в настоящее время стали объектом внимания **супрамолекулярной химии**, которую характеризуют, как междисциплинарную область науки, имеющей дело с **супер**-молекулярными ансамблями и **супрамолекулярными блоками** [1]. Эта наука стремительно расширяет границы химической науки до физических и биологических явлений, охватывая все типы **супрамолекулярных** блоков и их **супермолекулярных** ансамблей. Биохимия и молекулярная биология полностью входят туда и занимают в ней отдельную нишу, по мнению [10], основная проблема биологии топологическая, основное понятие которой гомеоморфизм. Однако, в данном случае у растений, согласно [10] о гомеоморфизме, можно говорить только по отношению к отдельным органам, таким как: лист, мезокотиль, корень.

Что касается аргинина, то можно сказать, что он выступает в роли биохимической связи, воспроизводящей механическое и резонансное соотношение. Относительно ядерного матрикса, как пилиэдра можно сказать, что это основание - поверхность геометрического многоугольника, который проявляет себя тем, что запускает динамику и кинетику специфики особенностей биологии развития.

Ассоциация нуклеосом поддерживается электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными N-концевыми доменами гистонов (в первую очередь, гистона H4) одной нуклеосомы и отрицательно заряженной площадкой на поверхности другой нуклеосомы. Следует иметь в виду, что обычные экспериментальные данные приводятся в виде усредненных результатов анализа пространственной организации генома в сотнях тысяч клеток.

**Таблица 2.** Особенности позиционирования протеомных **супермолекулярных** ансамблей на поверхности раздела топологически – ассоциированных **супрамолекулярных** блоков тотального хроматина в пространственно-временных периодах роста и развития зародышей яровой и выведенной из неё озимой пшениц

Супраблоки тотального хроматина	Протеомные <b>супермолекулярные</b> структуры-ансамбли	
<b>24ч</b>	Яровая	Озимая
Нп	$(H3+H4)' \geq H\gamma 6$	HI
Хр I	$(H3+H4)' \geq HI$	$(H2A+H2B)$
Хр II	$H\gamma 6 = (H2A+H2B)$	$H\gamma 6$
ЯМ	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$
<b>30 ч</b>		
Нп	$(H3+H4)'$	$(H3+H4)'$
Хр I	$H\gamma 6$	$(H3+H4)'$
Хр II	$H\gamma 6 = (H2A+H2B)$	$H\gamma 6$
ЯМ	HI	$(H2A+H2B)$
<b>36 ч</b>		
Нп	$H\gamma 6$	HI
Хр I	HI	$(H2A+H2B)$
Хр II	$H\gamma 6$	$(H3+H4)'$
ЯМ	HI	$H\gamma 6$

**Таблица 3.** Особенности реорганизации *супер*молекулярного протеома на поверхности раздела топологически-ассоциированных *супра*-блоков хроматина в процессе инициации ростового морфогенеза генетических подсистем целостного организма яровой и озимой пшениц

Блоки тотального хроматина	Органогенез	Протеомные <i>супер</i> молекулярные ансамбли- структуры	
		Яровая	Озимая
		<b>42 ч.</b>	
Нп	Колеоптиль	Нп	$(H2A+H2B) \geq H1 \geq Hгб$
	<b>Мезокотиль</b>	<b><math>(H3+H4)''</math></b>	$H1 \geq Hгб$
	<b>Корень</b>	Нп	<b><math>(H3+H4)'' \geq (H3+H4)'</math></b>
Хр I	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$
	<b>Мезокотиль</b>	<b><math>(H3+H4)''</math></b>	$(H2A+H2B)$
	Корень	$(H2A+H2B)$	$(H2A+H2B) \geq H1$
Хр II	Колеоптиль	$(H3+H4)'$	$H1 \geq Hгб$
	Мезокотиль	Нп	$(H3+H4)'$
	<b>Корень</b>	Нп	<b><math>(H3+H4)' + (H3+H4)''</math></b>
ЯМ	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$
	Мезокотиль	Нгб	Нгб
	<b>Корень</b>	$Hгб \geq H1$	$Hгб \geq H1 \geq (H3+H4)''$
<b>48 ч.</b>			
Нп	Колеоптиль	$(H3+H4)'$	Нгб
	Мезокотиль	$(H2A+H2B)$	Нп
	Корень	Нп	$(H2A+H2B) \geq Hгб$
Хр I	Колеоптиль	Нгб	$H1 \geq (H3+H4)' \geq Hгб$
	Мезокотиль	$Hгб \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4)'$
	Корень	$(H2A+H2B) \geq H1 \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4)'$
Хр II	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$H1 \geq (H3+H4)'$
	Мезокотиль	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) \geq (H3+H4)'$
	Корень	$(H3+H4)'$	$H1 \geq Hгб$
ЯМ	Колеоптиль	$H1 \geq Hгб$	Нгб
	Мезокотиль	$(H3+H4)'$	$Hгб \geq H1 \geq (H2A+H2B)$
	Корень	$(H2A+H2B)$	Нп

Таким образом, в топологическом аспекте биологического морфогенеза на уровне пространственной формы и фенотипа есть основное понятие гомеоморфизм. Следуя этому, обращает внимание, что в таблице 2 в органогенезе (36 ч.) зародышей яровой и озимой культур, четко прослеживается различие на поверхности раздела всех *супра*-блоков ТХМ и их протеомных *супер*молекулярных ансамблей, которое выражено в том, что яровая ТХМ (*супра*-блоки: Нп→ХрI→ХрII→ЯМ и их соответственно *протеом*: Нгб→Нп→Нгб→Нп) функционируют во взаимосвязи с линкерной ДНК, а озимая ТХМ (*супра*-блоки: Нп→ХрI→ХрII→ЯМ и их соответственно *протеом*: Нп→(H2A+H2B)→(H3+H4)'→Нгб)) как с линкерной, так и коровой ДНК. То есть, протеомные *супер*молекулярные ансамбли ТХМ яровых и озимых 36ч зародышей имеют разные точки локализации взаимосвязей с ДНК. По-видимому, это локальные зоны физико-химических взаимосвязей.

Следующая фенологическая фаза прорастания, представленная в таблице 1; (42 ч-48 ч), характеризуется ярко выраженным органоспецифическим, координированно-закономерным ростом проростка на уровне мезокотилия и активным ростом зародышевой оси, морфогенетической основы «сигнального языка» побега и корня, где ростовые процессы осуществляются вследствие деления клеток (анатомо-физиолого- биологические

особенности этого процесса остаются в ракурсе специалистов интегративной биологии). Это период, когда участки генома остаются доступными для динамического взаимодействия не только с ядерным микроокружением внутренних регулирующих факторов, но и возможностью осуществлять регуляторные антероградные и ретроградные взаимодействия с внутриклеточными органеллами и межклеточным пространством. Кроме того, это период активного процессирования **супрамолекулярной** энергетики митохондриального генома и его протеомных **супермолекулярных** ансамблей.

