

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 7, № 3
2022**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 7, № 3
2022**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 7, No. 3, 2022**

Севастополь
2022

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 7, № 3, 2022

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- И.А. Шаев, Е.В. Яблокова, В.В. Новиков**
Временная динамика продукции активных форм кислорода нейтрофилами после обработки в гипомагнитных условиях..... 363
- К.Ф. Сергейчев, Л.М. Апашева, Н.А. Лукина, М.И. Будник, Е.Н. Овчаренко, А.В. Лобанов**
Вода, активированная СВЧ-плазмой, как регулятор роста хвойных 369
- Л.М. Апашева, М.И. Будник, Л.А. Смурова, Е.Н. Овчаренко, А.В. Лобанов, В.В. Савранский, В.В. Турбин, М.В. Розанцев**
Использование лазерного импульсного излучения и растворов экопероксида для активации семян сахарной свеклы.....374
- Е.В. Семенова, В.И. Лобышев**
Электропроводность водных растворов аланина и валина, приготовленных итерационным методом разбавления с последующим интенсивным механическим воздействием379
- А.А. Цай, Т.И. Васильева, В.А. Глуценков, Н.А. Роденко**
Влияние импульсного магнитного поля на компоненты амилолитической реакции 384
- Н.Н. Тимченко, И.В. Головченко**
Температурное поведение гемоглобина 388

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- И.В. Кручинин, Л.В. Яковенко**
Два конкурирующих механизма при агрегации *Dictyostelium discoideum* 393
- В.В. Костюков, С.В. Леонтьева, Е.В. Савченко, К.А. Рыбакова, Д.П. Воронин**
TD-DFT study of Toluidine blue O in aqueous solution: vibronic transitions and electronic properties 399
- Д.К. Чистюлин, Е.А. Зелепуга, В.А. Хоменко, Н.Н. Баланева, Е.А. Чингизова, О.Д. Новикова**
Взаимодействие канала OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* с норфлоксацином 408
- В.В. Войнаровский, Г.Г. Мартинович**
Защитные свойства эритроцитов при гемолизе и их регуляция окислителями 413
- С.В. Аксенова, А.С. Батова, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов**
Влияние модуляторов на активацию рецептора NMDA418

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, Е.В. Михлина, И.И. Рыжков, В.С. Бондарь**
Сенсорный композит нановолокна $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ / наноалмазы / Cu^{2+} с увеличенной каталитической активностью для детекции фенолов в водной среде 423
- Г.А. Набережных, А.А. Сергеев, О.Д. Новикова**
Квантовые точки сульфида кадмия, полученные с использованием белков-порин, каррагинанов, хитозанов и липополисахаридов..... 428
- Е.В. Проскурнина, М.М. Созарукова, М.В. Федорова, М.В. Киселева**
Анализ активности микросомальных редуктаз ткани яичников после криоконсервации методом активированной хемилюминесценции..... 434
- М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов, Т.И. Старикова, Н.Г. Сараджи**
Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного пероксидом водорода, и их регулирование..... 440
- А.Г. Соловьева**
Влияние оксида азота на кинетические свойства ферментов антиоксидантной защиты крови при экспериментальной термической травме 446
- А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина**
Цистамин и цистин подавляют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки..... 451
- М.В. Новаковская, М.М. Игнатьева, И.А. Черенков**
Влияние липополисахарида сальмонеллы на диффузию толуидинового синего в альгинатном гидрогеле 458
- Р.В. Бутяев, Д.А. Чернышев, Э.С. Михайлец, Л.В. Плотникова, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко**
Применение метода главных компонент для анализа ИК спектров сыворотки крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями 462
- О.М. Масленникова, А.Л. Сибирев, М.Н. Шипко, М.А. Степович**
Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ 467
- Н.А. Гребешкова, А.А. Глотов, Н.А. Роденко**
Исследование воздействия импульсного магнитного поля на биологическую активность 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил) метанимина 476
- М.С. Конькова, Е.С. Ершова, Н.Н. Вейко, А.А. Кальянов, Е.М. Малиновская, Л.В. Каменова, В.П. Вейко, С.В. Костюк**
Окислительная модификация ДНК плазмид способствует их проникновению в цитоплазму мезенхимных стволовых клеток человека..... 481
- А.В. Ерофеев, Н.В. Грановский, П.И. Селиванова, А.И. Шугаева, А.С. Шаракшанэ, М.И. Щербаков, А.Д. Мансфельд, А.А. Аносов**
Контроль параметров температурного распределения в предплечье человека при процедуре УВЧ-гипертермии методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии 486

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**М.В. Фадеева, Е.В. Сергеева, К.А. Рыбакова, А.В. Кузнецов**Характеристика семейства катионных TRPA1-каналов *Trichoplax* SP. H2 (Placozoa)..... 493**О.А. Гасюк, Н.Н. Волченко, А.А. Лазукин, А.А. Самков, А.А. Худокормов**Биоэлектрогенез микробных топливных элементов в присутствии *Shewanella oneidensis* MR-1 и некоторых тяжелых металлов501**Е.В. Бажина, В.В. Стасова**

Особенности структуры кроны и строения побегов пихты сибирской разной сексуализации 505

Н.В. Бурдиян

Распределение анаэробных бактерий в донных осадках в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины (на примере прибрежной акватории Севастополя, Крым, Чёрное море)511

CONTENTS

Volume 7, No. 3, 2022

GENERAL BIOPHYSICS

- V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev**
Time dynamics of production of reactive oxygen species by neutrophils after treatment under hypomagnetic conditions..... 363
- K.F. Sergeychev, L.M. Apasheva, N.A. Lukina, M.I. Budnik, E.N. Ovcharenko, A.V. Lobanov**
Water activated by UHF-plasma as a growth for conifer seedlings 369
- L.M. Apasheva, M.I. Budnik, L.A. Smurova, E.N. Ovcharenko, A.V. Lobanov, V.V. Savransky, V.V. Turbin, M.V. Rozancev**
Use of laser pulsed radiation and ecoperoxide solutions for activation of sugar beet seeds374
- E.V. Semenova, V.I. Lobyshev**
Conductivity of aqueous solutions of alanine and valine prepared by the iterative dilution method followed by intensive mechanical impact.....379
- A.A. Tsay, T.I. Vasilyeva, V.A. Glushchenkov, N.A. Rodenko**
The effect of an impulse magnetic field on the components of the amylolytic reaction 384
- N.N. Timchenko, I.V. Golovchenko**
Hemoglobin temperature behavior 388

MODELLING IN BIOPHYSICS

- I.V. Kruchinin, L.V. Yakovenko**
Two competing mechanisms in aggregation of *Dictyostelium discoideum*..... 393
- V.V. Kostjukov, S.V. Leontieva, E.V. Savchenko, K.A. Rybakova, D.P. Voronin**
TD-DFT study of Toluidine blue O in aqueous solution: vibronic transitions and electronic properties 399
- D.K. Chistyulin, E.A. Zelepuga, V.A. Khomenko, N.N. Balaneva, E.A. Chingizova, O.D. Novikova**
Interaction of the *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin channel with norfloxacin 408
- V.V. Voinarovski, G.G. Martinovich**
Protective properties of erythrocytes during hemolysis and their regulation by oxidants 413
- S.V. Aksenova, A.S. Batova, A.N. Bugay, E.B. Dushanov**
Effects of modulators to the activation of NMDA receptors418

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, E.V. Mikhlina, I.I. Ryzhkov, V.S. Bondar**
Sensor composite γ -Al₂O₃ nanofibers / nanodiamonds / Cu²⁺ with enhanced catalytic activity for detection of phenols in aqueous medium..... 423
- G.A. Naberezhnykh, A.A. Sergeev, O.D. Novikova**
Quantum dots of cadmium sulfide produced with the use of proteins-porins, carrageenans, chitosans and lipopolysaccharides..... 428
- E.V. Proskurnina, M.M. Sozarukova, M.V. Fedorova, M.V. Kiseleva**
Analysis of microsomal reductase activity in ovarian tissue after cryopreservation by enhanced chemiluminescence..... 434
- M.A. Nakvasina, V.G. Artyukhov, T.I. Starikova, N.G. Saradzhi**
Ways of realization of apoptosis of human lymphocytes induced by hydrogen peroxide and their regulation 440
- A.G. Soloveva**
The influence of nitric oxide on kinetic properties of antioxidant protection enzymes in the blood during experimental thermal injury 446
- A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badyulina**
Cystamine and cystine suppress Na⁺ transport in frog skin epithelium..... 451
- M.V. Novakovskaya, M.M. Ignatieva, I.A. Cherenkov**
Influence of salmonella lipopolysaccharide on the diffusion of toluidine blue in alginate hydrogel..... 458
- R.V. Butyaev, D.A. Chernyshev, E.S. Mikhailets, L.V. Plotnikova, A.D. Garifullin, A.Yu. Kuvshinov, S.V. Voloshin, A.M. Polyanchko**
Application of the principal component analysis to IR spectra of blood serum of patients with oncohematological diseases..... 462
- O.M. Maslennikova, A.L. Sibirev, M.N. Shipko, M.A. Stepovich**
Features of protein-induced associates at superhigh dilution of antibodies to interferon- γ467
- N.A. Grebeshkova, A.A. Glotov, N.A. Rodenko**
Changes in the antimycotic activity of 1,1-Bis(1*H*-imidazol-1-yl)methanimin by the influence of a pulsed magnetic field476
- M.S. Konkova, E.S. Ershova, N.N. Veiko, A.A. Kalyanov, E.M. Malinovskaya, L.V. Kameneva, V.P. Veiko, S.V. Kostyuk**
Oxidative modification of plasmid DNA promotes their penetration into the cytoplasm of human mesenchymal stem cells.....481
- A.V. Erofeev, N.V. Granovsky, P.I. Selivanova, A.I. Shugaeva, A.S. Sharakshane, M.I. Shcherbakov, A.D. Mansfeld, A.A. Anosov**
Control of temperature distribution parameters in human forearm during UHF hyperthermia by passive acoustic thermometry and infrared thermography 486

ECOLOGICAL BIOPHYSICS**M.V. Fadeeva, E.V. Sergeeva, K.A. Rybakova, A.V. Kuznetsov**Characteristics of the cationic TRPA1-channels family in *Trichoplax* SP. H2 (Placozoa)..... 493**O.A. Gasyuk, N.N. Volchenko, A.A. Lazukin, A.A. Samkov, A.A. Khudokormov**Bioelectrogenesis of microbial fuel cells in the presence of *Shewanella oneidensis* MR-1 and some heavy metals501**E.V. Bazhina, V.V. Stasova**Crown structure and morphology peculiarities of *Abies sibirica* shoots with different sexualization..... 505**N.V. Burdiyan**

Distribution of anaerobic bacteria in bottom sediments depending on redox conditions and depth (by the example of the coastal water area of Sevastopol, Crimea, Black sea)511

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ В ГИПОМАГНИТНЫХ УСЛОВИЯХ

Шаев И.А., Яблокова Е.В., Новиков В.В.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: doctmag@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0527

Аннотация. Было показано, что инкубация суспензии перитонеальных нейтрофилов мышей в течение 30 минут в гипомангнитных условиях, полученных при помощи пермаллоевых магнитных экранов (постоянное магнитное поле не более 20 нТл, уровень переменных техногенных помех снижен до единиц нТл), вызывает существенное снижение (около 48%) интенсивности сигнала люцигенин-зависимой хемиллюминесценции, измеренного сразу после инкубации. Спустя 20 минут после магнитной обработки (с последующей инкубацией в условиях геомагнитного поля в течение этого времени, индукция 44 мкТл, уровень магнитных помех на частоте 50 Гц составлял 15-50 нТл) различия между контрольными и опытными группами сохраняются полностью (разница составила около 49%). Через 40 и 60 минут после воздействия «нулевого» поля с последующей выдержкой образцов в геомагнитном поле в течение указанных интервалов времени разница между контрольными и опытными образцами уменьшалась до 32% и 22% соответственно. Данный эффект зарегистрирован без дополнительной активации нейтрофилов химическими агентами, инициирующими респираторный взрыв, такими как формилованный пептид N-formyl-Met-Leu-Phe или форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетат, и не был связан с воздействием на клеточные системы, обеспечивающие этот взрыв.

Ключевые слова: гипомангнитное поле, геомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, хемиллюминесценция.

Активные формы кислорода (АФК) и другие свободные радикалы, вырабатываемые клетками, представляют собой молекулы, интенсивность продукции которых демонстрирует зависимость от магнитного окружения, в котором находятся клетки. Так, из литературных источников известно, что в различных типах клеток, находящихся в гипомангнитных условиях, продукция АФК снижается [1-4]. С учётом того, что АФК обладают как стрессорной, так и сигнальной активностями, эффект «нулевого» поля может, претерпевая трансформацию и усиление во внутриклеточных системах, проявляться, в том числе, в виде модуляций биологических функций целой клетки [5], включая изменения долговременного характера, связанные с перестройкой химического метаболизма. В предыдущих работах нами было показано, что экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей в гипомангнитных условиях приводит к снижению интенсивности внутриклеточной продукции АФК, которое было зарегистрировано при помощи методов флуоресцентного анализа и активированной хемиллюминесценции, с использованием как неселективных зондов к АФК - 2,7- дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрорадамина 123 [6-8], так и относительно селективного к супероксид-анион радикалу люцигенина [9-11]. При этом указанный эффект «нулевого» поля проявлялся без дополнительной стимуляции нейтрофилов химическими активаторами респираторного взрыва, и, следовательно, не был обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы [6,7]. В то же время оставался открытым вопрос о характере изменений в уровне продукции АФК после воздействия гипомангнитного фактора, и, более широко, об устойчивости этого эффекта во времени.

Для изучения временной динамики продукции АФК после воздействия «нулевого» поля нами был применен хорошо зарекомендовавший себя в предыдущих исследованиях по этой теме метод люцигенин-зависимой активированной хемиллюминесценции [11], который позволяет оперативно (в течение нескольких минут) оценивать изменения в скорости продукции АФК [9-11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 24–26 г., полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино Московская область). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 часов животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, и их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 1 час при 4° C (но не более чем на 3 часа, так как более длительное хранение в этом случае снижало хемиллюминесцентный ответ нейтрофилов на последующую добавку люцигенина). Эта процедура позволяла снизить спонтанную хемиллюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемиллюминесцентным

ответом, что обеспечивало возможность работы с ними в течение экспериментального дня. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов средой Хенкса (окончательный состав среды: 138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Нейтрофилы инкубировали при 37,0±0,1°C в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1,2 см и длиной 5,5 см), в которых затем измерялась люцигенин-зависимая хемилюминесценция суспензии нейтрофилов. Заданная температура поддерживалась циркуляционным водным термостатом.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (также одновременно проводилась последующая регистрация хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов в опытах с одинаковой продолжительностью их инкубации). Опытные образцы помещались в установку для формирования гипомагнитных условий на 30 минут, затем в образцах регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию (сразу после окончания инкубации в «нулевом» МП – опыты с «0» минутами последствия). Другие опытные группы образцов, сразу после окончания действия «нулевого» поля, переносили в условия инкубации в геомагнитном поле на 20, 40 и 60 минут с последующей регистрацией хемилюминесценции после окончания инкубации. Каждой экспериментальной группе образцов соответствовала своя контрольная группа, инкубируемая одновременно с опытной, но только в условиях ГМП.

В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура – установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл), и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [8,12]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 6). Опыты повторяли не менее трех раз.

Регистрация хемилюминесценции. После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0,35 мМ. В работе был использован 12 канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применялась программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При инкубации суспензии нейтрофилов в течение 30 минут в гипомагнитных условиях регистрируется существенное снижение (около 48%) хемилюминесцентного сигнала непосредственно после воздействия «нулевого» поля (рис. 1-3), что согласуется с данными предыдущих работ. Спустя 20 мин после магнитной стимуляции и пребывания образцов в течение этого времени в условиях геомагнитного поля выраженность эффекта сохранялась полностью (рис. 1-3), при этом разница между контролем и опытом составляла 49%. В то же время, в группах «40 и 60 мин после инкубации» наблюдалось уменьшение разницы в интенсивности хемилюминесценции между ними и контролем до 32% и 22% соответственно, что свидетельствовало об окончании периода устойчивого сохранения эффекта. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП не характеризуются наличием дополнительных максимумов (рис. 3).

В ходе эксперимента было отмечено, что с увеличением времени инкубации в геомагнитном поле имеет место общее снижение интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов как в контрольных, так и в опытных группах. Этот феномен может быть связан с изменением режима работы нейтрофильных антиоксидантных систем [13,14], либо с расходом внутриклеточных восстановительных эквивалентов, таких как НАДН и НАДФН [10]. Взаимосвязь этих процессов и механизмов действия гипомагнитного поля находится под вопросом, кроме того, динамика эффекта «нулевого» поля с максимальным ответом именно на ранние сроки наблюдений свидетельствует, скорее, против такой связи.

Полученные данные об устойчивости изменений в скорости продукции АФК после воздействия «нулевого» поля, регистрируемой в 20-минутном временном интервале, могут быть полезны как в фундаментальном, так и в практическом смысле. В первом случае можно говорить об инерционности клеточного ответа на магнитную стимуляцию, что может предполагать наличие метаболического компонента в комплексе ответных реакций клетки. В пользу этого сценария могут косвенно свидетельствовать данные по ингибированию активности

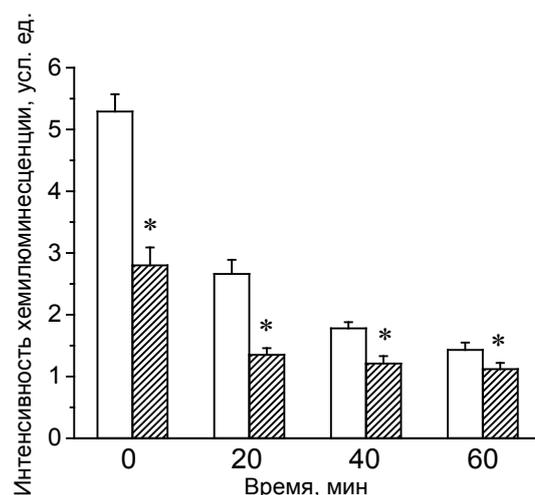


Рисунок 1. Влияние «нулевого» магнитного поля на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в зависимости от продолжительности последующей инкубации в геомагнитном поле. Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в условных единицах - Вольтах (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). Ось абсцисс – время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Не заштриховано – контроль. Заштриховано – опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$)

CuZn-супероксиддисмутазы гипомагнитным полем [2], что предполагает принципиальную возможность влияния данного физического фактора на активность ферментов.

Практическая же значимость результатов может заключаться в упрощении проведения исследований гипомагнитного эффекта, заключающегося в модуляции скорости продукции АФК, поскольку этот эффект имеет достаточное время последствия для того, чтобы проводить необходимые измерения вне зоны действия магнитных экранов. Это технически значительно упрощает технологию проведения эксперимента. Кроме этого, многие современные исследовательские приборы сами являются источником магнитных полей, что при их использовании во время фазы магнитной обработки не позволяет провести достаточно чистый эксперимент в плане неизменности параметров «нулевого» поля. При наличии же вышеуказанного 20-минутного промежутка времени возможно проведение измерений на этапе после инкубации, что дает возможность во время самой инкубации выдерживать значения индукции в заданных методикой эксперимента пределах.

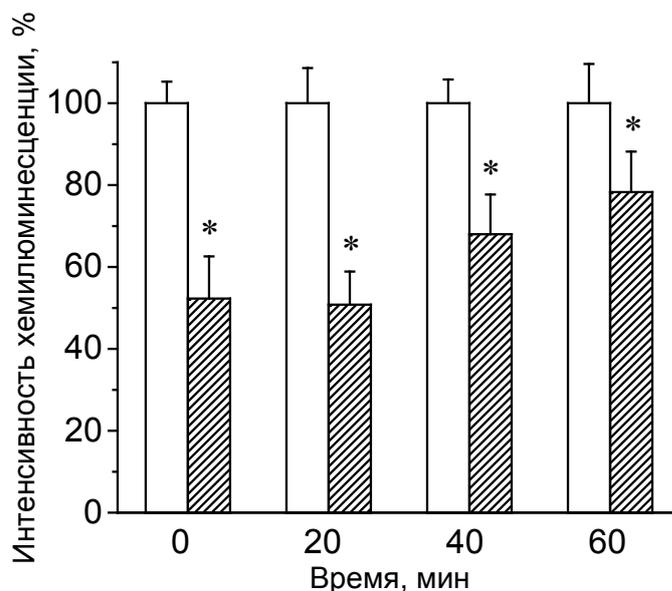


Рисунок 2. Временная динамика последствия «нулевого» магнитного поля в относительных единицах (%), нормализованных относительно контрольных значений (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). По оси абсцисс – время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Не заштриховано – контроль. Заштриховано – опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$)

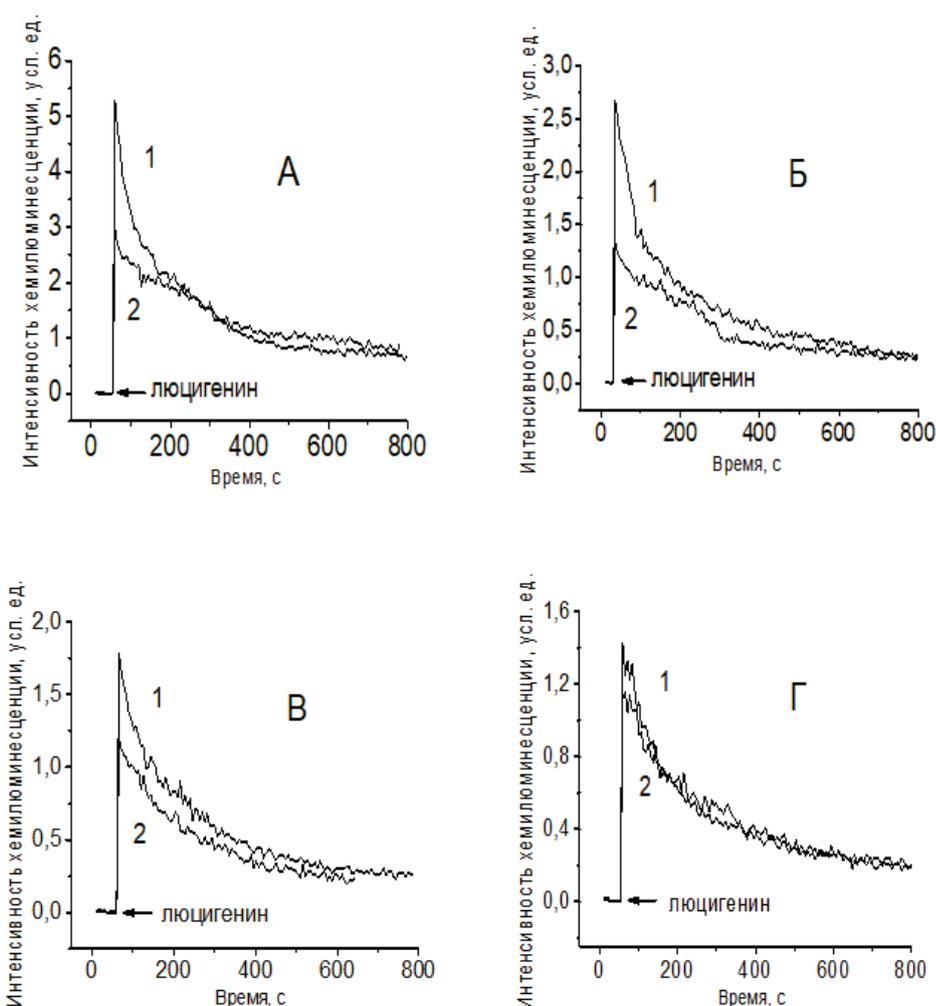


Рисунок 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП при различных временах последующей инкубации в геомагнитном поле. А – 0 минут (без инкубации в ГМП). Б – 20 минут. В – 40 минут. Г – 60 минут. 1 – контроль. 2 – опыт

Обнаруженные на сегодня эффекты «нулевого» поля в отношении клеток и целых организмов носят как позитивный, так и негативный характер и демонстрируют широкий интервал биологических изменений, начиная от процессов эмбрионального развития [15-17] и морфогенеза [18-22] и заканчивая поведенческими реакциями [23,24], что говорит о важности такого свойства как биомагниторецепция практически на каждом этапе развития биологического организма. Исследования в этой области имеют также и биофизический аспект, заключающийся в поиске и установлении первичного механизма неспецифической рецепции слабых магнитных полей биосистемами [4,5,25,26]. В данной работе были получены результаты, которые могут послужить прологом к дальнейшим экспериментам, призванным пролить свет на природу как первичной «мишени» магнитного воздействия, так и последующих звеньев цепи ответных реакций клетки на магнитную стимуляцию.

Список литературы / References:

1. Zhang H., Zhang Z., Mo W. et al. Shielding of the geomagnetic field reduces hydrogen peroxide production in human neuroblastoma cell and inhibits the activity of CuZn superoxide dismutase. *Protein Cell*, 2017, vol. 8, no. 7, pp. 527-537.
2. Martino C.F., Castello P.R. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 8, e22753.
3. Politanski P., Rajkowska E., Brodecki M. et al. Combined effect of X-ray radiation and static magnetic fields on reactive oxygen species in rat lymphocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 333-336.
4. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: Analytical review of experiments and theories. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 6, e0179340.
5. Zhang B., Tian L. Reactive oxygen species: potential regulatory molecules in response to hypomagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics*, 2020, vol. 41, no. 8, pp. 573-580.
6. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of a «zero» magnetic field on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 365-368. (In Russ.)]

7. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Валева Э.Р., Фесенко Е.Е. К вопросу о молекулярных механизмах действия «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 4, с. 720-725. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Valeeva E.R., Fesenko E.E. On the molecular mechanisms of the effect of a zero magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 371-375. (In Russ.)]
8. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 2, с. 524-529. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A., Fesenko E.E. The effect of a weak static magnetic field in the range of magnitudes from a “Zero” Field (0.01 μ T) to 100 μ T on the production of reactive oxygen species in nonactivated neutrophils. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 443-447. (In Russ.)]
9. Aasen T.B., Bolann B., Glette J., Ulvik R.J., Schreiner A. Lucigenin-dependent chemiluminescence in mononuclear phagocytes. Role of superoxide anion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1987, vol. 47, pp. 673-679.
10. Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Нестерова А.М. и др. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах. *Биологические мембраны*, 2017, т. 34, № 6, с. 116-123. [Dzhatdоеva A.A., Proskurnina E.V., Nesterova A.M. et al. Mitochondria as a Source of Superoxide Anion Radical in Human Platelets. *Biochemistry*, 2018, vol. 12, pp. 43-49. (In Russ.)]
11. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 4, с. 735-740. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A., Fesenko E.E. Decreased production of the superoxide anion radical in neutrophils exposed to a near-null magnetic field. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 625-630. (In Russ.)]
12. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 1, с. 97-103. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. A decrease of the respiratory burst in neutrophils after exposure to weak combined magnetic fields of a certain duration. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 82-87. (In Russ.)]
13. Barnes F., Kandala S. Effects of time delays on biological feedback systems and electromagnetic field exposures. *Bioelectromagnetics*, 2018, vol. 39, pp. 249-252.
14. Barnes F., Greenebaum B. Setting Guidelines for Electromagnetic Exposures and Research Needs. *Bioelectromagnetics*, 2020, vol. 41, pp. 392-397.
15. Osipenko M., Mezhevnikina L., Krasts I., Yashin V., Novikov V., Fesenko E. Deterioration of murine embryonic fibroblasts and early embryos upon magnetic field deprivation. *Biophysics*, 2008, vol. 53, pp. 317-321.
16. Trukhanov K., Gur'eva T., Dadasheva O., Kruglov O., Lebedev V., Spasskii A. Embryogenesis of the Japanese quail in hypomagnetic conditions applied to deep space flights. *Radiats Biol Radioecol*, 2014, vol. 54, pp. 179-185.
17. Крылов В.В., Осипова Е.А., Панкова Н.А., Таликина М.Г., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г., Батракова А.А., Непомнящих В.А. Влияние временного смещения суточной геомагнитной вариации на эмбрионы плотвы *Rutilus rutilus* L. Сравнение с эффектами имитации геомагнитных бурь. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 4, с. 825-832. [Krylov V.V., Osipova E.A., Pankova N.A., Talikina M.G., Chebotareva Y.V., Izyumov Y.G., Nepomnyashchikh V.A., Batrakova A.A. The effect of a temporal shift in diurnal geomagnetic variation on roach *Rutilus rutilus* L. embryos: a comparison with effects of simulated geomagnetic storms. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 675-681. (In Russ.)]
18. Новиков В.В., Шейман И.М., Фесенко Е.Е. Действие слабого и сверхслабого постоянного магнитного поля на интенсивность бесполого размножения планарий *Dugesia tigrine*. *Биофизика*, 2007, т. 52, вып. 5, с. 912-915. [Novikov V.V., Sheiman I.M., Fesenko E.E. The effect of weak and superweak constant magnetic fields on the intensity of asexual reproduction of *Dugesia tigrina* planarians. *Biophysics*, 2007, vol. 52, iss. 5, pp. 912-915. (In Russ.)]
19. Novikov V.V., Sheiman I.M., Fesenko E.E. Effect of weak static and low-frequency alternating magnetic fields on the fission and regeneration of the planarian *Dugesia* (*Girardia*) *tigrine*. *Bioelectromagnetics*, 2008, vol. 29, pp. 387-393.
20. Van Huizen A.V., Morton J.M., Kinsey L.J., Von Kannon D.G., Saad M.A., Birkholz T.R., Czajka J.M., Cyrus J., Barnes F.S., Beane W.S. Weak magnetic fields alter stem cell –mediated growth. *Sci Adv*, 2019, vol. 5, eaau7201.
21. Леднев В.В., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Рождественская З.Е., Климов А.А., Тирас Х.П. Слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на переметрический резонанс ядерных спинов атомов водорода, увеличивает пролиферативную активность необластов в регенерирующих планариях *Dugesia tigrina*. *ДАН*, 1996, т. 348, вып. 6, с. 830-833. [Lednev V.V., Srebniatskaya L.K., Ilyasova E.N., Rozhdestvenskaya Z.E., Klimov A.A., Tiras Kh.P. A weak combined magnetic field tuned to the permetric resonance of nuclear spins of hydrogen atoms increases the proliferative activity of neoblasts in the regenerating planaria *Dugesia tigrina*. *DAN*, 1996, vol. 348, iss. 6, pp. 830-833 (In Russ.)]
22. Тирас Х.П., Петрова О.Н., Мьякишева С.Н., Асланиди К.Б. Биологические эффекты слабых магнитных полей: сравнительный анализ. Фундаментальные исследования, 2014, № 12 (часть 7), с. 1442-1451. [Tiras Kh.P., Petrova O.N., Myakisheva S.N., Aslanidi K.B. Biological effects of weak magnetic fields: a comparative analysis. *Basic research*, 2014, no. 12 (part 7), pp. 1442-1451. (In Russ.)]
23. Zhang B., Lu H., Xi W., Zhou X., Xu S., Zhang K., Guo A. Exposure to hypomagnetic field space for multiple generations causes amnesia in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci Lett*, 2004, vol. 371, pp. 190-195.

24. Binhi V.N., Sarimov R.M. Zero magnetic field effect observed in human cognitive processes. *Electromagn Biol Med*, 2009, vol. 28, pp. 310-315.
25. Barnes F., Greenebaum B. The effects of weak magnetic fields on radical pairs. *Bioelectromagnetics*, 2015, vol. 36, pp. 45-54.
26. Ponomarev V.O., Novikov V.V. Effect of low-frequency alternating magnetic fields on the rate of biochemical reactions proceeding with formation of reactive oxygen species. *Biophysics*, 2009, vol. 54, pp. 163-168.

TIME DYNAMICS OF PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY NEUTROPHILS AFTER TREATMENT UNDER HYPOMAGNETIC CONDITIONS

Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A.

Institute of Cell Biophysics RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: docmag@mail.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0527

Abstract. It was shown that incubation of a suspension of mouse peritoneal neutrophils for 30 minutes under hypomagnetic conditions obtained using permalloy magnetic screens (a constant magnetic field of not more than 20 nT, the level of variable man-made noise is reduced to a few nT) causes a significant decrease (about 48%) signal intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence measured immediately after incubation. 20 minutes after magnetic treatment (followed by incubation in a geomagnetic field during this time, induction 44 μ T, the level of magnetic interference at a frequency of 50 Hz was 15-50 nT), the differences between the control and experimental groups remain completely (the difference was about 49%). In 40 and 60 minutes after exposure to the "zero" field, followed by keeping the samples in the geomagnetic field for the specified time intervals, the difference between the control and experimental samples decreased to 32% and 22%, respectively. This effect was registered without additional activation of neutrophils by chemical agents initiating respiratory burst, such as N-formyl-Met-Leu-Phe formylated peptide or phorbol-12-myristate-13-acetate phorbol ester, and was not associated with effects on cellular systems, providing this explosion.

Key words: *hypomagnetic field, geomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, lucigenin, chemiluminescence.*

ВОДА, АКТИВИРОВАННАЯ СВЧ-ПЛАЗМОЙ, КАК РЕГУЛЯТОР РОСТА ХВОЙНЫХ

Сергейчев К.Ф.², Апашева Л.М.¹, Лукина Н.А.², Будник М.И.¹, Овчаренко Е.Н.¹,
Лобанов А.В.¹

¹ Федеральний исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

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

² Федеральний исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»

ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: office@gpi.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0528

«Человечество далее не может стихийно строить свою историю, а должно согласовывать ее с законами биосферы, от которой человек неотделим».

В.И. Вернадский

Аннотация. Сокращение мировых лесных массивов грозит глобальной экологической катастрофой. Вклад лесов и фитопланктона морей и океанов в процессах фотосинтеза, отвечающего за поддержание кислорода в атмосфере Земли, делится поровну при соотношении площадей лесов и водной поверхности 9:71. Защита и возобновление утраченных лесов, в России хвойных лесов, первостепенная задача. Проблема восстановления лесов решается на правительственном уровне. Постановление Правительства РФ от 21.09.2020 № 1509 «Об особенностях использования, охраны, защиты, воспроизводства лесов ...». Исследовали влияние воды, активированной плазмой (ВАП), на прорастание семян, развитие хвойных на ранних стадиях их роста. ВАП получали с помощью СВЧ-плазмотрона, генерирующего плазму в атмосфере. ВАП содержит растворы пероксида водорода и оксидов азота, которые необходимы для жизнедеятельности растений. Растворы ВАП тестировали по концентрации пероксида водорода. Начальная концентрация пероксида водорода составила $8 \cdot 10^{-3}$ М. Семена ели, лиственницы проращивали на фильтрах, увлажненных в контроле водой, в опыте – растворами ВАП. Наиболее эффективным раствором ВАП оказался раствор с концентрацией пероксида водорода $2 \cdot 10^{-6}$ М, который обеспечивал повышение прорастания семян лиственницы и ели на 25 и 30% соответственно по сравнению с контролем. Проросшие семена помещали в прозрачные культуральные сосуды на песок, который однократно увлажняли в контроле водой, в опыте – растворами ВАП. Сосуды закрывали. Выращивали сеянцы в стрессовых условиях изоляции. Тестировали развитие дистанционно. К 30-м суткам в контроле выжило 5%, в опыте – 40-45% сеянцев.

Ключевые слова: плазма, стимуляция, регуляция роста, фотосинтез, семена, ель, лиственница.

Зарождение 2,45 млрд лет назад свободного кислорода в гидросфере и атмосфере Земли связано с появлением цианобактерий, которые положили начало процессу фотосинтеза, превращающего углекислый газ в углеводы и кислород [1,2]. Население Земли за 70 лет жизни одного поколения с 1951 по 2022 год выросло с 2,56 до 8,00 млрд человек. Накопление в атмосфере парниковых газов, вызванное хозяйственной деятельностью человека, стало одной из причин глобального потепления в середине прошлого века. Основную роль в глобальном потеплении сыграл углекислый газ CO₂, содержание которого в атмосфере выросло на 40% по сравнению с «доиндустриальным» периодом, что увеличило аккумуляцию тепла в атмосфере на 55%.

Основными источниками пополнения земной атмосферы кислородом являются леса и фитопланктон (включая водоросли) океанов и морей. Вклад кислорода в атмосферу от этих источников делится поровну. При этом из 71% водной поверхности Земли (морей и океанов) в атмосферу поступает столько же кислорода от фитопланктона и водорослей. Вопреки мнению некоторых экологов, что океаны и моря – неисчерпаемый источник кислорода, леса и зеленые насаждения оказываются в 8 раз более эффективными производителями кислорода в расчёте на единицу поверхности планеты.

Площади лесов сокращаются, что болезненно отражается на состоянии климата и биосферы планеты. К настоящему времени не существует уже половины всех лесов, покрывавших поверхность планеты 8000 лет назад [3]. Около 7,3 млн га лесных ресурсов теряются каждый год. Повсеместное сокращение лесных массивов (массовые неконтролируемые рубки, пожары и др.) грозит в условиях меняющегося климата обмелением рек, водоёмов, уменьшением запасов пресной воды.

В России проблема восстановления лесов решается на правительственном уровне (Постановление Правительства РФ от 21.09.2020 № 1509 «Об особенностях использования, охраны, защиты, воспроизводства лесов ...»). В РФ сокращаются леса преимущественно хвойных пород, имеющих коммерческое значение. Естественное возобновление хвойных пород деревьев на рубках наблюдается редко, место хвойных занимают лиственные. Хвойные породы при пересадке трудно приживаются, требуются определенные условия и уход за ними. Для воспроизводства лесов необходимо длительное время – не менее 30 лет. Выращивание лесных культур, в частности хвойных, осложнено еще тем, что прорастание семян в природных условиях начинается после нескольких месяцев глубокого покоя при пониженных температурах. Традиционно для проращивания семян

хвойных практикуется предварительная длительная обработка их холодом – стратификация. Перед посевом семена замачивают, всходы обычно появляются на 15-20-й день.

Востребованы исследования способов сокращения периода покоя, минуя стратификацию, исследования методов активации прорастания семян хвойных, методов стимуляции развития сеянцев.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование методов активации прорастания семян хвойных пород деревьев – ели, лиственницы без стратификации, а также разработка методов стимуляции роста сеянцев хвойных в условиях замкнутого объема на обедненной среде, используя растворы воды, активированной плазмой (далее – ВАП), получаемой с помощью СВЧ-плазмотрона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов выбраны представители хвойных пород: ель обыкновенная *Picea abies*, сорт Заповедные дали, лиственница *Larix* сорт Сибирская бригантина; семена предоставлены агрофирмой «Гавриш».

Растворы ВАП получали с помощью разработанной методики, основанной на активации дистиллированной воды струей термической аргоновой плазмы безэлектродного СВЧ-разряда при атмосферном давлении [4,5]. Растворы ВАП содержат пероксид водорода (H_2O_2) и оксиды азота (NO_x). Концентрацию пероксида определяли методом йодометрии на спектрофотометре «Specord-UV». Концентрацию оксидов азота измеряли по электропроводности растворов ВАП прибором TDS-3. Вклад пероксида водорода в электропроводность раствора ничтожно мал и его можно не учитывать.

В исходном растворе ВАП были измерены:

концентрация пероксида водорода $[H_2O_2] = 8 \cdot 10^{-3}$ М;

концентрация оксидов азота $[NO_x] = 3,1 \cdot 10^{-4}$ М.

Для получения рабочих растворов исходные растворы ВАП разбавляли дистиллированной водой. Растворы тестировали по содержанию в них пероксида водорода.

Сухие семена хвойных, не прошедшие стратификацию, раскладывали в чашки Петри на фильтры, которые увлажняли в контроле дистиллированной водой, в опыте – растворами ВАП. Чашки Петри с семенами помещали в термостат с температурой $+20$ °С, через 6 суток наблюдали появление уже проросших семян и учитывали их количество.

Далее для подращивания сеянцев отбирали живые проросшие семена и раскладывали их в специальные культуральные сосуды из ПЭТ-пластика на заранее промытый и высушенный песок. Песок однократно увлажняли в контроле дистиллированной водой, в опыте – растворами ВАП. Сосуды закрывали и переносили в люминистат. Условия культивирования: освещенность 130 люкс, ритм свет: темнота – 12:12 ч, температура $+19-20$ °С, обедненный грунт – промытый песок.

За развитием сеянцев наблюдали дистанционно в течение 50 суток. Учитывали степень развития сеянцев по меняющимся морфологическим признакам, количество выживших в условиях культивирования сеянцев к определенному времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растворы ВАП достаточно стабильны при хранении в условии лаборатории, что показано при измерении количества пероксида в растворах.

1. Прорастание семян в термостате в чашках Петри.

Изначально сухие семена ели и лиственницы прорастивали в течение 6 суток на фильтрах, увлажненных в контроле дистиллированной водой, в опыте – растворами ВАП с измеренной соответствующей концентрацией пероксида водорода.

Сразу отметим, что использование для обработки семян растворов ВАП (концентрация пероксида – $2 \cdot 10^{-3}$ М) блокировало прорастание семян ели и лиственницы. Использование растворов ВАП с концентрацией пероксида в них меньше $2 \cdot 10^{-6}$ М для прорастивания семян было не эффективно, отличия от контроля не наблюдали.

Приводим результаты определения числа проросших семян после 6 суток прорастивания в термостате, где отмечен эффект стимуляции прорастания. В опытах, где обрабатывали семена лиственницы, получено следующее. Проросло в контроле – 15% семян, лучший результат получен при использовании раствора ВАП с концентрацией пероксида $2 \cdot 10^{-6}$ М, где определено 40% проросших семян. В опытах с семенами ели определено в контроле 20% проросших семян, в опыте, где отмечен лучший результат с раствором ВАП с концентрацией пероксида $2 \cdot 10^{-6}$ М, определено 50% проросших семян.

2. Выращивание сеянцев в стрессовых условиях изоляции от окружающей среды.

Проросшие в чашках Петри живые семена ели отбирали для выращивания сеянцев. Семена раскладывали в культуральные сосуды из ПЭТ-пластика на заранее промытый и подсушенный песок. Песок однократно



Рисунок 1. Фото сеянцев ели на 15-е сутки роста. О – опыт, К – контроль

увлажняли в контроле дистиллированной водой, в опыте – растворами ВАП с определенной концентрацией пероксида водорода. В опыте 1 раствор ВАП с концентрацией пероксида $2 \cdot 10^{-5}$ М, в опыте 2 раствор ВАП с концентрацией пероксида $2 \cdot 10^{-6}$ М. Сосуды закрывали, выставляли в люминостат. Периодически осуществляли внекорневую обработку сеянцев в контроле дистиллированной водой, в опыте – соответствующими растворами ВАП через прокол в крышке. Наблюдение за развитием сеянцев вели дистанционно.

Учет развития сеянцев проводили в определенное время по следующим тестам.

1. Через 7 суток культивирования учитывали количество сеянцев с раскрытыми семядолями.
2. Через 15 суток культивирования учитывали количество сеянцев, имеющих свободную хвою.

3. Через 30 суток культивирования в стрессовых условиях определяли количество сеянцев, выживших в условиях изоляции на обедненном грунте.

На 7 суток культивирования определено количество сеянцев с раскрытыми семядолями: контроль – 30%, в опыте 2 в два раза больше сеянцев – 60%. На 15 сутки количество сеянцев со свободной хвоей было в контроле 20%, лучший результат в опыте 2 – 60%.

Наиболее значимый тест, по которому можно оценивать эффективность действия растворов ВАП на рост сеянцев в условиях обедненного грунта, – это учет количества выживших сеянцев. Показательно, что количество выживших в опыте сеянцев к 30 суткам опыта было в несколько раз больше, чем в контроле.

Результаты учета роста сеянцев ели в изолированном объеме на обедненной по составу среде приводим в таблице 1, а на рисунке 1 представлена фотография сеянцев ели на 15-е сутки роста в опыте 2 и контроле.

Получаемые растворы ВАП представляют собой комплексный раствор на основе дистиллированной воды, активированной горячей плазмой СВЧ-разряда с содержанием пероксида водорода и оксидов азота. Жизнь растений на клеточном уровне во многом определяется соотношением концентрации этих составляющих. Показано, что пероксид водорода и оксиды азота функционируют в растениях как сигнальные молекулы [6]. Разнообразные абиотические стрессы вызывают у растения образование пероксида, который играет важную роль в метаболизме растений, обеспечивая ему физиологическую защиту, но в то же время избыточное накопление

Таблица 1. Тестирование сеянцев ели, выращенных в изолированном объеме

Вариант	Процент выживших сеянцев, %			
	7 сутки, семядоли раскрыты	15 сутки, свободная хвоя	30 сутки, жизнеспособные	50 сутки, жизнеспособные
Контроль	30	20	5	-
Опыт 1	50	35	40	-
Опыт 2	60	60	45	30

пероксида, связанное наложением стрессов, потенциально опасно. Оксиды азота выступают в роли регулятора разнообразных патофизиологических процессов, благодаря свойству образовывать свободные радикалы, имеют короткую продолжительность жизни, проницаемость через биологические мембраны. Отмечается многообразие функций оксидов азота в росте, развитии и регуляции клеточных процессов у растений. Различные абиотические стрессы могут индуцировать синтез оксидов азота, их образование и механизм действия в растениях до конца не выяснены. Пероксид водорода – сигнальная молекула, является одной из существенных составляющих жизнедеятельности растения, играет определяющую роль в процессе фотосинтеза [7].

Проращивание семян под влиянием комплексного раствора ВАП ($\text{NO}_x\text{-H}_2\text{O}_2$) оказывает, вероятно, синергетическое действие на пробуждение семян в результате проникновения раствора через оболочку и инициации механизмов пробуждения при участии гиббереллиновой и абсцизовой кислот. Высокий выход проросших семян под действием раствора ВАП по сравнению с контролем дает объяснение тому, что стратификация может быть исключена из процедуры проращивания семян хвойных, благодаря замачиванию в растворах ВАП ($\text{NO}_x\text{-H}_2\text{O}_2$) оптимальной концентрации.

Таким образом:

1. Получены растворы ВАП (вода, активированная струей аргоновой плазмы безэлектродного СВЧ-разряда) с помощью авторской установки СВЧ-плазмотрона.
2. Растворы ВАП представляют собой комплексный раствор оксидов азота и пероксида водорода.
3. Определены оптимальные концентрации водных растворов ВАП для прорастания семян и роста сеянцев хвойных.
4. Получаемые растворы ВАП являются эффективными регуляторами роста для проращивания семян и культивирования сеянцев хвойных в стрессовых условиях.

Список литературы / References:

1. Holland H.D. In *Early Life on Earth* (ed. Bengtson S.). *Columbia Univ. Press*, New York, 1994, pp. 237-244.
2. Kump L. The rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 2008, vol. 451, pp. 277-278, doi: 10.1038/nature06587.
3. Калининская Е.И. Леса на планете Земля. *Наука и жизнь*, 2017, № 6, с. 46-49. [Kalininskaya E.I. Forests on the planet Earth. *Science and life*, 2017, no. 6, pp. 46-49. (In Russ.)]
4. Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Андреев С.Н., Апашева Л.М., Савранский В.В., Лобанов А.В. *Способ плазменной активации воды и устройство для его осуществления*. Патент РФ № 2702594, 2019 г. [Sergeychev K.F., Lukina N.A., Andreev S.N., Apasheva L.M., Savransky V.V., Lobanov A.V. *A method of plasma activation of water and a device for its implementation*. RF Patent no. 2702594, 2019. (In Russ.)]
5. Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Апашева Л.М., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В. Вода, активированная струей аргоновой СВЧ-плазмы, как фактор, стимулирующий прорастания семян. *Химическая физика*, 2022, т. 41, № 1, с. 60-65. [Sergeychev K.F., Lukina N.A., Apasheva L.M., Ovcharenko E.N., Lobanov A.V. Water activated by a jet of argon UHF plasma as a factor stimulating seed germination. *Chemical physics*, 2022, vol. 41, no. 1, pp. 60-65. (In Russ.)]
6. Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. Role of nitric oxide in regulation of H_2O_2 mediating tolerance of plants to abiotic stress: a synergistic signaling approach. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 34-74.
7. Комиссаров Г.Г. *Фотосинтез: физико-химический подход*. М.: Эдиториал УРСС, 2003, 224 с. [Komissarov G.G. *Photosynthesis: a physico-chemical approach*. М.: Editorial URSS, 2003, 224 p. (In Russ.)]

WATER ACTIVATED BY UHF-PLASMA AS A GROWTH FOR CONIFER SEEDLINGS
Sergeychev K.F.², Apasheva L.M.¹, Lukina N.A.², Budnik M.I.¹, Ovcharenko E.N.¹, Lobanov A.V.¹¹N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences

4 Kosygina Street, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ziraf@mail.ru

²A.M. Prokhorov Federal Research Center Institute for General Physics Russian Academy of Sciences

38 Vavilova Street, Moscow, 119991, Russia; e-mail: office@gpi.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0528

Abstract. The reduction of the world's forests threatens a global ecological catastrophe. The contribution of forests and phytoplankton of the seas and oceans in the processes of photosynthesis, responsible for maintaining oxygen in the Earth's atmosphere, is divided equally at a ratio of forest and water surface areas of 9:71. The protection and restoration of lost forests, in Russia coniferous forests, is a paramount task. The problem of forest restoration is being solved at the government level. Decree of the Government of the Russian Federation dated 21.09.2020 No. 1509 «On the peculiarities of the use, protection, protection, reproduction of forests ...». The effect of plasma-activated water (PAW) on the stimulation of seed germination, the development of conifers in the early stages of their growth was studied. PAW was obtained using UHF plasmotron generating plasma in the atmosphere. PAW contains solutions of hydrogen peroxide and nitrogen oxides, which are necessary for plant life. VAP solutions were tested by the concentration of hydrogen peroxide. The initial concentration of hydrogen peroxide was $8 \cdot 10^{-3}$ M. The seeds of fir and larch were germinated on filters moistened with water in the control, in the experiment with VAP solutions. The most effective VAP solution was a solution with a hydrogen peroxide concentration of $2 \cdot 10^{-6}$ M, which provided an increase in the germination of larch and fir seeds by 25 and 30%, respectively, compared with the control. The germinated seeds were placed in transparent culture vessels on sand, which was moistened once with water in the control, in the experiment with VAP solutions. The vessels were closed. Seedlings were grown in stressful isolation conditions. We tested the development remotely. By the 30th day, 5% of the seedlings survived in the control and 40–45% of the seedlings survived in the experiment.

Key words: *plasma, stimulation, growth regulation, photosynthesis, seeds, fir, larch.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИМПУЛЬСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И РАСТВОРОВ ЭКОПЕРОКСИДА ДЛЯ АКТИВАЦИИ СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Апашева Л.М.¹, Будник М.И.^{1,3}, Смурова Л.А.¹, Овчаренко Е.Н.¹, Лобанов А.В.¹, Савранский В.В.², Турбин В.В.³, Розанцев М.В.³

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ziraf@mail.ru

² Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»
ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: office@gpi.ru

³ Научно-производственное объединение «Экопероксид водорода»
21 км Варшавского ш, 1. Ленинский р-н, пос. Булатниковское, Московская обл., 142718, РФ;
e-mail: info@ecoperoksid.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0529

Аннотация. Сахарная свекла, двулетняя техническая сельскохозяйственная культура, используется для производства этанола, биотоплива, сахара и содержит до 70% сахарозы. Затруднено получение семян, сбор которых проходит на второй год культивирования корнеплодов. Изучали возможность ускорения активации семян, повышения всхожести способами предпосевной обработки сухих семян: лазерным импульсным излучением и растворами экопероксида. Первым тестом, свидетельствующим о начале пробуждения семян (один час после обработки), был тест определения выхода метаболитов в водную среду культивирования. Метаболиты определяли методом спектрофотометрии. Они имеют характерный спектр поглощения в УФ-области с четким максимумом при $\lambda_{\text{макс}} - 207$ нм и поглощением до границы с видимой областью $\lambda_{\text{макс}} - 330$ нм. Использовали лазер на парах меди. Параметры: одновременная генерация двух длин волн – зеленая 510,5 нм и желтая 578,2 нм. Длительность импульса излучения – 15 нс, частота повторения – 10 кГц. Время облучения 10, 20, 90 с. Наибольший эффект стимуляции прорастания семян при 10 с облучения превышал контроль на 30%. Увеличение интервала до 24 часов и более между облучением и помещением семян на проращивание сокращало количество проросших семян. Экопероксид получали при высокоэнергетическом бесконтактном воздействии на дистиллированную воду стримерами высоковольтного электрического разряда. Повышение всхожести семян на 30-40% отмечено при их контакте с раствором экопероксида в течение 30 мин.
Ключевые слова: сахарная свекла, лазерное импульсное излучение, экопероксид, стимуляция.

Сахарная свекла, двулетняя сельскохозяйственная техническая культура, используется для производства этанола, биотоплива, для получения сахара, содержит в сухой массе до 70% сахарозы. Ее выращивание требует определенных способов возделывания. Условия культивирования свеклы усложнены тем, что качественные семена возможно получить лишь на второй год культивирования корнеплодов. Для выращивания корнеплодов также необходимы определенные условия: сохранение их до следующего вегетационного периода и последующего культивирования в грунте [1]. Востребованы способы оптимизации предпосевной обработки семян свеклы с целью ускорения прорастания и дальнейшей стимуляции роста.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Известно, что начальные этапы роста во многом определяют последующее развитие растений. Изучали возможность стимуляции активации семян сахарной свеклы, повышения всхожести, ускорение их прорастания способами предпосевной обработки:

импульсным лазерным излучением при генерации двух длин волн [2];

водными растворами экологически чистого пероксида водорода (далее – экопероксид) [3].

Оценивали минимальное время обработки семян, достаточное для проявления стимуляционного воздействия лазерным излучением и водными растворами экопероксида. Определяли также минимальное время допустимого интервала между обработкой семян предлагаемыми способами и помещением семян на проращивание, где фиксировали начало пробуждения семян.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тест-объектом были семена сахарной свеклы F1 РМС 121 производства агрофирмы «Гавриш». Эффективность предпосевной обработки семян определяли в два этапа:

через 1-2 часа определяли начало пробуждения семян по выходу в водную среду культивирования метаболитов;

после обработки семян через 48 часов фиксировали прорастание семян по морфологическим тестам.

Начальные стадии процесса прорастания семян сопровождаются выходом в водную среду культивирования продуктов жизнедеятельности – метаболитов. Метаболиты имеют характерный спектр поглощения в УФ-области

с четко выраженным максимумом при $\lambda_{\text{макс}} - 207$ нм. Характер их спектра не меняется по ходу процесса прорастания семян, что свидетельствует о том, что другие возможные продукты прорастающего семени не имеют заметного поглощения в УФ-области на начальных стадиях роста. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра «Specord UV-Vis» при комнатной температуре в кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 10$ мм.

Сухие семена свеклы обрабатывали импульсным излучением лазера на парах меди. Параметры излучения: одновременная генерация двух длин волн – зеленая 510 нм и желтая 578,2 нм, длительность импульса излучения – 15 с, частота повторения импульсов – 10 кГц, суммарная энергия и мощность в импульсе $3 \cdot 10^{-4}$ Дж и $2 \cdot 10^4$ Вт, соответственно. Соотношение значений энергии и мощности между зеленой и желтой линиями излучения было 3:1, суммарная плотность мощности – $2 \cdot 10^4$ Вт/см². Облучение проводили в течение 10, 20 и 90 с.

Экопероксид получали с помощью созданных природоподобных способа и устройства, которые реализовывались при высокоэнергетическом, бесконтактном воздействии на дистиллированную воду стримерами высоковольтного электрического разряда. Растворы экопероксида тестировали по количеству содержащегося в них пероксида водорода. Количество пероксида водорода в растворах определяли методом йодометрии на спектрофотометре в УФ-области.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После обработки сухие семена свеклы помещали для проращивания в чашки Петри на фильтры, увлажненные в контроле водой, в опыте увлажнение осуществляли растворами экопероксида. Исходный получаемый раствор экопероксида содержал пероксид водорода с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ М. Его разводили водой для получения ряда растворов. Рабочие растворы имели следующие концентрации пероксида водорода:

$$O_1 - 5 \cdot 10^{-4} \text{ М}, O_2 - 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}, O_3 - 5 \cdot 10^{-6} \text{ М}.$$

Чашки с семенами переносили в термостат при температуре $+20^\circ\text{C}$. Через 48 часов культивирования проводили учет количества проросших семян. Получено, что использование раствора экопероксида с концентрацией O_1 блокировало прорастание семян. Наибольший эффект стимуляции отмечен при проращивании семян в опыте O_3 , где отмечено превышение контрольных значений на 30-40%.

Проведен анализ наименьшего времени, достаточного для стимуляции прорастания при контакте семян с раствором экопероксида. Тестирование пробуждения семян в первые часы контакта фиксировали спектрофотометрически, определяя выход метаболитов. Через 48 часов культивирования учитывали количество проросших семян. Определено минимальное время контакта семян с раствором экопероксида для стимуляции прорастания. Использовали метод фиксации выхода метаболитов в водную среду с помощью спектрофотометрии в УФ-области. Получено, что при 30-ти минутной обработке семян раствором экопероксида, где концентрация пероксида водорода была $5 \cdot 10^{-6}$ М, достаточно для активации семян, что зафиксировано уже через 1 час после обработки в анализированных пробах на спектрофотометре. Пробуждение семян с помощью морфологических тестов возможно отметить лишь более чем через 48 часов проращивания семян в термостате на влажных фильтрах в чашках Петри.

Для выявления эффектов обработки лазером сухих семян свеклы их облучали в течение 10, 20, 90 с. Семена разделяли на партии для определения временного интервала между облучением и получением эффекта обработки. Контрольные и обработанные семена помещали на проращивание в чашки Петри на фильтры, которые увлажняли водой и переносили в термостат при температуре $+20^\circ\text{C}$ на 48 часов.

При временном интервале в 1 час между облучением и увлажнением семян анализировали эффективность обработки. Получено, что облучение семян лазером в течение 10 с увеличивало число проросших семян по сравнению с контролем на 30%. Облучение в течение 20 с увеличило количество проросших семян только на 20%, облучение в течение 90 с блокировало прорастание. Увеличение временного интервала между облучением и увлажнением семян на фильтрах в термостате значительно снижает эффективность обработки. Снижение стимулирующего действия облучения при паузе в 24 часа между обработкой и фиксации эффекта уменьшало количество проросших семян в опыте по сравнению с контролем до 20%. Временная пауза в 48 часов между облучением и помещением семян на проращивание приводит к полной блокировке прорастания семян.

Одним из первых тестов, по которому можно судить об эффекте лазерного облучения семян, можно считать определение с помощью спектрофотометрии в УФ-области выхода метаболитов в водную среду культивирования в максимуме поглощения при $\lambda_{\text{макс}} - 207$ нм. Выход метаболитов, регистрируемый по УФ-спектру, наблюдается практически сразу после увлажнения семян и помещением их в культуральные сосуды с водой, когда морфологические изменения еще не наблюдаются. Можно предположить, что вещества, выделяемые в водную среду, представляют собой продукты катаболизма (аминокислоты, сахара). Аминокислоты обладают общим свойством – отсутствием поглощения по всей видимой области спектра. Контролем были семена, проращиваемые без облучения. Пробы воды в контроле и в опыте отбирали через определенные промежутки времени. Измеряли оптическую плотность и семена возвращали в культуральные сосуды с водой до следующих измерений.

На рисунке 1 представлены кинетические кривые выхода метаболитов во времени ($D_{\text{оп.ед.}} - t_{\text{мин}}$) из семян сахарной свеклы в контроле (рис. 1, кривая 1) и в опытных образцах (рис. 1, кривые 2, 3, 4) с облучением

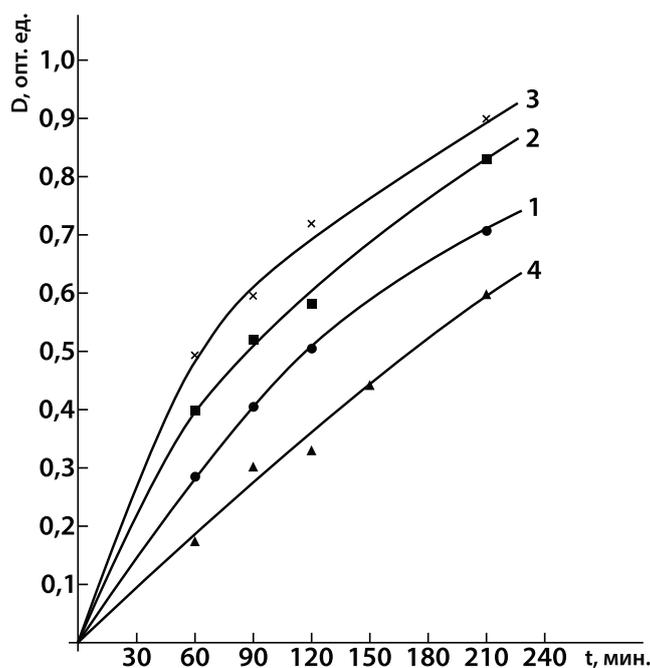


Рисунок 1. Кинетические кривые выхода метаболитов во времени из семян свеклы: 1 – контроль; 2 – облучение 10 с; 3 – облучение 20 с; 4 – облучение 90 с

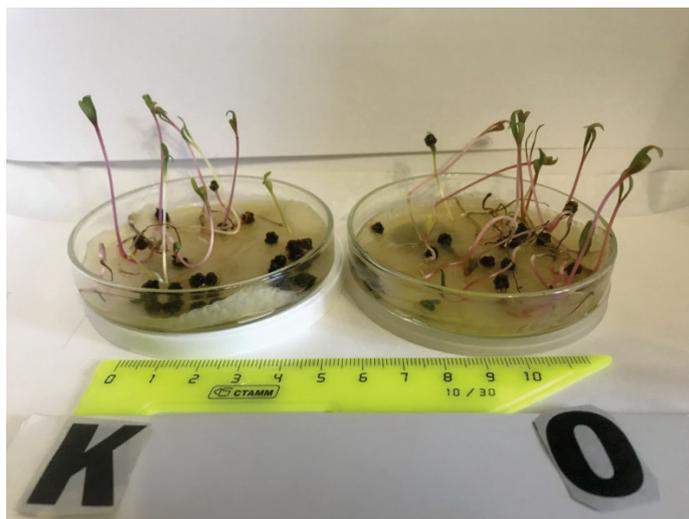


Рисунок 2. 8-суточные проростки сахарной свеклы после обработки семян лазером в течение 10 с (контроль и опыт)

10, 20, 90 с, соответственно, а на рисунке 2 – фотография 8-суточных проростков сахарной свеклы после обработки семян лазером в течение 10 с (контроль и опыт).

Из анализа полученных кинетических кривых следует, что процесс метаболизма идет достаточно быстро с начальной скоростью $\omega_1 = 4,2 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин для контрольного образца. Для опытных образцов определено $\omega_2 = 7,0 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин и $\omega_3 = 8,0 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин для образцов, облученных в течение 10 и 20 с, соответственно. Меньшая скорость $\omega_4 = 2,9 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин наблюдается в образце 4, где время облучения семян было 90 с, что блокировало прорастание семян.

Приведенные данные по обработке сухих семян сахарной свеклы растворами экопероксида с разным количеством пероксида водорода в них и импульсным лазерным излучением с разными временными позициями свидетельствуют о возможности стимулировать начало активации семян сахарной свеклы при минимальном воздействии, что показано уже при 1-1,5 часа после обработки. Существенно, что мы использовали короткое по времени воздействие на семена, а именно 30 мин контакта с раствором экопероксида или 10-ти секундным лазерным облучением. Этого воздействия было достаточно для получения стимулирующего эффекта. Полагаем, что в случае применения раствора экопероксида именно наличие свободного пероксида водорода в водных растворах экопероксида служит основным стимулирующим фактором для прорастания семян. Показана существенная роль пероксида водорода в жизнедеятельности растений, его значимость в осуществлении процесса фотосинтеза [4].

Предложенная спектрофотометрическая методика в УФ-области фиксации выхода метаболитов позволяет контролировать процесс прорастания семян на ранних стадиях эксперимента, а также изучать скорость накопления метаболитов на начальных стадиях прорастания. Спектрофотометрия может служить экспресс-методом определения эффективности действия различных способов обработки семян.

При воздействии лазерным облучением с одновременной генерации двух длин волн (зеленой 510,5 нм и желтой 578,2 нм) появляются новые длины волн излучения, а именно: 271 нм и 1367 нм в УФ- и ИК-областях соответственно. Имеет место реализация четырех волнового взаимодействия, значительно отличающегося от одночастотного. Возможно протекание биохимических реакций по 4-м каналам, что увеличивает эффект воздействия и влияет на скорость пробуждения семян. Полагаем, что именно этим обеспечивается эффект стимуляции при однократном и кратковременном секундном воздействии лазера на семена.

Кроме того, стимулирующее действия лазера на семена может реализовываться через пероксид водорода, получающийся в результате появляющегося излучения в УФ-области (271 нм), которое может приводить к образованию пероксида водорода [5], обладающего рострегулирующими свойствами [6].

Таким образом:

1. Показана возможность стимулировать прорастание семян сахарной свеклы при предпосевной обработке, используя: а) лазерное импульсное облучение при одновременной генерации двух длин волн; б) водные растворы экопероксида.
2. Предлагаемые методы активации семян сахарной свеклы эффективны при однократном и кратковременном 10-20-секундном воздействии лазера на семена, а также при 30-ти минутной обработке семян водными растворами экопероксида с концентрацией в диапазоне от $5 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М.
3. Ранним (часы) экспресс-методом для фиксации эффекта предпосевной обработки семян предложена спектрофотометрия в УФ-области.

Список литературы / References:

1. Векленко В.И. Тенденции развития и устойчивости производства сахарной свеклы в ведущих странах и регионах РФ. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*, 2022, № 2, с. 114-122. [Veklenko V.I. Trends in the development and sustainability of sugar beet production in the leading countries and regions of the Russian Federation. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*, 2022, no. 2, pp. 114-122. (In Russ.)]
2. Апашева Л.М., Будник М.И., Овчаренко Е.Н., Савранский В.В. *Способ повышения всхожести семян и стрессоустойчивости*. Заявка на изобретение № 2022106818 от 15.03.2022. [Apasheva L.M., Budnik M.I., Ovcharenko E.N., Savransky V.V. *A method for increasing seed germination and stress resistance*. Application for invention no. 2022106818 dated 15.03.2022. (In Russ.)]
3. Стребков Д.С., Будник М.И., Апашева Л.М., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н. *Получение экологически чистых растворов пероксида водорода при высокоэнергетическом бесконтактном воздействии на воду и их применение*. Материалы XV международной научной конференции, Севастополь, сентябрь 14-16, 2020, с. 191-192. [Strebkov D.S., Budnik M.I., Apasheva L.M., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N. *The production of ecologically pure hydrogen peroxide solutions at high energy non-contact effects on water and their application*. Proceedings of the XV International Scientific Conference, Sevastopol, September 14-16, 2020, pp. 191-192. (In Russ.)]
4. Комиссаров Г.Г. *Фотосинтез: физико-химический подход*. М.: Эдиториал УРСС, 2003, 224 с. [Komissarov G.G. *Photosynthesis: a physico-chemical approach*. М.: Editorial URSS, 2003, 224 p. (In Russ.)]
5. Пискарев И.М. Образование перекиси водорода в водных растворах под действием УФ-С излучения. *Химия высоких энергий*, 2018, т. 52, № 3, с. 194-198. [Piskarev I.M. Formation of hydrogen peroxide in aqueous solutions under the action of UV-C radiation. *High Energy Chemistry*, 2018, vol. 52, no. 3, pp. 194-198. (In Russ.)]
6. Апашева Л.М., Будник М.И., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Розанцев М.В., Турбин В.В., Сергеев А.И., Стребков Д.С. Экологически чистый пероксид водорода: получение, рострегулирующие свойства. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 358-361. [Apasheva L.M., Budnik M.I., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Rozancev M.V., Turbin V.V., Sergeev A.I., Strebkov D.S. Environmentally friendly hydrogen peroxide: production, growth-regulating properties. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 6, no. 1, pp. 358-361. (In Russ.)]

USE OF LASER PULSED RADIATION AND ECOPEROXIDE SOLUTIONS FOR ACTIVATION OF SUGAR BEET SEEDS

Apasheva L.M.¹, Budnik M.I.¹, Smurova L.A.¹, Ovcharenko E.N.¹, Lobanov A.V.¹, Savransky V.V.²,
Turbin V.V.³, Rozancev M.V.³

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
4 Kosygina Street, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ziraf@mail.ru

² A.M. Prokhorov Federal Research Center Institute for General Physics Russian Academy of Sciences
38 Vavilova Street, Moscow, 119991, Russia; e-mail: office@gpi.ru

³ Scientific and production Association «Eco hydrogen peroxide»
21 km of Varshavskoye highway, 1, Bulatnikovskoye rural settlement, Moscow region, 142718, Russia;
e-mail: info@ecoperoksid.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0529

Abstract. Sugar beet, a biennial industrial agricultural crop, is used for the production of ethanol, biofuels, sugar and contains up to 70% sucrose. It is difficult to obtain seeds, the collection of which takes place in the second year of cultivation of root crops. The possibility of accelerating seed activation, increasing germination by methods of pre-sowing treatment of dry seeds: laser pulsed radiation and ecoperoxide solutions was studied. The first test indicating the beginning of seed awakening (one hour after treatment) was a test for determining the release of metabolites into the aqueous culture medium. The metabolites determined by spectrophotometry. They have a characteristic absorption spectrum in the UV region with a clear maximum at $\lambda_{\max} - 207$ nm and absorption up to the boundary with the visible region of $\lambda_{\max} - 330$ nm. A copper vapor laser was used. Parameters: simultaneous generation of two wavelengths – green 510.5 nm and yellow 578.2 nm. The duration of the radiation pulse is 15 ns, the repetition rate is 10 kHz. The irradiation time is 10, 20, 90 s. The greatest effect of seed germination stimulation at 10 s of irradiation exceeded the control by 30%. Increasing the interval to 24 hours or more between irradiation and placing seeds for germination reduced the number of germinated seeds. Ecoperoxide was obtained by high-energy non-contact exposure to distilled water with high-voltage electric discharge streamers. An increase in seed germination by 30-40% was noted when they came into contact with a peroxide solution for 30 minutes.

Key words: sugar beet, laser pulsed radiation, ecoperoxide, stimulation.

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АЛАНИНА И ВАЛИНА, ПРИГОТОВЛЕННЫХ ИТЕРАЦИОННЫМ МЕТОДОМ РАЗБАВЛЕНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИНТЕНСИВНЫМ МЕХАНИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

Семенова Е.В., Лобышев В.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1/2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: lobyshev@yandex.ru
Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0530

Аннотация. Описана методика приготовления сильно разбавленных растворов путем итерационного разбавления, сопровождающегося интенсивным механическим воздействием. Представлены результаты измерений высокочастотной электропроводности и диэлектрической проницаемости серии образцов L и D изомеров аланина и валина. Отсутствие диэлектрического инкремента во всех образцах свидетельствует об отсутствии в растворах мезочастиц с высокой диэлектрической проницаемостью. Зарегистрирована немонотонная, сложная зависимость электропроводности от числа N итераций разбавления. Такого типа зависимость сохраняется при больших N, когда понятие концентрации растворяемого вещества теряет смысл, что свидетельствует об изменениях состава водных растворов при механических воздействиях. Повторные измерения образцов, хранившихся в закрытых флаконах, находившихся в закрытых картонных коробках при комнатных условиях, выявили долговременные эволюционные процессы в водных растворах. Особенность эволюции электропроводности растворов аланина и валина, по сравнению с ранее исследованными потенцированными растворами диклофенака, состоит в уменьшении электропроводности со временем, что противоречит дополнительному растворению углекислого газа из атмосферы при открытии флаконов и растворению стекла. Различий в свойствах растворов L и D изомеров аланина и валина не обнаружено.

Ключевые слова: разбавленные водные растворы, интенсивное механическое воздействие, аминокислоты, диклофенак, электропроводность, активные формы кислорода.

Работа является развитием решения проблемы влияния малых и сверхмалых концентраций на биологические системы в части изучения физико-химических особенностей растворов, приготовленных по технологии многократных последовательных разбавлений с интенсивным механическим воздействием на каждой стадии разбавления [1]. Кратко отметим основные особенности разбавленных водных растворов, которые необходимо принимать во внимание. Обычно рассматриваемая чистая вода является идеальной моделью, но реальная вода, даже в лабораторных исследованиях, является раствором. Традиционно считающееся нерастворимым такое вещество как хлористое серебро, образует насыщенный раствор с концентрацией около 10^{-5} М. Растворенный в воде углекислый газ из атмосферы дает концентрацию бикарбоната 10^{-5} М в нейтральной области pH, что подтверждается экспериментальными данными [2]. Наряду с разнообразными катионами и анионами солей в атмосфере обнаруживают муравьиную и уксусную кислоту не антропогенной природы. Концентрация этих кислот, растворенных в дождевой воде, зависит от сезона и географического положения, и в бразильской Амазонии может превышать 10 мкМ [3]. В свете этих данных нетрудно понять обнаружение различных элементов в сильно разбавленных растворах, приготовленных по технологии итерационного разбавления с интенсивным механическим воздействием, используемой в приготовлении гомеопатических препаратов [4]. Коммерческая вода для хроматографии “Fisher Scientific” гарантирует отсутствие лишь избранных ионов Al, Cd, Cr, Cu, K на уровне 10 ppb, т.е. на уровне 10^{-8} . Чистая вода I класса MQ, обладающая удельным сопротивлением 18,2 МОм•см гарантирует отсутствие углерода на уровне 3 ppb, но указанное сопротивление быстро уменьшается при контакте воды с воздухом за счет растворения углекислого газа. Чистая вода неравновесна и может растворять любые элементы, находящиеся в атмосфере лаборатории в соответствии с законом Генри. При интенсивном механическом воздействии (встряхивание, вибрации, перемешивание) в водных растворах образуются активные формы кислорода и азота, появление которых в присутствии бикарбонатов неизбежно влечет за собой каскад сопряженных цепных электрон-радикальных реакций и изменений окислительно-восстановительного потенциала среды весьма важного для функционирования живых систем [1,5,6].

На примере широко распространенного противовоспалительного и анальгезирующего средства – диклофенака нами было обнаружено существование немонотонной зависимости электропроводности водных растворов диклофенака от числа итераций при последовательных сотенных разбавлениях, сопровождающихся активным встряхиванием [7,8]. Такие образцы называют для краткости потенцированными. Измерения электрических характеристик водных растворов проводили с помощью прецизионного анализатора импеданса WK 65120 BD1 (Wayne Kerr Electronics) в кювете с коаксиальными цилиндрическими электродами из титана. Такая конструкция кюветы позволяет быструю эффективную промывку и замену измеряемого образца. Кювета снабжена термостатирующей рубашкой, позволяющей поддерживать с помощью водяного термостата колебания температуры, не превышающие 0,1 °С. Измерения проводили при температуре 25 °С. Небольшие колебания температуры термостата приводили к соответствующим изменениям электрических характеристик образцов.

Регистрацию электрических характеристик проводили при минимальном значении параметров, характеризующих “температурную пилу”, что обеспечивало погрешность не более 0,5%. Более подробно технические детали изложены в работе [7]. Важно отметить отсутствие инкремента диэлектрической проницаемости во всех исследованных растворах, что говорит об отсутствии релаксационных процессов и самоорганизующихся мезочастиц с большими дипольными моментами. Зависимость изучаемой физической характеристики от числа итерационных разбавлений при небольшом числе итераций $N \leq 11$ (для используемых сотенных разбавлений) можно назвать концентрационной зависимостью, однако, при больших числах N , понятие концентрации растворяемого вещества теряет смысл и такую зависимость в целом корректно называть паттерном. Немонотонная зависимость электропроводности потенцированных образцов диклофенака наблюдалась также при числе итераций N , в которых понятие концентрации исходного вещества теряет смысл, что свидетельствует о существенной роли технологии приготовления образцов разбавленных растворов [8]. Еще одной особенностью исследованных образцов оказалось наличие длительной эволюции паттернов сопротивления при сохранении высокой корреляции (выполняется уровень значимости $\beta \leq 0,001$) между паттернами, измеренными через большие интервалы времени, что можно видеть на рисунке 1.