В этом контексте я останавливаюсь только на ярко выраженном результате эксперимента, который получен у **ярового сорта с мезокотилем (42ч)**, так как именно в этот период удалось выделить коровые **(НЗ+Н4)"-[Нп] → (НЗ+Н4)"[ХрI]** гистоны в функциональной взаимосвязке с протеомом Н1 – Нгб соответственно **супра-блоков: ХрII и ЯМ**. Выявленный аргинин-богатый протеом **(НЗ+Н4)"** выделяется при жёстком экстрагировании, в то время как, обогащенные аргинином гистоны **(НЗ+Н4)'**, выделяются при экстракции в три раза слабее (таблица 1.4). У **озимого сорта активный рост зародышевой оси, морфогенетической основы «сигнального языка» побега и корня (42ч)**, сопровождается выявлением в **корневой системе аргинин-богатого протеома (НЗ+Н4)"** в блоках **Нп, ХрII, ЯМ** в соединении с коровым протеомом  $(Н2А+Н2В) \geq Н1$  блока **ХрI**. Ранние данные [21] показали, что фракция **(НЗ+Н4)'** представляет собой полный комплект нуклеосомных белков, обогащенных аргинин-богатой фракцией, в то время как **(НЗ+Н4)"** представляет собой блок аргинин-богатых гистонов, со следами других нуклеосомных гистонов. Возможно, морфогенетические процессы яровости и озимости, связанные с инициацией развития органов и объясняют наличие у ярового сорта в **мезокотиле (42ч) Нп → ХрI** блока коровых гистонов **(НЗ+Н4)"**, которые на уровне целостности организма и клеточного ядра заякорены в **ЯМ Нгб-мезокотиле (42ч) и Нгб=Н1 корня (42ч)**. В то время как у **озимого сорта, протеомный комплекс коровых гистонов (НЗ+Н4)"** на уровне функциональной целостности организма проявляется только в **корневой системе**.

С этой позиции можно предположить, следуя рассуждениям [13, 22], что именно в период 42ч все вместе взятые генетические подсистемы (мезокотиль, корень → coleoptile) целостного организма могут являться источником эпигенетической информации для ростового морфогенеза, который на **супермолекулярном** уровне проявляется с позиции **(НЗ+Н4)"**, представляя собой локальные стресс зоны адаптации, на пути от генома, генотипа к фенотипу, формируя свой паттерн фиксации самопроцессирования в структурную устойчивость.

Таким образом, исторический путь анализа морфологической адаптации [23], но уже с новым информационным содержанием: молекулярного морфогенеза [21] → **супрамолекулярного** [1] → пространственно-топологической формы гомеоморфизма у растений [10], всё больше приобретает физико-химическое истолкование в области молекулярной биологии развития, что сближает эти познания с физикой, наукой издавна опиравшейся на математику, которая способствовала развитию в понимании общих закономерностей, с которыми сталкивается биология. В этом случае биофизические закономерности рассматриваются как структуры в многомерном пространстве. Так как в настоящее время в жизнь науки активно внедряется **супрамолекулярная** химия, с позиции междисциплинарности [1], то в данной работе представлена попытка рассмотрения её эколого-молекулярно-биологического аспекта. С этой позиции представлен вывод – показан алгоритм динамики протеомных **супермолекулярных** ансамблей на поверхности раздела **супрамолекулярных** структур ТХМ. Выявлена позиционирующая роль «коровых» гистоновых **(НЗ+Н4)"** ансамблей в **супра-блоках: Нп, Хр-II, ЯМ** у озимого фенотипа, в зоне гомеоморфизма корневой системы, как интеграционной стабилизации (42 ч) пространственно-временной физиолого-генетической стрессоустойчивости организма по отношению к яровой пшенице.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № НИОКТР АААА-А18-118022190104-7. В работе использована приборная база Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.*

#### Список литературы / References:

1. Лен Ж.-М. *Супрамолекулярная химия*. Новосибирск, Наука, 1998, 333 с. [Lehn J.-M., *Supramolecular chemistry*. Novosibirsk, Science, 1998, 333 p. (In Russ.)]
2. Иванова Э.А. Особенности «структурированных процессов» в интерфазных ядрах у пшеницы, выведенной в условиях холодного стресса. *Экобиотех*, 2019, т. 2, № 4, с. 1-6. [Ivanova E.A. Features of "structured processes" in interphase nucleus wheat bred under cold stress. *Ecobiotech*, 2019, vol. 2, no. 4, 1-6. (In Russ.).] DOI: 10.3 1163/2618-964X-2019-2-4-000-000
3. Иванова Э.А. Биофизическая экология в ракурсе концепции супрамолекулярной биохимии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 1, с. 194-200. [Ivanova E.A. Biophysical ecology from the perspective of the concept of supramolecular biochemistry. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 194-200. (In Russ.)]
4. Иванова Э.А. Биофизическая экология в ракурсе концепции супрамолекулярной биохимии. *Материалы XV международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*. Севастополь, 2020, с. 179-180. [Ivanova E.A. Biophysical ecology from the perspective of the concept of supramolecular biochemistry. *Proceedings of the XV international scientific conference "Modern trends of biological physics and chemistry"*. Sevastopol, 2020, pp. 179-180. (In Russ.)]

5. Ivanova E.A. Arg-X proteo-processing as model system for organization of karyogenomics Interphase chromatin of mature germs of wheats, formed in the conditions of cold stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2017, vol. 13, no. 4, pp. 65-73.
6. Ivanova E.A. On the question of epigenetic mechanisms of kariogenomic winter wheat in the concept of supramolecular biochemistry. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2019, vol. 15, no. 3, pp. 14-20.
7. Ivanova E.A. Analysis of the proteomics of chromatin suprastructures as areas of replication (origins) and perception of signal and stress systems in the development of spring wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2020, vol. 16, no. 4, pp. 22-34.
8. Ivanova E.A. Stress resistance on the example of supramolecular-genetic level of plant development. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2021. submitted to the press.
9. Шайтан К.В. Фундаментальные закономерности формирования пространственных структур конформационно подвижных молекул. *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. Сочи: Кубанский государственный университет*, 2019, том 1, с. 36. [Shaitan K.V. The fundamental laws of the formation of spatial structures of conformationally mobile molecules. *Collection of scientific papers of the VI Congress of Biophysicists of Russia. Sochi: Kuban State University*, 2019, vol. 1, p. 36. (In Russ.)]
10. Том Р. Структурная устойчивость и морфогенез. М.: Логос, 2002, 280 с. [Tom R. *Structural Stability and Morphogenesis*. M.: Logos, 2002, 280 p. (In Russ.)]
11. Белоусов Л.В. Биологический морфогенез. М.: МГУ, 1987, 234 с. [Belousov L.V. *Biological morphogenesis*. M.: Moscow State University, 1987, 234 p. (In Russ.)]
12. Белоусов Л.В. Морфомеханический аспект эпигенеза. *Генетика*, 2006, т. 42, № 9, с. 1165-1169. [Belousov L.V. Morphomechanical aspect of epigenesis. *Genetics*, 2006, vol. 42, no. 9, pp. 1165-1169. (In Russ.)]
13. Барлоу П.У. Деление клеток в меристемах и значение этого процесса для органогенеза и формообразования растений. *Онтогенез*, 1994, т. 25, № 5, с. 5-38. [Barlou P.U. Cell division in meristems and the importance of this process for plant organogenesis and morphogenesis. *Ontogenesis*, 1994, vol. 25, no. 5, pp. 5-38. (In Russ.)]
14. Mistelli T., Spector D.L. The Nucleus. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
15. Галимзянов А.В., Ступак Е.Э., Чураев Р.Н. Эпигенные сети, теория, модели, эксперимент. *Успехи современной биологии*, 2019, т. 139, № 2, с. 107-113. [Galimzyanov A.V., Stupak E.E., Churaev R.N. Epigenetic networks, theory, models, experiment. *Advances in modern biology*, 2019, vol. 139, no. 2, pp. 107-113. (In Russ.)]
16. Лобов В.П., Даскалюк А.П. Сравнительное исследование ДНК озимых и яровых форм пшеницы. Докл. АН СССР, 1984, том 275, № 1, с. 218-221. [Lobov V.P., Daskalyuk A.P. Comparative study of the DNA of winter and spring forms of wheat. *Dokl. Academy of Sciences of the USSR*, 1984, vol. 275, no. 1, pp. 218-221. (In Russ.)]
17. Чураев Р.Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе. *Генетика*, 2006, т. 42, № 9, с. 1276-1296. [Churaev R.N. Epigenetics: gene and epigenetic networks in ontogeny and phylogenesis. *Genetics*, 2006, vol. 42, no. 9, pp. 1276-1296. (In Russ.)]
18. Smith E.L., De Lange R.J., Bonner J. Chemistry and biology of the histones. *Physiol. Revs.*, 1970, vol. 50, no. 2, pp. 159-170.
19. Гельфанд М.С. Эволюция регуляторных систем. *Материалы докладов V съезда биофизиков России. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета*, 2015, т. 1, с. 19. [Gelfand M.C. The evolution of regulatory systems. *Materials of reports of the V Congress of Biophysicists of Russia. Rostov-on-Don: Publishing House of the Southern Federal University*, 2015, vol. 1, p. 19. (In Russ.)]
20. Финкельштейн А.В., Птицин О.Б. *Физика белка*. Москва: Книжный дом, 2005, 460 с. [Finkelstein A.V., Ptitsin O.B. *Physics of protein*. Moscow: Book house, 2005, 460 p. (In Russ.)]
21. Иванова Э.А., Ахметов Р.Р. Модификация негистоновых белков в проростках растений. *Физиология растений*, 1987, т. 34, № 3, с. 507-512. [Ivanova E.A., Akhmetov R.R. Modification of non-histon proteins in plant seedlings. *Physiology plants*, 1987, vol. 34, no. 3, pp. 507-512. (In Russ.)]
22. Robin H. Epigenetics. *An overview. Dev. Genet.*, 1994, vol. 15, no. 6, pp. 453-457.
23. Конарев В.Г. *Морфогенез растений и молекулярно-биологический анализ*. Санкт-Петербург: РАСХН, ВИР им. Н.И.Вавилова, 1998, 370 с. [Konarev V.G. *Morphogenesis and molecular-biological analysis of plants*. Saint-Peterburg, VIR, 1998, 370 p. (In Russ.)]