Диклофенак – довольно сложное органическое соединение, имеющее молекулярную массу 296 Да и содержащее два активных электроотрицательных атома хлора. Для выяснения поведения потенцированных растворов более простых молекул были выбраны аминокислоты алифатического ряда – аланин и валин, а для выяснения возможной роли изомерии использовали L и D формы аминокислот. По вышеописанной технологии готовили растворы аминокислот от Sigma-Aldrich: L-аланин (A7627), D-аланин (A7377), L-валин (V0500) и D-валин (V1255). Для разбавления использовали воду MQ. Сначала готовили раствор аминокислоты с концентрацией 0,01 М, соответствующий $N=0$. Из этого образца отбирали 0,1 мл, помещали в стеклянный флакон объемом 20 мл и добавляли 9,9 мл воды. Затем этот образец сотенного разбавления подвергали интенсивному встряхиванию и присваивали итерационный номер $N=1$. Этот образец имеет концентрацию аминокислоты 10^{-4} М. Следующий образец готовили разбавлением образца $N1$ с последующей механической обработкой, получая образец $N2$. Эту процедуру повторяли многократно и получили ряд N раз (до $N=33$) разбавленных потенцированных образцов в закрытых флаконах, хранившихся в закрытой картонной коробке в комнатных условиях. Для корректного сравнения электрических характеристик L- и D- аминокислот готовили две параллельных серии образцов, сначала L- $N1$ и D- $N1$, затем L- $N2$ и D- $N2$, и т.д., поскольку, как было показано ранее [8,9], немонотонные паттерны электропроводности параллельно приготовленных рядов разбавлений одного и того же вещества очень хорошо коррелируют друг с другом. Хранившиеся образцы через несколько дней снова измеряли для определения длительной эволюции характеристик растворов, связанных с процессами самоорганизации в растворе. Измерения электропроводности проводили на частоте 100 кГц, где влияние двойного электрического слоя на металлических электродах пренебрежимо мало. Эволюция паттернов электрического сопротивления потенцированных растворов L и D аминокислот представлена на рисунках 2-5.

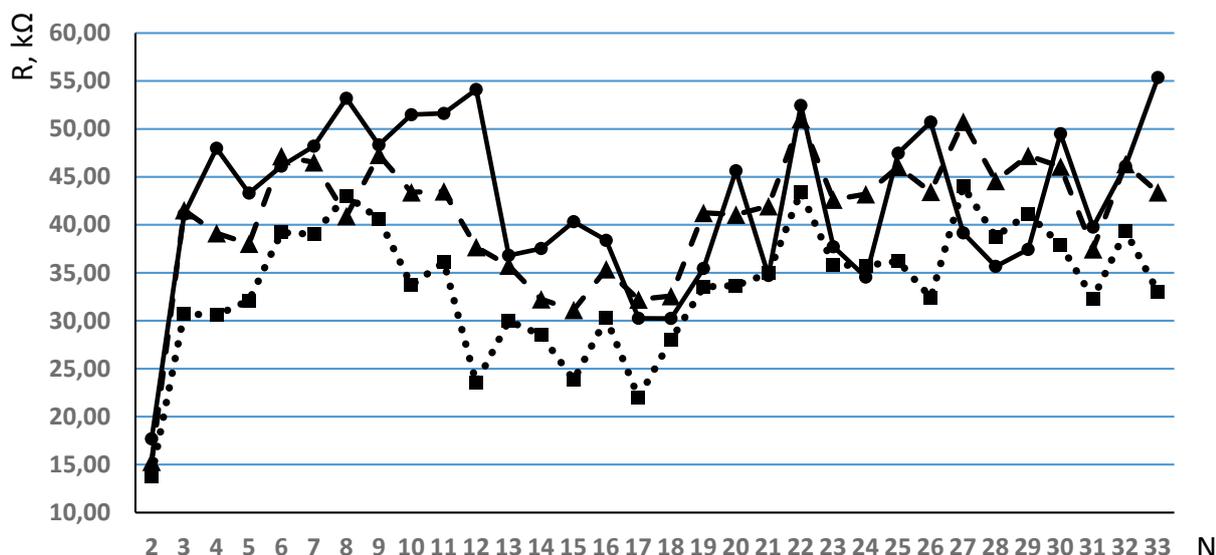


Рисунок 1. Эволюция паттернов сопротивления потенцированных образцов растворов диклофенака, где N – число итераций сотенного разбавления. Экспериментальные точки соединены линиями для наглядности. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: 1 день – сплошная, 14 дней – пунктирная, 30 дней – точечная линии. Стандартная погрешность не превышает размера точки

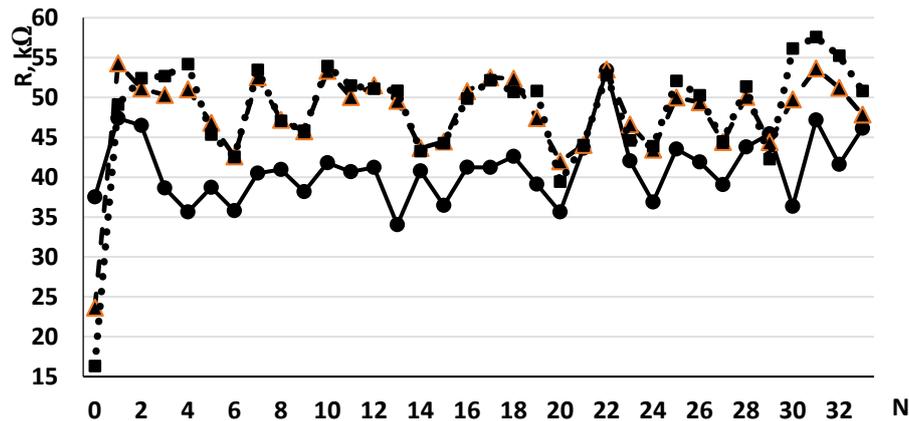


Рисунок 2. Эволюция паттернов сопротивления потенцированных образцов растворов L-аланина, где N – число итераций сотенного разбавления. Экспериментальные точки соединены линиями для наглядности. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: 1 день – сплошная, 7 дней – пунктирная, 14 дней – точечная линии. Стандартная погрешность не превышает размера точки

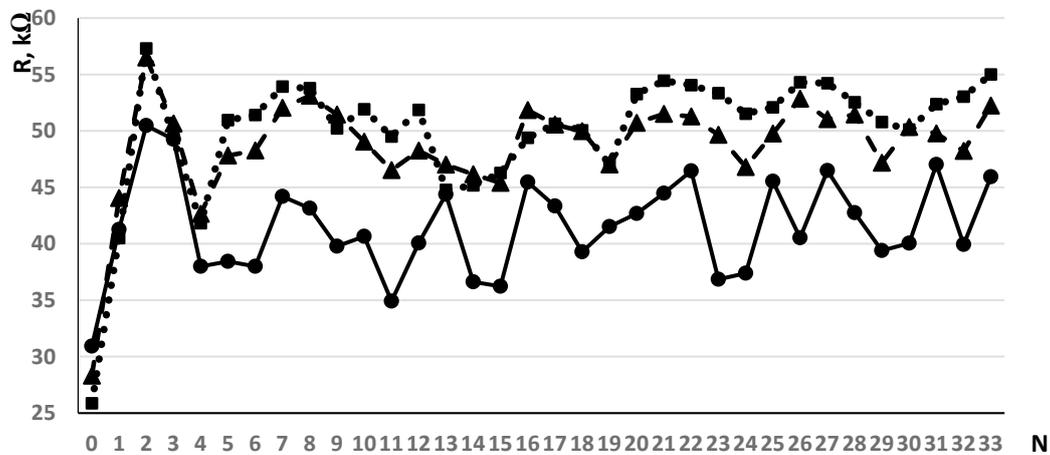


Рисунок 3. Эволюция паттернов сопротивления потенцированных образцов растворов D-аланина, где N – число итераций сотенного разбавления. Экспериментальные точки соединены линиями для наглядности. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: 1 день – сплошная, 7 дней – пунктирная, 14 дней – точечная линии. Стандартная погрешность не превышает размера точки

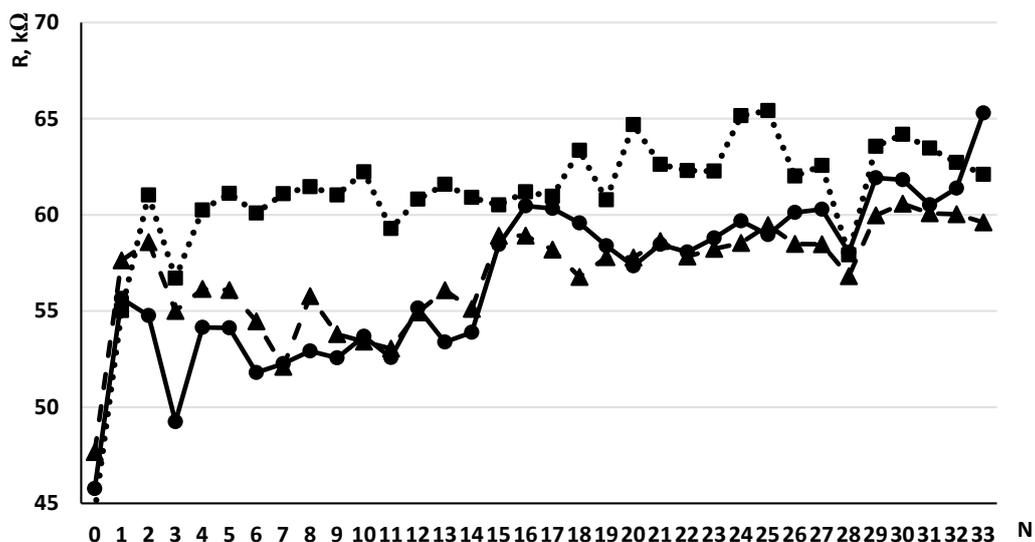


Рисунок 4. Эволюция паттернов сопротивления потенцированных образцов растворов L-валина, где N – число итераций сотенного разбавления. Экспериментальные точки соединены линиями для наглядности. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: 2 дня – сплошная, 8 дней – пунктирная, 29 дней – точечная линии. Стандартная погрешность не превышает размера точки

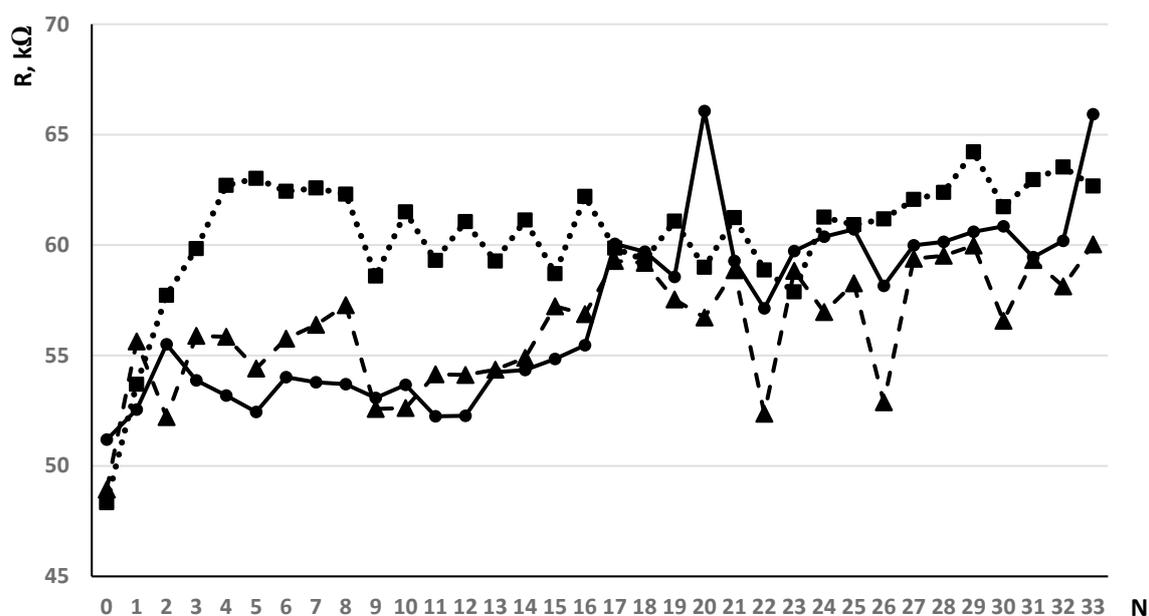


Рисунок 5. Эволюция паттернов сопротивления потенцированных образцов растворов D-валина, где N – число итераций сотенного разбавления. Экспериментальные точки соединены линиями для наглядности. Интервал времени между приготовлением образцов и измерениями: 2 дня – сплошная, 8 дней – пунктирная, 29 дней – точечная линии. Стандартная погрешность не превышает размера точки

Как и в случае растворов диклофенака наблюдается сложная немонотонная зависимость проводимости вплоть до $N=33$, где уже при $N \geq 10$ понятие концентрации растворяемого вещества теряет смысл, что означает несомненную роль технологии приготовления образцов. Отсутствует также инкремент диэлектрической проницаемости во всем диапазоне разбавлений, а вариации диэлектрической проницаемости образцов во времени не превышают 0,1% и являются случайными. Рассчитаны коэффициенты линейной корреляции между паттернами сопротивления образцов L и D аминокислот для разных интервалов количества итераций N и разных сроков хранения образцов после их приготовления. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Для оценки там же представлены критические значения коэффициентов корреляции для разных уровней значимости и соответствующего количества экспериментальных точек. Можно видеть, что при сравнении паттернов одинаковых образцов, измеренных в разное время хранения, сохраняется высокая корреляция, удовлетворяющая уровню значимости 0,001. Исключение составляет серия образцов аланина в интервале хранения от одного до 7 дней, где наличие корреляции удовлетворяет уровню значимости 0,05. Этот результат свидетельствует о том, что наблюдаемая немонотонная зависимость не случайна и зависит от процедуры приготовления образцов, испытывающих последующие процессы самоорганизации. Из таблицы 2 видно, что корреляция между паттернами L и D изомеров аминокислот высока и соответствует уровню значимости 0,01, что говорит об отсутствии различий электрических характеристик при использованной технологии разбавления. При больших N (20-33) корреляция становится незначимой, а результат потенцирования не зависит от исходно

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между паттернами изомеров аминокислот, зарегистрированными при разных сроках хранения в интервале $N=0-33$

изомеры	аланин		валин		Критические значения для разных уровней значимости		
	1-7 дней	7-14 дней	2-8 дней	8-29 дней	R 0,05	R 0,01	R 0,001
L - L	0,41	0,95	0,88	0,69	0,34	0,44	0,54
D - D	0,71	0,93	0,67	0,55	0,34	0,44	0,54

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между паттернами для L и D изомеров аминокислот

интервал N	аланин			валин			Критические значения для разных уровней значимости		
	1 день	7 дней	14 дней	2 дня	8 дней	29 дней	R 0,05	R 0,01	R 0,001
0-33	0,43	0,64	0,59	0,80	0,65	0,73	0,34	0,44	0,54
0-12	0,47	0,73	0,76	0,31	0,51	0,89	0,55	0,68	0,80
20-33	0,50	0,21	0,14	0,34	0,24	-0,12	0,53	0,66	0,78

растворяемого вещества. Тем не менее, интенсивное перемешивание приводит к изменению электропроводности водных растворов.

Существенное отличие от всех предыдущих исследований [7-10] состоит в качественно иной эволюционной траектории образцов с растворами аминокислот. Среднее значение электропроводности не возрастало со временем, как в образцах растворов диклофенака, чистой воды, тяжелой воды, растворов глицерина, но уменьшалась, что полностью противоречит возможности растворения ионов стекла в хранящихся образцах и дополнительного насыщения образцов углекислым газом при открывании флаконов для отбора проб при измерениях. Более подробная информация будет получена при непосредственной регистрации активных форм кислорода.

Список литературы / References:

1. Лобышев В.И. О проблеме влияния малых концентраций на биологическую активность. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, изд. Севастопольский государственный университет (Севастополь), 2020, т. 5, № 3, с. 390-398. [Lobyshev V.I. On the problem of low concentrations on biological activity. *Russian Journal of Biological Physics And Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 390-398. (In Russ.)]
2. Xibo Yan, Delgado M., Aubry J., Gribelin O., Stocco A., Da Cruz F.B., Bernard J., Ganachaud F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018, vol. 9, pp. 96-103, doi: 10.1021/acs.jpcclett.7b02993.
3. Khare P., Kumar N., Kumari K.M., Srivastava S.S. Atmospheric formic and acetic acid: an overview. *Reviews of Geophysics*, 1999, vol. 37, no. 2, pp. 227-248.
4. Rajendran E.S. *Nanodynamics*. Mohna Publ., Kerala, India, 2015.
5. Bruskov V.I., Chernikov A.V., Ivanov V.E., Karmanova E.E., Gudkov S.V. Formation of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon dioxide in aqueous solutions under physical impacts. *Phys. Wave Phenom.*, 2020, vol. 28, no. 2, pp. 103-106, doi: 10.3103/s1541308x2002003x.
6. Gudkov S.V., Nikita V., Penkov N.V., Baimler I.V., Lyakhov G.A., Pustovoy V.I., Simakin A.V., Sarimov R.M., Scherbakov I.A. Effect of Mechanical Shaking on the Physicochemical Properties of Aqueous Solutions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, p. 8033, doi: 10.3390/ijms21218033.
7. Lobyshev V.I. Dielectric Characteristics of Highly Diluted Aqueous Diclofenac Solutions in the Frequency Range of 20 Hz to 10 MHz. *Physics of Wave Phenomena*, 2019, vol. 27, no. 2, pp. 119-127. doi: 10.3103/S1541308X19020067.
8. Lobyshev V.I. Non-monotonous impedance patterns of diclofenac centesimal potentiated solutions and their evolution. *Water. Special edition*, 2022, doi: 10.14294/WATER.2022.S4.
9. Lobyshev V.I. Evolution of High-Frequency Conductivity of Pure Water Samples Subjected to Mechanical Action: Effect of a Hypomagnetic Field. *Physics of Wave Phenomena*, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 98-101, doi: 10.3103/S1541308X21020084.
10. Lobyshev V.I. Electrical Properties of Heavy Water Samples Subjected to Vigorous Shaking during Successive Dilutions. *Physics of Wave Phenomena*, 2022, vol. 30, no. 3, pp. 141-144.

CONDUCTIVITY OF AQUEOUS SOLUTIONS OF ALANINE AND VALINE PREPARED BY THE ITERATIVE DILUTION METHOD FOLLOWED BY INTENSIVE MECHANICAL IMPACT

Semenova E.V., Lobyshev V.I.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: lobyshev@yandex.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2022.0530

Abstract. The method of preparation of highly diluted solutions, by iterative dilution accompanied by intense mechanical action is described. The results of high-frequency electrical conductivity and dielectric permittivity of L and D isomers of alanine and valine are presented. The absence of dielectric increment in all samples indicates the absence of mesoparticles with high dielectric permittivity in solutions. A non-monotonic, complex dependence of electrical conductivity on the number of N dilution iterations is recorded. This type of dependence persists at large N, when the concept of the solute concentration loses its meaning, which indicates changes in the composition of aqueous solutions under mechanical impact. Repeated measurements of samples stored in closed vials in closed cardboard boxes at room conditions revealed long-term evolutionary processes in aqueous solutions. The peculiarity of the evolution of the electrical conductivity of alanine and valine solutions, in comparison with the previously studied potentiated diclofenac solutions, consists in a decrease in electrical conductivity over time, which contradicts the additional dissolution of carbon dioxide from the atmosphere when opening vials and dissolving glass. There were no differences in the properties of L and D isomers of alanine and valine solutions.

Key words: dilute aqueous solutions, intensive mechanical impact, amino acids, diclofenac, electrical conductivity, reactive oxygen species.

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КОМПОНЕНТЫ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

Цай А.А.¹, Васильева Т.И.¹, Глушечков В.А.^{1,2}, Роденко Н.А.^{1,2}

¹ Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева
ул. Академика Павлова, 1, г. Самара, 443011, РФ; e-mail: annatsay2001@mail.ru

² Самарский федеральный исследовательский центр РАН
Студенческий переулок, 3А, г. Самара, 443001, РФ; e-mail: t.rodenko@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0531

Аннотация. В работе изучается влияние импульсного магнитного поля (ИМП) на фермент (α -амилазу) и субстрат (крахмал) и на процесс протекания ферментативной реакции. Обработка ИМП проводилась на магнитно-импульсной установке МИУ-15. Вещества в порошкообразном виде обрабатывались коротким однократным импульсом с различной напряженностью H магнитного поля. Крахмал (30 мг) в пенициллиновом флаконе обрабатывали ИМП с напряженностями $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, амилазу (10 мг) обрабатывали ИМП на той же установке при напряженностях $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м. Опытные и контрольные пробы, содержащие обработанный и не обработанный ИМП компонент ферментативной реакции, инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Ферментативную активность определяли стандартным методом, используя реакцию Сакса. Оптическую плотность измеряли при длине волны 590 нм. Была показана устойчивость α -амилазы и крахмала к ИМП при различных напряженностях магнитного поля. Предполагается, что устойчивость фермента может быть связана с его структурой, содержащей стабилизирующие ионы кальция.

Ключевые слова: амилаза, крахмал, импульсное магнитное поле, ферментативная активность.

В настоящее время изучается влияние магнитного поля на биологические системы. Известны данные о влиянии импульсного магнитного поля на ферменты [1-3] и вещества, обладающие сродством к активному центру [4]. Результатом таких работ являлось изменение активности фермента. Эффект влияния всегда противоречив и зависит от вида магнитного поля, его интенсивности, биологической системы, в которой происходит ферментативная реакция. Механизм воздействия магнитного поля может быть выявлен при действии магнитного поля на изолированные молекулы.

Поскольку ферменты широко применяются в разных областях промышленности и медицины, обработка магнитным полем может использоваться для повышения эффективности биотехнологических процессов. Одним из наиболее важных промышленных ферментов является амилаза. В связи с широким применением амилаз в промышленности, а также с интересом познания механизма воздействия ИМП на фермент и субстрат, целью нашей работы являлось изучение влияния импульсного магнитного поля на компоненты амилолитической реакции.

Магнитно-импульсная установка (МИУ) представляет собой генератор однократных импульсов тока, который содержит высоковольтный емкостный накопитель энергии. Основные характеристики МИУ определяются параметрами компонентов накопителя энергии: импульсных высоковольтных конденсаторов, разрядников и элементами зарядного блока [5].

Магнитно-импульсная обработка веществ проводилась по следующей схеме (рис. 1):

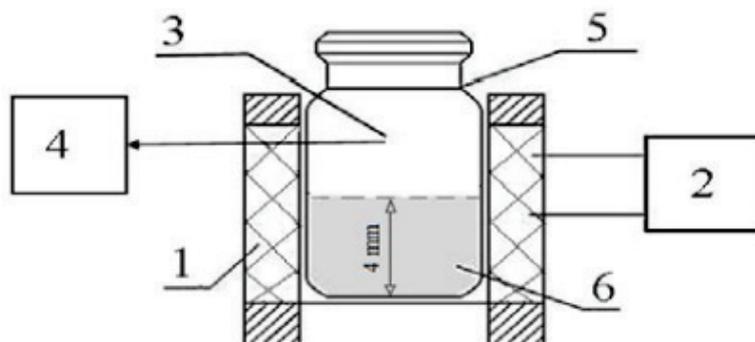


Рисунок 1. Схема магнитно-импульсной обработки веществ

Обозначения: индуктор (1), генератор импульсного тока (2), датчик замера напряженности ИМП (3) и осциллограф (4). Датчик ИМП (3) соединен с осциллографом (4). В индуктор (1) вставляется флакон (5) с порошкообразным веществом (6), после чего происходит обработка ИМП

Таблица 1. Параметры воздействия ИМП на крахмал и амилазу в порошкообразном виде

Напряжение, кВ	Энергия, кДж	Частота f, кГц	Напряженность H·10 ⁶ , А/м	Количество импульсов, n
1	0,05	40	0,03	1
3	0,45		0,09	
10	5,08		0,30	
15	11,4		0,45	

При протекании по индуктору (1) импульса тока вокруг индуктора создается переменное магнитное поле, которое наводит в обрабатываемой заготовке вихревые токи, имеющие обратное по отношению к току индуктора направление.

Силовое воздействие со стороны индуктора осуществляется дистанционно, то есть без механического или электрического контакта между инструментом и обрабатываемой заготовкой (веществом) [6].

α -амилазу грибную Амилоризин (Биопрепарат, Россия), полученную на основе штамма *Aspergillus oryzae*, и картофельный крахмал (Реахим, Россия) в порошкообразном виде обрабатывали ИМП на магнитно-импульсной установке МИУ-15, сконструированной в Самарском университете.

Крахмал (30 мг) в пенициллиновом флаконе обрабатывали ИМП при напряженностях магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, амилазу (10 мг) обрабатывали на той же установке при напряженностях магнитного поля $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м (табл. 1).

Осциллограмма тока при воздействии ИМП представлена на рисунке 2.

Активность α -амилазы определяли стандартным методом [7], используя реакцию Сакса. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0,05$.

Для определения активности амилазы 2 мл крахмала, приготовленного на 0,9% NaCl, 2 мл буфера и 0,4 мл ферментативного раствора инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Одновременно ставили контрольную пробу, содержащую 2 мл крахмала и 2,4 мл буфера. После инкубации добавляли 0,8 мл 0,5N HCl для остановки реакции и 0,1 мл р-ра Люголя. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 590 нм. Раствор обнуления содержал 2 мл 0,9% NaCl, 2 мл буфера и 0,4 мл ферментативного раствора.

Для расчета активности амилазы использовали следующую формулу (1):

$$A = \frac{(D_k - D_o) \times m_1}{D_k \times t \times m_2} \quad (1)$$

где A – активность фермента, которая выражается в массе крахмала (в граммах), которую гидролизует 1 г амилазы за 1 минуту, D_k – ОП для контроля, D_o – ОП для опыта, m_1 – масса крахмала, m_2 – масса амилазы, t – время (в минутах).

В опыте по обработке ИМП крахмала мы получили, что ферментативная активность амилазы, гидролизующей крахмал, достоверно не отличается от контроля (рис. 3).

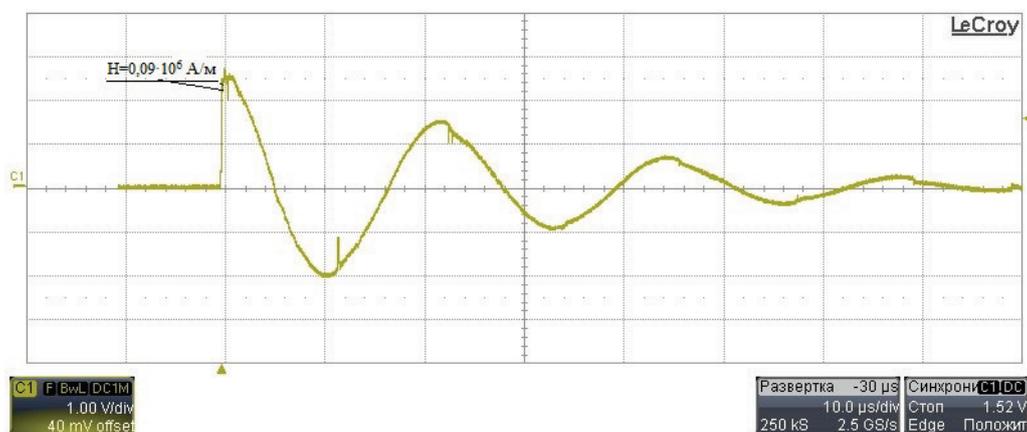


Рисунок 2. Осциллограмма разрядного тока при напряженности магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м импульсного магнитного поля

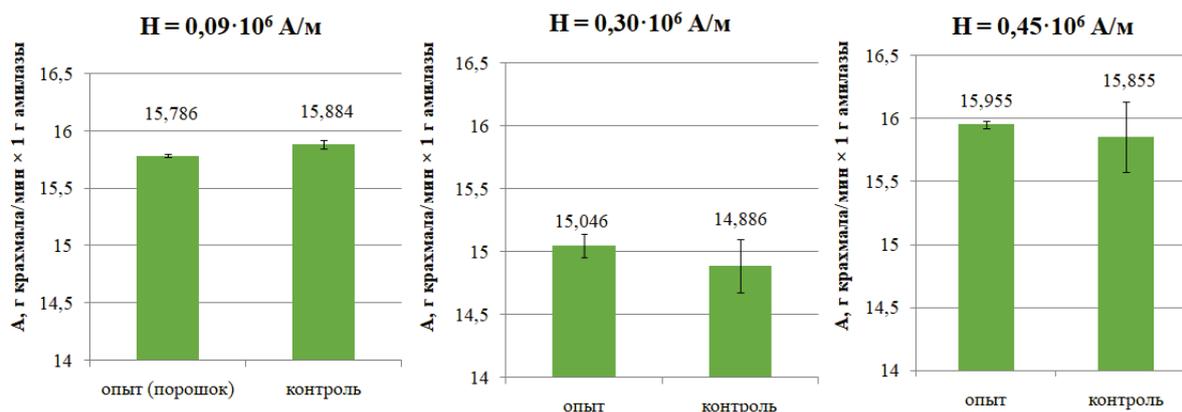


Рисунок 3. Активность амилазы при взаимодействии с обработанным и необработанным ИМП субстратом (крахмалом) при различных напряжённостях магнитного поля

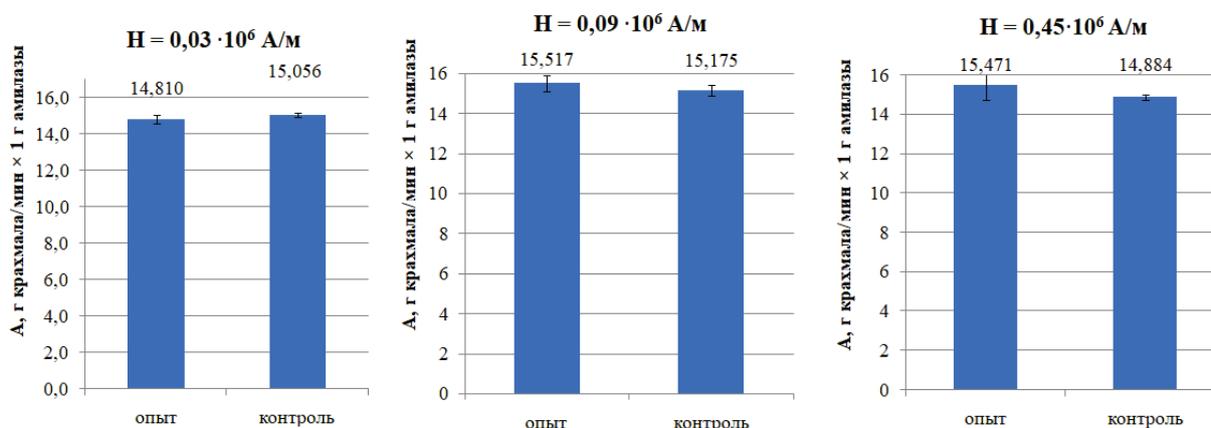


Рисунок 4. Активность обработанной и необработанной ИМП амилазы при различных напряжённостях магнитного поля

При воздействии ИМП на амилазу достоверных отличий от контроля также не было зафиксировано (рис. 4).

В таблице 2 представлены результаты эксперимента по изучению активности амилазы при взаимодействии с обработанным и необработанным ИМП субстратом (крахмалом) и активность обработанной и необработанной ИМП амилазы при различных напряженностях магнитного поля. Контрольный образец не подвергался воздействию ИМП.

Показано отсутствие достоверных отличий активности амилазы в отличие от контроля при воздействии ИМП на порошок крахмала при напряженностях магнитного поля $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,30 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м, а также отсутствие достоверных отличий активности обработанной ИМП амилазы при напряженностях магнитного поля $H = 0,03 \cdot 10^6$ А/м, $H = 0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H = 0,45 \cdot 10^6$ А/м в отличие от необработанной. Таким образом, крахмал и амилаза устойчивы к действию импульсного магнитного поля при исследуемых параметрах. Предполагается, что это может быть связано с большим размером молекул, которые не успевают перестроиться за короткий однократный импульс. Устойчивость амилазы к действию магнитного поля предположительно можно объяснить входящими в ее состав ионами кальция.

Таблица 2. Активность амилазы до и после воздействия ИМП на субстрат (крахмал) и активность амилазы до и после воздействия ИМП на фермент при различных напряженностях магнитного поля

Обработанный ИМП компонент реакции		Крахмал			Амилаза		
Напряжение U, кВ		3	10	15	1	3	15
Напряженность $H \cdot 10^6$, А/м		0,09	0,30	0,45	0,03	0,09	0,45
Активность амилазы (г крахмала/мин \times 1 г амилазы)	Опыт	15,786 \pm 0,017	15,046 \pm 0,093	15,955 \pm 0,031	14,810 \pm 0,120	15,517 \pm 0,262	15,470 \pm 0,138
	Контроль	15,884 \pm 0,034	14,886 \pm 0,211	15,855 \pm 0,281	15,056 \pm 0,242	15,175 \pm 0,403	14,884 \pm 0,765

Список литературы/References:

1. Snine M.B., Guruprasad K.N., Anand Anjali. Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 2011, no. 32, pp. 474-484.
2. Минникова Т.В., Денисова Т.В., Колесников С.И. Влияние совместного воздействия переменных магнитных полей промышленной частоты 50 Гц и загрязнения никелем на ферментативную активность и фитотоксичность чернозёма Керченского полуострова. *Научный журнал КубГАУ*, 2015, № 112 (08). [Minnikova T.V., Denisova T.V., Kolesnikov S.I. Influence of joint influence of variation magnetic fields of the industrial frequency of 50 Hz and contamination by nickel on enzyme activity and phytotoxicity of the chernozem of the Southern of the half-island of Kerch. *Scientific Journal of KubSAU*, 2015, no. 112 (08). (In Russ.)]
3. Чеботарева Е.Г., Бородулин В.Б., Горошинская И.А., Бабушкина И.В., Фомина Н.Ю., Моррисон В.В., Усанов А.Д., Скрипаль А.В., Усанов Д.А. Влияние магнитного поля на активность фермента лактатдегидрогеназы. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*, 2006, № 4, с. 80-83. [Chebotareva E.G., Borodulin V.B., Goroshinskaya I.A., Babushkina I.V., Fomina N.Yu., Morrison V.V., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. E.G. The effect of the magnetic field on the activity of lactate dehydrogenase enzyme. *News of universities. The North Caucasus region. Natural Sciences*, 2006, no. 4, pp. 80-83. (In Russ.)]
4. Васильева Т.И., Беляева И.А., Глушченков В.А., Роденко Н.А. Магнитные эффекты антибактериального действия облученного бензилпенициллина натриевой соли. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2018, т. 20, № 5(2), с. 307-316. [Vasilyeva T.I., Belyaeva I.A., Glushchenkov V.A., Rodenko N.A. The magnetic effects of antibacterial effect of radiation benzylpenicillin sodium salt. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 20, no. 5(2), pp. 307-316. (In Russ.)]
5. Юсупов Р.Ю. Универсальные и специальные магнитно-импульсные установки нового поколения. *Вестник Самарского государственного аэрокосмического университета им. академика С.П. Королёва (Национального исследовательского университета)*, 2012, № 5-2 (36), с. 125-130. [Yusupov R.Yu. Multipurpose and specialized pulse-magnetic installations of new vintage. *Bulletin of Samara State Aerospace University named after Academician S.P. Korolev (National Research University)*, 2012, no. 5-2 (36), pp. 125-130. (In Russ.)]
6. Прокофьев А.Б., Беляева И.А., Глушченков В.А., Карпукхин В.Ф., Черников Д.Г., Юсупов Р.Ю. *Магнитно-импульсная обработка материалов (МИОМ): монография*. Самара: АНО «Издательство СНЦ», 2019, 140 с. [Prokofiev A.B., Belyaeva I.A., Glushchenkov V.A., Karpukhin V.F., Chernikov D.G., Yusupov R.Yu. *Magnetic pulse processing of materials (MIOM): monograph*. Samara: ANO "SNC Publishing House", 2019, 140 p. (In Russ.)]
7. Кленова Н.А., Макурина О.Н., Писарева Е.В., Языкова М.Ю. *Спецпрактикум по биохимии животных, растений и микроорганизмов. Учебное пособие*. Самара: Изд-во «С-Принт», 2013, 148 с. [Klenova N.A., Makurina O.N., Pisareva E.V., Yazykova M.Yu. *Special practice on biochemistry of animals, plants and microorganisms. Study guide*. Samara: Publishing house "S-Print", 2013, 148 p. (In Russ.)]

THE EFFECT OF AN IMPULSE MAGNETIC FIELD ON THE COMPONENTS OF THE AMYLOLYTIC REACTION

Tsay A.A.¹, Vasilyeva T.I.¹, Glushchenkov V.A.^{1,2}, Rodenko N.A.^{1,2}

¹ Samara National Research University named after academician S.P. Korolev
Academician Pavlov str., 1, Samara, 443011, Russia; e-mail: annatsay2001@mail.ru

² Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences
Studentskiy pereulok, 3A, Samara, 443001, Russia; e-mail: t.rodenko@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0531

Abstract. The effect of a pulsed magnetic field (PMF) on the enzyme (α -amylase) and a substrate (starch) and the enzymatic reaction process is studied. The PMF treatment was carried out on a pulse-magnetic installation MIU-15. The substances represented by the powder were treated with short single pulse with different magnetic field strengths H . Starch (30 mg) in penicillin vial was treated by the PMF with intensities of $H = 0.09 \cdot 10^6$ A/m, $H = 0.30 \cdot 10^6$ A/m and $H = 0.45 \cdot 10^6$ A/m, amylase (10 mg) was treated by the same unit at intensities of $H = 0.03 \cdot 10^6$ A/m, $H = 0.09 \cdot 10^6$ A/m and $H = 0.45 \cdot 10^6$ A/m. Experimental and control samples containing the PMF-treated and untreated component of the enzymatic reaction were incubated at 37°C for 30 minutes. The enzymatic activity was determined by the standard method using Sachs' reaction. The optical density was measured at a wavelength of 590 nm. The resistance of α -amylase and starch to the PMF was shown at various magnetic field strengths. It is assumed that the stability of the enzyme may be related to its structure containing stabilizing calcium ions.

Key words: amylase, starch, pulsed magnetic field, enzymatic activity.

ТЕМПЕРАТУРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

Тимченко Н.Н., Головченко И.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0532

Аннотация. Широкое применение методов низкотемпературного хранения биологических объектов требует изучения механизмов влияния температуры на молекулярном уровне. Исследовано влияние температуры в диапазоне $+10\div+38^\circ\text{C}$ на гемоглобин А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектроскопии и анализа первых производных спектров поглощения. Зависимость $\Delta E/E$ от температуры для раствора гемоглобина А имеет S-образный вид. На зависимости $\Delta E/E$ от температуры для гемоглобина А наблюдаются изломы: первый в области температуры $+25\div+27^\circ\text{C}$ и второй излом в области температур $+33\div+35^\circ\text{C}$. В эксперименте, проведенном на миеломном иммуноглобулине G, получена S-образная зависимость интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров от температуры, которая имеет изломы при $+25$ и $+35^\circ\text{C}$. Авторы данную S-образную зависимость связывают с наличием конформационного перехода в области температур $+25\div+35^\circ\text{C}$. По-видимому, можно предположить, что в молекуле гемоглобина А конформационные изменения происходят в области температур $+25\div+35^\circ\text{C}$. По данным спектроскопии конформационное состояние глобина изменяется при температурах около $+26\div+30^\circ\text{C}$. Данные наших исследований свидетельствуют о наличии конформационных перестроек в молекуле гемоглобина при $+25$ и $+35^\circ\text{C}$. Наши данные, предположительно свидетельствующие об изменении структуры гемоглобина А человека при температуре около $+25^\circ\text{C}$, вероятно, подтверждаются и другими исследованиями с помощью динамического светорассеяния, некогерентного светорассеяния, ИР-спектроскопии, исследованиями для внутриэритроцитарного гемоглобина А донорской крови 5-ти дней хранения о содержании оксигемоглобина А, согласно которому, так как уменьшение содержания оксигемоглобина А и оксигенация молекулы гемоглобина связана с её конформационным состоянием, то, возможно, при $+25^\circ\text{C}$ начинает проявляться изменение конформационного состояния молекулы гемоглобина А, которое может способствовать более выраженному уменьшению содержания оксигемоглобина А. Особенности свойства HbA, определяющие наличие специальной температуры около $+25^\circ\text{C}$ на температурных зависимостях различных параметров гемоглобина, требует дальнейшего исследования в сравнении в различных температурных интервалах.

Ключевые слова: гемоглобин, конформационные изменения, температура.

С расширением задач медицины в настоящее время гемоглобин продолжают изучать, в том числе и в медицинских биофизических исследованиях [1-3]. Основной функцией гемоглобина, входящего в состав эритроцитов, является транспорт кислорода из легких животного во внутренние органы и обратный – углекислого газа. Гемоглобин состоит из двух пар миоглобин-подобных субъединиц. Четыре субъединицы вместе образуют почти правильный тетраэдр. Молекула кислорода присоединяется к гемам, используя шестую координационную связь Fe^{2+} так-же как и в случае миоглобина. В связывании углекислого газа участвуют свободные α -аминогруппы N-концов гемоглобина [4]. Методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения идентифицировано расположение молекул воды, наиболее прочно связанных с деокси- и метформой гемоглобина [5]. Некоторое количество молекул воды локализовано в области контактов между субъединицами и образует мостиковые связи, дополнительно стабилизируя тетрамер. Много молекул воды на поверхности субъединиц зарегистрировано вблизи полярных групп субъединиц гемоглобина [6]. На картах электронной плотности гемоглобина всего зарегистрировано только 90 молекул воды. Это составляет 10% от гидратной оболочки гемоглобина. Остальная часть обладает большей подвижностью и не может быть зарегистрирована рентгеноструктурным методом. Процесс присоединения кислорода тетрамером гемоглобина носит кооперативный характер. Кооперативность в данном случае означает, что присоединение первых молекул кислорода к гемоглобину облегчает присоединение остальных молекул кислорода. Гемоглобин можно рассматривать как белок, моделирующий аллостерические свойства ферментов. В результате подведения итогов серии рентгеноструктурных исследований предложен стереохимический механизм гем-гемового взаимодействия [7]. При переходе гемоглобина из окси- в деоксиформу наиболее значительно изменяется четвертичная структура белка. Пусковым механизмом этих изменений является перемещение атома железа на 0,075 нм относительно плоскости порфиринового кольца одной из субъединиц при связывании в шестом положении Fe (II) молекулы O_2 . Fe (II) при этом переходит из высоко- в низкоспиновое состояние и располагается в плоскости гема. Атом железа, как бы “подтягивает” к гему проксимальный остаток гистидина. Это вызывает перемещение спирали к центру молекулы и вытеснение ТирС2(140) из полости между спиралями. Дальнейшие события приводят к поэтапному разрыву солевых мостиков, стабилизирующих четвертичную структуру деоксиформы гемоглобина, и переходу гемоглобина в оксиформу. Переход гемоглобина из деокси- в оксиформу сопровождается разрывом

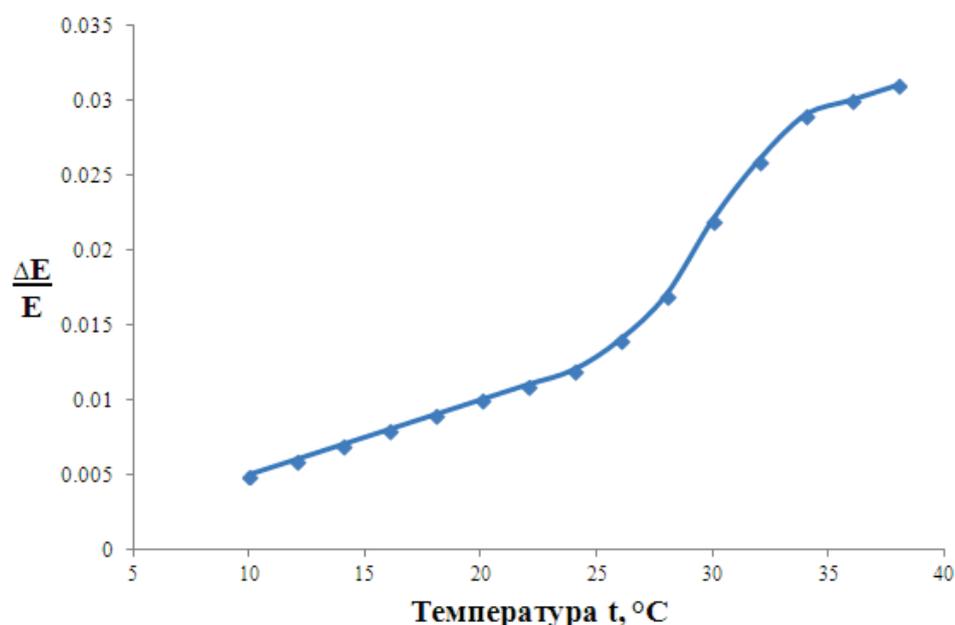


Рисунок 1. Зависимость интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров (ТПДС) при 286 нм раствора HbA (температура сравнения +10°C), пронормированной на интенсивность спектра поглощения (СП) при +10°C, от температуры

шести солевых мостиков и освобождением протонов (эффект Бора). Широкое применение методов низкотемпературного хранения биологических объектов требует изучения механизмов влияния температуры на молекулярном уровне. Исследовано влияние температуры в диапазоне +10÷+38°C на оксиформу гемоглобина А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа первых производных спектров поглощения. Зависимость $\Delta E/E$ от температуры для раствора гемоглобина А имеет S-образный вид (рис. 1). На зависимости $\Delta E/E$ от температуры для гемоглобина А (рис. 1) видны изломы: первый в области температуры +25÷+27°C и второй излом в области температур +33÷+35°C. В эксперименте [8], проведённом на миеломном иммуноглобулине G получена S-образная зависимость интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров от температуры, которая имеет изломы при +25 и +35°C. Авторы [8] данную S-образную зависимость связывают с наличием конформационного перехода в области температур +25÷+35°C. По-видимому, можно предположить, что в молекуле гемоглобина А конформационные изменения происходят в области температур +25÷+35°C. По данным спектрофотометрии конформационное состояние глыбина изменяется при температурах около +26-+30°C. Для растворов гемоглобина А при +10 и +18°C структуры первых производных спектров поглощения сходны между собой (рис. 2). Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм при температуре +18°C

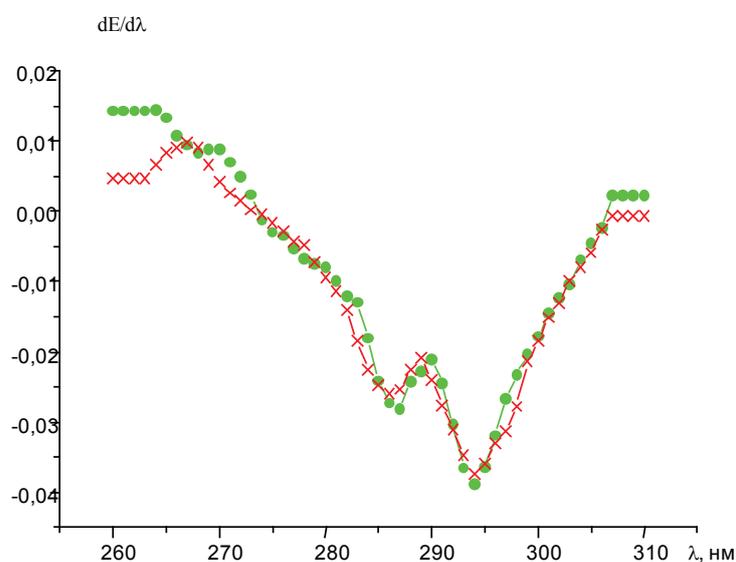


Рисунок 2. ППСП раствора HbA; • - при +10°C, × - при +18°C

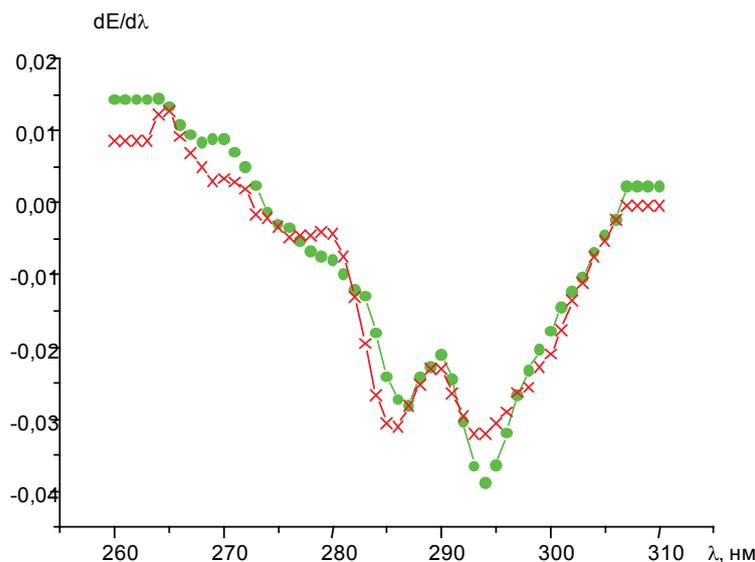


Рисунок 3. ПСП раствора HbA; • - при +10°C, x - при +36°C

практически не отличаются от соответствующих интенсивностей при температуре сравнения +10°C. Для растворов гемоглобина А при +10 С и +36°C структуры первых производных спектров поглощения отличаются между собой (рис. 3). Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм при температуре +36°C отличаются от соответствующих интенсивностей при температуре сравнения +10°C. Из данных (рис. 3) можно заключить, что, поскольку для растворов гемоглобина А на первых производных спектров поглощения изменяется интенсивность отрицательного максимума в области 284-286 нм (соответствующего суммарному поглощению полярных тирозиновых и гидрофобных триптофановых аминокислотных остатков) и отрицательного максимума в области 292 нм (соответствующего поглощению гидрофобных триптофановых аминокислотных остатков), то это свидетельствует о конформационных изменениях, происходящих в молекуле гемоглобина А. Наши данные, предположительно свидетельствующие об изменении структуры гемоглобина А человека при температуре около +25°C, вероятно, подтверждаются и другими исследованиями, согласно которым наблюдается изменение коэффициента трансляционной диффузии при +27°C и времени местожительства между прыжками в прыжковой диффузии при +26,9°C HbA человека в красных кровяных клетках, определённые с помощью метода динамического светорассеяния [9]. Согласно данным авторов, можно предположить, что до +27°C трансляционное движение больше и до +26,9°C прыжковое движение меньше, а после +27°C трансляционное движение меньше и после +26,9°C прыжковое движение больше, возможно, после +26,9°C движение более локализовано. Вероятно, на трансляционное и прыжковое движение гемоглобина человека в красных кровяных клетках может влиять пространственная организация молекул гемоглобина, способствуя им, или наоборот, мешая им. Например, более компактные молекулы могли бы двигаться более свободно, чем молекулы в более разрыхлённом состоянии, если это действительно так, то можно сделать вывод, что после +26,9÷+27°C пространственное устройство молекулы гемоглобина А изменяется. Кроме того, изменяется характер увеличения среднеквадратичного отклонения, т.е. гибкости HbA человека при +26°C, что определено авторами с помощью метода некогерентного нейтронного рассеяния [10]. Также увеличивается изменение энтальпии во время конформационных переходов, демаскирующих внутренние пептидные атомы водорода (PHs) HbA человека между температурами +10÷+30°C и +30÷+40°C в исследованиях авторов с помощью IR-спектроскопии [11]. Наблюдается изменение аккумуляции общего глобина в синтезе гHb1.1 в *Escherichia coli*. при +24°C в исследованиях авторов [12]. Также определено изменение структуры гемоглобина земляных червей HbGr между +25°C и +38°C для pH 9,0 и 9,3 [13]. Для внутриэритроцитарного гемоглобина А донорской крови 5-ти дней хранения нами получены данные о том, что уменьшение содержания оксигемоглобина А менее выражено в интервале температур +6÷+25°C, чем в интервале температур +25÷+43°C, другими авторами получены результаты об уменьшении содержания оксигемоглобина А при +55°C по сравнению с +37°C [14]. Так как после 25°C происходит более выраженное уменьшение содержания оксигемоглобина А и оксигенация молекулы гемоглобина связана с её конформационным состоянием, то, возможно, при +25°C начинает проявляться изменение конформационного состояния молекулы гемоглобина А, которое может способствовать более выраженному уменьшению содержания оксигемоглобина А. Необходимо отметить, что исходя из данных литературы следует, что множественным набором методических способов возможно определить составляющие компоненты, характеризующие изменение конформации, которые мы определили с помощью ультрафиолетовой спектрофотометрии. Особенности свойства HbA, определяющие наличие специальной температуры около +25°C на температурных зависимостях различных параметров

гемоглобина, вероятно, связаны с электронной конфигурацией атомов, составляющих молекулу гемоглобина и с их энергией активации. Свойства гемоглобина вблизи этой температуры требуют дальнейшего исследования, возможно, в сопоставлении с изучением сродства гемоглобина к кислороду [15], в том числе и в сравнении в различных температурных интервалах.

Список литературы / References:

1. Stadler R.R., Soyka M.B. A prospective pilot study comparing nasal blood sampling and venipuncture for the assessment of hemoglobin levels and INR. *Laryngoscope*, 2017, vol. 127, no. 3, pp. 577-581.
2. Michnik A., Drzazga Z., Kluchewska A., Michalik K. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophys. Chem.*, 2005, vol. 118, no. 2-3, pp. 93-101, doi: 10.1016/j.bpc.2005.06.012.
3. Mauer J., Peltomaki M., Poblete S., Gompper G., Fedosov D.A. Static and dynamic light scattering by red blood cells: A numerical study. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 5, e0176799, doi: 10.1371/journal.pone.0176799.
4. Rossi-Bernardi L., Roughton F.J. The specific influence of carbon dioxide and carbonate compounds on butter power and Bohr effects in human haemoglobin solutions. *J. physiol*, 1967, vol. 189, pp. 1-29.
5. Fermi G. Three-dimensional Fourier syntess of human deoxyhaemoglobin at 2,5 Å° resolution: refinement of the atomic model. *J. mol. biol.*, 1975, vol. 97, pp. 237-256.
6. Takano T. Structure of myoglobin refinsd at 2,0 Å° resolution. *J. mol. biol.*, 1977, vol. 110, pp. 533-584.
7. Perutz M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, 1970, vol. 228, pp. 726-739.
8. Zavialov V.P., Troitsky G.V., Demchenko O.P., Generalov I.V. Temperature and pH dependent changes of immunoglobulin G structure. *Biochim et biophys. Acta*, 1975, vol. 386, p. 155.
9. Stadler A.M., Digel I., Artmann G.M., Embs J.P., Zaccai G., Buldt G. Hemoglobin dynamics in red blood cells. Correlation to body temperature. *Biophys. J.*, 2008, vol. 95, no. 11, pp. 5449-5461.
10. Stadler A.M., Garvey C.J., Bocahut A., Sacquin-Mora S., Digel I., Schneider G.J., Natali F., Artmann G.M., Zaccai G. Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics. *Journal of the royal society interface*, 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0364.
11. Абатуров Л.В., Молчанова Т.П., Носова Н.Г., Шляпников С.В., Файзуллин Д.А. Конформационная динамика тетрамерной молекулы гемоглобина по данным водородного обмена. I. Влияние pH, температуры и связывания лигандов. *Молекулярная биология*, 2006, т. 40, № 2, с. 326-340. [Abaturov L.V., Molchanova T.P., Nosova N.G., Schlyapnikov S.V., Faizullin D.A. Conformational dynamics of tetramer hemoglobin molecule by hydrogen exchange data. I. Influence of pH, temperature and binding of ligands. *Molekularnaya biologiya*, 2006, vol. 40, no. 2, pp. 326-340. (In Russ.)]
12. Weickert M.J., Apostol I. High-fidelity translation of recombinant human hemoglobin in Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 1998, vol. 64, no. 5, pp. 1589-1593.
13. Santiago P.S., Moura F., Moreira L.M., Dominques M.M., Santos N.C., Tabak M. Dynamiclight scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. *Biophysical journal*, 2008, vol. 94, no. 6, pp. 2228-2240.
14. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Савостин В.С. Физико-химические свойства и термостабильность молекул гемоглобина человека, модифицированного реополиглюкином и диальдегиддекстраном. *Биофизика*, 2006, т. 51, № 3, с. 430-439. [Artyuhov V.G., Putintseva O.V., Savostin V.S. Physic-chemical properties and thermostability of human hemoglobin molecule modified by reopolyglukin and dialdegiddextrane. *Biofizika*, 2006, vol. 51, no. 3, pp. 430-439. (In Russ.)]
15. Webb K.L., Dominelli P.B. Influence of high hemoglobin-oxygen affinity on human during hypoxia. *Front. Physiol*, 2022, doi: 10.3389/fphys.2021.763933.

HEMOGLOBIN TEMPERATURE BEHAVIOR

Timchenko N.N., Golovchenko I.V.

Sevastopol State University

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

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0532

Abstract. The wide application of biological objects low-temperature storage methods requires studying the temperature influence mechanisms at the molecular level. The effect of +10÷+38°C temperature range on hemoglobin A was studied using the methods of temperature-perturbation spectrophotometry and absorption spectra first derivatives analysis. The $\Delta E/E$ dependence on temperature for hemoglobin A solution is of an S-shaped form. On the $\Delta E/E$ dependence on temperature for hemoglobin A, breaks are observed: the first in +25÷+27°C temperature range and the second break in +33÷+35°C temperature range. In the experiment performed on myeloma immunoglobulin G, the S-shaped dependence of the temperature-differential spectra intensity on temperature was obtained, which has breaks at +25 and +35°C. The authors attribute this S-shaped dependence to the conformational transition presence in +25÷+35°C temperature range. Apparently, it can be assumed that in the hemoglobin A molecule, conformational changes occur in +25÷+35°C temperature range of +25÷+35°. According to spectrophotometry data, the globin conformational state changes at temperatures around +26÷+30°C. Our studies data indicate the conformational rearrangements presence in the hemoglobin molecule at 25 and 35°C. Our data, presumably indicating a change in the structure of human hemoglobin A at a temperature of about 25°C, are probably confirmed by other studies using dynamic light scattering, incoherent light scattering, IR spectroscopy, studies for intraerythrocyte hemoglobin A of donor blood 5 days of storage on oxyhemoglobin A content, according to which, since a decrease in oxyhemoglobin A content and hemoglobin molecule oxygenation is associated with its conformational state, it is possible that at 25°C a change in the hemoglobin A molecule conformational state begins to appear, which can contribute to a more pronounced decrease in oxyhemoglobin A content. The peculiar properties of HbA, which determine the presence of a special temperature of about 25°C on the various hemoglobin parameters temperature dependences, require further study in comparison in different temperature ranges.

Key words: *hemoglobin, conformational changes, temperature.*

ДВА КОНКУРИРУЮЩИХ МЕХАНИЗМА ПРИ АГРЕГАЦИИ *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

Кручинин И.В., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр.2, 119991, ГСП-1, г. Москва, РФ; e-mail: iv.kruchinin@physics.msu.ru
Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0533

Аннотация. В настоящей работе гибридная клеточно-автоматная модель начальных стадий агрегации клеточного слизевика *Dictyostelium discoideum*, предложенная авторами ранее, модифицирована посредством учета зависимости движения миксамеб от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Клеточный автомат представляет собой трехмерную решетку, ячейки которой либо пусты, либо содержат одну амёбу, то есть состояние автомата определяется распределением амёб по ячейкам. Состояние автомата изменяется на каждом шаге по времени по фиксированным правилам, которые определяются по решениям систем уравнений, описывающих распределение агрегационных факторов в среде и их концентрации внутри клеток. Движение амёб может быть либо направленным по градиенту концентрации циклического аденозинмонофосфата, либо случайным блужданием. Результаты расчетов показывают, что при достижении агрегатом некоторого размера его рост прекращается, и число клеток в нем колеблется вокруг среднего значения. Такое поведение указывает на то, что агрегация определяется двумя конкурирующими механизмами: один способствует росту агрегата, другой -- отсоединению от него клеток или мелких кластеров.

Ключевые слова: *Dictyostelium*, модель агрегации, Ca^{2+} -регуляция, клеточный автомат.

Возникновение многоклеточности, так же как эволюция и морфогенез, относится к важнейшим проблемам теоретической биологии и биофизики. В связанных с ним исследованиях очень часто используется модельный эукариотический организм – клеточный слизевик *Dictyostelium discoideum* (DD), относящийся к типу Мусетозоа [1-4]. В природных условиях он встречается в почве и на листьях во влажной лесной подстилке. Использование DD в качестве модельного организма в биологии развития связано с особенностями его жизненного цикла, в котором происходит чередование одноклеточных и многоклеточных стадий.

DD питается бактериями, и пока их достаточно, он существует в виде отдельных подвижных клеток – миксамеб, которые размножаются простым делением. При истощении пищевых ресурсов или же при повышении плотности популяции выше некоторого порога миксамебы переходят в «режим голодания», в котором происходит их агрегация, приводящая к формированию подвижного многоклеточного псевдоплазмодия, обычно называемого слизнем. Все стадии перехода от свободноживущих амёб к агрегации и образованию слизня регулируются множеством различных биохимических сигналов, природа которых установлена, но их взаимодействие трудно исследовать экспериментально [5]. В связи с этим в исследованиях по агрегации DD широко распространены различные математические модели. Известные модели различаются по используемым подходам и по степени детализации механизмов регуляции этого процесса. В частности, известны модели на основе клеточных автоматов [6,7], которые в ряде случаев дают более точное описание поведения миксамеб, чем более традиционные модели, использующие дифференциальные уравнения [8,9]. В настоящей статье развивается модель, предложенная в [10], в которой дополнительно учтена зависимость формирования агрегатов от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

Модель основана на учете основных сигнальных каскадов в регуляции агрегации. DD имеет систему «кворум сенсоров», как у многоклеточных организмов, в которых она служит для контроля числа клеток в тканях. У DD она ограничивает рост популяции и способствует транскрипции генов, необходимых для постмитотического развития [5]. Клетки DD постоянно секретируют в среду небольшой белок – кворум-фактор, который накапливается пропорционально плотности клеток и активирует фермент N-ацетил-глюкозаминидазу, что сложит сигналом для перехода в режим «голодания». Кроме того, клетки постоянно выделяют в окружающую среду фактор предголодания *PSF*, концентрация которого пропорциональна плотности популяции. Он также играет роль кворум-фактора, запуская соответствующий сигнальный каскад при превышении некоторой пороговой концентрации: активируется синтез протеинкиназы *YakA* (в отсутствие аминокислот в среде), что приводит к увеличению синтеза аденилатциклазы *ACA* и ингибированию белка *PufA*, который является ингибитором трансляции протеинкиназы *PKA*. *PKA* влияет на множество процессов, в частности, он ингибирует самоактивацию *ACA*, что приводит к тому, что при некоторой пороговой концентрации *PKA* клетка начинает реагировать на наличие сAMP снаружи (сAMP_p) и сама начинает выделять сAMP (рис. 1). Существуют также дополнительные вспомогательные сигнальные пути, которые снижают порог чувствительности к *PKA*, стимулируя переход клеток в режим голодания.

Для DD сAMP служит хемоаттрактантом, и амёбы движутся, в основном, в направлении роста его концентрации. Однако одного хемоаттрактанта недостаточно для регуляции процесса образования агрегата, поэтому клетки используют дополнительные сигнальные цепи, создавая так называемое хемотаксическое поле в среде. Оно обеспечивает формирование сложной системы положительных и отрицательных обратных связей,

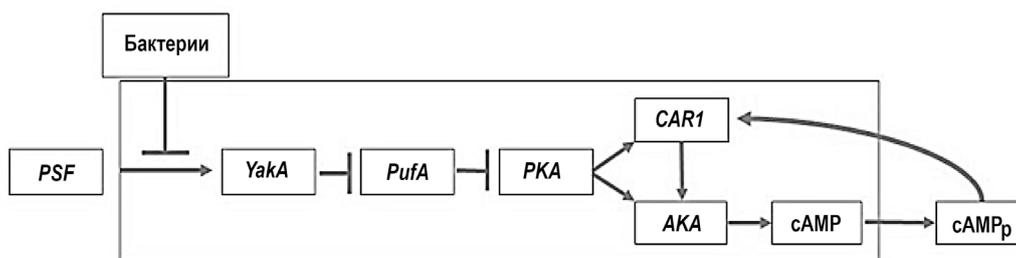


Рисунок 1. Схематическое изображение основных сигнальных путей при активации режима "голодания" фактором предголодания *PSF* (адаптировано из [5]). Большим прямоугольником ограничены внутриклеточные сигнальные пути

которые обуславливают направленное движение и взаимодействие клеток. Схематически важнейшие сигнальные цепи приведены на рисунке 2.

При наличии *PKA* в достаточной концентрации происходит фосфорилирование фактора *GataC*, который активирует экспрессию нескольких белков, включая *RegA*, *ACA*, *Erk2*, *CAR1*. *Erk2* ингибирует *RegA*, который расщепляет внутриклеточный *сAMP*. Внеклеточный *сAMP* (*сAMP_p*) расщепляется фосфодиэстеразой *A* (*PDE*) до аденозин-5'-монофосфата (*AMP*). *сAMP_p* связывается с рецептором *CAR1*, который запускает пути синтеза и расщепления *сAMP* через *ACA* и *Erk2*, соответственно. *CAR1* может быть в двух состояниях, фосфорилированном (*D*) и дефосфорилированном (*R*), переходы между которыми обратимы. При малых концентрациях *сAMP* клетки выделяют ингибитор *PDE* (*PDI*). Сама *PDE* выделяется постоянно, но при высоких концентрациях *сAMP* скорость ее выделения возрастает в 4–5 раз.

Известно, что Ca^{2+} играет существенную роль в регуляции агрегации. При связывании *сAMP_p* с рецептором *CAR1* внеклеточный кальций через ионные каналы поступает в цитозоль клетки и, кроме того, происходит высвобождение кальция из внутриклеточных компартментов. Концентрация кальция в цитозоле возрастает, благодаря чему увеличивается рефрактерный период «реле» *сAMP* [11]. Ионы кальция также являются хемоаттрактантом для клеток *DD* [12].

Существует несколько подходов к моделированию агрегации *DD*. Первый подход – молекулярная динамика, второй – нелинейная динамика (используются дифференциальные уравнения с начальными и граничными условиями, которые необходимо задать глобально) и третий подход – клеточный автомат. Молекулярная динамика позволяет с хорошей точностью описывать поведение системы на уровне отдельных молекул и даже атомов, но у нее есть один существенный недостаток – сложная реализация даже на суперкомпьютере. Нелинейная динамика позволяет моделировать конкретные режимы эволюции системы клеток во времени, но требует, так же, как и молекулярная динамика, чрезвычайно сложных расчетов. Эти два метода позволяют построить детерминистические модели эволюции системы клеток. Клеточный автомат представляет собой универсальный подход, позволяющий объединить в модели элементы предыдущих двух методов, при этом на автомат накладываются только локальные условия и системы уравнений решаются локально для каждой клетки. Этот метод подразумевает использование модели стохастической динамики системы клеток [13-16].

В предложенных ранее математических моделях [4,17-19] расчеты давали результаты, не полностью согласующиеся с результатами наблюдений и экспериментов по агрегации *DD*. В настоящей работе использована модель, описанная в [10], в которую добавлена зависимость агрегации от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

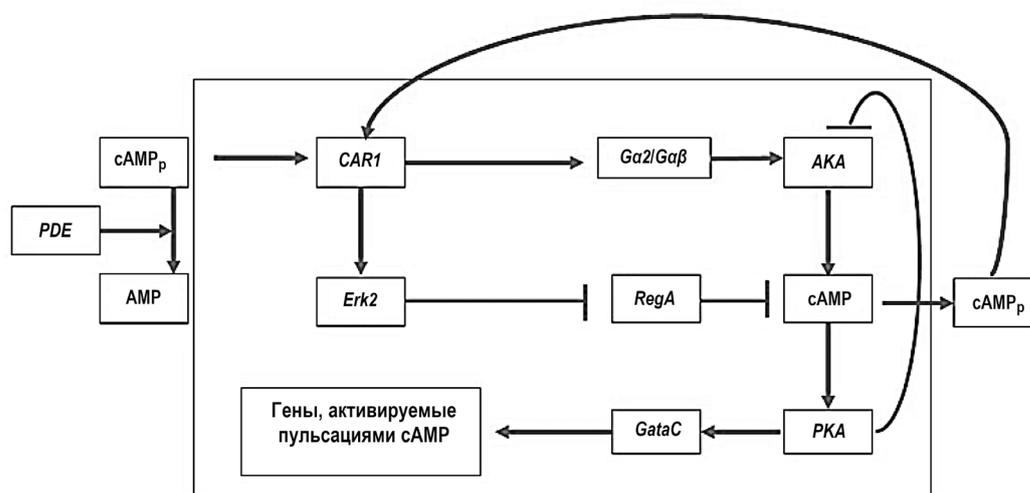


Рисунок 2. Важнейшие сигнальные цепи, обеспечивающие создание хемотаксического поля (адаптировано из [5]). Внутри большого прямоугольника показаны внутриклеточные сигнальные пути

Модель представляет собой гибридную клеточно-автоматную модель, в которой правила изменения состояния автомата частично определяются решениями дифференциальных уравнений, описывающих изменения концентраций основных внутри- и внеклеточных сигнальных факторов. В целом, клеточный автомат представляет собой сопряженную систему из трех одинаковых двумерных решеток и одной трехмерной (набора четырех двумерных, расположенных одна над другой), причем все двумерные решетки имеют одинаковые размеры и состоят из одинаковых кубических ячеек с ребром 10 мкм и объемом 10^3 мкм³. В каждой ячейке может находиться амеба DD или ячейка может быть пустой. Первые три решетки представляют собой модель реакции-диффузии, на каждой из которых моделируется распределение концентраций cAMP, PDE и PDI, соответственно. На трехмерной решетке моделируется движение амёб (хемотаксис и случайные блуждания) и образование промежуточных кластеров и агрегатов [10]. На каждом шаге по времени определяется состояние автомата и происходит его изменение: ячейка остается занятой или опустевает, но при этом заполняется одна из соседних пустых ячеек. Во всех двумерных решетках нумерация ячеек одна и та же, и соседние ячейки определяются во всех решетках по соответствующим номерам. В кластерах, сформировавшихся в процессе агрегации, только ближайшие соседи (в двумерном случае их 8, а в трехмерном – 26) могут влиять на центральную клетку с учетом процессов внутриклеточной сигнализации.

Внутриклеточная сигнализация описывается следующей системой уравнений:

$$\frac{dP_i}{dt} = P_{i-1} + \frac{k_1 C_{ext}}{k_r} (1 - P_{i-1}) + k_{s1} (1 - P_{i-1}) - k_{-s1} P_{i-1} \quad (1)$$

$$\frac{dA_i}{dt} = A_{i-1} + k_a \left((1 - P_{i-1}) * CAR1 * C_{ext} \right)^2 \frac{(1 - A_{i-1})}{k_r^2} - k_d (P_{i-1} * CAR1 * C_{ext})^2 \frac{A_{i-1}}{k_d^2} \quad (2)$$

$$\frac{dC_i}{dt} = C_{i-1} + (1 + A_{i-1} * 39.35) C_{base} - k_{ie} C_{i-1} - k_i C_{i-1} \quad (3)$$

$$(k_{ie})_i = k_{iemin} + (k_{iemax} - k_{iemin}) \frac{S_{frommaxc}}{X_{lim/2}} \quad (4)$$

$$Ca_c i = 10^{-8} * \ln(C_i) + 3.4 * 10^{-7} \quad (5)$$

где P – доля фосфорилированных рецепторов cAMP; A – доля активированной аденилатциклазы ACA ; C – концентрация внутриклеточного cAMP; C_{ext} – концентрация внеклеточного cAMP в данной ячейке сетки; k_1 – константа скорости перехода R-с => D-с, где R-с – дефосфорилированный рецептор $CAR1$, связанный с cAMP; D-с – фосфорилированный рецептор, связанный с cAMP; k_r – константа диссоциации R-с; k_{s1} – константа скорости перехода R в D; k_{-s1} – константа скорости перехода D в R; k_a – константа скорости активации аденилатциклазы ACA ; $CAR1$ – общая концентрация рецепторов cAMP в одной клетке; k_d – константа скорости деактивации ACA ; C_{base} – базовая активность аденилатциклазы ACA ; k_i – константа скорости разложения внутриклеточного cAMP внутриклеточной фосфодиэстеразой; k_{ie} – константа скорости выделения cAMP во внеклеточную среду; $S_{frommaxc}$ – расстояние между данной ячейкой и положением максимума концентрации cAMP; $X_{lim/2}$ – линейный размер половины поля ячеек по координате X; Ca_c – концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле клетки DD; коэффициент 39.35 введен для учета доли активированной аденилатциклазы ACA . В (3) и (4) k_{ie} зависит от расстояния между клеткой и положением глобального максимума концентрации cAMP и возрастает с его уменьшением. Благодаря этой зависимости реализуется линейная положительная обратная связь.

В сокращенной записи уравнения (1)–(4) выглядят следующим образом:

$$\frac{dD}{dt} = k_1 RC + k_{s1} R - k_{-s1} D, \quad (1')$$

$$\frac{dAC_a}{dt} = k_a RC^2 AC_d - k_d DC^2 AC_a, \quad (2')$$

$$\frac{dC_i}{dt} = k_{c1} AC_a + k_{c2} AC_d - k_{ie} C_i - k_{pd}, \quad (3')$$

$$Ca_i = 10^{-8} * \ln(C_i) + 3.4 * 10^{-7} \quad (5')$$

$$RC = \frac{R * C}{k_r} \quad DC = \frac{D * C}{k_d}, \quad (6)$$

где D – концентрация фосфорилированных рецепторов; R – концентрация дефосфорилированных рецепторов; RC и DC – концентрации рецепторов, связанных с cAMP; AC_a и AC_d – концентрации активированных и деактивированных аденилатциклаз; C и C_i – внеклеточная и внутриклеточная концентрации cAMP; k_{c1} и k_{c2} – константы скорости реакции синтеза C_i ; Ca – концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле клетки DD; k_{pd} – константа скорости расщепления внутриклеточного cAMP внутриклеточной фосфодиэстеразой. Все остальные обозначения те же, что и в уравнениях (1)–(5).

Хемотаксис определяется, в основном, концентрациями cAMP вокруг клетки. cAMP выделяется клетками в окружающую среду, а локальные концентрации зависят как от скорости выделения, так и от скорости разложения под действием PDE . На каждом шаге каждая клетка меняет свое состояние и, по результатам расчетов внутриклеточной динамики, выделяет определенное количество различных веществ в окружающую среду. Их концентрации описываются следующей системой уравнений:

$$P_s = P_{smin} + (P_{smax} - P_{smin}) \frac{C_{ext}^2}{C_{por} P^2}, \quad (7)$$

$$Pde_{i-1} = Pde_{i-1} + P_s, \quad (8)$$

$$I_s = I_{smax} (1 - \frac{C_{ext}^2}{C_{por} Ing^2}), \quad (9)$$

$$Ing_{i-1} = Ing_{i-1} + I_s, \quad (10)$$

$$(C_{ext})_{i-1} = (C_{ext})_{i-1} + k_{ie} C_{i-1} V_{am} / V_{cell}, \quad (11)$$

где P_s и Pde – секретируемая и внешняя PDE ; C_{ext} и $C_{por}P$ – концентрация внеклеточного сАМР и условная концентрация сАМР, при которой концентрация секретируемой PDE равна P_{smax} ; I_s – секретируемый ингибитор PDE ; Ing – внеклеточный ингибитор PDE ; $C_{por}Ing$ – пороговая концентрация сАМР, при котором выделение PDI прекращается; C_i – концентрация внутриклеточного сАМР; V_{am} и V_{cell} – объем клетки и объем ячейки сетки, соответственно. Уравнения (7)–(10) описывают выделение PDE и PDI , соответственно, а (11) – выделение сАМР.