## SUPERMOLECULAR REORGANIZATION OF PROTEOMIC ENSEMBLES OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURES OF PLANT CHROMATIN UNDER STRESS ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Ivanova E.A.

Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences

Oktyabrya Ave., 69, Ufa, 450054, Russia; e-mail: fiona\_belobor@mail.ru

**Abstract.** From the perspective of ecological adaptation of plants, from the position of interdisciplinary science - **supramolecular** chemistry, the dynamics of **supramolecular** topologically associated structures of the total chromatin matrix (TChrM) is considered: Np-nucleoplasm, ChrI-chromatin is fragile and ChrII-strongly bound to the nuclear matrix and NM itself. At the interface of which, there is a proteomic **supermolecular** reorganization of non-histone and histone ensembles of the TChrM proteome, the macrokinetics of which is important for understanding the features of biochemical processes in the genetic subsystems of a plant (root → mesocotyl → coleoptile) of the transition period from heterotrophic to autotrophic plant development. An algorithm for the dynamics of proteomic **supermolecular** ensembles at the interface of the **supramolecular** structures of TChrM is shown. The positioning role of the "core" histone (H3 + H4) "ensembles in the supra-blocks: Np, Chr-II, NM in the winter phenotype, in the zone of homeomorphism (according to the topological terminology of R. Tom) of the root system, as an integrative stabilization of the space-temporal, physiological and genetic stress resistance of the organism relative to spring wheat. The data presented may be of interest to biophysicists and enter the database of the ontology of the stages of growth and development of stress resistance of plants in the environment.

**Key words:** *Proteomics, Interphase chromatin topology, supramolecular biochemistry, wheat, genetic stress resistance.*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИН БЕРЕЗЫ И ОСИНЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ТЕХНОГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Гурова Н.Н.<sup>1</sup>, Дигурова И.И.<sup>2</sup>, Гусев С.Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79/10, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: nina-guro@mail.ru

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: digurova56@mail.ru

<sup>3</sup> Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Минздрава России

ул. Партизана Железняка, 1, г. Красноярск, 660022, РФ; e-mail: sdg53@rambler.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2021

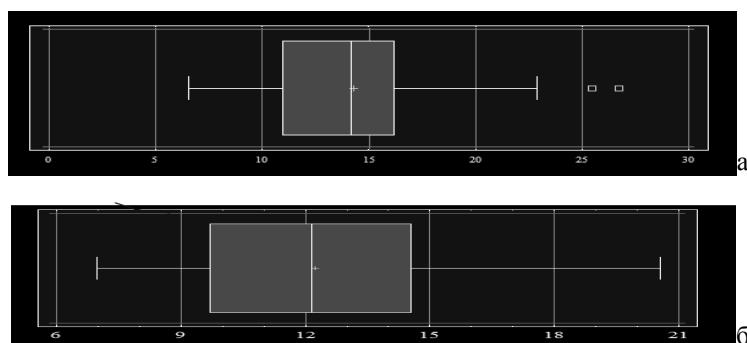
**Аннотация.** В статье рассматриваются результаты исследования морфометрических показателей листьев основных лесобразующих пород около постоянно действующего факела по сжиганию попутных газов. Сравнительному анализу подвергались результаты измерения периметра и площади листовых пластин, а также фрактального параметра – отношения периметра листа к корню квадратному из его площади. Длительное влияние техногенного фактора на смешанное осиново-березовое насаждение оценивалось с помощью альтернативных математических методов, направленных на возможное обнаружение скрытой информации и обеспечивающих надежную интерпретацию в крупных массивах данных. Полученные результаты позволили предположить наличие оптимизации морфометрических параметров листьев, более выраженной у березы. Вдоль трансекты фрактальный показатель возрастал при приближении к источнику загрязнения.

**Ключевые слова:** морфометрия листовой пластины, факел сжигания попутных газов, осиново-березовое насаждение.

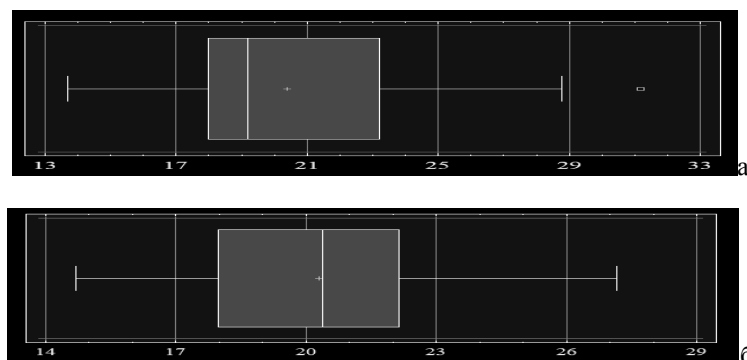
Реакция растений на воздействия выбросов промышленных предприятий позволяет оценить глубину экологической проблемы и выявить возможные адаптационные изменения. Из комплекса морфологических параметров важными для оценки устойчивости древесного растения к техногенным воздействиям и его адаптивного потенциала являются линейные размеры и площадь листовой пластинки. В работах разных авторов отмечаются разные направления изменений морфометрических показателей при воздействии вредных факторов техногенного характера. Так некоторые исследователи не обнаружили изменений площади листьев березы в ответ на негативное воздействие [1]. В то же время другие авторы отмечают наличие разных компенсаторных реакций древесных растений на техногенный стресс: а) аномальное увеличение площади листовой пластинки [2, 3] и б) уменьшение площади листовой пластинки [4-9]. Во втором случае наибольшие значения наблюдаются на самых дальних от источника загрязнения исследованных участках [10]. Снижение площади листа расценивается как адаптационные изменения [11]. На этот показатель влияет тип загрязнения [12] и время воздействия неблагоприятного фактора. Многие авторы отмечают, что при длительном пребывании в условиях техногенеза у растений наблюдается уменьшение линейных размеров и площади листьев [13, 14]. Однако роль многолетнего влияния факелов по сжиганию попутных газов, действующих на нефтеперерабатывающих заводах и удаленных от населенных пунктов, недостаточно изучена. В том числе, мало информации о влиянии данного техногенного фактора на морфометрические показатели лесобразующих пород в естественных насаждениях умеренной зоны, примыкающих к промышленным центрам. В связи с этим ранее нами было проведено исследование морфологических параметров листьев березы и осины около действующего факела для сжигания попутных газов Ачинского нефтеперерабатывающего завода. Анализ полученных данных с использованием стандартных методов описательной статистики не выявил статистически значимых изменений средних значений морфометрических показателей в зоне 30-летнего техногенного воздействия вдоль трансекты, пересекающей естественное березово-осиновое насаждение в направлении преобладающих ветров. Также не отмечено статистически значимых различий при сравнении с фоновыми значениями [15, 16]. Однако применение альтернативных математических методов (классификационный анализ - Divisive Analysis и непараметрический критерий Краскела-Уоллиса) позволило получить дополнительную информацию и возможность новой интерпретации экспериментальных данных [16, 17]. В результате была отвергнута нулевая гипотеза о том, что периметр и площадь листовых пластин каждой из изучаемых древесных пород для разных площадок трансекты и удаленного фона относятся к одной совокупности. Таким образом, на разных расстояниях от факела было выявлено различие исследуемых показателей; также отмечено уменьшение размеров листовых пластин на участке, более приближенном к факелу. Целью настоящей работы явился сравнительный анализ морфометрических показателей листьев березы и осины при длительном воздействии факела по сжиганию попутных газов, в том числе фрактального показателя (отношения периметра листовой пластины к корню квадратному из ее площади). В этом случае использовались данные, полученные на удаленном фоне (13,5 км от факела), а также на наветренной и подветренной опушках (соответственно 500 м и 800 м от факела).