Модель реакции-диффузии состоит из трех решеток (клеточных автоматов), связанных между собой и описывающих диффузию сАМР, PDE и PDI с использованием следующих уравнений:

$$\frac{dC}{dt} = C_s + D_c \Delta C - k_p \frac{C^H}{C^H + K_m}, \quad (12)$$

$$\frac{dI}{dt} = I_s + D_i \Delta I - k_i P * I, \quad (13)$$

$$\frac{dP}{dt} = P_s + D_p \Delta P - k_i P * I, \quad (14)$$

где D_c, D_i и D_p – коэффициенты диффузии сАМР, PDE и PDI , соответственно; k_p, k_i – константы скорости разложения сАМР и ингибирования PDE ; K_m и H – константы Михаэлиса-Ментен и Хилла [15,18].

Для описания движения амёб используется следующий алгоритм. На первом шаге генерируется случайное распределение клеток на нижней двумерной решетке трехмерного автомата с заданным числом ячеек. Каждая амёба имеет собственный идентификационный номер и имеет 6 основных параметров состояния. Специальный алгоритм, подобный алгоритму распознавания образов, разбивает амёб на группы (кластеры): если у амёбы есть ближайшие соседи в прилежащих ячейках, то они при соответствующих условиях могут объединиться в кластер. На первом шаге количество и размеры кластеров определяются плотностью популяции (на координатной плоскости размером 1,5 мм² в среднем находится 10⁴ клеток; чем больше плотность популяции, тем выше вероятность образования кластеров на первом шаге, и тем большие по размеру кластеры могут образовываться). Перемещение отдельных амёб и кластеров может быть либо направленным в сторону возрастания (то есть по градиенту) концентрации сАМР (хемотаксис), либо случайным блужданием. Кроме концентрации сАМР во внешней среде, на направление движения клеток и кластеров влияет концентрация ионов Ca²⁺ в цитозоле [12]: если концентрация Ca²⁺ менее 40 нМ (рассчитывается по формуле (5)), то клетка с вероятностью 0,2 движется в первоначально выбранном направлении (в сторону ячейки с максимальной концентрацией сАМР); если концентрация Ca²⁺ ≥ 120 нМ, то клетка с вероятностью 0,9 движется в первоначально выбранном направлении. Промежуточным значениям концентрации Ca²⁺ приписываются промежуточные значения вероятности хемотаксического движения.

В качестве начального условия принято, что клетка или клеточный кластер, находящийся ближе других к центру поля, уже выделил минимальное количество сАМР. В реальной клеточной популяции именно с этого начинается процесс агрегации, то есть появляется некий пейсмейкер.

В кластере возбудимость, периодичность выделения химических сигналов и движение клеток синхронизируются. Клетки движутся не постоянно, а в некотором ритме, который в популяции DD практически один и тот же (2 минуты клетка движется, затем 5–6 минут стоит на месте). Внутри каждого кластера ритм определяется по клетке, которая геометрически расположена в центре этого кластера (в малых кластерах центральная клетка выбирается случайным образом). Кластер движется как одно целое, но клетки в нем могут изменять взаимное расположение. При контакте кластеры могут сливаться с образованием нового большого кластера, движущегося к пейсмейкеру. Кластеризация происходит на нижней решетке трехмерного автомата.

Как только образуется кластер с участием пейсмейкера, меняются правила движения. Сила тяжести, силы межклеточной адгезии и тяговые усилия, развиваемые клеткой, имеют приблизительно один и тот же порядок величины (~10 пН), поэтому в модели принято, что когда клетка является пейсмейкером и у нее есть ближайшие соседи (хотя бы по одной клетке в 8-ми соседних ячейках) и над ней в вышележащем слое ячейка свободна, то за счет взаимодействий с соседними клетками она получает возможность переместиться на вышележащий уровень. Другие клетки этого сделать не могут, так как потоки со всех сторон движутся по направлению к клетке-пейсмейкеру. При переходе пейсмейкера на вышележащий слой его место занимает одна из ближайших к нему клеток, а на ее место, в свою очередь, перемещается более удаленная клетка. Если клетка-пейсмейкер не может перейти наверх, то она остается на своем месте, а близлежащие амёбы заполняют свободные ячейки в областях сетки, прилежащих к пейсмейкеру. Так формируется «холмоподобная» структура, предшествующая образованию слизня.

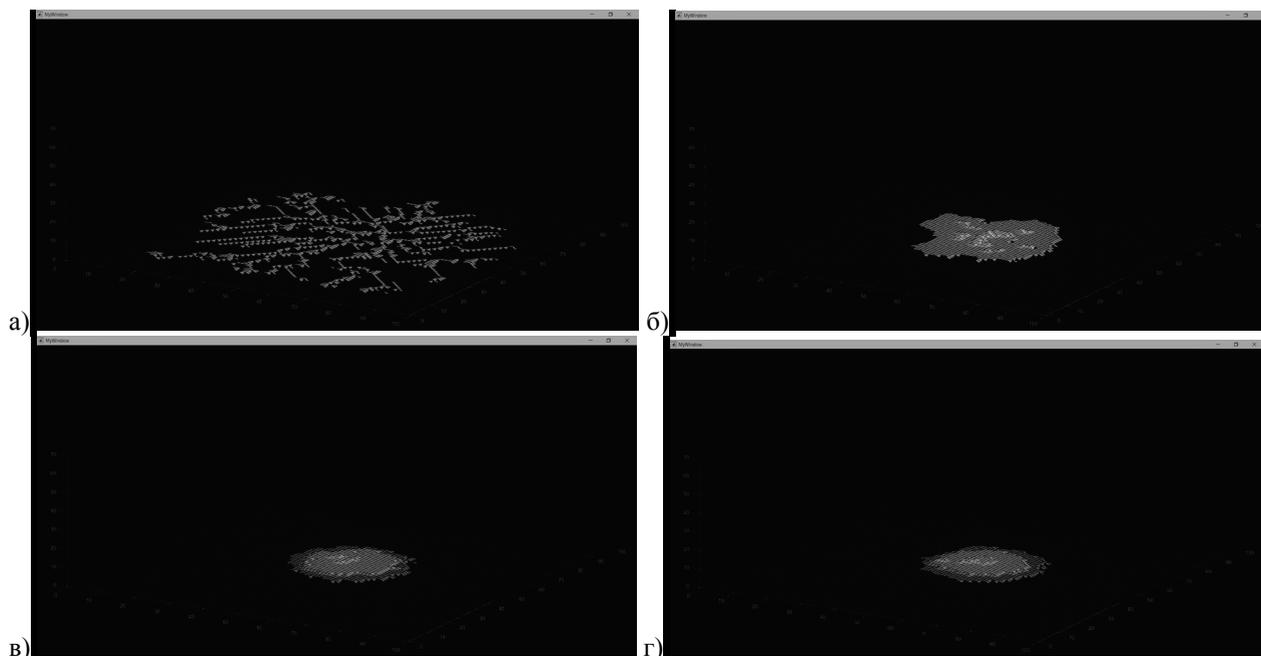


Рисунок 3. На рисунке изображены результаты модельных расчетов, а) 200 минут агрегации, б) 1000 минут, в) 3000 минут, г) 5000 минут

Добавление Ca^{2+} -регуляции в модель [10] привело к изменению результатов расчетов. Основное отличие состоит в том, что в некоторый момент, примерно при достижении агрегатом высоты в четыре слоя, его средний размер перестает увеличиваться, и количество клеток в агрегате колеблется вокруг среднего значения (рис. 3).

В реальной популяции DD размер агрегата не увеличивается беспредельно, и за это отвечает так называемый фактор счета. Однако в настоящей модели он в явном виде не учтен. Это может указывать на то, что при выбранных правилах решений клеточных автоматов реализуются два конкурирующих механизма, один из которых способствует росту агрегата, а другой – его разбиению на более мелкие структуры. Для выяснения деталей этих механизмов необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы / References:

1. Devreotes P. Dictyostelium discoideum: a model system for cell-cell interactions in development. *Science*, 1989, vol. 245, no. 4922, pp. 1054-1058, doi: 10.1126/science.2672337.
2. Pears C.J., Gross J.D. Microbe Profile: Dictyostelium discoideum: model system for development, chemotaxis and biomedical research. *Microbiology*, 2021, vol. 167, no. 3, doi: 10.1099/mic.0.001040.
3. Schaap P. Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Development*, 2011, vol. 138, pp. 387-396, doi: 10.1242/dev.048934.
4. Dallon J.C. Numerical Aspects of Discrete and Continuum Hybrid Models in Cell Biology. *Applied Numerical Mathematics*, 2000, vol. 32, pp. 137-159, doi: 10.1016/S0168-9274(99)00021-5.
5. Loomis W.F. Cell signaling during development of Dictyostelium. *Developmental Biology*, 2014, vol. 391, pp. 1-16, doi: 10.1016/j.ydbio.2014.04.001.
6. Palsson E., Othmer H.G. A model for individual and collective cell movement in Dictyostelium discoideum. *PNAS*, 2000, vol. 97, no. 19, pp. 10448-10453, doi: 10.1073/pnas.97.19.10448.
7. Fates N. Solving the decentralised gathering problem with a reaction-diffusion-chemotaxis scheme. *Swarm Intell.*, 2010, vol. 4, pp. 91-115, doi: 10.1007/s11721-010-0038-4.
8. Vasieva O.O., Vasiev B.N., Karpov V.A., Zaikin, A. A model of Dictyostelium discoideum aggregation. *Journal of Theoretical Biology*, 1994, vol. 171, no. 4, pp. 361-367, doi: 10.1006/jtbi.1994.1240.
9. Noorbakhsh J., Schwab D.J., Sgro A.E., Gregor T., Mehta P. Modeling oscillations and spiral waves in Dictyostelium populations. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 2015, vol. 91, no. 6, 062711, doi: 10.1103/PhysRevE.91.062711.
10. Кручинин И.В., Яковенко Л.В. Компьютерная модель начальных стадий агрегации миксамеб Dictyostelium discoideum. *Учен. зап. физ. фак-та Моск. ун-та*, 2021, № 6, 2160701. [Kruchinin I.V., Yakovenko L.V. Computer model of the initial stages of aggregation of mixamoebae Dictyostelium discoideum. *Uchyonyye Zapiski Fizicheskogo Fakulteta Moskovskogo Universiteta*, 2021, no. 6, 2160701 (In Russ.)]
11. Martiel J.L., Goldbeter A. A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in Dictyostelium cells. *Biophys. J.*, 1987, vol. 52, no. 5, pp. 807-828, doi: 10.1016/S0006-3495(87)83275-7.
12. Malchow D., Lusche D.F., Schlatterer C. A link of Ca^{2+} to cAMP oscillations in Dictyostelium: the calmodulin antagonist W-7 potentiates cAMP relay and transiently inhibits the acidic Ca^{2+} -store. *BMC Developmental Biology*, 2004, vol. 4, no.7, doi: 10.1186/1471-213X-4-7.

13. Thompson R.L., Goel N.S. Movable finite automata (MFA) models for biological systems I: Bacteriophage assembly and operation. *J. Theor. Biol.*, 1988, vol. 131, pp. 351-385, doi: 10.1016/s0022-5193(88)80230-3.
14. Bastounis E., Meili R., Alvarez-Gonzalez B., Francois J., del Alamo J.C., Firtel R.A., Lasheras J.C. Both contractile axial and lateral traction force dynamics drive amoeboid cell motility. *J. Cell Biol.*, 2014, vol. 204, no. 6, pp. 1045-1061, doi: 10.1083/jcb.201307106.
15. Weijer C.J. Dictyostelium morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2004, vol. 14, pp. 392-396, doi: 10.1016/j.gde.2004.06.006.
16. Bedau M.A. Artificial life: organization, adaptation and complexity from the bottom up. *TRENDS in Cognitive Sciences*, 2003, vol. 7, no. 11, doi: 10.1016/j.tics.2003.09.012.
17. Nagano S. Modeling the model organism *Dictyostelium Discoideum*. *Develop. Growth Differ.*, 2000, vol. 42, pp. 541-550, doi: 10.1046/j.1440-169x.2000.00547.x.
18. Levine H., Tsimring L., Kessler D. Computational modeling of mound development in *Dictyostelium*. *Physica D*, 1997, vol. 106, pp. 375-388, doi: 10.1016/S0167-2789(97)00038-9.
19. Yeh R.P., Chan F.K., Coukell M.B. Independent regulation of the extracellular cyclic AMP phosphodiesterase-inhibitor system and membrane differentiation by exogenous cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 1978, vol. 66, pp. 361-374, doi: 10.1016/0012-1606(78)90245-2.

TWO COMPETING MECHANISMS IN AGGREGATION OF *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

Kruchinin I.V., Yakovenko L.V.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: iv.kruchinin@physics.msu.ru

Received 21.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbp.2022.0533

Abstract. In the present work, the hybrid cellular automaton model of the initial stages of aggregation of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, proposed by the authors earlier, is modified by taking into account the dependence of myxamoebae movement on the intracellular Ca^{2+} concentration. The cellular automaton is a three-dimensional grid the cells of which are either empty or contain one amoeba, the state of the automaton being determined by the distribution of amoebae over the grid. At each time step, the state of the automaton changes according to fixed rules which are determined by solutions to systems of equations that describe the distribution of aggregation factors in the medium and their concentrations inside cells. Movements of amoebae can be either directed along the concentration gradient of cyclic adenosine monophosphate, or random walk. The calculation results show that when the aggregate reaches a certain size its growth stops and the number of cells in it fluctuates around the average value. Such behavior suggests that aggregation is determined by two competing mechanisms: one promotes the growth of the aggregate while the other promotes detachment of cells or small clusters from it.

Key words: *Dictyostelium*, aggregation model, Ca^{2+} -regulation, cellular automaton.

TD-DFT STUDY OF TOLUIDINE BLUE O IN AQUEOUS SOLUTION: VIBRONIC TRANSITIONS AND ELECTRONIC PROPERTIES

Kostjukov V.V., Leontieva S.V., Savchenko E.V., Rybakova K.A., Voronin D.P.

Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: Viktor_Kostukov@mail.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbp.2022.0534

Abstract. The vibronic absorption spectrum of Toluidine blue O (TBO) dye in an aqueous solution was calculated using the time-dependent density functional theory (TD-DFT). The calculations were performed using all hybrid functionals supported by Gaussian16 software and 6-31++G(d,p) basis set with IEFPCM and SMD solvent models. The IEFPCM gave underestimated values of λ_{\max} in comparison with the experiment, what is a manifestation of the TD-DFT "cyanine failure". However, the SMD made it possible to obtain good agreement between calculated and experimental spectra. The best fit was achieved using the X3LYP functional. The dipole moments and atomic charges of the ground and excited states of the TBO molecule were calculated. Photoexcitation leads to an increase in the dipole moment of the dye molecule. An insignificant photoinduced electron transfer was found in the central ring of the chromophore of the TBO molecule. Vibronic transitions play a significant role in the absorption spectrum of the dye.

Key words: Toluidine blue O, aqueous solution, vibronic absorption spectrum, time-dependent density functional theory, electronic properties

INTRODUCTION

Toluidine blue O (3-amino-7-(dimethylamino)-2-methylphenothiazin-5-ium, TBO, Fig. 1) is a thiazine dye discovered by William Henry Perkin in 1856.

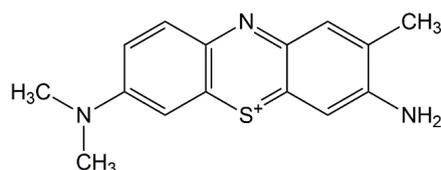


Figure 1. The Toluidine blue O molecule

TBO is widely used in photodynamic therapy of bacterial infections [1-8], for staining tissues and cells [9-11], as well as in biosensors (together with nanostructures) [12-16], solar cells [17] and semiconductor nanocomposites [18]. The therapy of Alzheimer's disease with TBO based on its inhibition of Tau protein aggregation is promising [19]. Using optical methods, it was found that the TBO molecule is able to effectively bind to DNA [20-26], RNA [26-28], proteins [19,29-34], silver nanoparticles [6,35,36], silica [15] and cadmium sulfide [37], natural organic matter [38], cyclodextrins [39-41], surfactant micelles [40-42], chitosan [43], heparin [44], nanotubes [2], fatty acids [45], polysaccharides [9,46-48] and other polymers [18,49,50]. Numerous experimental optical studies of TBO itself have been carried out - aggregation [21,51-54], reduction [36,42,55-57], photodegradation [58-60], metachromasia [61-63], polymerization [16,64] and photophysical properties of TBO in solutions [51,52,54,65,66], thin films [67-70], in the solid amorphous phase [53], and on a gold electrode [64]. However, theoretical studies of the optical properties of TBO have not yet been carried out. In particular, the absorption spectrum of the dye was not calculated.

METHODS

In an excited state, not only the electronic energy of the molecule changes, but also the vibrational energy, i.e. the molecule undergoes an electronic-vibrational (vibronic) transition (Fig. 2).

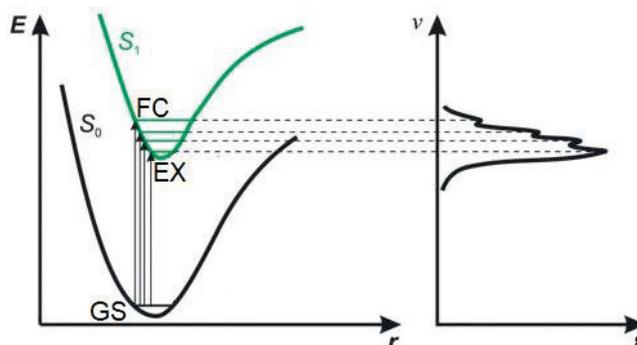


Figure 2. The energetic diagram of vibronic transition

When a photon is absorbed by a molecule of a solute in the ground state (GS), according to the Franck-Condon principle, a redistribution of the electron density occurs in it at constant positions of the nuclei, i.e. the molecule of the solute passes into an excited nonequilibrium (Franck-Condon) state FC (vertical transition). In this case, a similar process (polarization with immobile nuclei) occurs in the nearest solvation shell. After that, the "solute-solvent" system relaxes to the equilibrium excited (EX) state by means of the displacement of the nuclei (Fig. 2).

In our work, we used the methodology of Baiardi et al. for calculating vibrationally resolved electronic spectra of one-photon absorption by the method of TD-DFT, which is described in detail in Ref. [71]. Therefore, here we will only briefly list its main features. The vibronic spectra were calculated using the adiabatic Hessian model, in which the potential energy surfaces (PESs) of the ground and excited states were calculated near their respective equilibrium nuclear coordinates. Both PESs - for ground and excited states (see Fig. 2) - were described in the harmonic approximation. The first-order term corresponds to the Franck-Condon approximation [72], and the second-order term corresponds to the Herzberg-Teller approximation [73]. To calculate the vibronic spectra, we used the general Franck-Condon-Herzberg-Teller method [74]. E_{ad} is the difference between the energies of the ground vibrational states of the ground and excited states, $\chi(t)$ is the vibrational wave function. The temperature $T=298$ K was taken. In the numerical integration, 2^{18} steps were used and the time interval $\Delta t=2^{18}\times 10^{-17}=2.62\times 10^{-12}$ s. To broaden the bands of vibronic transitions, we used Gaussians with a full width at half maximum $HWHM=600$ cm^{-1} (the broadening was chosen so that the calculated spectra corresponded best to the experimental one).

Water is the most difficult medium for implicit accounting due to its specific interactions with solute molecules. Therefore, for a more objective picture, we used PCM (Polarizable Continuum Model with External Integration Formalism - IEF) with its original parameters [75], as well as with atomic radii and non-electrostatic terms of SMD (Solvation Model based on solute electron Density) [76]. IEFPCM calculates the energy in a solution by making the electrostatic potential of the solute self-consistent with the reaction field of the solvent (state-specific approach).

The initial spatial structure of the TBO cation was taken from the ChemSpider database <http://www.chemspider.com> (ID 11239098). All other calculations were performed using the Gaussian16 software package [77]. The calculation results were visualized using the GaussView software [78].

RESULTS AND DISCUSSION

It is known that the results of TD-DFT calculations of the excited electronic states of organic molecules are largely determined by the functional used [79-82]. Therefore, to calculate the vibronic absorption spectrum of TBO in an aqueous solution, we used all hybrid functionals supported by Gaussian16. Singlet HOMO \rightarrow LUMO transitions in the visible region of the spectrum were analyzed. We used the 6-31++G(d,p) basis set as well as IEFPCM and SMD solvent models (Fig. 3). The large difference between the values of λ_{vert} and λ_{vibron} stands out. This indicates the importance of considering the vibronic coupling when calculating the absorption spectra. Although direct comparison of λ_{vert} and λ_{exp} is widespread in the literature, it is more correct to compare λ_{vibron} and λ_{exp} [82]. Fig. 3 shows that all functionals with IEFPCM solvent model give an underestimated λ_{vibron} values in comparison with the experimental value $\lambda_{\text{max}}\approx 630$ $\text{nm}=1.97$ eV [9,54,66]. This is a manifestation of the so-called "cyanine failure", which consists in a systematic underestimation of the wavelength by all hybrid functionals with the PCM solvent model. [83-85]. The best result with the IEFPCM solvent model was shown by the O3LYP functional (625 $\text{nm}=1.98$ eV). However, SMD solvent model shows a good agreement with experimental value λ_{max} in combination with X3LYP functional ($\lambda_{\text{vibron}}=632$ $\text{nm}=1.96$ eV, see Fig. 4). X3LYP [86] is an improved version of very popular B3LYP functional. Therefore, further analysis of vibronic transitions and electronic states of TBO will be carried out at X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD theory level.

Note that the solvent model affects the position of the absorption maximum and vibronic transitions; however, on the whole, the band shape remains practically unchanged (see Fig. 4). The calculated vibronic absorption spectrum of TBO (see Fig. 4) in its shape good coincides with the experimental one. It has a pronounced asymmetry (the long-wavelength slope is steeper than the short-wavelength one), but does not have a shoulder, like the spectra of some other thiazine dyes (methylene blue, thionine, azure B, and azure C [87,88]). The thiazine dye Azure A also has a spectrum form similar to TBO [87] and differs from it in the absence of a methyl group in the ortho position. As can be seen from Fig. 4, the asymmetry of the absorption spectrum of the dye is due to vibronic transitions, mainly #7, #8 and #9. The approximation of the spectrum of a diluted dye solution to a symmetric (Gaussian) curve led to a significant shift in the calculated absorption maximum of the monomer (610 nm) with respect to the experimental one (630 nm) [52]. At the same time, such a fit, performed using an arbitrary curve, gave a maximum of the latter at 628 nm [51]. The other (beside HOMO \rightarrow LUMO) electronic transitions of the TBO molecule in the visible range have low oscillator strength (Table 1).

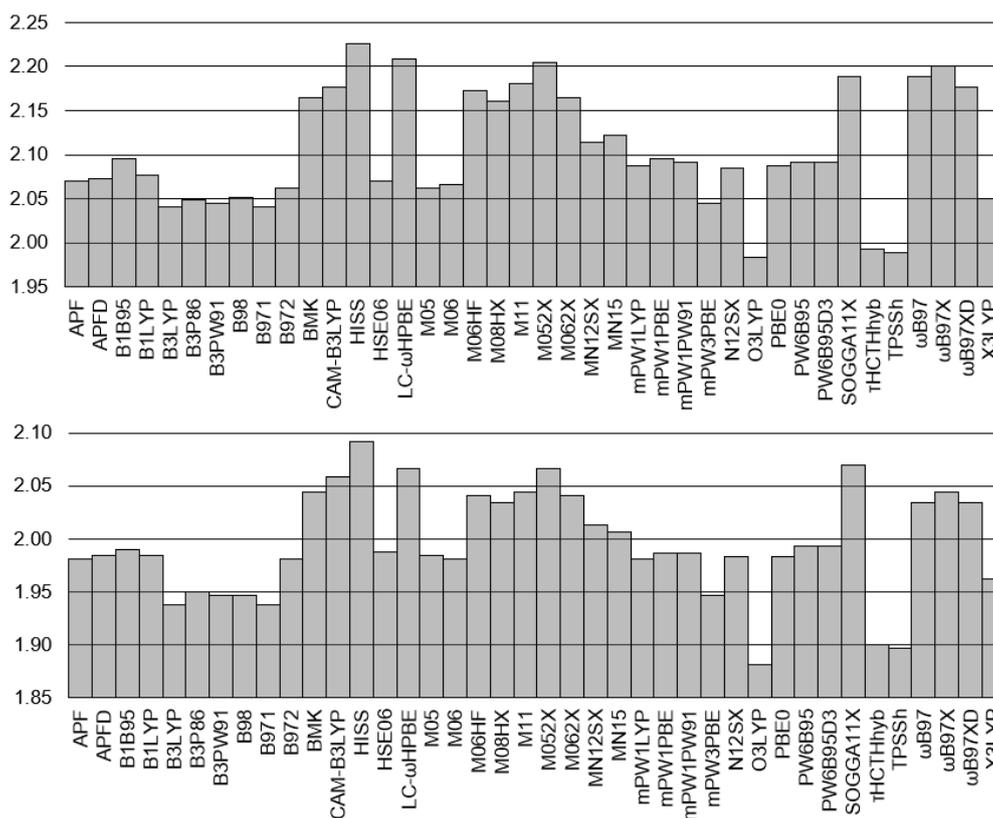


Figure 3. Calculated values of λ_{vibron} (eV) for various functionals with IEFPCM (top) and SMD (bottom) solvent models

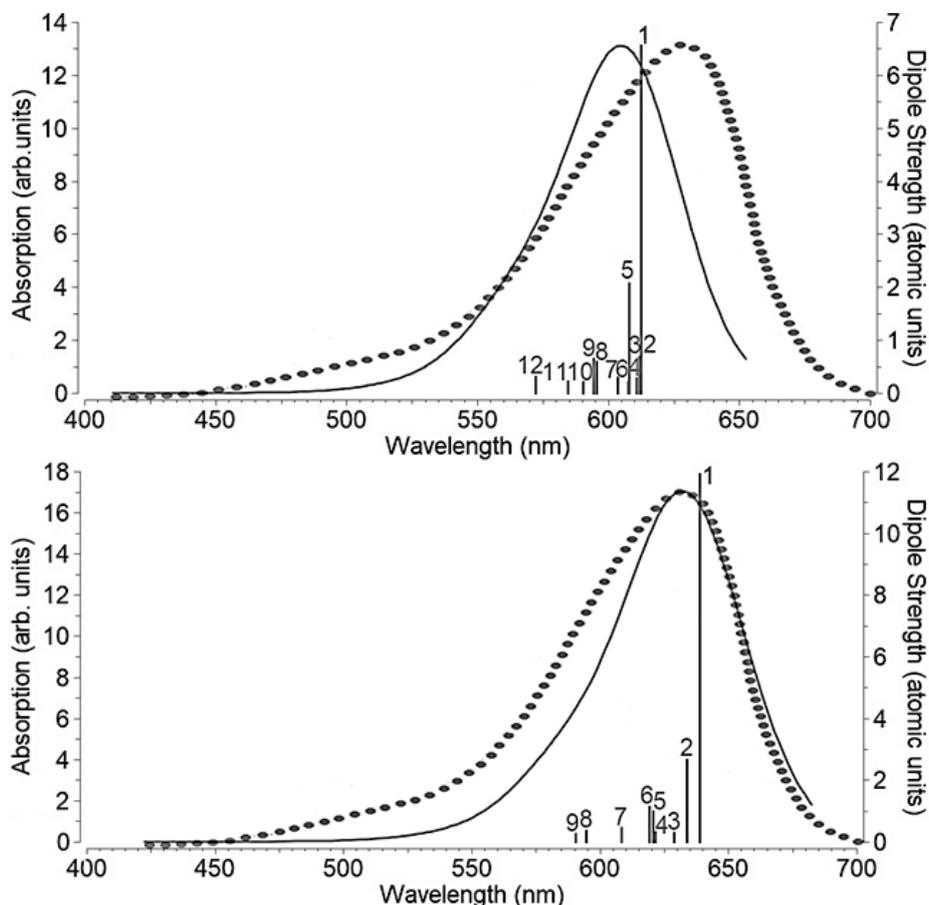


Figure 4. Calculated absorption spectra of TBO molecule (solid lines, X3LYP/6-31++G(d,p)/IEFPCM (top) and X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD (bottom) theory levels). Vertical lines are dipole strength of vibronic transitions. Dotted lines: experimental absorption spectrum of TBO (5 μM , 298 K) in aqueous solution from Ref. [51], permission from Elsevier®, order number 5023050596891)

The TBO molecule contains 456 molecular orbitals, of which 71 are occupied and 385 are unoccupied. Thus, MO #71 is the highest occupied (HOMO) and MO #72 is the lowest unoccupied (LUMO). The orbitals involved in the studied electronic transitions are shown in Fig. 5. Their configurations are π - and π^* -type, respectively. The differential electron correlation is large (Fig. 5 shows the typical odd/even alternance of cyanines). Comparing HOMO and LUMO, it can be seen that the redistribution of the electron density upon photoexcitation mainly occurs in the central ring of the chromophore.

The most intense vibronic transition (except $0_0 \rightarrow 0^0$) is $0_0 \rightarrow 6^1$ (Table 2, see Fig. 4). The total number of normal vibrational modes of the TBO molecule is 99. The sum of Franck-Condon factors was 99.88%. Thus, the contribution of the Herzberg-Teller effect (see Eq. (2)) turned out to be negligible.

The transition dipole moment M is directed along the x -axis of the chromophore (Table 3) which coincides with the experimental data on the measurement of the dichroism of the dye in a stretched PVA film [70]. A value of $M=3.34$ a.u. was obtained in Ref. [51] on the basis of spectrophotometric data. The calculated values of the dipole moment μ of the

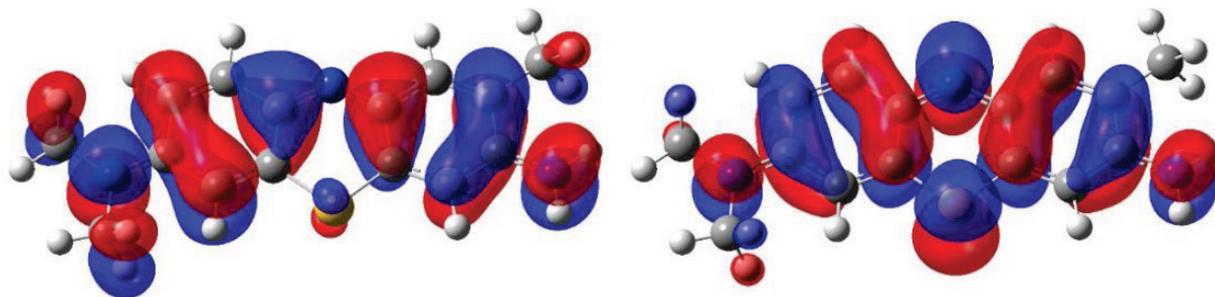


Figure 5. The TBO molecular orbitals between which the investigated electronic transition occurs: HOMO (left) and LUMO (right). Positive lobes are colored red and negative lobes are colored blue

Table 1. The three lowest electronic transitions of TBO

Transition	λ_{vert}		f	Involved transitions
	nm	eV		
$S_0 \rightarrow S_1$	529	2.35	0.8631	HOMO \rightarrow LUMO
$S_0 \rightarrow S_2$	473	2.62	0.0115	(HOMO-1) \rightarrow LUMO
$S_0 \rightarrow S_3$	360	3.44	0.0014	(HOMO-4) \rightarrow LUMO

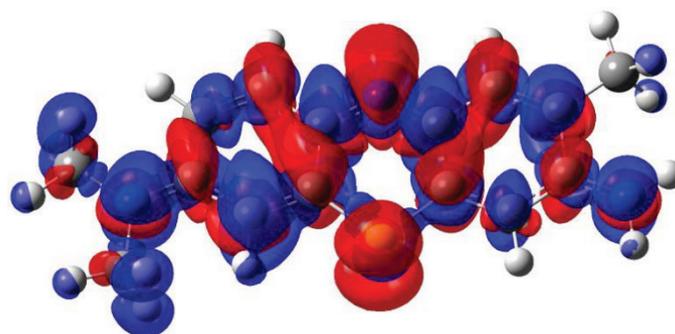
Table 2. Vibronic absorption transitions in the TBO molecule

#	Transition	λ		$\Delta\nu$ (cm^{-1})	I	p (a.u.)	Vibration description
		nm	ν				
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	63 9	1.9 4	0	102800	11.9	-
2	$0_0 \rightarrow 6^1$	63 4	1.9 6	12 4	23120	2.66	Flexural vibrations of a chromophore in its plane
3	$0_0 \rightarrow 6^2$	62 9	1.9 7	24 9	2495	0.285	see above
4	$0_0 \rightarrow 23^1$	62 1	2.0 0	43 8	2777	0.314	Compression-stretching of the central ring of the chromophore along the short axis of the latter
	$0_0 \rightarrow 23^1$	621	2.00	463	8754	0.987	Bending vibrations of the side rings of the chromophore in antiphase to each other
6	$0_0 \rightarrow 25^1$	61 9	2.0 0	49 8	10020	1.13	Compression-stretching of the central ring of the chromophore along the long axis of the latter
7	$0_0 \rightarrow 37^1$	60 8	2.0 4	78 4	4196	0.464	
8	$0_0 \rightarrow 54^1$	59 5	2.0 8	116 8	3316	0.358	Pendulum vibrations of chromophore hydrogen atoms
9	$0_0 \rightarrow 60^1$	59 0	2.1 0	128 8	2557	0.274	

λ is the wavelength, $\Delta\nu$ is the relative frequency, I is the line intensity, and p is the dipole strength

Table 3. Calculated dipole moments (D) and transition electric dipole moments (a.u.) of TBO molecule

Dipole moment	Ground state	Franck-Condon state	Equilibrium excited state
μ_x	0.0983	-1.35	-1.83
μ_y	-3.61	-4.15	-4.42
μ_z	0.0182	0.0230	0.0301
μ	3.61	4.37	4.78
Ground to Franck-Condon state transition electric dipole moments			
M_x		-5.11	
M_y		0.504	
M_z		-0.0007	
M^2		26.4	

**Figure 6.** The electron density difference between Franck-Condon and ground states of TBO molecule. Areas of positive values are colored red and areas of negative values are colored blue

TBO molecule in the excited state turn out to be larger than in the ground state: $\mu_{EX} > \mu_{FC} > \mu_{GS}$. This indicates the predominance of the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition type [89]. This also means a stronger interaction with the solvent of the TBO molecule in the excited state compared to the ground state, and is consistent with its slight positive solvatochromism (in methanol $\lambda_{max} = 629$ nm [7], and in water $\lambda_{max} = 630$ nm [9,54,66]). Note that the authors of Ref. [48] also assert the $\pi \rightarrow \pi^*$ type of TBO electronic transition.

CONCLUSIONS

In this work, we calculated the vibronic absorption spectrum of the thiazine dye Toluidine blue O in an aqueous solution using TD-DFT, all hybrid functionals supported by Gaussian16 software, 6-31++G(d,p) basis set, and two solvent models (IEFPCM and SMD). The IEFPCM solvent model showed overestimated transition energies for all used functionals, demonstrating the well-known "cyanine failure". At the same time, the SMD model in combination with the X3LYP functional gave excellent agreement with the experiment. The electronic properties of the ground and excited states of the dye were also investigated: the dipole moments and atomic charges were calculated; the distribution maps of the electron density were built. Photoexcitation leads to an increase in the dipole moment of the dye molecule. In accordance with our results, the absorption peak of the Toluidine blue O solution in the visible region of the spectrum is due to the electronic transition of $\pi \rightarrow \pi^*$ type.

References:

1. Fekrazad R., Zare H., Mohammadi S., Vand S. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on Staphylococcus aureus and Escherichia coli: An in vitro study, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, vol. 15, pp. 213-217, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.001.
2. Anju V.T., Paramanantham P., Lal S.B.S., Sharan A., Syed A., Bahkali N.A., Alsaedi M.H., Kaviyarasu K., Busi S. Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue-carbon nanotube conjugate against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus - Understanding the mechanism of action. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2019, vol. 27, pp. 305-316, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.06.014.
3. Moslemi N., Rouzmeh N., Shakerinia F., Bahador A., Azar P.S., Kharazifard M.J., Paknejad M., Fekrazad R. Photodynamic Inactivation of Porphyromonas gingivalis utilizing Radachlorin and Toluidine Blue O as Photosensitizers: An In Vitro Study. *J. Lasers Med. Sci.*, 2018, vol. 9, pp. 107-112, doi: 10.15171/jlms.2018.21.