Диаграммы Box-and-Whisker-Plot, компактно изображающих распределение вероятностей и характеризующих плотность группировки данных, представлены на рисунках 1-4. Для морфометрических показателей обеих древесных пород имело место сужение прямоугольников, в которых заключено 50% наблюдений в 1,2-1,4 раза (за исключением площади листа березы). В то же время интерквартильный размах значений периметра листа березы с наветренной стороны был сужен в 1,7 раза, а его площади – в 2,2 раза по сравнению с фоновыми значениями. Для площади листа осины и его периметра наблюдалось уменьшение интерквартильного размаха в 1,2 и 1,3 раза соответственно по сравнению с контрольными значениями.

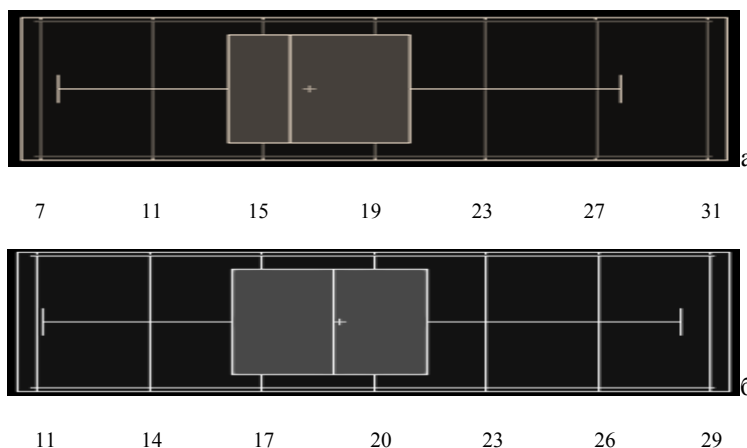
Полученные результаты могут свидетельствовать об оптимизации изучаемых показателей вследствие продолжительного действия техногенного фактора, причем менее выраженной для листа осины по сравнению с такими же показателями для листовой пластины березы. Возможно, причиной являются различия в степени устойчивости к неблагоприятному воздействию [1, 18].



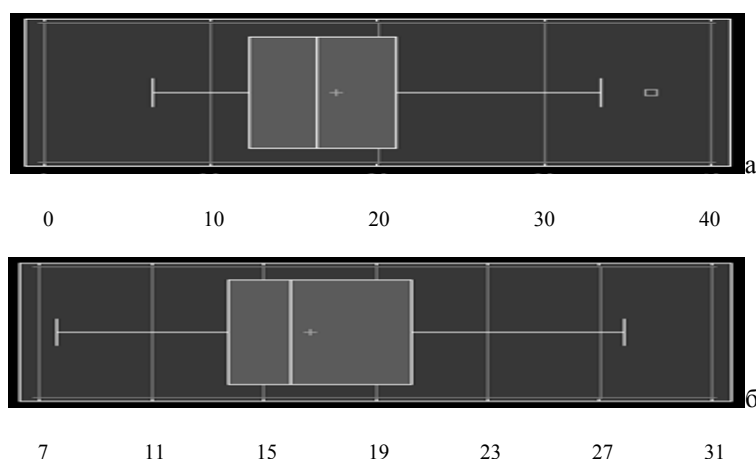
**Рисунок 1.** Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Площадь листовой пластины березы на удаленном фоне (а) и на опушке с наветренной стороны (б)



**Рисунок 2.** Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Периметр листовой пластины березы на удаленном фоне (а) и на опушке с наветренной стороны (б)



**Рисунок 3.** Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Площадь листовой пластины осины на удаленном фоне (а) и на опушке с наветренной стороны (б)



**Рисунок 4.** Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Периметр листовой пластины осины на удаленном фоне (а) и на опушке с наветренной стороны (б)

Для оценки действия источника загрязнения информативным является фрактальный показатель [19]. Средние значения для листьев березы составили: 5,88 с наветренной стороны, 5,51 - с подветренной стороны, а на удаленном фоне - 5,68. Результаты кластерного анализа данного показателя представлены в таблице 1. При разбиении значений для листовой пластины березы с наветренной стороны на 3, 4 и 5 кластеров 100% листьев относились к кластерам с центрами выше фоновой медианы, с подветренной – от 72 до 100% имели значения ниже этой цифры. При разбиении данных на 3 кластера на фоновом участке 43% объектов относилось к кластеру со средним значением 5,14, в то время как с наветренной стороны 44% листьев относились к кластеру со средним значением 5,853. Дальнейшее увеличение количества кластеров (6 и более) не дало содержательной информации. При исследовании листовых пластин осины получены следующие значения изучаемого параметра: 4,606 (фон), 4,634 (наветренная сторона), 4,556 (подветренная сторона). Для листьев осины распределение по кластерам представлено в таблице 2. Из этих данных следует, что при разбиении на 3 кластера 56% листовых пластин имели среднее значение 4,582 с подветренной стороны; такой же процент листовых пластин на удаленном фоне относились к кластеру с центром 4,575. С наветренной же стороны все центральные значения превышали фоновый показатель. Различия значений на наветренной и подветренной сторонах насаждения более выражены для листьев березы. Следовательно, на ближнем к факелу участке фрактальный показатель возрастает. Это согласуется с данными об увеличении в урбанизированной среде этого параметра, являющегося информативным маркером состояния растений [20].

Таким образом, в подфакельной зоне имела место оптимизация морфометрических показателей листовой пластины (площади, периметра). На ближнем к факелу участке наблюдается увеличение фрактального показателя для листовых пластин обоих видов деревьев. Для березы все отмеченные изменения более выражены, что может быть связано с различной устойчивостью. Следовательно, применение альтернативных методов обработки экспериментальных данных позволило провести сравнительный анализ морфометрических показателей двух лесобразующих пород при длительном воздействии техногенного фактора.

**Таблица 1.** Результаты кластерного анализа фрактального показателя листовой пластины березы

Кластеры	Наветренная опушка		Подветренная опушка		Фон	
	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев
1	5,759	49	5,440	68	5,78	68
2	5,989	51	5,668	32	5,62	32
1	5,739	33	5,381	24	5,81	38
2	5,853	44	5,449	48	5,14	43
3	6,130	23	5,681	28	5,98	19
1	5,736	33	5,391	22	5,80	34
2	5,983	29	5,429	32	5,26	26
3	5,800	23	5,673	19	5,70	26
4	6,169	15	5,597	27	6,07	14
1	5,743	28	5,461	19	6,16	17
2	5,985	23	5,619	28	5,81	21
3	5,728	19	5,658	5	5,70	30
4	5,856	18	5,583	25	5,14	20
5	6,238	12	5,358	23	4,60	12

Таблица 2. Результаты кластерного анализа фрактального показателя листовой пластины осины

Кластеры	Наветренная опушка		Подветренная опушка		Фон	
	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев	P/S <sup>0,5</sup>	% листьев
1	4,634	54	4,569	28	4,613	58
2	4,633	46	4,551	72	4,594	42
1	4,626	40	4,582	56	4,707	12
2	4,625	29	4,534	33	4,575	56
3	4,652	31	4,496	11	4,603	32
1	4,615	31	4,513	7	4,600	6
2	4,679	12	4,585	47	4,579	36
3	4,636	30	4,589	20	4,625	50
4	4,633	27	4,492	26	4,604	8
1	4,544	17	4,585	47	4,600	6
2	4,699	13	4,532	7	4,604	8
3	4,598	35	4,602	18	4,589	32
4	4,665	33	4,492	26	4,602	26
5	4,679	12	4,383	2	4,629	28

**Список литературы / References:**

1. Бухарина И.Л. Эколого-биологические особенности адаптации древесных растений в условиях усиленной техногенной нагрузки. *Принципы и способы сохранения биоразнообразия*. Матер. IV Всерос. науч. конф. Йошкар-Ола: Изд-во Мар. гос. ун-та, 2010, с. 4-7. [Bukharina I.L. Ecological and biological features of adaptation of woody plants in conditions of increased anthropogenic load. *Principles and methods of biodiversity conservation*. Mater. IV Vseros. nauch. konf. Ioshkar-Ola: Izd-vo Mar. gos. un-ta, 2010, pp. 4-7. (In Russ.)]
2. Коробова Н.Л., Коробова А.Н. К вопросу о целесообразности биоиндикации загрязнения атмосферы урбосистем с помощью высших растений. *Естествознание и гуманизм*, 2007, т. 4, № 4, с. 70-71. [Korobova N.L., Korobova A.N. To the question of expediency of bioindication of air pollution of urban systems by means of higher plants. *Estestvoznaniye i gumanizm*, 2007, vol. 4, no. 4, pp. 70-71. (In Russ.)]
3. Бельская Е.А., Воробейчик Е.Л. Динамика трофической активности филлофагов березы в период снижения атмосферных выбросов медеплавильного завода. *Экология*, 2018, т. 1, с. 74-80. [Bel'skaya Ye.A., Vorobeychik Ye.L. Dynamics of trophic activity of birch phyllophages during the period of decreasing atmospheric emissions from a copper smelter. *Ekologiya*, 2018, vol. 1, pp. 74-80. (In Russ.)]
4. Павлов И.Н. Биологический мониторинг техногенного загрязнения по морфометрическим показателям древесных растений. *Фундаментальные исследования*, 2006, № 8, с. 34-37. [Pavlov I.N. Biological monitoring of technogenic pollution by morphometric indicators of woody plants. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2006, no. 8, pp. 34-37. (In Russ.)]
5. Хузина Г.Р. Влияние урбаноcреды на морфометрические показатели листа березы повислой (*Betula pendula* Roth.). *Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле*, 2010, № 3, с. 53-57. [Khuzina G.R. Influence of urban environment on morphometric parameters of birch leaf (*Betula pendula* Roth.). *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Biologiya. Nauki o Zemle*, 2010, no. 3, pp. 53-57. (In Russ.)]
6. Колмогорова Е.Ю. Морфометрическая характеристика древесных растений, произрастающих в условиях воздействия выбросов автотранспорта. *Живые и биокосные системы*, 2013, № 4. [Kolmogorova Ye.Yu. Morphometric characteristics of woody plants growing under the influence of vehicle emissions. *Zhivyye i biokosnyye sistemy*, 2013, no. 4. (In Russ.)]
7. Кончина Т.А., Гусева М.В. Влияние техногенного загрязнения на некоторые биологические характеристики рудеральных растений. *Молодой ученый*, 2015, № 23, т. 2 (103.2), с. 118-122. [Konchina T.A., Guseva M.V. Influence of technogenic pollution on some biological characteristics of ruderal plants. *Molodoy uchenyy*, 2015, no. 23, vol. 2 (103.2), pp. 118-122. (In Russ.)]
8. Петункина Л.О., Сарсацкая А.С. Береза повислая как индикатор качества городской среды. *Вестник Кемеровского государственного университета*, 2015, с. 68. [Petunkina L.O., Sarsatskaya A.S. Hanging birch as an indicator of the quality of the urban environment. *Vestnik Kemerovskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2015, p. 68. (In Russ.)]
9. Ростунов А.А., Кончина Т.А. Влияние техногенных загрязнений на физиологические показатели листьев древесных растений. *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*, 2016, т. 15, с. 68-79. [Rostunov A.A., Konchina T.A. Influence of technogenic pollution on the physiological parameters of leaves of woody plants. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Biologiya. Ekologiya»*, 2016, vol. 15, pp. 68-79. (In Russ.)]