4. Parasuraman P., Antony A.P., Lal S.B.S., Sharan A., Siddhardha B., Kasinathan K., Bahkali N.A., Dawoud T.M.S., Syed A. Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 2019, vol. 35, pp. 89-103, doi: 10.1080/08927014.2019.1570501.
5. Almeida A.M., Oliveira O.N., Aoki P.H.B. Role of Toluidine Blue- O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes. *Langmuir*, 2019, vol. 35, pp. 16745-16751, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b03045.
6. Misba L., Kulshrestha S., Khan A.U. Antibiofilm action of a toluidine blue O-silver nanoparticle conjugate on *Streptococcus mutans*: a mechanism of type I photodynamic therapy. *Biofouling*, 2016, vol. 32, pp. 313-328, doi: 10.1080/08927014.2016.1141899.
7. Wainwright M., O'Kane C., Rawthore S. Phenothiazinium photosensitizers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, vol. 160, pp. 68-71, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.035.
8. Rolim J.P.M.L., de-Melo M.A.S., Guedes S.F., Albuquerque-Filho F.B., de Souza J.R., Nogueira N.A.P., Zanin I.C.J., Rodrigues L.K.A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2012, vol. 106, pp. 40-46, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001.
9. Drzymala R.E., Liebman P.A., Romhanyi G. Acid Polysaccharide Content of Frog Rod Outer Segments Determined by metachromatic Toluidine Blue Staining. *Histochemistry*, 1982, vol. 76, pp. 363-379, doi: 10.1007/BF00543958.
10. Bastos A.L., Marques D.V., da Silva J.F., Nunes J.B.M., Correia A.D., Vigarior J.D., Terrinha A.M. Primary Inducible Fluorescence in Secretory Granules of Tumor Cells Supravivally Stained by a Toluidine Blue Dye. *Z. Naturforsch.*, 1968, vol. 23b, pp. 969-975, doi: 10.1515/znb-1968-0716.
11. Sridharan G., Shankar A.A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 2012, vol. 16, pp. 251-255, doi: 10.4103/0973-029X.99081.
12. Li X., Yuan R., Chai Y., Zhang L., Zhuo Y., Zhang Y. Amperometric immunosensor based on toluidine blue/nano-Au through electrostatic interaction for determination of carcinoembryonic antigen. *J. Biotechnol.*, 2006, vol. 123, pp. 356-366, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.023.
13. Bai X., Chen G., Shiu K.-K. Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide modified electrode with Prussian blue and poly(toluidine blue O) coating. *Electrochim. Acta*, 2013, vol. 89, pp. 454-460, doi: 10.1016/j.electacta.2012.11.086.
14. Gao H.-W., Qin P., Lin C., Shang Z.-M., Sun W. Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of *Listeria Monocytogenes* Using Toluidine Blue as a Hybridization Indicator. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2010, vol. 7, pp. 119-127, doi: 10.1007/BF03245868.
15. Liu M., Zhang G.Shi.L., Zhao G., Jin L. Electrode modified with toluidine blue-doped silica nanoparticles, and its use for enhanced amperometric sensing of hemoglobin. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, vol. 391, pp. 1951-1959, doi: 10.1007/s00216-008-2103-z.
16. Gligor D., Walcarius A. Glassy carbon electrode modified with a film of poly(Toluidine Blue O) and carbon nanotubes for nitrite detection. *J. Solid State Electrochem.*, 2014, vol. 18, pp. 1519-1528, doi: 10.1007/s10008-013-2365-z.
17. Zeyada H.M., Youssif M.I., El- Ghamaz N.A., Nasher M.A. Carrier transport mechanisms and photovoltaic characteristics of Au/toluidine blue/n-Si/Al heterojunction solar cell. *J. Mater. Sci.: Mater. Electronics*, 2018, vol. 29, pp. 3592-3601, doi: 10.1007/s10854-017-8289-0.
18. Viswanath V., Nair S.S., Subodh G., Muneera C.I. Emission features, surface morphology and optical limiting properties of semiconducting Toluidine Blue O dye- poly(vinyl alcohol) nanocomposite architecture. *SN Appl. Sci.*, 2019, vol. 1, no. 43, doi: 10.1007/s42452-018-0043-6.
19. Dubey T., Gorantla N.V., Chandrashekar K.T., Chinnathambi S. Photoexcited Toluidine Blue Inhibits Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *ACS Omega*, 2019, vol. 4, pp. 18793-18802. doi: 10.1021/acsomega.9b02792.
20. Ilanchelian M., Ramaraj R. Binding Interactions of Toluidine Blue O with *Escherichia Coli* DNA: Formation of Bridged Structure. *J. Fluoresc.*, 2011, vol. 21, pp. 1439-1453, doi: 10.1007/s10895-010-0829-4.
21. Sato S., Matsumoto S., Freivalds T., Erenpreisa J. Consideration on the Metachromatic Spectra of Toluidine Blue Dimers Formed on DNA Oligomers. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2010, vol. 83, pp. 1216-1222, doi: 10.1246/bcsj.20100032.
22. Chi Z., Liu R., Sun Y., Wang M., Zhang P., Gao C. Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA. *J. Hazard. Mater.*, 2010, vol. 175, pp. 274-278, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.09.160.
23. Wang J., Yang X. Multiplex binding modes of toluidine blue with calf thymus DNA and conformational transition of DNA revealed by spectroscopic studies. *Spectrochim. Acta A*, 2009, vol. 74, pp. 421-426, doi: 10.1016/j.saa.2009.06.038.
24. Paul P., Kumar G.S. Thermodynamics of the DNA binding of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B. *J. Chem. Thermodynamics*, 2013, vol. 64, pp. 50-57, doi: 10.1016/j.jct.2013.04.023.
25. Chen L.-H., Nie Y.-T., Liu L.-Z., Shen H.-X. Determination of Nucleic Acids on the Basis of Enhancement Effect of Resonance Light Scattering of Toluidine Blue. *Anal. Lett.*, 2003, vol. 36, pp. 107-122, doi: 10.1081/AL-120017266.
26. Paul P., Mati S.S., Bhattacharya S.C., Kumar G.S. Spectroscopic, calorimetric, cyclic voltammetric and molecular modeling studies of new methylene blue-polyadenylic acid interaction and comparison to thionine and toluidine

- blue O: Understanding self-structure formation by planar dyes. *Dyes Pigments*, 2017, vol. 136, pp. 205-218, doi: 10.1016/j.dyepig.2016.08.027.
27. Paul P., Kumar G.S. Targeting ribonucleic acids by toxic small molecules: Structural perturbation and energetics of interaction of phenothiazinium dyes thionine and toluidine blue O to tRNA^{phe}. *J. Hazard. Mater.*, 2013, vol. 263, pp. 735-745, doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.040.
28. Liu J., Zou A., Mu B. Toluidine blue: Aggregation properties and distribution behavior in surfactin micelle solution. *Colloids Surfaces B*, 2010, vol. 75, pp. 496-500, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.025.
29. Shanmugaraj K., Umadevi P., Senthilkumar L., Ilanchelian M. Elucidation of binding mechanism of photodynamic therapeutic agent toluidine blue O with chicken egg white lysozyme by spectroscopic and molecular dynamics studies. *Photochem. Photobiol.*, 2017, vol. 93, pp. 1043-1056, doi: 10.1111/php.12744.
30. Sharma A.S., Anandakumar S., Ilanchelian M. A combined spectroscopic and molecular docking study on site selective binding interaction of Toluidine blue O with Human and Bovine serum albumins. *J. Luminesc.*, 2014, vol. 151, pp. 206-218, doi: 10.1016/j.jlumin.2014.02.009.
31. Saha B., Chowdhury S., Sanyal D., Chattopadhyay K., Kumar G.S. Comparative Study of Toluidine Blue O and Methylene Blue Binding to Lysozyme and Their Inhibitory Effects on Protein Aggregation. *ACS Omega*, 2018, vol. 3, pp. 2588-2601, doi: 10.1021/acsomega.7b01991.
32. Ganguly B., Nath R.K., Panda A.K. Spectral Studies on the Interaction of Toluidine Blue O with Bovine Serum Albumin. *J. Surface Sci. Technol.*, 2013, vol. 29, pp. 1-16.
33. Shanmugaraj K., Anandakumar S., Ilanchelian M. Unraveling the binding interaction of Toluidine blue O with bovine hemoglobin - a multi spectroscopic and molecular modeling approach. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 3930-3940, doi: 10.1039/c4ra11136b.
34. Wang J., Guo Y., Liu B., Cheng C., Wang Z., Han G., Gao J., Zhang X. Spectroscopic analyses on interaction of bovine serum albumin (BSA) with toluidine blue (TB) and its sonodynamic damage under ultrasonic irradiation. *J. Luminesc.*, 2011, vol. 131, pp. 231-237, doi: 10.1016/j.jlumin.2010.10.003.
35. Yu M.-E., Cheong B.-S., Cho H.-G. SERS Spectroscopy and DFT Studies of Thionine and its Derivatives Adsorbed on Silver Colloids: Which N Atom is Used for Coordination of a Phenothiazine- Based Natural Dye to Electron-Deficient Metal Surface? *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2017, vol. 38, pp. 928-934, doi: 10.1002/bkcs.11205.
36. Aranaz I., Alcantara A.R., Heras A., Acosta N. Efficient reduction of Toluidine Blue O dye using silver nanoparticles synthesized by low molecular weight chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, vol. 131, pp. 682-690, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.119.
37. Neelakandeswari N., Sangami G., Dharmaraj N., Taek N.K., Kim H.Y. Spectroscopic investigations on the photodegradation of toluidine blue dye using cadmium sulphide nanoparticles prepared by a novel method. *Spectrochim. Acta A*, 2011, vol. 78, pp. 1592-1598, doi: 10.1016/j.saa.2011.02.008.
38. Xie X., Guo H., Yan M., Korshin G. Interactions between natural organic matter (NOM) and the cationic dye toluidine blue at varying pHs and ionic strengths: Effects of NOM charges and Donnan gel potentials. *Chemosphere*, 2019, vol. 236, p. 124272, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.003.
39. Ilanchelian M., Raj C.R., Ramaraj R. Spectral Studies on the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Toluidine Blue O and Meldola's Blue in Aqueous Solution. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2000, vol. 36, pp. 9-20, doi: 10.1023/A:1008085829227.
40. Dasmandal S., Bhattacharyya D., Rudra S., Patel B.K., Mahapatra A. Spectroscopic investigation on interaction of toluidine blue/AOT/ γ -cyclodextrin ternary system. *J. Luminesc.*, 2016, vol. 179, pp. 340-349, doi: 10.1016/j.jlumin.2016.06.057.
41. Yuan Z., Zhu M., Han S. Supramolecular inclusion complex formation and application of β -cyclodextrin with heteroanthracene ring cationic dyes. *Anal. Chim. Acta*, 1999, vol. 389, pp. 291-298, doi: 10.1016/S0003-2670(99)00134-8.
42. Arikan B., Tuncay M. The effect of SDS micelles on reduction of toluidine blue by ascorbic acid in acid medium. *Colloids Surf. A*, 2006, vol. 273, pp. 202-207, doi: 10.1016/j.colsurfa.2005.08.025.
43. Mohamed A.A., Ulber R., Zayed A. Chitosan-Toluidine Blue Beads for Purification of Fucoidans. *Carbohydrate Polymers*, 2020, vol. 231, p. 115686, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115686.
44. D'Ilario I.L., Francolini I., Martinelli A., Piozzi A. Insight into the Heparin-Toluidine Blue (C.I. Basic Blue 17) interaction. *Dyes Pigments*, 2009, vol. 80, pp. 343-348, doi: 10.1016/j.dyepig.2008.07.015.
45. Robinson-Duggon J., Pizarro N., Gunther G., Ziniga- Nunez D., Edwards A.M., Greer A., Fuentealba D. Fatty Acid Conjugates of Toluidine Blue O as Amphiphilic Photosensitizers: Synthesis, Solubility, Photophysics and Photochemical Properties. *Photochem. Photobiol.*, 2021, vol. 97, pp. 71-79, doi: 10.1111/php.13304.
46. Kiraly K., Lapvetalainen T., Arokoski J., Torronen K., Modis L., Kiviranta I., Helminen H.J. Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry. *Histochem. J.*, 1996, vol. 28, pp. 577-590, doi: 10.1007/BF02331378.
47. Hahn T., Schulz M., Stadtmüller R., Zayed A., Muffler K., Lang S., Ulber R. Cationic dye for the specific determination of sulfated polysaccharides. *Anal. Lett.*, 2016, vol. 49, pp. 1948-1962, doi: 10.1080/00032719.2015.1126839.
48. Hahn T., Muffler K., Ulber R. Isothermal microcalorimetric studies of toluidine blue O/sulfated polysaccharides interactions. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2016, vol. 123, pp. 2291-2296, doi: 10.1007/s10973-015-5101-3.

49. Fradj A.B., Lafi R., Gzara L., Hamzaoui A.H., Hafiane A. Spectrophotometric study of the interaction of toluidine blue with poly(ammonium acrylate). *J. Mol. Liquids*, 2014, vol. 194, pp. 110-114, doi: 10.1016/j.molliq.2014.01.008.
50. Ushio H., Yasunaga T., Sano T., Tsuji Y. Kinetic Study of Cooperative Binding Reaction of Toluidine Blue to Poly (α ,L-glutamic acid) by Means of the Electric-Field Pulse Method. *Biopolymers*, 1976, vol. 15, pp. 187-201, doi: 10.1002/bip.1976.360150113.
51. Ghanadzadeh Gilani A., Poormohammadi-Ahandani Z., Kian R. Additive-induced aggregate changes of two structurally similar dyes in aqueous solutions: A comparative photophysical study. *Spectrochim. Acta*, 2018, vol. 189, pp. 543-555, doi: 10.1016/j.saa.2017.08.048.
52. D'Ilario L., Martinelli A. Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects. *Modelling Simul. Mater. Sci. Eng.*, 2006, vol. 14, pp. 581-595, doi: 10.1088/0965-0393/14/4/003.
53. Matassa R., Sadun C., D'Ilario L., Martinelli A., Caminiti R. Supramolecular Organization of Toluidine Blue Dye in Solid Amorphous Phases. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, pp. 1994-1999, doi: 10.1021/jp066555j.
54. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2003, vol. 71, pp. 87-98, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002.
55. Jonnalagadda S.B., Tshabalala D. A Kinetic Study of the Reduction of Toluidine Blue with Thiourea in Acidic Solution. *Int. J. Chem. Kinetics*, 1992, vol. 24, pp. 999-1007, doi: 10.1002/kin.550241110.
56. Arikan B., Tuncay M. Micellar effects and reactant incorporation in reduction of toluidine blue by ascorbic acid. *Dyes Pigments*, 2005, vol. 64, pp. 1-8, doi: 10.1016/j.dyepig.2004.03.013.
57. Mahadevan J., Guha S.N., Kishore K., Moorthy P.N. One-electron reduction of toluidine blue. A pulse radiolysis study. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, 1989, vol. 101, pp. 43-53, doi: 10.1007/BF02869385.
58. Mosleh S., Rahimi M.R., Ghaedi M., Dashtian K., Hajati S. BiPO₄/Bi₂S₃-HKUST-1-MOF as novel blue light-driven photocatalyst for simultaneous degradation of toluidine blue and auramine-O dyes in new rotating packed bed reactor: optimization and comparison to conventional reactor. *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, pp. 63667-63680, doi: 10.1039/C6RA10385E.
59. Singh H.K., Saquib M., Haque M.M., Muneer M. Heterogeneous photocatalysed decolorization of two selected dye derivatives neutral red and toluidine blue in aqueous suspensions. *Chem. Eng. J.*, 2008, vol. 136, pp. 77-81, doi: 10.1016/j.cej.2007.05.009.
60. Robinson-Duggon J., Marino-Ocampo N., Barrias P., Zuniga-Nuñez D., Gunther G., Edwards A.M., Greer A., Fuentealba D. Mechanism of Visible-Light Photooxidative Demethylation of Toluidine Blue O. *J. Phys. Chem. A*, 2019, vol. 123, pp. 4863-4872, doi: 10.1021/acs.jpca.9b03588.
61. Mandal N.C., Biswas B.B. Metachromasia Induced by Inositol-Hexa-Phosphate with Toluidine Blue. *Histochemie*, 1969, vol. 18, pp. 202-209, doi: 10.1007/BF00306167.
62. Vleugels L.F.W., Ricois S., Voets I.K., Tuinier R. Reversal of metachromasy revisited; displacement of Toluidine-blue from alginate by surfactants. *Colloids Surf. A*, 2017, vol. 529, pp. 454-461, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.06.027.
63. Azariah J. Studies on metachromasia. 1. The non-specificity of green metachromasia to toluidine blue. *Acta Histochem.*, 1972, vol. 43, pp. 254-259.
64. Mazeikiene R., Niaura G., Eicher-Lorka O., Malinauskas A. Raman spectroelectrochemical study of Toluidine Blue, adsorbed and electropolymerized at a gold electrode. *Vibr. Spectrosc.*, 2008, vol. 47, pp. 105-112, doi: 10.1016/j.vibspec.2008.02.018.
65. 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. 1456-1452, doi: 10.1002/jps.2600640907.
66. Woislowski S. The Spectrophotometric Determination of Ionization Constants of Basic Dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, vol. 75, pp. 5201-5203, doi: 10.1021/ja01117a016.
67. Nasher M.A., Youssif M.I., El-Ghamaz N.A., Zeyada H.M. Linear and Nonlinear Optical Properties of Irradiated Toluidine Blue Thin Films. *Optik*, 2019, vol. 178, pp. 532-543, doi: 10.1016/j.ijleo.2018.10.001.
68. Nasher M.A., Youssif M.I., El-Ghamaz N.A., Zeyada H.M. Structural, optical and electrical studies of Toluidine Blue thin films prepared by thermal evaporation technique. *J. Luminesc.*, 2018, vol. 204, pp. 428-435, doi: 10.1016/j.jlumin.2018.08.037.
69. Viswanath V., Muneera C.I. Nonlinear Refraction Behaviour of Toluidine Blue O Dye-PVA Nanocomposite Films under CW Laser Light Excitation. *Mater. Today Proc.*, 2017, vol. 4, pp. 4412-4416, doi: 10.1016/j.matpr.2017.04.013.
70. Platonova N.V., Popov K.R. Electronic states in the acridine and phenothiazine dye molecules. *J. Appl. Spectrosc.*, 1979, vol. 30, pp. 321-326, doi: 10.1007/BF00608271.
71. 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. 4097-115, doi: 10.1021/ct400450k.
72. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872, doi: 10.1103/PhysRev.32.858.
73. Herzberg G., Teller E. Schwingungsstruktur der Elektronenübergänge bei mehratomigen Molekülen. *Z. Phys. Chem., Abt. B*, 1933, vol. 21, pp. 410-446, doi: 10.1515/zpch-1933-2136.

74. 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 Q_x band of porphyrin as a case study. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, p. 224311, doi: 10.1063/1.2929846.
75. Improta R., Barone V., Scalmani G., Frisch M.J. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 125, p. 054103, doi: 10.1063/1.2222364.
76. 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, doi: 10.1021/jp810292n.
77. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., et al. *Gaussian 16*, Revision C.01, Inc., Wallingford CT, 2016.
78. Dennington R., Keith T.A., Millam J.M. *GaussView*, Version 6.1, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2016.
79. Dierksen M., Grimme S. The Vibronic Structure of Electronic Absorption Spectra of Large Molecules: A Time-Dependent Density Functional Study on the Influence of “Exact” Hartree-Fock Exchange. *J Phys Chem A*, 2004, vol. 108, pp. 10225-10237, doi: 10.1021/jp047289h.
80. Jacquemin D., Bremond E., Planchat A., Ciofini I., Adamo C. TD-DFT vibronic couplings in anthraquinones: from basis set and functional benchmarks to applications for industrial dyes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, vol. 7, pp. 1882-1892, doi: 10.1021/ct200259k.
81. Adamo C., Jacquemin D. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, vol. 42, pp. 845-856, doi: 10.1039/C2CS35394F.
82. Jacquemin D., Bremond E., Ciofini I., Adamo C. Impact of Vibronic Couplings on Perceived Colors: Two Anthraquinones as a Working Example. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, vol. 3, pp. 468-471, doi: 10.1021/jz201552x.
83. Jacquemin D., Zhao Y., Valero R., Adamo C., Ciofini I., Truhlar D.G. Verdict: Time-Dependent Density Functional Theory “Not Guilty” of Large Errors for Cyanines. *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, vol. 8, pp. 1255-1259, doi: 10.1021/ct200721d.
84. Le Guennic B., Jacquemin D. Taking Up the Cyanine Challenge with Quantum Tools. *Acc. Chem. Res.*, 2015, vol. 48, pp. 530-537, doi: 10.1021/ar500447q.
85. Zhou P. Why the lowest electronic excitations of rhodamines are overestimated by time-dependent density functional theory. *Int. J. Quantum Chem.*, 2018, vol. 118, e25780, doi: 10.1002/qua.25780.
86. 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, doi: 10.1073/pnas.0308730100.
87. Paul P., Mati S.S., Bhattacharya S.C., Kumar G.S. Exploring the interaction of phenothiazinium dyes methylene blue, new methylene blue, azure A and azure B with tRNA^{Phe}: spectroscopic, thermodynamic, voltammetric and molecular modeling approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, vol. 19, pp. 6636-6653, doi: 10.1039/C6CP07888E.
88. Ghanadzadeh Gilani A., Ghorbanpour T., Salmanpour M. Additive effect on the dimer formation of thiazine dyes. *J. Mol. Liquids*, 2013, vol. 177, pp. 273-282, doi: 10.1016/j.molliq.2012.09.005.
89. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358, doi: 10.1021/cr00032a005.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАНАЛА OMPF ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С НОРФЛОКСАЦИНОМ

Чистюлин Д.К., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Баланева Н.Н., Чингизова Е.А., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: cdk27@mail.ru
Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.20930/tusjbpс.2022.0535

Аннотация Данная работа посвящена исследованию взаимодействия OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* с гидрохлоридом норфлоксацина, (Nf·HCl), производным антибиотика фторхинолонового ряда. С помощью метода бислойных липидных мембран (БЛМ) было обнаружено, что молекулы водорастворимого Nf·HCl диссоциируют на ионы и, связываясь на короткое время с участками внутри канала, блокируют ионный ток через пору OmpF порина. Исследование кинетических характеристик этого процесса совместно с использованием метода молекулярного докинга позволило построить модель, объясняющую картину данного взаимодействия. Предполагается, что внутри поринового канала с разных сторон от зоны сужения, находятся два сайта связывания с ионом Nf·H⁺, стабилизированные преимущественно электростатическими взаимодействиями. При этом связывание с сайтом, расположенным внутри канала вблизи вестибуля, образуемого наружными петлями порина, приводит к блокировке тока, вследствие создания пространственных затруднений для движения K⁺ и Cl⁻ ионов, в то время как связывание с сайтом, расположенным на выходе из канала, не препятствует прохождению тока.

Ключевые слова: порины грамотрицательных бактерий, норфлоксацин, бислойные липидные мембраны, антимикробная активность, молекулярный докинг.

Белки наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий играют важную роль в антибактериальной устойчивости, бактериальной вирулентности и, таким образом, влияют на патогенные свойства бактерии. В ходе эволюции бактерии, в том числе патогенные, разработали несколько стратегий для выживания во множестве вредных условий, как в окружающей среде, так и в организме хозяев. Реакция грамотрицательных бактерий на ограничение питательных веществ, окислительный стресс, повреждение оболочки, воздействие антимикробных препаратов и другие ограничивающие их рост изменения условий привели к развитию у бактерий антибиотикорезистентности. Общие (неспецифические) поры и селективные каналы, формируемые в НМ бактерий трансмембранными β-структурированными белками (поринами) обеспечивают транспорт низкомолекулярных веществ через мембрану. Этому фундаментальному процессу в биологии посвящено огромное число исследований. Значительная доля этих работ принадлежит изучению пассивной диффузии через каналы неспецифических поринов НМ бактерий (OmpF и OmpC типа), поскольку они представляют собой эффективную модель электростатически регулируемого наносита.

Основным путём проникновения молекул антибиотиков внутрь грамотрицательной бактерии являются водонаполненные каналы, образованные порообразующими белками. В результате обширного ряда исследований поринов наружной мембраны дикого типа и их мутантных форм было показано, что резистентность грамотрицательных бактерий зависит как от уровня экспрессии того или иного типа поринов, так и от особенностей структуры их внешних петель и интерьера канала. В связи с распространением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в том числе госпитальных, исследование взаимодействия поринов с антибиотиками способствует не только пониманию молекулярных механизмов антибиотикорезистентности, но и необходимо для конструирования более эффективных антибиотиков с высоким уровнем проникновения в клетку-мишень.

В данной работе методами бислойных липидных мембран (БЛМ) и молекулярного докинга исследовано взаимодействие неспецифического порина OmpF, выделенного из *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм 598, серовар 1В), с гидрохлоридом норфлоксацина (Nf·HCl), производным норфлоксацина, антибиотика фторхинолонового ряда.

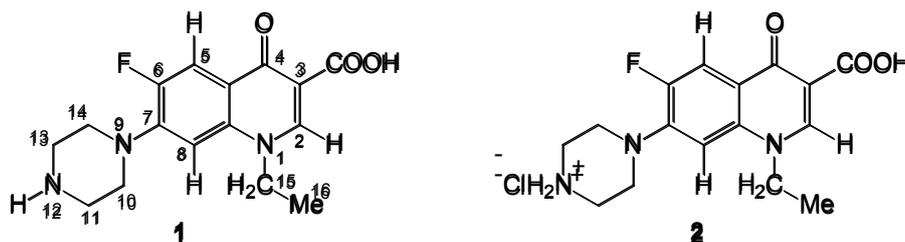


Таблица 1. Антимикробная активность моногидрохлорида норфлоксацина

Штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>	ИК ₅₀ , мкМ	ИК ₁₀₀ , мкМ
Моногидрохлорид норфлоксацина	0,13±0,01	0,30±0,02
Гентамицин	6±0,12	10,5±0,04

Норфлоксацин (1) – синтетический антимикробный препарат широкого спектра действия. Как известно штаммы *Y. enterocolitica/Y. pseudotuberculosis* высоко чувствительны к фторсодержащим хинолонам (норфлоксацин, цiproфлоксацин, пефлоксацин).

Поскольку само основание (1) в воде нерастворимо, его использовали в виде хорошо растворимого моногидрохлорида. Последний получали путем обработки (1) раствором газообразного HCl в сухом метаноле (MeOH). Газообразный HCl генерировали реакцией MeOH с расчётным количеством хлористого ацетила. Молекула основания (1) имеет 3 центра связывания молекулы HCl: два третичных атома N в положениях 1 и 9 и один вторичный в положении 12. В случае норфлоксацина молекула HCl связывается, прежде всего, с вторичным атомом азота, образуя соль (2). Это было установлено через сравнение спектров ЯМР¹H соединений (1) и (2). Наибольшие изменения значений химических сдвигов протонов наблюдались в спектре гидрохлорида (2) для метиленовых групп пиперазинового цикла.

Полученный Nf·HCL был протестирован на антимикробную активность в отношении культуры клеток *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, серovar IB) в 96-луночных микропланшетах в жидкой питательной среде Мюллера-Хинтона. 90 мкл бактериальной суспензии *Y. pseudotuberculosis* (10⁹ КОЕ в 1 мл в среды) добавляли в каждую лунку микропланшета, инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 24 ч. Ингибирование роста микроорганизмов оценивали путем измерения оптической плотности при 620 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (BioTek, США) после предварительного встряхивания в течение 10 мин [1,2]. Эксперимент проводили дважды в трех повторах. В качестве положительного контроля использовали гентамицин, в качестве отрицательного контроля — 1% раствор диметилсульфоксида в солевом фосфатном буфере. Nf·HCL. Как следует из данных таблицы, Nf·HCL обладает высокой антимикробной активностью, значительно превосходящей таковую стандартного антибиотика.

Проведенные электрофизиологические исследования показали следующее. Добавление Nf·HCL в ячейку, со встроенным в липидный бислой OmpF порином *Y. pseudotuberculosis*, вызывало появление многочисленных событий блокировки пориновых каналов. Вероятно, молекулы водорастворимого Nf·HCL диссоциируют на ионы и на короткое время, связываясь с участками внутри канала, блокируют ионный ток. В ходе эксперимента на одиночных каналах (20 нг/мл белка) были выявлены особенности взаимодействия антибиотика с порином. Потенциал на мембране варьировали в пределах от -100 до +100 мВ, антибиотик добавляли с разных сторон от мембраны, а порин — с *cis*-стороны.

Если рассматривать процесс блокировки канала как одноступенчатый, то можно рассчитать его кинетические параметры, а именно, константу ассоциации пропорциональную частоте возникновения событий блокировки и константу диссоциации обратно пропорциональную времени блокировки. В ходе эксперимента выяснилось, что на кинетические параметры влияет изначальное положение иона NfH⁺ по отношению к порину, а также направление и величина потенциала на мембране. Схемы четырех принципиально различных положений ионов NfH⁺ по отношению к молекуле порина, при разных направлениях приложенного к мембране потенциала и соответствующие кинетические характеристики приведены на рисунке 1 А-Г. Максимальные значения констант ассоциации (K_{on}) и минимальные констант диссоциации (K_{off}) наблюдались при добавлении NfH⁺ с *cis* стороны мембраны, соответствующей области наружных петель порина (рис. 1А). Это свидетельствует о максимальном времени и максимальном количестве событий блокировки поринового канала. При этом увеличение потенциала приводит к увеличению значения K_{on}, но не влияет на значение K_{off}.

При противоположном по знаку потенциале (рис. 1Б), количество событий блокировки резко уменьшается, падая до очень низких значений при максимальных потенциалах (75, 100 мВ), время блокировки при этом уменьшается в среднем в два раза. Возможно, это происходит из-за того, что электрическое поле, действуя на ион NfH⁺ в противоположном направлении, препятствует продвижению молекулы антибиотика вдоль канала.

В случае добавления NfH⁺ с транс-стороны мембраны (рис. 1В) события блокировки не регистрируются. Однако смена направления потенциала (рис. 1Г) приводит к появлению событий блокировки канала, хотя в меньшем количестве и с меньшим временем по сравнению с условиями эксперимента, приведенными на рисунке 1А. Интересно отметить, что при достаточно высоких значениях потенциала (1Г, +75, +100мВ) происходит резкое возрастание константы ассоциации.

Для объяснения результатов электрофизиологических исследований привлечено молекулярное моделирование. *In silico* анализ взаимодействия Nf·HCL с поверхностью бислойной липидной мембраны из DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), выполненный при помощи удаленного ресурса PerMM [3] показал, что связанное с мембраной состояние является наиболее энергетически благоприятным. Оценка его

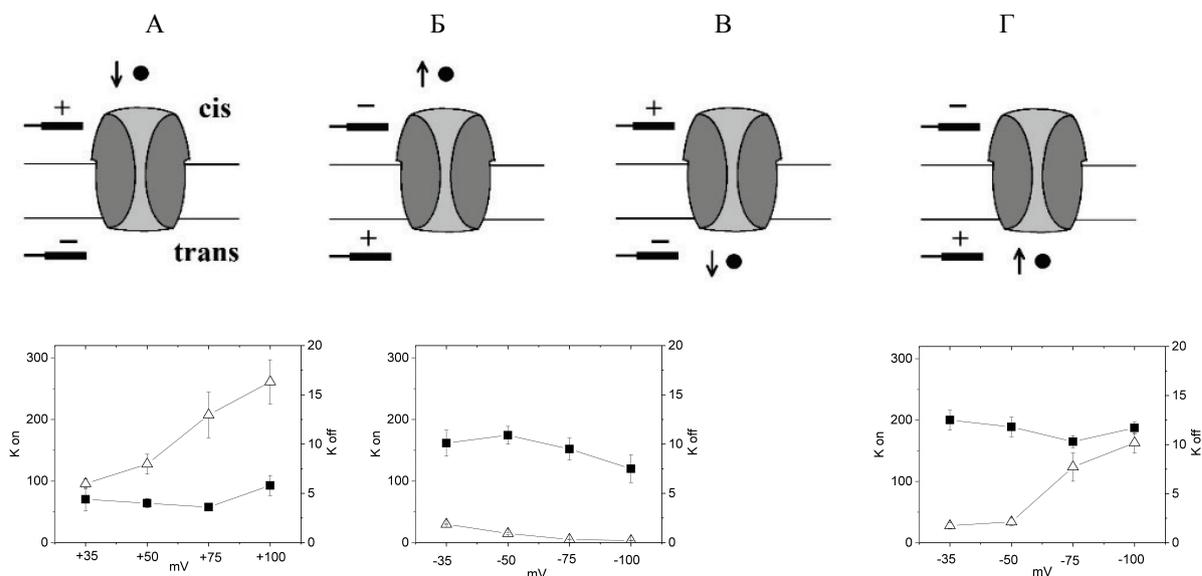


Рисунок 1. А – NfH⁺ с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Б – NfH⁺ с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный; В – NfH⁺ с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Г – NfH⁺ с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный. Графики зависимости кинетических констант K_{on} (белые треугольники) K_{off} (чёрные квадраты) от приложенного к мембране потенциала приведены под каждой соответствующей схемой

пассивной проницаемости через модельную мембрану указывает на наличие потенциального барьера величиной более ΔG 7,6 ккал/моль. Эти данные свидетельствуют о том, что транспорт антибиотика в бактериальную клетку осуществляется, по-видимому, через пориновый канал.

Для предсказания вероятных взаимодействий порина с NfH⁺ с внутренней областью канала YrOmpF была применена методология слепого белок-лигандного докинга в программе MOE2020.0109 CCG [4]. При этом молекула антибиотика рассматривалась как гибкая, в то время как рецептор оставался жестким. В качестве рецептора.] использовали 3D-модель YrOmpF порина, которая была построена методом гомологичного моделирования с помощью программы MOE2019.01 CCG [8] на основании кристаллической структуры порина OmpF из *Escherichia coli* (PDB ID 2OMF), как это было описано ранее [5].

Вычислительные эксперименты позволили обнаружить существование двух наиболее энергетически выгодных кластеров, что указывает на наличие двух сайтов связывания NfH⁺ на внутренней поверхности поры YrOmpF. Сайт связывания, характеризующийся минимальным значением оценочной функции (-6,50) локализован на транс-стороне канала YrOmpF (trans-минимум), в то время как второй сайт связывания (-5,56) расположен выше зоны констрикции на внеклеточной стороне канала (cis-минимум) (рис. 2). Очевидно, при поглощении антибиотика бактериальными клетками из внешней среды движение NfH⁺ происходит от *cis*- к *trans*-стороне мембраны. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH⁺ может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования взаимодействия энрофлоксацина (EF) с OmpF порином *Escherichia coli* (EcOmpF) [6], для которого было показано наличие двух сайтов связывания лиганда выше и ниже зоны констрикции. Однако K.R. Mahendran и соавторы полагают, что EF стабилизирован в центрах связывания преимущественно благодаря гидрофобным взаимодействиям с остатками Met38 и консервативным Phe118, а также водородными связями с Arg132, Arg 82 и Tyr32.

Для детальной характеристики данных сайтов связывания были отобраны наиболее энергетически выбранные решения, которые подвергались процедуре минимизации энергии, в силовом поле Amber 14: ЕНТ для оптимизации полученных структур, позволяющей учесть гибкость боковых цепей рецептора. В случае YrOmpF оценка энергетического вклада межмолекулярных взаимодействий в стабилизацию комплекса белка с Nf-HCL, выполненная с помощью соответствующего приложения программы MOE CCG [7], позволяет предполагать, что в данном случае основной движущей силой взаимодействия являются электростатические силы. При этом роль «горячих точек» взаимодействия принадлежит Arg323 и Asp116 в cis-минимуме и Asp92 в trans-минимуме.

Действительно, несмотря на то что EcOmpF и YrOmpF характеризуются высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности (более 50%), они имеют некоторые различия, в частности в длине и пространственной организации внешних петель, а также в распределении заряженных аминокислотных остатков во внутренней области их каналов. Так, EcOmpF характеризуется наличием гидрофобного кармана в области Met38 и Phe118 и наличием объемного ароматического остатка Tyr32 на более длинной, чем у YrOmpF петле L1, тогда как YrOmpF, вместо Met38 и Gly325 (петля L8) имеет соответственно основные остатки Lys33 и Arg 323, которые совместно формируют область положительного заряда. Именно этот кластер основных остатков

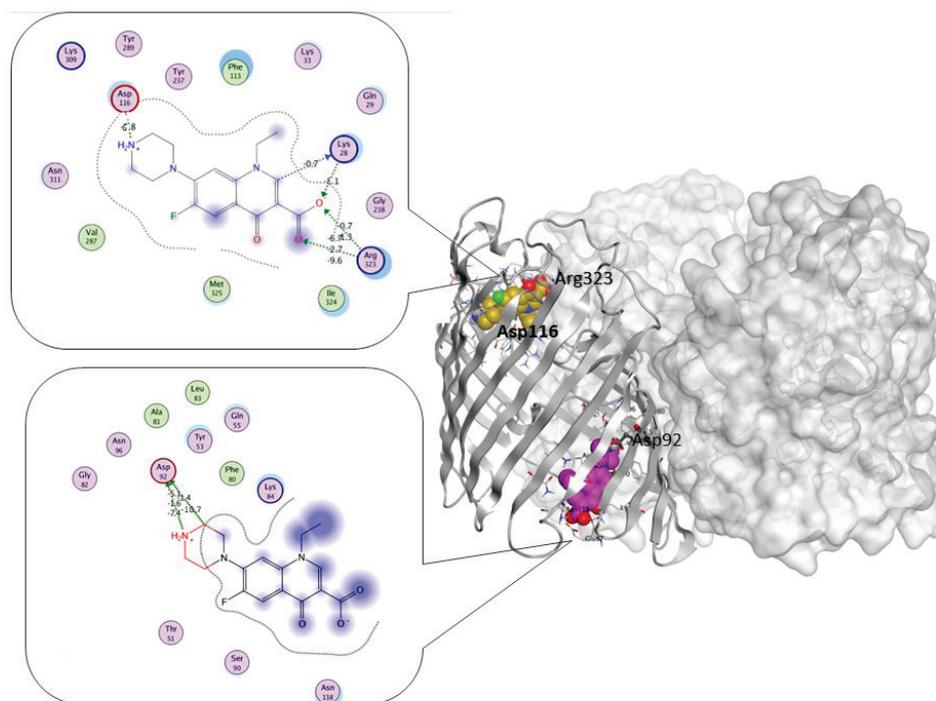


Рисунок 2. Пространственная организация вероятных комплексов YrOmpF с Nf-HCL. 3D структура гомотримера порина YrOmpF, две субъединицы представлены в виде молекулярной поверхности, одна в виде ленточной диаграммы. Молекулы Nf-HCL в двух сайтах связывания приведены в шаровом представлении, в *trans* положении – розовым, в *cis* положении – желтым, окружающие их аминокислотные остатки приведены в стержневом представлении. В выносках приведены 2D диаграммы межмолекулярных взаимодействий Nf-HCL в обоих сайтах связывания

определяет ориентацию карбоксильной группы молекулы антибиотика, в то время как его пиперазиновый цикл взаимодействует с Asp116 внутри сайта связывания в области устья внешнего вестибуля поры YrOmpF. Суммарный вклад солевых мостиков в энергию связывания составляет -23,63 ккал/моль.

Таким образом, показано, что электростатические взаимодействия вносят основной вклад при связывании антибиотика с обоими сайтами. При этом с *cis*-стороны ключевым остатком является Arg323 (-9,60 ккал/моль), с *trans*-стороны — Asp92 (-14,03 ккал/моль). Очевидно, при поглощении антибиотика бактериальными клетками из внешней среды движение NfH⁺ происходит от *cis*-к *trans*-стороне мембраны. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH⁺ может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер.

Результаты исследования взаимодействия YrOmpF, выделенного из грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, серовар IB) с моногидрохлоридом норфлоксацина, проявляющего высокую антимикробную активность в отношении данного штамма, расширяют представления о механизме проницаемости антибиотиков в каналы грамотрицательных патогенов, что способствует разработке эффективных антибиотиков против иерсиний, вызывающих широко распространенное и социально-значимое кишечное заболевание.

Список литературы / References:

- Wayne P.A. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard—Tenth edition. CLSI Document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. *Studies in mycology*, Baarn, 1974, vol. 6, p. 119.
- Lomize A.L., Hage J.M., Schnitzer K., Golobokov K., LaFaive M.B., Forsyth A.C. Pogozeva I.D. PerMM: A WebTool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J. Chem. Inf. Model.*, 2019, vol. 59, no. 7, pp. 3094-3099.
- Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01. *Chemical Computing Group ULC*, 1010 Sherbooke St. West, Suite no. 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2021.
- Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2005, vol. 23, no. 2, pp. 163-174, doi: 10.1080/07391102.2005.10507056.
- Mahendran K.R., Hajjar E., Mach T., Lovelle M., Kumar A., Sousa I., Spiga E., Weingart H., Gameiro P., Winterhalter M., Ceccarelli M. Molecular Basis of Enrofloxacin Translocation through OmpF, an Outer Membrane

Channel of *Escherichia coli* – When Binding Does Not Imply Translocation. *J. Phys. Chem. B*, 2010, vol. 114, pp. 5170-5179.

7. Clark A.M., Labute P. 2D depiction of protein–ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, no. 47, pp. 1933-1944.

INTERACTION OF THE *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* OMPF PORIN CHANNEL WITH NORFLOXACIN

Chistyulin D.K., Zelepuga E.A., Khomenko V.A., Balaneva N.N., Chingizova E.A., Novikova O.D.

*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS,
prosp. 100 let Vladivostoku, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: cdk27@mail.ru*

Received 22.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0535

Abstract. This work is devoted to the study of the interaction of *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin with norfloxacin hydrochloride (Nf•HCL), a derivative of a fluoroquinolone antibiotic. Using the bilayer lipid membrane (BLM) method, it was found that water-soluble Nf•HCL molecules dissociate into ions and, binding for a short time to sites inside the channel, block the ion current through the OmpF porin pore. The study of the kinetic characteristics of this process, together with the use of the molecular docking method, made it possible to construct a model that explains the pattern of this interaction. It is proposed that inside the porin channel, on opposite sides of the constriction zone, there are two binding sites with the Nf•H⁺ ion, stabilized mainly by electrostatic interactions. At the same time, binding to the site located inside the channel near the vestibule formed by the outer loops of the porin leads to blocking of the current, due to the creation of spatial difficulties for the movement of K⁺ and Cl⁻ ions, while binding to the site located at the exit from the channel does not prevent the passage of current.

Key words: porins of gram-negative bacteria, norfloxacin, lipid bilayer membranes, antimicrobial activity, molecular docking.

ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГЕМОЛИЗЕ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЯМИ

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.

Белорусский государственный университет

пр. Независимости 4, г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0536

Аннотация. Пероксид водорода, образующийся при клеточном дыхании и действии физико-химических факторов, является важным участником внутриклеточных регуляторных процессов. Умеренное повышение концентрации пероксида водорода активирует механизмы, связанные с защитой и адаптацией, а при высоком уровне окислителя наблюдается повреждение клеточных структур. В работе показано, что при действии пероксида водорода в микромолярных концентрациях наблюдается повышение структурной стабильности мембран и снижение доли гемолизированных эритроцитов при разрушении хлорноватистой кислотой, наночастицами серебра и нитратом серебра. Предложен метод количественной оценки регуляции защитных свойств эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе различными факторами. Показано, что диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток (область гормезиса), различается для различных факторов, приводящих к разрушению. На основе разработанной математической модели разрушения клеток при действии повреждающего фактора и гормезисных зависимостей ответа эритроцитов на действие пероксида водорода проведён расчёт параметров, характеризующих регуляцию клеточных адаптационных процессов. Предложенный метод анализа защитных свойств клеток позволяет сравнивать адаптационные свойства эритроцитов и определять оптимальные условия для их регуляции внешними факторами.

Ключевые слова: эритроциты, адаптация, резистентность, гемолиз.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов адаптации клеток к стрессу и разработка способов регуляции их резистентности к действию физических, химических и биологических повреждающих факторов является актуальной задачей медицинской биофизики. Ключевыми участниками адаптационных процессов клеток являются активные формы кислорода (АФК) – высокорекреационные продукты метаболизма кислорода, обладающие широким спектром физиологического и патофизиологического действия [1].

Согласно современным представлениям основной молекулой группы АФК, участвующей в регуляторных процессах, является пероксид водорода [2]. Умеренное повышение концентрации пероксида водорода активирует механизмы, связанные с защитой и адаптацией, а при высоком уровне окислителя наблюдается повреждение клеточных структур [1,2]. Такое свойство живых систем, описываемое изменением знака биологического эффекта при увеличении величины стрессора, называется гормезисом и объясняется наличием специфических компенсаторно-адаптационных механизмов [3].

Ключевую роль в адаптационных процессах большинства клеток млекопитающих играет фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), активность которого контролируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) [4]. Однако в эритроцитах данная система поддержания редокс-гомеостаза отсутствует, и защита клеток при стрессовых воздействиях осуществляется цитоплазматическими механизмами, включающими регуляцию функционального состояния белков и их взаимодействий с мембраной и цитоскелетом клетки [5]. Ранее нами было показано, что структурная стабильность мембран эритроцитов зависит от внеклеточной концентрации пероксида водорода: повышается при низких концентрациях и снижается при высоких [6]. Установлено, что соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина определяет гормезисную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода – регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких.

В данной работе предложен метод количественной оценки защитных свойств клеток и способности стрессовых факторов регулировать защитные свойства эритроцитов на основе анализа гормезисных зависимостей ответа эритроцитов на действие пероксида водорода. Изучено влияние предварительного инкубирования клеток с пероксидом водорода и в средах с различным рН на структурную стабильность при гемолизе. Показано, что диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток, различается для различных факторов, приводящих к разрушению. В качестве таких факторов использовались наночастицы серебра, нитрат серебра и хлорноватистая кислота. Численная оценка параметров изменения защитных свойств клеток при действии пероксида водорода проводилась на основе разработанной математической модели разрушения клеток при действии повреждающего фактора.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Повышение структурной стабильности мембран эритроцитов, индуцируемое пероксидом водорода, усиливает защитные свойства клеток и, следовательно, уменьшает количество разрушенных при гемолизе клеток. В предложенной модели гемолиза эритроцитов считается, что скорость разрушения клеток пропорциональна количеству клеток в суспензии (n) и концентрации повреждающего фактора в активном состоянии (c_a). Действие защитных систем клеток в модели учитывается изменением скорости перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Такой процесс, например, может быть обусловлен скоростью трансмембранного переноса или в случае наночастиц, скоростью высвобождения ими токсичных соединений. Повышение защитных свойств клеток, индуцированное окислителями в концентрации $c_{ок}$ приводит к уменьшению коэффициента активации k_a , что снижает вероятность перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Максимум обусловленного окислителем изменения защитных свойств клеток учитывается путём введения коэффициента защиты k_3 . Скорость достижения максимума определяется коэффициентом k_n , который численно равен концентрации окислителя, при которой эффект достигает половины от максимума. Скорость изменения количества клеток в суспензии регулируется двумя конкурирующими процессами (защиты и разрушения) и описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -k_p \cdot n \cdot c_a \\ \frac{dc_a}{dt} = \left(k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}\right) \cdot c_n \\ \frac{dc_n}{dt} = -\left(k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}\right) \cdot c_n \end{cases},$$

где k_p – коэффициент разрушения, k_a – коэффициент активации.

Построенная математическая модель является нелинейной, численное решение системы выполнялось в программе Wolfram Mathematica.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали нитрат серебра (AgNO_3) (ЛенРеактив, Россия), пероксид водорода (H_2O_2) (РУП Белмедпрепараты, Беларусь) и гипохлорит натрия (NaOCl) (Sigma-Aldrich).

Концентрацию раствора NaOCl определяли спектрофотометрически, как концентрацию OCl^- при pH 12,0, коэффициент молярной экстинкции (ϵ_{292}) равен $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Поскольку pK_a для HOCl $\sim 7,5$ при физиологических pH, половина соединения присутствует в протонированной форме HOCl и половина в депротонированной форме OCl^- . Таким образом, под термином HOCl понимается смесь HOCl/OCl^- . Рабочий раствор HOCl готовили непосредственно перед анализом путем растворения препарата в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 137 мМ NaCl .

Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Беларусь). Лейкоцитарный слой и плазму крови отделяли после двукратного центрифугирования при 1500 об/мин. Спектрофотометрические исследования эритроцитов проводили в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , 5 мМ D-глюкозы (pH 7,4). Количество эритроцитов оценивалось по спектрам поглощения с использованием спектрофлуориметра CM-2203 и спектрофотометра UV-VIS PB 2201 на длине волны 680 нм (Solar, Республика Беларусь).

Получение наночастиц проводили с применением методов “зелёной химии” [7]. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным яблочным экстрактом в соотношении 9:1 при pH 8,0 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика на длине волны 400 нм, обусловленного поверхностным плазмонным резонансом. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию ионов серебра, необходимую для их синтеза.

Гемолиз предварительно проинкубированных (10 минут) с пероксидом водорода эритроцитов проводили путём добавления наночастиц серебра, нитрата серебра и хлорноватистой кислоты. Через 50 минут (для наночастиц) и 20 минут (для нитрата серебра) после начала разрушения измеряли спектры поглощения суспензий. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Защитный эффект определяли по увеличению доли негемолизированных эритроцитов. Гемолиз хлорноватистой кислотой проводили при предварительном инкубировании клеток с пероксидом водорода и в буферах со значением pH в диапазоне от 5 до 7,4.

Результаты представлены как средние значения плюс–минус стандартное отклонение среднего для трёх–пяти независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность значений определяли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования показано, что при действии пероксида водорода в микромолярных концентрациях наблюдается повышение структурной стабильности мембран и снижение доли гемолизированных эритроцитов для всех исследуемых факторов, приводящих к разрушению. Зависимости доли негемолизированных клеток от концентрации пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра, нитратом серебра и хлорноватистой кислотой представлены на рисунке 1 (а-в). Максимум защитного эффекта при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, при разрушении нитратом серебра – 700 мкМ, при разрушении хлорноватистой кислотой – 150 мкМ.

На основе анализа экспериментально полученных гормональных зависимостей доли негемолизированных эритроцитов от концентрации пероксида водорода методом наименьших квадратов определены значения параметров модели и коэффициенты детерминированности, представленные в таблице 1.

Из представленных данных следует, что гемолиз эритроцитов нитратом серебра характеризуется более высокими значениями коэффициентов k_p и k_a и вызывает более быстрое разрушение клеток, чем наночастицы серебра. Наиболее быстро осуществляется гемолиз хлорноватистой кислотой, для которой определены самые высокие значения коэффициентов k_p и k_a . Различия в скорости разрушения клеток при действии разных факторов обуславливают различия в значениях коэффициента защиты, свидетельствуя о том, что уровень активации защитных систем при действии пероксида водорода зависит от времени. Максимум защитного эффекта для хлорноватистой кислоты, имеющей самое высокое значение коэффициента k_3 и самое низкое значение коэффициента k_n , наблюдается при самой низкой концентрации пероксида водорода из всех исследуемых факторов.

Количественной характеристикой защитного эффекта является отношение коэффициентов защиты и активации, т.е. величина, характеризующая снижение способности повреждающего фактора к переходу в токсическое (активное) состояние. Как видно из таблицы величина отношения стремится к единице, т.е. пероксид водорода способен активировать адаптационные механизмы эритроцитов максимально эффективно для заданных условий. Схожесть коэффициентов k_n для наночастиц и нитрата серебра свидетельствует о сходном механизме защиты при адаптации клеток.

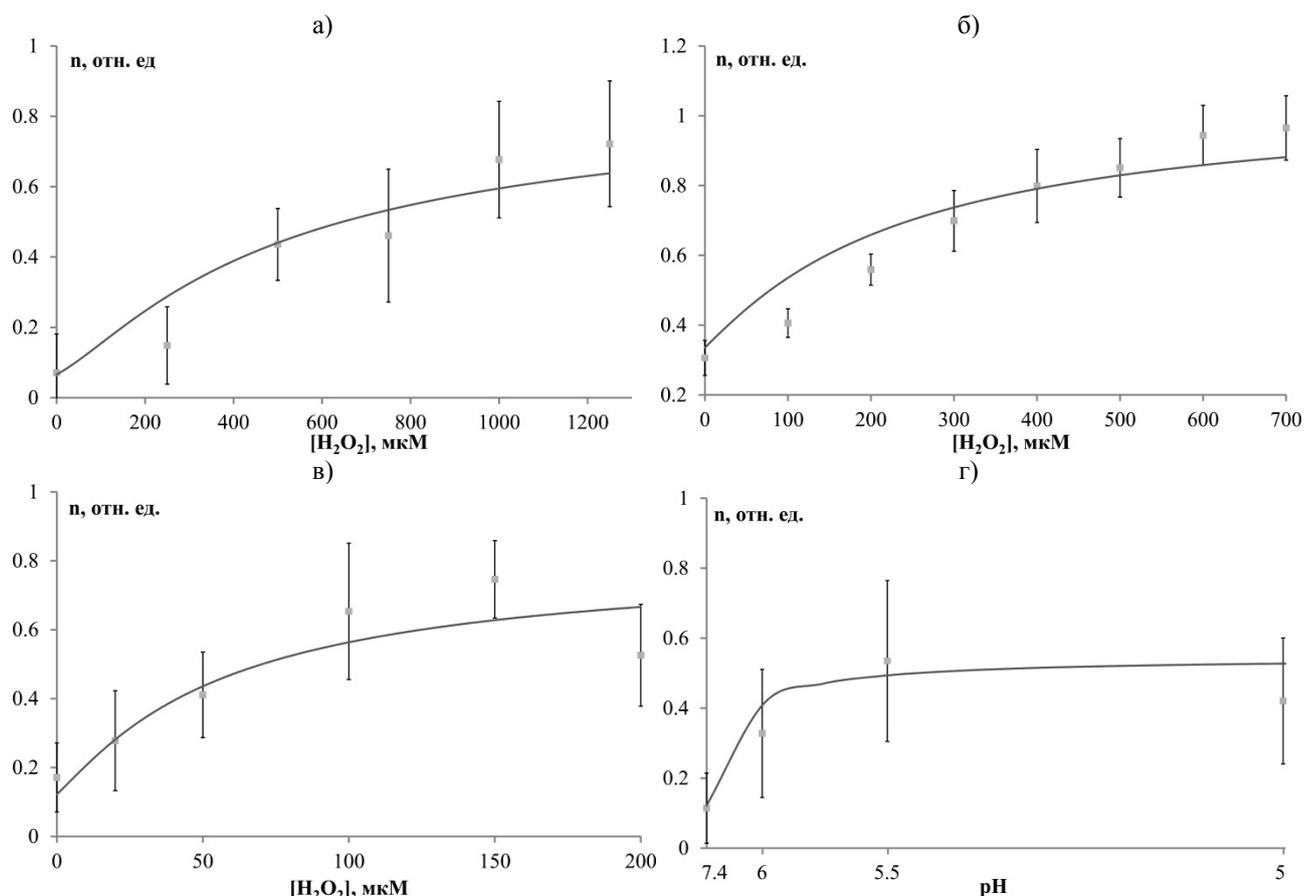


Рисунок 1. Зависимости доли негемолизированных клеток от концентрации пероксида водорода (а – при гемолизе наночастицами серебра, б – при гемолизе нитратом серебра, в – при гемолизе хлорноватистой кислотой), и от величины pH буфера (г – при гемолизе хлорноватистой кислотой). Кривая – расчёт, точки – экспериментальный данные

Таблица 1. Значения коэффициентов для различных разрушителей клеток

Разрушитель	$k_p, \text{нМ}^{-1}\text{с}^{-1}$	$k_a, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$	k_2 / k_a	$k_n, \text{мкМ}$	R^2
Наночастицы серебра	0,802	0,166	0,164	0,99	45,4	0,98
Нитрат серебра	1,001	0,231	0,224	0,97	55,2	0,99
Гипохлорит натрия	4,12	0,515	0,494	0,96	13,4	0,98
Гипохлорит натрия (адаптация к изменению pH)	4,27	0,491	0,406	0,83	0,119	0,98

Обнаружено, что предварительное инкубирование клеток в среде с низким значением pH также приводит к повышению структурной стабильности мембран эритроцитов и уменьшает число гемолизированных клеток. На рисунке 1г представлены экспериментальная и рассчитанная в модели зависимости доли негемолизированных эритроцитов при предварительном инкубировании в растворах с pH от 7,4 до 5. Максимальное увеличение структурной стабильности, что соответствовало росту доли неразрушенных эритроцитов на 40 %, наблюдалось при pH 5,5. Активация адаптационных механизмов, в этом случае, может быть обусловлена ростом внутриклеточной концентрации окислителей. Показано, что снижение внеклеточного pH вызывает в эритроцитах уменьшение внутриклеточного pH и усиление окислительного стресса [8]. В случае регуляции адаптационных механизмов кислотным стрессом в сравнении с действием пероксида водорода наблюдается снижение отношения коэффициента защиты к коэффициенту активации, что позволяет предположить, что при снижении pH образуется недостаточно АФК для полной активации защитных систем.

Таким образом, пероксид водорода является эффективным фактором, активирующим адаптацию эритроцитов и вызывающим усиление их резистентности. Предложенный метод анализа защитных свойств клеток позволяет сравнивать адаптационные свойства эритроцитов и определять оптимальные условия для их регуляции внешними факторами.

Список литературы / References:

1. Мартинович Г.Г. *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы*. Минск: БГУ, 2021, 239 с. [Martinovich G.G. *Reactive oxygen species in the regulation of cell functions and properties: phenomena and mechanisms*. Minsk: BSU, 2021, 239 p. (In Russ.)]
2. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 1-21, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
3. Merry T.L., Ristow M. Mitohormesis in exercise training. *Free radical biology and medicine*, 2015, vol. 11, pp. 955-964, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.032.
4. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Кандалинцева Н.В., Мартинович Г.Г., Меньщикова Е.Б. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия*, 2017, т. 82, № 5, с. 749. [Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G., Menshchikova E.B. Mazes of Nrf2 Regulation. *Biochemistry*, 2017, vol. 82, no. 5, pp. 556-564, doi: 10.1134/S0006297917050030. (In Russ.)]
5. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, т. 55, № 2, с. 107-123. [Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Blindar V.N., Topunov A.F. Binding of Erythrocyte Hemoglobin to the Membrane to Realize Signal-Regulatory Function. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, vol. 55, pp. 83-98, doi: 10.1134/S0003683819020091. (In Russ.)]
6. Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода: математическая модель и эксперимент. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 28-43. [Voianrouski V.V., Martinovich G.G., Regulation of the Structural Stability of Erythrocytes by Hydrogen Peroxide: Mathematical Model and Experiment. *Biochemistry Supplement Series A*, 2022, vol. 16, pp. 91-105, doi: 10.1134/S1990747822010093. (In Russ.)]
7. He D., Jones A.M., Garg S., Pham A.N., Waite T.D., Silver nanoparticle–reactive oxygen species interactions: application of a charging–discharging model. *Journal of Physical Chemistry*, 2011, vol. 115, pp. 5461-5468, doi: 10.1021/jp111275a. (In Russ.)]
8. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Голубева Е.Н., Черенкевич С.Н., Роль ионов водорода в регуляции редокс-состояния эритроцитов. *Биофизика*, 2009, т. 54, № 5, с. 846-851. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Golubeva E.N., Cherenkevich S.N., Role of hydrogen ions in the regulation of the redox state of erythrocytes. *Biofizika*, 2009, vol. 54, pp. 846-851. (In Russ.)]

PROTECTIVE PROPERTIES OF ERYTHROCYTES DURING HEMOLYSIS AND THEIR REGULATION BY OXIDANTS**Voynarovski V.V., Martinovich G.G.**

Belarusian State University

Nezavisimosti Ave. 4, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Received 24.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbp.2022.0536

Abstract. Hydrogen peroxide, which is formed during cellular respiration and the action of physicochemical factors, is an important participant in intracellular regulatory processes. A moderate increase in the concentration of hydrogen peroxide activates the mechanisms associated with protection and adaptation, and at a high level of the oxidant, damage to cellular structures is observed. The work shows that under the action of hydrogen peroxide in micromolar concentrations, an increase in the structural stability of membranes and a decrease in the proportion of hemolyzed erythrocytes are observed upon destruction by hypochlorous acid, silver nanoparticles, and silver nitrate. A method for quantitative assessment of the regulation of the erythrocyte protective properties by hydrogen peroxide during hemolysis by various factors is proposed. It has been shown that the range of hydrogen peroxide concentrations at which an increase in the proportion of non-hemolyzed cells (the region of hormesis) is observed differs for various factors leading to destruction. Based on the developed mathematical model of cell destruction under the action of a damaging factor and hormesis dependences of the erythrocyte response to the action of hydrogen peroxide, the parameters characterizing the regulation of cellular adaptation processes were calculated. The proposed method for analyzing the protective properties of cells makes it possible to compare the adaptive properties of erythrocytes and determine the optimal conditions for their regulation by external factors.

Key words: *erythrocytes, adaptation, resistance, hemolysis.*

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ НА АКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА NMDA**Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.**

Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жолио Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: kgyr@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0537

Аннотация. В настоящей работе предложен модельный подход для анализа свойств нейронных сетей гиппокампа с различными типами NMDA-рецепторов: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2B. Было проведено молекулярно-динамическое моделирование активации ионного канала рецепторов NMDA, модифицированного действием аллостерических модуляторов. Изучение сетевой активности нейронов с измененной структурой NMDA-рецепторов проводилось в моделях нейронных сетей CA1 и CA3 областей гиппокампа. В результате исследования свойств нейронной сети гиппокампа с модифицированной структурой NMDA-рецепторов получены электрофизиологические характеристики модели нейронной сети в зависимости от строения ионного канала рецептора NMDA. Исходя из анализа изменения проводимостей ионного канала и связывания ионов магния были выявлены различия в амплитуде тета- и гамма-частотных диапазонов в нейронных сетях с различными модельными структурами NMDA-рецепторов. Анализ сетевой активности нейронов с различными типами NMDA выявил незначительные изменения проводимости ионного канала и локального потенциала в зависимости от субъединиц, входящих в состав рецептора и типа модулятора. При воздействии Ro 25-6981 и кетамина для дигетеромерной модели GluN1/GluN2A NMDA-рецептора наблюдалось падение амплитуды тета-частотных и рост гамма-частотных диапазонов по сравнению с нативными формами рецептора. Для тригетеромера GluN1/GluN2A/GluN2B имеет место возрастание тета-частоты и снижение частоты гамма-диапазона по сравнению с GluN1/GluN2B. В отсутствие кетамина для моделей GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA-рецептора наблюдалось возрастание амплитуды тета-частотных и гамма-частотных диапазонов по сравнению с нативными формами NMDA-рецептора.

Ключевые слова: гиппокамп, рецептор NMDA, болезнь Альцгеймера, молекулярная динамика, нейронная сеть.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых узлов в ЦНС являются синаптические рецепторы, обеспечивающие связи между нервными клетками (нейронами). Рецепторы NMDA привлекают к себе большое внимание в последние несколько десятилетий благодаря их роли во многих типах нервной пластичности, а также их участия в эксайтотоксичности [1]. Глутаматные рецепторы NMDA (N-метил-D-аспартат) играют важную роль в нормальном функционировании мозга и таких процессах как обучение, память, моторные и сенсорные функции. Дисфункция рецептора наблюдается при различных патологиях, включая инсульт, эпилепсию, болезнь Паркинсона, Болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Хантингтона и шизофрению.

Ионотропные рецепторы глутамата, ответственные за быструю нейронную коммуникацию в возбуждающих синапсах, включают три подсемейства: рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты (AMPA), каинатные рецепторы и NMDA. Рецепторы NMDA являются подклассом глутаматных рецепторов, для активации которых требуется как связывание глутамата, так и постсинаптическая деполяризация, которая опосредует проникновение Ca^{2+} при их активации (рис. 1а).

NMDA-рецепторы имеют решающее значение для развития центральной нервной системы (ЦНС), генерации ритмов дыхания, передвижения, а также процессов, лежащих в основе обучения, памяти и нейропластичности. Аномальные уровни экспрессии и измененная функция рецепторов NMDA вовлечены в многочисленные неврологические расстройства и патологические состояния, включая депрессию, шизофрению, болезнь Альцгеймера и аутоиммунный анти-NMDA-рецепторный энцефалит [2,3]. Гипофункция NMDA может привести к когнитивным дефектам, тогда как чрезмерная стимуляция вызывает эксайтотоксичность и последующую нейродегенерацию [4].

Структурными составляющими NMDA являются субъединицы NR1, NR2A, NR2B и т.д. Субъединицы NR1 считаются базовыми. Переключение NR2B на NR2A происходит в основном во время эмбрионального развития человека. Профили экспрессии генов GRIN2A и GRIN2B, кодирующих синтез NR2A и NR2B субъединиц в мозжечке человека, показывают, что уровень экспрессии GRIN2B снижается в период пренатального и раннего детства, в то время как уровень экспрессии GRIN2A повышается в течение этого периода [5]. Другими словами, с возрастом экспрессия GRIN2A будет преобладать, и изучение свойств NMDA-рецептора с различными субъединицами может играть важную роль в понимании возрастных изменений в ЦНС.

Рецепторы NMDA усеяны регуляторными сайтами, связывающими низкомолекулярные лиганды, которые действуют как положительные или отрицательные аллостерические модуляторы и допускают субъединично-специфическую модуляцию (рис. 1). Различные модуляторы, мутации и разнообразие состава субъединиц могут

привести к изменению функциональных свойств NMDA-рецепторов с точки зрения агонистической активности, проницаемости ионов кальция, гейтинга, кинетики и максимальной вероятности открытия канала [6].

В связи с тем, что дисфункция NMDA-рецепторов приводит к развитию патологических процессов, лежащих в основе неврологических и когнитивных заболеваний, в настоящее время разрабатываются препараты для фармакологической регуляции функции рецептора NMDA. Известно, что действие таких анестетиков, как фенциклидин и кетамин, связано с подавлением активности рецепторов NMDA путем блокирования рецепторного канала. Сильнодействующий селективный ингибитор рецепторов NMDA, содержащих субъединицу NR2B, антидепрессант Ro 25-6981, представляет собой модулятор сайта связывания N-концевого домена [7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью настоящей работы является изучение влияния аллостерических модуляторов на активацию рецепторов NMDA с различным составом субъединиц и сетевую активность нейронов гиппокампа. Разработанный вычислительный подход позволяет произвести анализ различных структур рецепторов NMDA, оценить их электрофизиологические свойства на примере моделей нейронных сетей гиппокампа [8-10] и воспроизвести паттерны электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование активации ионного канала различных типов рецепторов NMDA (дигетеромеры GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2B, тригетеромер GluN1/GluN2A/GluN2B), структура которых была изменена в соответствии с действием аллостерического модулятора Ro 25-6981. Исходя из анализа проводимости ионных каналов и распределения ионов магния в каналах рецепторов NMDA, было изучено поведение нейронной сети с каждым типом NMDA, произведен расчёт локального потенциала и определены значения коллективных колебаний (ритмов) нейронной сети гиппокампа. Изучение сетевой активности нейронов с различными типами рецепторов NMDA проводилось в моделях нейронных сетей CA1 и CA3 [8-10] областей гиппокампа. Для изучения поведения нейронной сети применялся пакет NEURON [11]. Наибольший интерес представляет исследование θ - и γ -ритмов мозга, т.к. они оказывают определяющее влияние на формирование памяти. Гиппокамп вносит наибольший вклад в их генерацию.

Снижение тета-ритма (4-8 Гц) и увеличение гамма-ритма (30-100 Гц) вызывают близкие к шизофрении психотические симптомы у мышей [12]. Аналогичные изменения наблюдаются и у людей. Нами проведены исследования поведения этих ритмов при замене субъединиц в составе рецептора NR2B \rightarrow NR2A, которая преобладает с возрастом, а также рассмотрена промежуточная форма рецептора (NR1A/NR2A/NR2B). Функциональные свойства рецептора оценивались по нескольким параметрам, которые затем были интегрированы в модели нейронных сетей CA1 и CA3 областей гиппокампа. При этом код модели был модифицирован для изменения свойств рецепторов NMDA. А именно, ионный ток через единственный рецептор NMDA был взят в виде:

$$I_{\text{NMDA}} = \frac{G P (V_{\text{pre}})(V - V_e)}{1 + c[\text{Mg}^{2+}] \exp[-qV]}, \quad (1)$$

где G – максимальная проводимость для определенного типа иона, в нашем случае токи иона Na^+ , P – вероятность открытия канала в зависимости от пресинаптического потенциала V_{pre} и макроскопическая кинетика состояний рецептора, V – постсинаптический мембранный потенциал с равновесным напряжением V_e , c и q – феноменологические константы. Последние два параметра отражают связывание магния и электрохимические свойства, соответственно. Эти параметры обычно получают из экспериментальных данных.

Чтобы оценить разницу между проводимостью открытого ионного канала рецептора для каждой из смоделированных форм белка, мы применили следующую процедуру. Если предположить, что радиус канала зависит от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, которая перпендикулярна мембране, проводимость G канала можно оценить по следующей формуле:

$$\frac{1}{G} = \int_0^L \frac{dz}{\pi \sigma r^2(z)}, \quad (2)$$

где σ – ионная проводимость цитозоля; L и r – длина ионного канала и эффективный радиус поры соответственно.

Структура NR1/NR2B рецептора была выбрана в качестве нативной, а модели NR1/NR2A и NR1/NR2A/NR2B были модифицированы с учетом субъединичного состава рецептора. Таким образом, соотношение проводимости нативной и модифицированных форм оценивали по следующей формуле:

$$\frac{G_{\text{mod}}}{G_{\text{nat}}} = \int_0^L \frac{dz}{r_{\text{nat}}^2} / \int_0^L \frac{dz}{r_{\text{mod}}^2}. \quad (3)$$

Зависимости $r(z)$ в (2) и (3) были восстановлены с использованием расчетов при помощи программы HOLE [13] для нативной формы рецепторов (NR1A/NR2B) и каждой из смоделированных форм (NR1A/NR2A, NR1A/NR2A/NR2B).

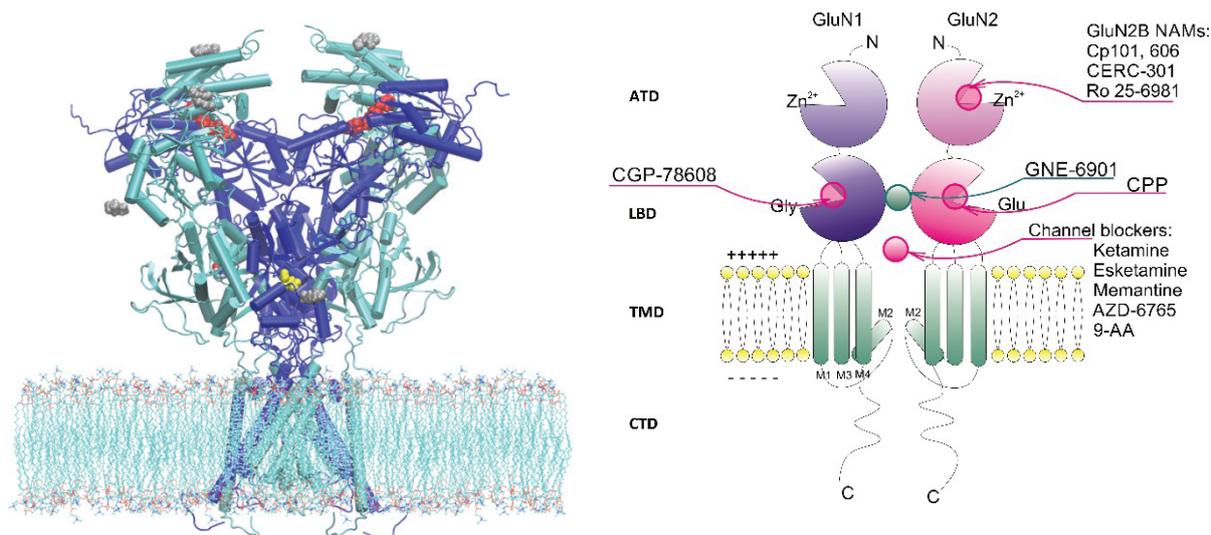


Рисунок 1. Модель рецептора NMDA, встроенная в фосфолипидную мембрану. Справа указаны функциональные домены рецептора NMDA (амино-концевой домен (ATD) и лиганд-связывающий домен (LBD), находящиеся во внеклеточном пространстве, трансмембранный домен (TMD) и внутриклеточно расположенный С-концевой домен (CTD)) и сайты связывания химических веществ с рецепторным комплексом NMDA. Домен TMD содержит три трансмембранных сегмента (M1, M3 и M4) и реентерабельную петлю (M2)

В ходе моделирования проводился анализ радиуса ионного канала [14]. Благодаря расчетам удалось визуализировать зависимость радиуса канала r от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, перпендикулярной мембране. Используемая зависимость была использована при расчете отношения проводимостей для различных форм рецептора. Расчеты показывают, что проводимость ионных каналов NR1/NR2A-форм глутаматных рецепторов и тригетеромера NR1A/NR2A/NR2B выше по сравнению с NR1/NR2B формой NMDA-рецепторов (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

Влияние различных аллостерических модуляторов на динамику нейросетей гиппокампа оценивалось по спектрам мощности, отражающим выраженность того или иного частотного диапазона генерируемых осцилляций. Рассмотрены два частотных диапазона: тета (4-8 Гц) и гамма (30-60 Гц).

В ходе исследования были выявлены различия в амплитуде тета- и гамма-частотных диапазонов в нейронных сетях с различными модельными структурами NMDA-рецепторов. При воздействии Ro 25-6981 и кетамина для дигетеромерной модели GluN1/GluN2A NMDA-рецептора в нейросети области CA3 гиппокампа (модель из [8]) наблюдалось падение амплитуды тета-частотного и рост амплитуды гамма-частотного диапазонов по сравнению с GluN1/GluN2B формой рецептора. Для три-гетеромера GluN1/GluN2A/GluN2B имеет место возрастание амплитуды тета-частоты и снижение амплитуды гамма-диапазона по сравнению с GluN1/GluN2B (рис. 2а). В отсутствие кетамина для моделей GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA-рецептора наблюдалось возрастание амплитуды тета-частотных и гамма-частотных диапазонов по сравнению с GluN1/GluN2B формой NMDA-рецептора (рис. 2б). При этом наблюдается снижение амплитуды бета-диапазона, свойственного для данных структур. Изучение влияния Ro 25-6981 на свойства NMDA-рецепторов в области CA1 гиппокампа (модели из [9] и [10]) не выявило значимых изменений в динамике нейронной популяции для каждой из форм рецептора.