10. Савинов А.Б., Ерофеева Е.А., Никитин Ю.Д. Морфологическая изменчивость и биохимические показатели листьев в ценопопуляциях *Aegopodium podagraria* L. (Apiaceae, Apiales) при разных уровнях загрязнения почв тяжелыми металлами. *Поволжский экологический журнал*, 2018, № 3, с. 315-326. [Savinov A.B., Yerofeeva Ye.A., Nikitin YU.D. Morphological variability and biochemical parameters of leaves in cenopopulations of *Aegopodium podagraria* L. (Apiaceae, Apiales) at different levels of soil contamination with heavy metals. *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal*, 2018, no. 3, pp. 315-326. (In Russ.)]
11. Еськова Е.Н. Влияние автотранспортной загрязненности придорожной территории на морфометрические характеристики подорожника большого (PLANTO MAIOR). *Вестник КрасГАУ*, 2018, № 4, с. 235-239. [Yes'kova Ye.N. Influence of road traffic pollution on the morphometric characteristics of the large plantain (PLANTO MAIOR). *Vestnik KrasGAU*, 2018, no. 4, pp. 235-239. (In Russ.)]
12. Тюлькова Е.Г. Морфометрические параметры и зольность древесных и травянистых растений гомельского региона как факторы их адаптации к техногенным условиям среды. *Известия Гомельского университета им. Ф.Скорины*, 2017, т. 94, № 1, с. 28-36. [Tyul'kova Ye.G. Morphometric parameters and ash content of woody and herbaceous plants of the Gomel region as factors of their adaptation to technogenic environmental conditions. *Izvestiya Gomel'skogo universiteta im. F.Skoriny*, 2017, vol. 94, no. 1, pp. 28-36. (In Russ.)]
13. Агафонова Д.А., Артеменко С.В. Влияние антропогенной нагрузки на морфобиологические показатели ивы ломкой (*salix fragilis*) в районах г. Тюмени. *Экология городской среды: история, современность и перспективы*. Сборник статей всероссийской научно-практической конференции с международным участием 25-26 октября 2018 г., г. Астрахань, с. 11-17. [Agafonova D.A., Artemenko S.V. Influence of anthropogenic load on the morphophysiological parameters of the brittle willow (*salix fragilis*) in the districts of Tyumen // *Ekologiya gorodskoy sredy: istoriya, sovremennost' i perspektivy*. Sbornik statey vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem 25-26 oktyabrya 2018 g., g. Astrakhan', pp. 11-17. (In Russ.)]
14. Сейдафаров Р.А. Возрастная динамика площади листовой пластинки липы мелколистной в различных типах техногенных условий. *Вестник БГТУ им. В.Г. Шухова*, 2013, № 1, с. 121-124. [Seydafarov R.A. Age dynamics of the leaf blade area of small-leaved linden in various types of technogenic conditions. *Vestnik BGTU im. V.G. Shukhova*, 2013, no. 1, pp. 121-124. (In Russ.)]
15. Гурова Н.Н., Гуров А.В. Изменение параметров листовой пластинки березы и активность филофагов в зоне воздействия Ачинского НПЗ. *Лесные биогеоценозы бореальной зоны: география, структура, функции, динамика*. Матер. междунар. конференции. Красноярск, Россия, 16-19 сентября 2014, с. 319-321. [Gurova N.N., Gurov A.V. The change in the parameters of the leaf blade of birch and the activity of phyllophagous in the zone of influence of Achinsk refinery. *Forest biogeocenoses of the boreal zone: geography, structure, functions, dynamics*. Mater. Mezhdunar. konf. Krasnoyarsk, Russia, 16-19 sent. 2014, pp. 319-321. (In Russ.)]
16. Гурова Н.Н., Дигурова И.И., Гусев С.Д. Оценка влияния постоянно действующего факела Ачинского НПЗ на морфологические параметры листьев березы и осины. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, Севастополь, 2019, т. 4, № 4, с. 585-589. [Gurova N.N., Digurova I.I., Gusev S.D. Assessment of the effect of a permanent torch of the Achinsk refinery on the morphological parameters of birch and aspen leaves. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, Sevastopol', 2019, vol. 4, no. 4, pp. 585-589. (In Russ.)]
17. Гурова Н.Н., Дигурова И.И. Изменение морфометрических параметров листовой пластины при действии техногенного фактора. *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*, 2019, том. 2, с. 342-343. [Gurova N.N., Digurova I.I. Changes in the morphometric parameters of the leaf plate under the influence of the technogenic factor. *Sbornik nauchnykh trudov VI s"yezda biofizikov Rossii*, 2019, vol. 2, pp. 342-343. (In Russ.)]
18. Легощина О.М. Дендрэкологическая характеристика березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях смешанного типа загрязнения окружающей среды: Уфимский промышленный центр: Автореф дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2018, 24 с. [Legoshchina O.M. *Dendroecological characteristics of silver birch (Betula pendula Roth.) In conditions of mixed type of environmental pollution: Ufa industrial center: Avtoref dis. ... kand. biol. nauk.* Tomsk, 2018, 24 p. (In Russ.)]
19. Федоряка Н.И. Морфобиологические особенности и математическая интерпретация параметров листьев сортов земляники в условиях ЦЧР: Автореф. дисс. ... канд.с-х.наук. Мичуринск, 2004, 24 с. [Fedoryaka N.I. *Morphobiological features and mathematical interpretation of the parameters of the leaves of strawberry varieties in the conditions of the Central Black Earth Region: Avtoref.diss. ... kand.s-kh.nauk.* Michurinsk, 2004, 24 p. (In Russ.)]
20. Алексейченко Н.А., Лиханов А.Ф. Вариабельность морфологических и биохимических признаков листьев растений рода *TILTA* L. в урбанизированной среде. *Наук. праці Лісівничої акад. наук України*, 2017, № 14, с. 23-30. [Alekseychenko N.A., Likhanov A.F. Variability of morphological and biochemical characteristics of leaves of plants of the genus *TILTA* L. in an urbanized environment. *Science. works of the Forestry Academy. Sciences of Ukraine*, 2017, no. 14, pp. 23-30. (In Russ.)]

**COMPARATIVE ANALYSIS OF MORPHOMETRIC INDICATORS OF BIRCH AND ASPEN LEAF PLATES UNDER LONG TECHNOGENIC EXPOSURE****Gurova N. N.<sup>1</sup>, Digurova I. I.<sup>2</sup>, Gusev S. D.<sup>3</sup>**<sup>1</sup> Siberian Federal University*Svobodnyj av., 79/10, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: nina-guro@mail.ru*<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University*Ostrovitianov str., 1, Moscow, 117997, Russia; e-mail: digurova56@mail.ru*<sup>3</sup> Krasnoyarsk state medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky*Partizan Zheleznyak str., 1, Krasnoyarsk, 660022, Russia; e-mail: sdg53@rambler.ru*

**Abstract.** The article discusses the results of a comparative analysis of the morphometric parameters of the leaves of the main forest-forming species near a permanent gas flare torch for burning unprocessed waste gases. Comparative analysis was performed on the results of measuring the perimeter and area of leaf plates, as well as the fractal parameter – the ratio of the perimeter of the sheet to the square root of the leaf sheet area. The long-term influence of the technogenic factor on the mixed aspen-birch plantation was assessed using alternative mathematical methods aimed at the possible detection of hidden information and providing reliable interpretation in large data sets. The results obtained allowed us to assume the presence of optimization of the morphometric parameters of leaves, more pronounced in birch. Along the transect, the fractal exponent increased with approaching the source of pollution.

**Key words:** *foliage plate morphometry, torch for burning of passing gases, aspen-birch plantation.*

## РАЗРАБОТКА АВТОНОМНОЙ ЭКСПЕДИЦИОННОЙ УСТАНОВКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Гулин А.С., Тренкеншу Р.П.

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

ул. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: gulins\_gent@mail.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** В работе сформулированы основные проблемы, связанные с исследованием микроводорослей в экспедиционных условиях. Проведено обоснование необходимости разработки автономной экспедиционной установки, предназначенной для оценки первичной продукции водоемов, непосредственно у водоема, в условиях отсутствия лабораторных условий. После рассмотрения задач, которые предстоит решить с помощью экспедиционной установки, составлен перечень необходимых систем с их подробным описанием.

**Ключевые слова:** экспедиционная установка для исследования роста микроводорослей, культиватор, хемостат, измерение оптической плотности.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время микроводоросли все чаще находят применение в научно-исследовательских, медицинских и промышленных целях.

Их клетки богаты витаминами, белками, углеводами, микро и макроэлементами не только количественно, но и качественно. Известен опыт применения микроводоросли *S. platensis*, в пищевой промышленности, в качестве высокобелковых и витаминизированных пищевых добавок, а также как биостимулятора и регулятора роста.

Широкий спектр применения микроводорослей в сельском хозяйстве. В качестве кормовых добавок в животноводстве и птицеводстве.

Микроводоросли могут быть промышленным сырьем для получения альгиновых кислот и альгинатов, сорбита, этилового и метилового спиртов, ацетона, органических кислот, эфиров, нитроцеллюлозы, меченых аминокислот, стеролов, инсектицидов, репеллентов [1].

Микроводоросли служат эффективным преобразователем световой энергии, являются источниками витаминов, растительного белка, в связи с этим представляют интерес в качестве объекта биотехнологии [2-5].

Перечисленные факторы позволяют сделать вывод, что исследование и культивирование микроводорослей является востребованной и актуальной задачей.

Производство биомассы микроводорослей заключается в синтезе ими белков, углеводов, липидов, витаминов и других соединений из углекислого газа, соды, воды и минеральных солей, находящихся в питательной среде, с помощью энергии света. Микроводоросли имеют короткий цикл роста, производство не требует больших затрат: для их культивирования требуется только вода, солнечный свет, питательные вещества, не требуется плодородная почва и дорогостоящие удобрения, нет ограничений, связанных с сезонностью.

В связи с изложенными аспектами возникает вопрос о способах культивирования микроводорослей. Разработка систем культивирования микроводорослей является популярной задачей [6, 7]. Разработчики предлагают разные виды конструкций, от самых простых лабораторных культиваторов, заканчивая дорогостоящими автоматизированными промышленными образцами [8-10].

При изучении роста микроводорослей непосредственно в природном водоеме, мы сталкиваемся с тем, что водоросли растут и выедаются там же. В результате подсчет оказывается сильно затруднен.

При проведении исследований культура из водоема, как правило, перевозится из водоема в исследовательскую лабораторию, где помещается в культиватор. В результате получаются косвенные данные, это связано с такими факторами, как несоответствие температуры и химического состава воды в лабораторном культиваторе параметрам водоема.

В экспедиционных условиях лабораторные условия как правило отсутствуют. Этот фактор фактически исключает проведение исследований микроводорослей непосредственно в полевых условиях (в водоеме).

Таким образом, разработка экспедиционной установки для исследования микроводорослей является востребованной задачей в связи с возможностью проводить оценку первичной продукции водоемов. Установка предоставит возможность проводить исследования вне лаборатории в естественных условиях, приближенных к ситуации в водоеме, а также получать новые знания о процессах роста и накопления биохимических компонентов клетками микроводорослей.

В данной работе предлагается проект экспедиционной установки, обеспечивающей рост культуры микроводорослей как в различных режимах при требуемых удельных скоростях потока.

При проведении экспедиционных работ применение установки позволит производить исследование культур микроводорослей в условиях максимально приближенных к естественным, поскольку и культура, и вода берутся непосредственно из водоема. Температура и химический состав воды и интенсивность освещения также соответствуют природным характеристикам.



К устройству экспедиционной установки предъявляется ряд требований исходя из факторов, ограничивающих рост культуры микроводорослей. Таких как: световые условия, поддержание температурного режима, газовое обеспечение и минеральные компоненты питательной среды [11, 12]. Все эти факторы оказывают влияние на форму накопительной кривой.

### УСТРОЙСТВО УСТАНОВКИ

Для реализации требуемого функционала, в конструкцию установки необходимо включить несколько отдельных систем, таких как: культиватор, система газообеспечения, систем освещения, система поддержания температурного режима, система обеспечения режима культивирования, контрольно-измерительной системы, системы подачи питательной среды и система питания.

#### **Перечень систем установки:**

1. Ёмкость культиватора;
2. система освещения;
3. система газообеспечения;
4. система поддержания температурного режима;
5. система обеспечения режима культивирования;
6. контрольно-измерительная система;
7. система подачи питательной среды;
8. система питания.

#### **Культиватор.**

Представляет собой ёмкость, минимальный объем которой должен позволять обеспечивать условное невмешательство в процессы роста [13].

Для обеспечения достаточного количества биомассы и ежедневного отбора проб оптимальным является компромисс между толщиной освещаемого слоя и общим объемом фотобиореактора при его небольших размерах и весе.

Для поддержания постоянного уровня освещенности фронтальные стенки культиватора целесообразно изготовить из стекла.

Для экспедиционной установки наиболее оптимально использовать горизонтальную конструкцию культиватора. Горизонтальная конструкция по сравнению с вертикальной более устойчива и позволяет снизить затраты энергии на перемешивание культуры. Так же горизонтальная схема обеспечивает более эффективное использование естественного освещения, что в свою очередь снижает потребление системой освещения.

Но главным преимуществом такой конструкции является максимальное приближение условий роста к естественным. В дальнейшем горизонтальная конструкция позволит переносить данные на промышленные системы культивации микроводорослей (бассейны).

#### **Система освещения.**

Удельная освещенность клеток складывается из поверхностной освещенности, которая обусловлена мощностью световой матрицы, освещаемого ею слоя фотобиореактора и интенсивности перемешивания культуры.

Для реализации максимальной скорости роста культур микроводорослей необходимы мощные источники света, тонкий освещаемый слой при активном перемешивании суспензии клеток.

Но учитывая экспедиционное использование установки, необходимо добиться минимального энергопотребления. В связи с этим, в качестве источника света целесообразно использование светодиодной матрицы. Необходимо предусмотреть регулировку интенсивности светового излучения путем изменения яркости свечения светодиодной матрицы, как в ручном режиме, так и в автоматическом.

Средняя освещенность на поверхности фотобиореактора составляет 10 кЛк на расстоянии 5 см от источника света.

#### **Система газообеспечения.**

Служит для обеспечения равномерного перемешивания суспензии микроводорослей внутри ёмкости культиватора и распределения питательных веществ между клетками. Также эта система реализует подачу в культиватор углекислого газа и вынос кислорода, являющегося побочным продуктом фотосинтеза. Основным элементом системы является малогабаритный аквариумный компрессор. Также компрессор обеспечивает перемешивание суспензии для равномерного распределения клеток в культиваторе и, соответственно, равномерного освещения.

Для обеспечения максимальной продуктивности необходимо увеличить подачу углекислого газа в фотобиореактор до максимального предела, который составляет 5% от газо-воздушной смеси [14]. Применение аквариумного насоса, баллона с углекислым газом, смесителя с обратным клапаном, позволит обеспечить выполнение данного режима работы.

Для автоматизации работы системы газо-обеспечения необходимо предусмотреть датчик концентрации углекислого газа (CO<sub>2</sub>) и датчик содержания кислорода.

#### **Система поддержания температурного режима.**

При работе в экспедиционных условиях в теплое время года культиватор будет подвергаться повышенному нагреву от солнечных лучей. Для поддержания температурного режима необходимо реализовать как систему охлаждения, так и систему для подогрева культиватора.

Систему охлаждения целесообразно выполнить в виде водяной рубашки на корпусе культиватора и обеспечить циркуляцию посредством насоса через нее воды из водоема. Изменение скорости потока воды через водяную рубашку позволит поддерживать температуру в фотореакторе на заданном уровне. Для повышения эффективности охлаждения в теплое время года целесообразно применить дополнительный вентилятор, охлаждающий водяную рубашку.

Для поддержания заданной температуры в холодное время года возможно использование современных аквариумных нагревателей с возможностью поддержания заданной температуры.

#### **Система обеспечения режима культивирования.**

Основными задачами системы является анализ в непрерывном режиме сигналов, поступающих от датчиков контрольно-измерительной системы с последующей записью их значений на карту памяти и обеспечение стабильной работы остальных систем установки.

Для реализации поставленных задач, в системе обеспечения режима культивирования целесообразно использовать микропроцессорную систему на базе платформы Arduino.

Основные преимущества платформы Arduino:

Низкая стоимость по сравнению с другими платформами;

кросс-платформенность – программное обеспечение Arduino работает под ОС Windows, Macintosh OSX и Linux. Большинство микроконтроллеров ограничивается ОС Windows;

простая и понятная среда программирования – среда Arduino IDE подходит как для начинающих пользователей, так и для опытных.

#### **Контрольно-измерительная система.**

Измерительная система предназначена для контроля над основными параметрами процесса и возможность простого управления ими. Включает в себя несколько датчиков с системами анализа и управления:

Измеритель оптической плотности

Предназначен для оценки биомассы культуры микроводорослей в режиме постоянного времени на всех стадиях роста. Данная задача продолжает оставаться одной из сложнейших в теоретическом, так и в практическом плане. Наиболее востребованным и точным методом для оценки биомассы является спектрофотометрический.

Устройство представляет собой фотометрическую ячейку, состоящую из стеклянной кюветы, изолированной от внешних источников освещения. С одной стороны кюветы находится монохроматический светодиод, световой поток которого направлен таким образом, чтобы полностью освещать кювету по всей площади. С обратной стороны кюветы находится фотоэлемент, к которому подключен вольтметр, регистрирующий изменение напряжения на фотоэлементе. Циркуляция культуры через кювету, обеспечивается аквариумным насосом.

Принцип действия фотометрической ячейки основан на применении закона свето-поглощения Бугера-Ламберта-Бера.

Источником света является монохроматический полупроводниковый светодиод красного цвета свечения. Световое излучение от светодиода проходит через проточную ячейку и частично поглощается исследуемой культурой микроводоросли. Прошедшее через ячейку световое излучение попадает на фотоприемник, в качестве которого используется полупроводниковый фотоэлемент. В фотоприемнике происходит преобразование света в электрический фототок, пропорциональный силе света. Дальнейшее передача фототока на систему управления позволит определять оптическую плотность в режиме реального времени, а также контролировать рост культуры микроводоросли.

Измеритель подключен непосредственно к культиватору и работает с проточной культурой, передавая данные на систему обеспечения режима культивирования, для их последующей обработки и записи.

Измеритель освещенности предназначен для определения количества световой энергии, попадающей на поверхность культиватора как от естественного освещения, так и от светодиодной матрицы. Чувствительность датчика составляет 100 мВ на 10 кЛк. В диапазоне 0-200 мВ сохраняется линейная зависимость между освещенностью и вольт-амперными характеристиками, что и составляет измерительный диапазон прибора.

Измеритель pH предназначен для измерения кислотных и/или щелочных показателей, активности ионов водорода в жидкостях и активности других одновалентных катионов, оснащен температурной компенсацией и имеет высокую точность ( $\pm 0,005$  pH). Датчик измерителя установлен непосредственно в емкости культиватора и позволяет получать данные в режиме реального времени.

Цифровой термометр необходим для контроля температуры и поддержания температурного режима питательной среды в культиваторе в процессе проведения исследований. Диапазон измерения температуры от 0 до  $+50^{\circ}\text{C}$ , погрешность  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

#### **Система подачи питательной среды.**

Система предназначена для обеспечения роста микроводорослей в режиме хемостата. Состоит из емкости для питательной среды и электромагнитного клапана. В качестве емкости для питательной среды целесообразно использовать 5-и литровый пластиковый бак. Питательная среда через шланг поступает к электромагнитному клапану, находящемуся в нормально закрытом состоянии.

При подаче управляющего сигнала от системы обеспечения режима культивирования, на клапан подается напряжение, он открывается, и питательная среда поступает в культиватор. Необходимо реализовать регулировку скорости подачи питательной среды, как программно, так и в ручном режиме.

#### Система питания.

В автономной экспедиционной установке к системе питания, предъявляются жесткие требования по обеспечению стабильной работы. Основная задача системы – обеспечение непрерывности электропитания как при наличии сети электропитания 220 В, так и при ее отсутствии.

В экспедиционных условиях очень важно в случае отключения или ухудшения качества электрической энергии на входе сетевого питания 220, обеспечить переход питания нагрузки на аккумуляторные батареи для непрерывного питания установки.

Для этих задач целесообразно применить инвертор 12 В – 220 В с системой бесперебойного питания мощностью не менее 1000 Вт и свинцовую батарею с напряжением 12 В и ёмкостью не менее 100 а/ч.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В предлагаемом проекте автономной экспедиционной установки, разработана оптимальная конструкция. Данная система в экспедиционных условиях позволит производить контроль основных параметров роста и физиологического состояния микроводорослей, а также возможность простого управления ими в непосредственной близости у водоема.

Главными преимуществами данной системы является мобильность, простота конструкции, доступность ремонта, возможность дальнейшего усовершенствования и также невысокая стоимость.

Применение установки в экспедиционных условиях, позволит в режиме реального времени получать данные о росте различных видов микроводорослей непосредственно у водоема, без использования специальной лаборатории.

*Работа выполнена на базе ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ, в рамках темы госзадания № 0556-2021-0004 «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса».*

#### Список литературы / References:

1. Топачевский А.В. *Пресноводные водоросли Украинской ССР*. К.: Вища школа, 1984, 336 с. [Topachevsky A.V. *Freshwater algae of the Ukrainian SSR*. K.: Vishcha school, 1984, 336 p. (In Russ.)]
2. *Курс низших растений*. М.: Высшая школа, 1981, 520 с. [Course of lower plants. M.: Higher school, 1981, 520 p. (In Russ.)]
3. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Терентьева Н.В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор. *МЭЖ*, 2008, № 2, с. 5-23. [Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Chubchikova I.N., Terentyeva N.V. Single-celled algae as a renewable biological resource: a review. *MEJ*, 2008, no. 2, pp. 5-23. (In Russ.)]
4. Тренкеншу Р.П., Геворгиз Р.Г., Боровков А.Б. *Основы промышленного культивирования дуналиеллы солоноводной (dunaliella salina teod.)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005, с. 103. [Trenkenshu R.P., Gevorgiz R.G., Borovkov A.B. *Fundamentals of industrial cultivation of dunaliella salina teod.* Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2005, p. 103. (In Russ.)]
5. *Водоросли*: Справочник. Киев, 1989, 608 с. [Algae: A Handbook. Kiev, 1989, 608 p. (In Russ.)]
6. Цыганков А.А., Елизаров Е.Е. Патент РФ № RU2451446C1, 29.09.2010. *Фотобиореактор*. Опубликовано: 27.05.2012 Бюл. № 15. [Tsygankov A.A., Elizarov E.E. RF patent no. RU2451446C1, 09/29/2010. *Photobioreactor*. Published: 27.05.2012 Bul. no. 15. (In Russ.)]
7. Перт С.Д. *Основы культивирования микроорганизмов*. М.: Мир, 1978, 331 с. [Perth S.D. *Fundamentals of the cultivation of microorganisms*. M.: Mir, 1978, 331 p. (In Russ.)]
8. Fabregas J., Garcia D., Morales E. Renewal rate of semi-continuous culture of the microalga *Por-phyridium cruentum* modifies phyco-erythrin, exopolysaccharoide and fatty acid productivity. *J. Ferment. Bioengin.*, 1998, vol. 86, no. 5, pp. 463-467.
9. Novick A., Szilard L. Description of the chemostat. *Scien.*, 1950, vol. 112, pp. 715-718.
10. Vonshak A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. *Handbook of micro-algal mass culture*, 1986, pp. 117-145.
11. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура. *Экология моря*, 2005, № 67, с. 89-97. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth. 1. Periodic culture. *Ecology of the Sea*, 2005, no. 67, pp. 89-97. (In Russ.)]
12. *Курс низших растений*. М.: Высшая школа, 1981, 520 с. [Course of lower plants. M.: Higher school, 1981, 520 p. (In Russ.)]
13. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1, с. 28.

[Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Standardized installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1, p. 28. (In Russ.)]

14. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей в культуре*. Белгород: ООО «Константа», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling the growth of microalgae in culture*. Belgorod: LLC "Constanta", 2017, 152 p. (In Russ.)] DOI: 10.21072/978-5-906952-28-8.

#### DEVELOPMENT OF AN AUTONOMOUS EXPEDITION UNIT FOR RESEARCHING MICROALGAE UNDER NATURAL CONDITIONS

**Gulin A.S., Trenkenshu R.P.**

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

*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: gulins\_gent@mail.ru*

**Abstract.** The paper formulates the main problems associated with the study of microalgae in expeditionary conditions. The substantiation of the need for the development of an autonomous expeditionary installation designed to assess the primary production of reservoirs, directly at the reservoir, in the absence of laboratory conditions has been carried out. After considering the tasks to be solved with the help of the expeditionary installation, a list of the necessary systems with their detailed description has been compiled.

**Key words:** *expeditionary installation for studying the growth of microalgae, cultivator, chemostat, measurement of optical density.*