Таблица 1. Значения параметров связывания ионов магния в каналах рецепторов NMDA: G – максимальная проводимость для определенного типа иона, N_m – количество ионов Mg^{2+} , которые достигают сайта связывания в TMD, N_b – количество связанных ионов Mg^{2+} , B_b – фактическое количество связей Mg^{2+} с одним из четырех аминокислотных остатков N616, u – длина связи

Тип NMDA	G/G_{base}	N_m/N_b	B_b	$u, \text{Å}$
NR1-NR2B	1,00	1	2	1,84
NR1-NR2A	1,83	1	1	1,98
NR1-NR2A-NR2B	2,57	1	3	1,96

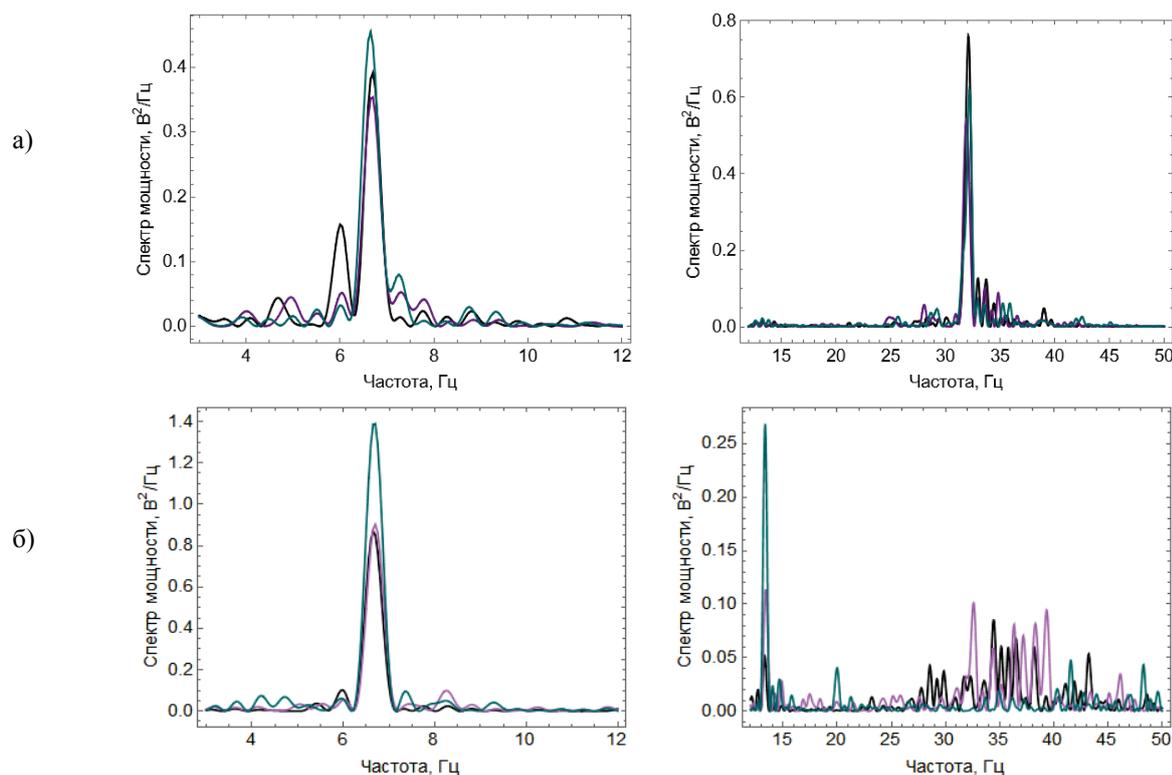


Рисунок 2. Частотный спектр осцилляций θ и γ -ритмов для NR1A/NR2A (фиолетовый), NR1A/NR2A/NR2B (зеленый) и NR1A/NR2B (черный): а) при воздействии модулятора Ro 25-6981 и кетамина; б) при воздействии только модулятора Ro 25-6981

Рассмотренный в работе подход позволяет количественно связать биофизические характеристики синаптических рецепторов с макроскопическими величинами, отражающими активность нейронных сетей. Благодаря этому методу можно оценить эффекты субклеточных изменений в нейронах на функционирование различных областей мозга. Проведенные ранее исследования [15] показали влияние мутационных изменений в структуре рецептора на процесс активации ионного канала NMDA. Полученные характеристики структур с мутациями имеют согласие с экспериментальными показателями.

Список литературы / References:

1. Vyklicky V., Korinek M., Smejkalova T., Balik A., Krausova B., Kaniakova M., Lichnerova K., Cerny J., Krusek J., Dittert I., Horak M., Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.*, 2014, vol. 63, suppl. 1, pp. S191-203, doi: 10.33549/physiolres.932678.
2. Wang C.C. et al. A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. *Neuron*, 2011, vol. 72, pp. 789-805, doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.023.
3. Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front. Neurosci.*, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.00473.
4. Blanke M.L., VanDongen A.M.J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press, 2009, chapter 13.
5. Myers J.S., Yuan H., Kang J.-Q., Tan F.Ch.K. Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions. *F1000Res.*, 2019, vol. 8, doi: 10.12688/f1000research.18949.1.
6. Wang H. et al. Gating mechanism and a modulatory niche of human GluN1-GluN2A NMDA receptors. *Neuron*, 2021, vol. 109, pp. 2443-2456, doi: 10.1016/j.neuron.2021.05.031.
7. Monaghan D.T. et al. Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators. *Neurochem. Int.*, 2012, vol. 61, no. 4, pp. 581-592, doi: 10.1016/j.neuint.2012.01.004.
8. Neymotin S.A. et al. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, pp. 11733-11743, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0501-11.2011.
9. Saudargiene A., Cobb S., Graham B.P. A computational study on plasticity during theta cycles at Schaffer collateral synapses on CA1 pyramidal cells in the hippocampus. *Hippocampus*, 2015, vol. 25, no. 2, pp. 208-218, doi: 10.1002/hipo.22365.
10. Cutsuridis V., Cobb S., Graham B.P. Encoding and Retrieval in a Model of the Hippocampal CA1 Microcircuit. *Hippocampus*, 2010, vol. 20, pp. 423-446, doi: 10.1002/hipo.20661.
11. Hines M.L., Carnevale N.T. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.*, 1997, vol. 9, pp. 1179-1209, doi: 10.1162/neco.1997.9.6.1179.
12. Hong L.E. et al. Gamma and delta neural oscillations and association with clinical symptoms under subanesthetic ketamine. *Neuropsychopharmacology*, 2010, vol. 35, pp. 632-640.

13. Smart O.S., Neduvelil J.G., Wang X., Wallace B.A., Sansom M.S. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 354-360, doi: 10.1016/S0263-7855(97)00009-X.

14. Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б. Моделирование основных ритмов гиппокампа с различными типами рецепторов NMDA. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 55-56. [Aksenova S.V., Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Modeling of the main rhythms of the hippocampus with different types of NMDA receptors. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 55-56. (In Russ.)]

15. Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Effect of mutant NMDA receptors on oscillations in a model of Hippocampus. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019, vol. 17, no. 01, doi: 10.1142/S0219720019400031.

EFFECTS OF MODULATORS TO THE ACTIVATION OF NMDA RECEPTORS

Aksenova S.V., Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot Curie str., 6, Dubna, 141980, Russia; e-mail: kgyr@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0537

Abstract. In this paper, we have proposed a model approach for analyzing the properties of hippocampal neural networks with different types of NMDA receptors: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2B. Molecular dynamics modeling of the activation of the ion channel of NMDA receptors modified by the action of allosteric modulators was carried out. The study of the network activity of neurons with a modified structure of NMDA receptors was carried out in models of neural networks in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus. As a result of studying the properties of the neural network of the hippocampus with a modified structure of NMDA receptors, the electrophysiological characteristics of the neural network model were obtained depending on the structure of the ion channel of the NMDA receptor. Based on the analysis of changes in the conductivities of the ion channel and the binding of magnesium ions, differences in the amplitude of the theta and gamma frequency ranges in neural networks with different model structures of NMDA receptors were revealed. Analysis of the network activity of neurons with different types of NMDA revealed minor changes in the ion channel conductance and local potential depending on the subunits that make up the receptor and the type of modulator. Under the influence of Ro 25-6981 and ketamine for the diheteromeric model of the GluN1/GluN2A NMDA receptor, a decrease in the amplitude of the theta-frequency ranges and an increase in the gamma-frequency ranges were observed in comparison with the native forms of the receptor. For the GluN1/GluN2A/GluN2B trigger heteromer, there is an increase in theta frequency and a decrease in the gamma frequency compared to GluN1/GluN2B. In the absence of ketamine, for the GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptor models, an increase in the amplitude of theta-frequency and gamma-frequency ranges was observed compared to the native forms of the NMDA receptor.

Key words: hippocampus, NMDA receptor, Alzheimer's disease, molecular dynamics, neural network.

СЕНСОРНЫЙ КОМПОЗИТ НАНОВОЛОКНА γ - Al_2O_3 / НАНОАЛМАЗЫ / Cu^{2+} С УВЕЛИЧЕННОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФЕНОЛОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Ронжин Н.О.¹, Посохина Е.Д.¹, Михлина Е.В.², Рыжков И.И.^{2,3}, Бондарь В.С.¹

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: roniol@mail.ru

² Институт вычислительного моделирования ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/44, г. Красноярск, 660036, РФ

³ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0538

Аннотация. С помощью химической модификации ионами меди нового композитного материала на основе нановолокон оксида алюминия и наноалмазов в работе получен функционализированный композит нановолокна γ - Al_2O_3 / наноалмазы / Cu^{2+} с улучшенными сенсорными свойствами для детекции фенолов в водной среде. Химическая модификация композита позволила более чем в два раза увеличить его каталитическую активность в реакции соокисления фенолов с 4-аминоантипирином в присутствии H_2O_2 . Полученный эффект позволил вдвое снизить порог минимально выявляемой концентрации аналитов при их тестировании с помощью функционализированного композита, что было продемонстрировано на примере детекции фенола и 4-хлорфенола. В работе показано, что полученный композит обеспечивает линейный отклик в широком диапазоне концентраций фенола (0,25–100 мкМ) и 4-хлорфенола (0,5–25 мкМ). Установлено, что адсорбированные на композит ионы Cu^{2+} прочно связаны с его поверхностью, не десорбируются и не инактивируются реагентами реакции соокисления при многократном использовании композита. В модельных экспериментах показана применимость функционализированного композита в качестве многоразового сенсора в ходе последовательного многократного тестирования фенола в водных образцах. В работе также проведены сравнительные исследования кинетики и изотермы адсорбции ионов Cu^{2+} на композитный материал и матрицу из оксида алюминия, оценена их сорбционная емкость.

Ключевые слова: наноалмазы, нановолокна оксида алюминия, композит, катализатор, ионы меди, детекция фенолов.

Определение и мониторинг уровня концентрации вредных и токсичных веществ в водной среде являются крайне востребованными и глобальными задачами в современном мире. При этом возрастает спрос на разработку простых в использовании и эффективных аналитических систем, позволяющих проводить оценку состояния водной среды *in situ*. В данной работе получен функционализированный композит нановолокна γ - Al_2O_3 / наноалмазы / Cu^{2+} с увеличенной каталитической активностью, изучены кинетика и изотерма адсорбции ионов меди на композитный материал, исследованы сенсорные характеристики полученного композита на примере тестирования фенола и 4-хлорфенола в водной среде.

Для получения композитного материала использовали наноалмазы детонационного синтеза со средним размером кластеров 70 нм и высокой коллоидной устойчивостью в водных суспензиях [1]. В качестве матрицы для фиксации наноалмазов использовали нановолокна γ - Al_2O_3 марки NafenTM (ANF Technology, Эстония) с диаметром волокон 10–15 нм [2]. Композиционный материал получали по изложенной ранее схеме [3]. Образцы композита и матрицы из нановолокон γ - Al_2O_3 функционализировали с помощью адсорбции на их поверхность ионов Cu^{2+} , инкубируя образцы в водном растворе CuSO_4 разной концентрации при 22 °С после чего трижды отмывая раствором 120 мМ NaCl. Оценка каталитической активности функционализированных и исходных образцов проводили с помощью реакции соокисления фенолов с 4-аминоантипирином в присутствии H_2O_2 , сопровождающейся образованием цветного продукта [4].

Исследования показали, что наибольшая адсорбция ионов Cu^{2+} на композит нановолокна γ - Al_2O_3 / наноалмазы наблюдается в деионизированной воде при pH 7. Смещение pH в кислую область сопровождается снижением адсорбции ионов – при pH 4 количество адсорбированных ионов в два раза ниже, чем при pH 7. При этом сдвиг pH в щелочную область приводит к кластеризации ионов с образованием нерастворимых хлопьевидных осадков $\text{Cu}(\text{OH})_2$, что препятствует адсорбции ионов на композит.

Кинетика адсорбции ионов Cu^{2+} на композит и контрольную матрицу из нановолокон γ - Al_2O_3 показала (рис. 1а), что в обоих случаях в течение первых 20 минут количество адсорбируемых ионов быстро возрастает, после чего этот процесс замедляется и к 45 минутам достигается адсорбционное равновесие. Анализ результатов показал, что экспериментальные кинетические кривые адсорбции наилучшим образом соответствуют кинетической модели псевдо-первого порядка, на что указывает большее значение коэффициента детерминации (табл. 1). Экспериментальные данные изотерм адсорбции показали высокое соответствие с моделью изотермы Ленгмюра (табл. 1). Это позволяет заключить, что при использованных экспериментальных условиях ионы Cu^{2+}

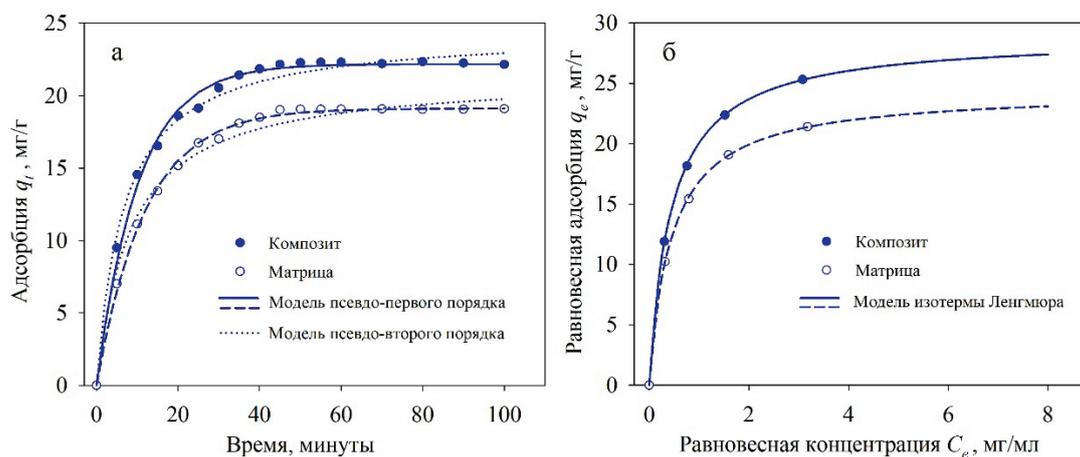


Рисунок 1. Кинетические кривые (а) и изотермы (б) адсорбции ионов Cu^{2+} на композит и матрицу

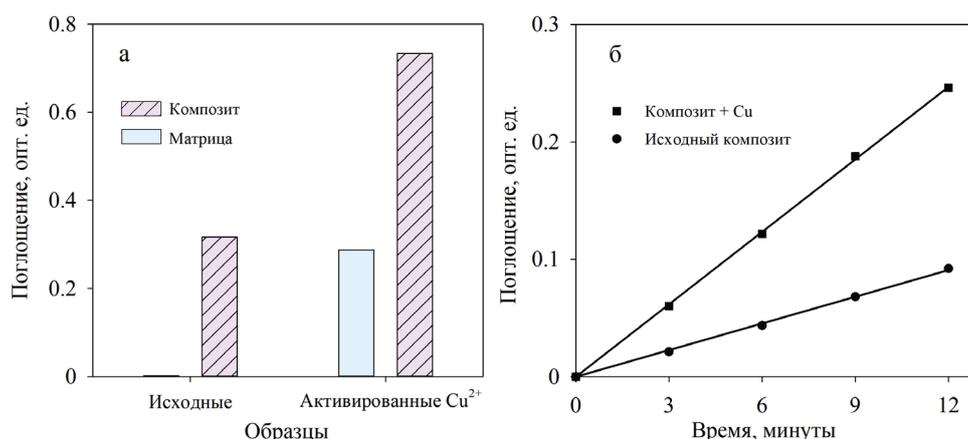


Рисунок 2. Выход (а) и кинетика образования (б) продукта реакции, отображающие уровень каталитической активности образцов матрицы и композита до и после их функционализации ионами Cu^{2+}

адсорбируются на гетерогенную поверхность композита в виде монослоя, взаимодействуя с ее функциональными группами (сайтами связывания). Также из представленных данных на рисунке 1б следует, что удельная величина адсорбированных на композит ионов Cu^{2+} на 15% выше, по сравнению с удельной величиной адсорбированных ионов на контрольную матрицу из нановолокон оксида алюминия. Это позволяет сделать вывод, что инкорпорированные в матрицу наноалмазы, обладающие большей площадью поверхности и наличием химически активных сайтов для связывания ионов, обеспечивают композитному материалу большую сорбционную емкость к ионам Cu^{2+} , по сравнению с чистой матрицей из нановолокон $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Оценка каталитической активности показала (рис. 2а), что функционализация ионами меди увеличивает каталитическую эффективность композита более чем в два раза и обеспечивает каталитическую активность матрице из нановолокон оксида алюминия, которая изначально не обладает каталитической функцией. При этом каталитическая эффективность функционализированной ионами меди матрицы составляет около 90%, по сравнению с каталитической эффективностью исходного (не функционализированного) композита. Композит, функционализированный ионами Cu^{2+} , как и исходный композит, обеспечивает линейное образование продукта реакции в течение, как минимум, 12 минут (рис. 2б). Однако в отличие от исходного композита он функционирует в 2,7 раза эффективнее при проведении реакции, с концентрацией фенола в пробе 100 мкМ (рис. 2б).

Таблица 1. Параметры кинетики и изотермы адсорбции Cu^{2+} на матрицу и композит

Модель	Параметры	Матрица	Композит
Псевдо-первого порядка	k_1 (мин ⁻¹)	0,0835	0,0974
	q_e (мг г ⁻¹)	19,12	22,18
	R^2	0,998	0,994
Псевдо-второго порядка	k_2 (г мг ⁻¹ мин ⁻¹)	0,0056	0,0061
	q_e (мг г ⁻¹)	21,40	24,46
	R^2	0,984	0,988
Изотерма Ленгмюра	q_m (мг/г)	24,39	28,9
	K_L (л/мг)	2,23	2,17
	R^2	0,999	0,999

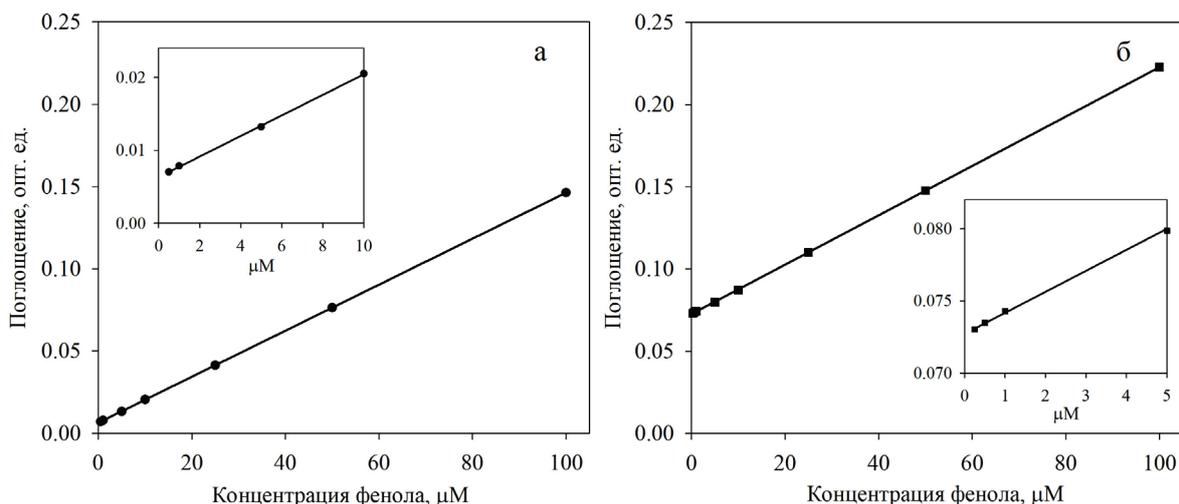


Рисунок 3. Зависимость образования продукта реакции от концентрации фенола при использовании исходного композита (а) и композита, функционализированного Cu²⁺ (б)

Показано, что композит нановолокна γ -Al₂O₃ / наноалмазы и композит нановолокна γ -Al₂O₃ / наноалмазы / Cu²⁺ обеспечивают линейный выход цветного продукта реакции соокисления в широком диапазоне концентраций фенола (рис. 3), а одинаковые значения тангенсов угла наклона полученных кривых ($\text{tg } \alpha = 0,0015$) свидетельствуют об одинаковой чувствительности обоих сенсоров к тестируемому аналиту. При этом для исходного композита детектируемая пороговая концентрация фенола составляет 0,5 мкМ (рис. 3а), в то время как композит, функционализированный ионами меди, за счет значительно большего образования продукта реакции позволяет детектировать в 2 раза меньшую концентрацию аналита – 0,25 мкМ (рис. 3б). Таким образом, представленные данные позволяют говорить о преимуществах применения композита нановолокна γ -Al₂O₃ / наноалмазы / Cu²⁺ в аналитике для выявления фенола в водных образцах.

Аналогичные результаты были получены при сравнительной оценке применимости исходного и функционализированного медью композита для определения 4-хлорфенола (рис. 4). Линейный аналитический диапазон для обоих сенсорных композитов достигается верхним пределом концентрации 4-хлорфенола 25 мкМ. При этом в диапазоне низких концентраций порог выявляемой концентрации для исходного композита составляет 1 мкМ, в то время как для композита, функционализированного медью, он в два раза ниже и составляет 0,5 мкМ.

В таблице 2 представлены аналитические характеристики композита нановолокна γ -Al₂O₃ / наноалмазы / Cu²⁺ в сравнении с рядом сенсоров, ранее разработанных другими авторами. Видно, что полученный в работе сенсорный композит обеспечивает самый широкий линейный диапазон (LR) выявления концентраций фенола и самый низкий предел обнаружения (LOD). Единственным исключением является кондуктометрический биосенсор, имеющий верхний предел обнаружения 3187 мкМ и нижний предел 10 мкМ, что значительно превышает показатели сконструированного нами сенсора. Для 4-хлорфенола сконструированный нами сенсор имеет достаточно широкий диапазон определяемых концентраций аналита и удовлетворительное значение LOD.

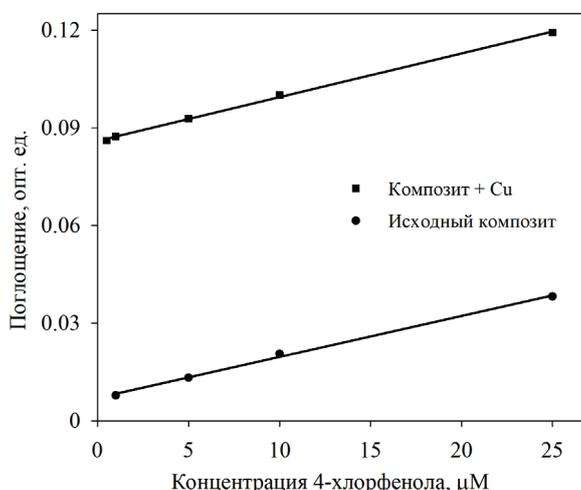


Рисунок 4. Зависимость образования продукта реакции от концентрации 4-хлорфенола при использовании исходного композита и композита, функционализированного Cu²⁺

Таблица 2. Сравнение аналитических характеристик сенсорного композита нановолокна $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ / наноалмазы / Cu^{2+} с другими сенсорами для обнаружения фенола и 4-хлорфенола

Сенсоры на основе различных нано(био)материалов	фенол		4-хлорфенол	
	LR (мкМ)	LOD (мкМ)	LR (мкМ)	LOD (мкМ)
нановолокна $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ / наноалмазы / Cu^{2+}	0,25 – 100	0,25	0,5 – 25	0,5
Сенсор на основе Fe_3O_4 NPs [5]	1 – 15	1,0	–	–
Сенсор на основе CuO NPs [6]	0,25 – 2,5	0,69	0,25 – 1	0,43
HRP/Au/GCE [7]	–	–	2,5 – 40	0,39
Композит тирозиназа/хитозан [8]	2,5 – 70	1,0	2,5 – 50	0,9
Кондуктометрический биосенсор на основе бактерий [9]	10 – 3187	2	–	–
Электрохимический сенсор PGEs/DTAB [10]	10 – 50	1,2	–	–

В модельных экспериментах продемонстрирована применимость функционализированного композита, в сравнении с исходным, в качестве многоразового сенсора для повторного тестирования фенола в водной среде. На рисунке 5 показано, что оба композита обеспечивают стабильный отклик в серии из четырех последовательных измерений проб воды с одинаковой концентрацией фенола. Стоит отметить, что после каждого измерения оба композита трижды промывались деионизированной водой для удаления остаточных компонентов и продукта реакции. Таким образом, регистрируемый стабильный отклик в случае функционализированного композита позволяет заключить, что адсорбированные ионы Cu^{2+} прочно связаны с композитом, не десорбируются и не инактивируются реагентами реакции соокисления при многократном использовании композита.

В результате, в работе с помощью химической модификации ионами меди сенсорного композита на основе нановолокон оксида алюминия и наноалмазов получен функционализированный композит нановолокна $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ / наноалмазы / Cu^{2+} с увеличенной каталитической активностью для детекции фенолов в водной среде. Функционализация композита ионами Cu^{2+} значительно повышает его каталитическую эффективность в реакции соокисления фенольных соединений с 4-аминоантипирином, что позволяет детектировать в два раза меньшие концентрации этих аналитов, по сравнению с исходным композитом. Адсорбированные на композит ионы Cu^{2+} прочно связываются с его поверхностью, не десорбируются и не инактивируются реагентами реакции соокисления при многократном использовании композита, что позволяет использовать полученный функционализированный композит в качестве многоразового сенсора.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0287-2021-0016).

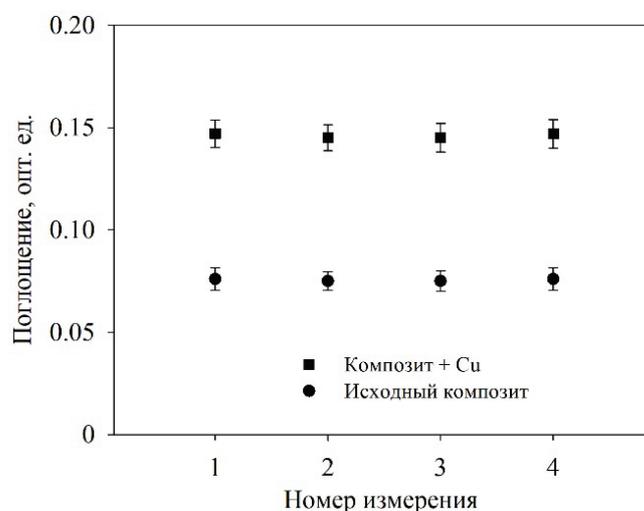


Рисунок 5. Образование продукта реакции при последовательном многократном использовании исходного и функционализированного композита в водных образцах с одинаковой концентрацией фенола (100 мкМ)

Список литературы / References:

1. Puzyr A.P., Bondar V.S. *Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability*. RU Patent № 2252192, 2005.
2. Kutuzov M. *Method and system for alumina nanofibers synthesis from molten aluminum*. US Patent №2013/0192517 A1, 2013.
3. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mikhlina E.V., Mikhlin Y.L., Simunin M.M., Tarasova L.S., Vorobyev S.A., Bondar V.S., Ryzhkov I.I. A new composite material based on alumina nanofibers and nanodiamonds: synthesis, characterization, and sensing application. *Journal of Nanoparticle Research*, 2021, vol. 23, doi: 10.1007/s11051-021-05309-y.
4. Eremin A.N., Semashko T.V., Mikhailova R.V. Cooxidation of phenol and 4-aminoantipyrin catalyzed by polymers and copolymers of horseradish root peroxidase and *Penicillium funiculosum* 46.1 glucose oxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42, doi: 10.1134/S0003683806040119.
5. Chandane P., Ladke J., Jori C., Deshmukh S., Zinjarde S., Chakankar M., Hocheng H., Jadhav U. Synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles from scrap iron and use of their peroxidase like activity for phenol detection. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2019, vol. 7, doi: 10.1016/j.jece.2019.103083.
6. Pino F., Mayorga-Martinez C.C., Merkoçi A. High-performance sensor based on copper oxide nanoparticles for dual detection of phenolic compounds and a pesticide. *Electrochemistry Communications*, 2016, vol. 71, doi: 10.1016/j.elecom.2016.08.001.
7. Qiu C., Chen T., Wang X., Li Y., Ma H. Application of horseradish peroxidase modified nanostructured Au thin films for the amperometric detection of 4-chlorophenol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, vol. 103, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.017.
8. Abdullah J., Ahmad M., Karupiah N., Heng L.Y., Sidek H. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, vol. 114, doi: 10.1016/j.snb.2005.06.019.
9. Kolahchia N., Braiekb M., Ebrahimipoura G., Ranaei-Siadatc S.O., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N. Direct detection of phenol using a new bacterial strain-based conductometric biosensor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2018, vol. 6, doi: 10.1016/j.jece.2017.12.023.
10. Congur G., Gul U.D. Phenol monitoring in water samples using an inexpensive electrochemical sensor based on pencil electrodes modified with DTAB surfactant. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, vol. 9, doi: 10.1016/j.jece.2021.105804.

SENSOR COMPOSITE γ -Al₂O₃ NANOFIBERS / NANODIAMONDS / Cu²⁺ WITH ENHANCED CATALYTIC ACTIVITY FOR DETECTION OF PHENOLS IN AQUEOUS MEDIUM**Ronzhin N.O.¹, Posokhina E.D.¹, Mikhlina E.V.², Ryzhkov I.I.^{2,3}, Bondar V.S.¹**¹ Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: roniol@mail.ru

² Institute of Computational Modeling FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/44, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³ Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0538

Abstract. A functionalized composite γ -Al₂O₃ nanofibers / nanodiamond / Cu²⁺ with improved sensor properties for the detection of phenols in an aqueous medium was obtained by chemical modification with copper ions of a new composite material based on alumina nanofibers and nanodiamonds. The chemical modification of the composite made it possible to increase its catalytic activity more than twice in the co-oxidation of phenols with 4-aminoantipyrine in the presence of H₂O₂. The obtained effect enabled to reduce the threshold of the minimum detectable concentration of analytes by half when they were tested using a functionalized composite. What was demonstrated by the example of the detection of phenol and 4-chlorophenol. It was shown that the obtained composite provides a linear response in a wide range of concentrations of phenol (0.25–100 μ M) and 4-chlorophenol (0.5–25 μ M). It is found that the adsorbed Cu²⁺ ions are firmly bound to composite surface, are not desorbed, and are not inactivated by co-oxidation reagents during repeated use of the composite. The applicability of a functionalized composite as a reusable sensor was shown in model experiments in the course of sequential multiple testing of phenol in aqueous samples. Comparative studies of the kinetics and isotherms of adsorption of Cu²⁺ ions on a composite material and an alumina matrix, and estimation their sorption capacity were also carried out in the work.

Key words: nanodiamonds, alumina nanofibers, composite, catalyst, copper ions, phenol detection.

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВ-ПОРИНОВ, КАРРАГИНАНОВ, ХИТОЗАНОВ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Набережных Г.А.¹, Сергеев А.А.², Новикова О.Д.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: naber1953@mail.ru

² Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН
ул. Радио, 5, г. Владивосток, 690041, РФ

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0539

Аннотация. Квантовые точки (КТ) представляют собой новое поколение флуорохромов, обладающих значительными преимуществами по сравнению с традиционными органическими красителями. КТ на основе CdS являются перспективными материалами для оптики, оптоэлектроники, биологии и медицины. В данной работе предложен новый эффективный метод получения биоконъюгатов на основе природных биополимеров. Меченные квантовыми точками CdS матрицы были синтезированы *in situ* в водном растворе с использованием OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) и полисахаридов, положительно (хитозан) и отрицательно (каррагинан, липополисахарид) заряженных. Максимум спектров эмиссии для всех полученных образцов составлял 450 нм, что свидетельствует об одинаковом размере КТ, который определяется размером «ячеек» сетчатой матрицы, ограничивающих их размер. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции КТ, синтезированных в растворе липополисахарида, была в два раза выше, чем у остальных образцов. Флуоресценция меченых биоматриц и максимумы спектров их эмиссии (450 нм) сохраняются при интенсивном диализе против буферов, что свидетельствует об устойчивости КТ и возможности практического использования полученных биоконъюгатов. Апробация биосенсора на основе порина показала, что взаимодействие с IgG, специфичными к YpOmpF, приводит к существенному изменению интенсивности люминесценции комплекса КТ-порин. Эти результаты открывают перспективу использования наноструктур на основе поринов, меченных КТ, в качестве биосенсоров для целей иммунодиагностики.

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

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наметился значительный прогресс в использовании различных наноматериалов для создания биосенсоров. Новый скачок в создании нанопор из природных биополимеров дали исследования биологических мембран. В настоящее время при создании такого рода нанопор внимание исследователей в значительной степени сосредоточено на порообразующих токсинах и белках наружной мембраны бактерий. Эти белки имеют прочную β -баррельную структуру, что делает их удобным объектом для нанотехнологии [1]. Белковые молекулы обладают уникальным свойством передачи материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта своеобразная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем.

Нанокристаллические полупроводниковые материалы, называемые квантовыми точками (КТ), обладают уникальными оптическими и спектроскопическими свойствами: широкое поглощение, узкое и перестраиваемое излучение, сильная люминесценция, устойчивость к фотообесцвечиванию. Квантово-размерные эффекты играют ключевую роль в оптоэлектронных свойствах квантовых точек. Изменяя их размер, можно регулировать длину волны излучения в видимом и ближнем инфракрасном спектре [2]. Ставшие в настоящее время классическими квантовые точки халькогенидов металлов по-прежнему остаются ключевым элементом при создании новых светоизлучающих устройств, солнечных элементов, фотокатализаторов и различного рода оптических сенсоров. Низкомолекулярные и белковые флуорофоры нашли применение в многочисленных биологических приложениях [3,4]. Наиболее часто используется синтез КТ в органических растворителях. Альтернативным способом создания квантовых точек, обеспечивающим достаточное количество реакционных центров на поверхности частицы и препятствующим агрегации частиц, является использование пористых биополимерных матриц. При синтезе неорганических частиц используют различные источники природных материалов, таких как бактерии, белки, полисахариды и аминокислоты [5,6].

Ранее нами [7] были апробированы подходы для формирования новых люминесцентных биоконплексов, состоящих из упорядоченных надмолекулярных структур поринов иерсиний, меченных КТ. Были разработаны два способа получения меченых биоконъюгатов: (1) конъюгирование пориновой матрицы с предварительно полученными стабилизированными КТ и (2) синтез КТ на предварительно сформированной на слое пориновой матрице в поддерживающем липидном бислое (support lipid bilayer, SLB). В данной работе квантовые точки

сульфида кадмия (CdS) были успешно синтезированы в растворе различных пористых матриц, белковых и полисахаридных, и получены их физико-химические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка порина. Изолированный OmpF порин из *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF) получали экстракцией бактериальных клеток ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН) согласно процедурам, описанным в работе [8]. Для очистки порина от сопутствующих белков использовали гель-хроматографию на Sephacryl S-300 HR (Pharmacia, Швеция) в Трис-НСl буфере (0,03 М, рН 7,5) (буфер А), содержащем 0,25 % ДСН. В результате был получен электрофоретически гомогенный образец порина, содержащий белок в нативной тримерной форме.

Выделение хитозана, каррагинана и липополисахарида. Хитозан высокой молекулярной массы (200 кДа) был получен, как описано ранее [9]. S-форму ЛПС выделяли из бактерий *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 6-8 °С, экстракцией клеток 45%-ным водным фенолом по методу Вестфала [10]. Каррагинан (120 кДа) получали горячей водной экстракцией из красных водорослей *Chondrus armatus* (Gigartineae) [11].

Получение стабилизированных КТ. Синтез квантовых точек сульфида кадмия проводили по методу, описанному в работе [7].

Получение КТ сульфида кадмия в растворах порина и полисахаридов. КТ получали при смешивании растворов YpOmpF (1 мг/мл) в буфере А, содержащем 0,25 % ДСН или растворов полисахаридов (1 мг/мл) в буфере А с 70 мкл 4 мМ CdCl₂, смесь выдерживали в течение 12 ч, добавляли 20 мкл 30 мМ Na₂S, еще раз выдерживали в течение 12 ч и затем диализовали против буфера А в течение 24 ч.

Получение пориновой матрицы, меченной КТ, на слюде. Формирование на слюде SLB из липосом, состоящих из дидодецилфосфатидил холина, осуществляли по методу [12]. На слюду с SLB наносили 10 мкл конъюгата КТ-порин (100 мкг/мл) в 0,03 М Трис-НСl буфере рН 5,5, выдерживали в течение 1 ч и отмывали от не связанного белка буфером А (5 раз по 20 мкл).

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

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Размеры КТ и их конъюгатов с белком в растворе определяли методом ДРС с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания), оснащенного He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 4 мВт), в кювете 10x10 мм при температуре 20 °С при фиксированном угле рассеяния 173°. Время накопления данных составило 15-30 мин. Расчет Z average (среднего гидродинамического радиуса) и R_H (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их числового распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Метод сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Спектры люминесценции образцов измеряли с помощью спектрофлуориметра FluoroLog 3 (Horiba, Япония). В качестве источника излучения использовали широкополосную ксеноновую лампу со средней мощностью 450 Вт. Спектры люминесценции регистрировали с шагом 1 нм при времени усреднения 0,1 с. Максимум возбуждения люминесценции находился в пределах от 300 до 450 нм (4,15-2,75 эВ) и зависел от размеров полученных квантовых точек в исследуемых образцах. Средние размеры люминесцирующего ядра КТ (без учета стабилизирующей оболочки) определяли методом эффективных масс электрона и дырки [13]. Этот метод основан на определении энергии оптического перехода между известными уровнями размерного квантования электронов и дырок, зависящей от размеров КТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Меченные КТ биоматрицы получали в растворе с использованием YpOmpF, а также полисахаридов, заряженных положительно (хитозан) и отрицательно (каррагинан, липополисахарид). С помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) были определены размеры КТ и их конъюгатов с порином. Частицы комплекса КТ-порин в растворе были полидисперсными, 40% из них составляли частицы со средним гидродинамическим радиусом $R_H = 19,5$ нм, на более крупные частицы с R_H 40,93 и 32,48 нм приходилось соответственно 26,2 и 20,15%.

Для определения морфологии поверхности комплекса КТ-порин, полученного в растворе, использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью микроскопа NanoDST (PNI, USA). Нанесенный на слюду SLB формировал разрозненные массивы с шириной на полувысоте порядка 25 нм и высотой около 3 нм. При добавлении предварительно полученных КТ к SLB наблюдаются сферические структуры, ширина которых на полувысоте составляет около 25 нм, а высота – 20 нм (рис. 1а, б).

Добавление комплекса КТ-порин приводит к формированию на поверхности подложки пленки, покрывающей, в том числе, массивы липидного слоя. Латеральные размеры массивов липидного слоя в присутствии КТ-YpOmpF увеличиваются примерно в два раза: их ширина на полувысоте составляет около 30 нм, а высота – 10 нм (рис. 1в, г).

При изучении оптических свойств полученных биоконъюгатов, синтезированных в растворах как белковой, так и полисахаридных матриц, обнаружено, что максимум испускания КТ лежит в одном и том же спектральном

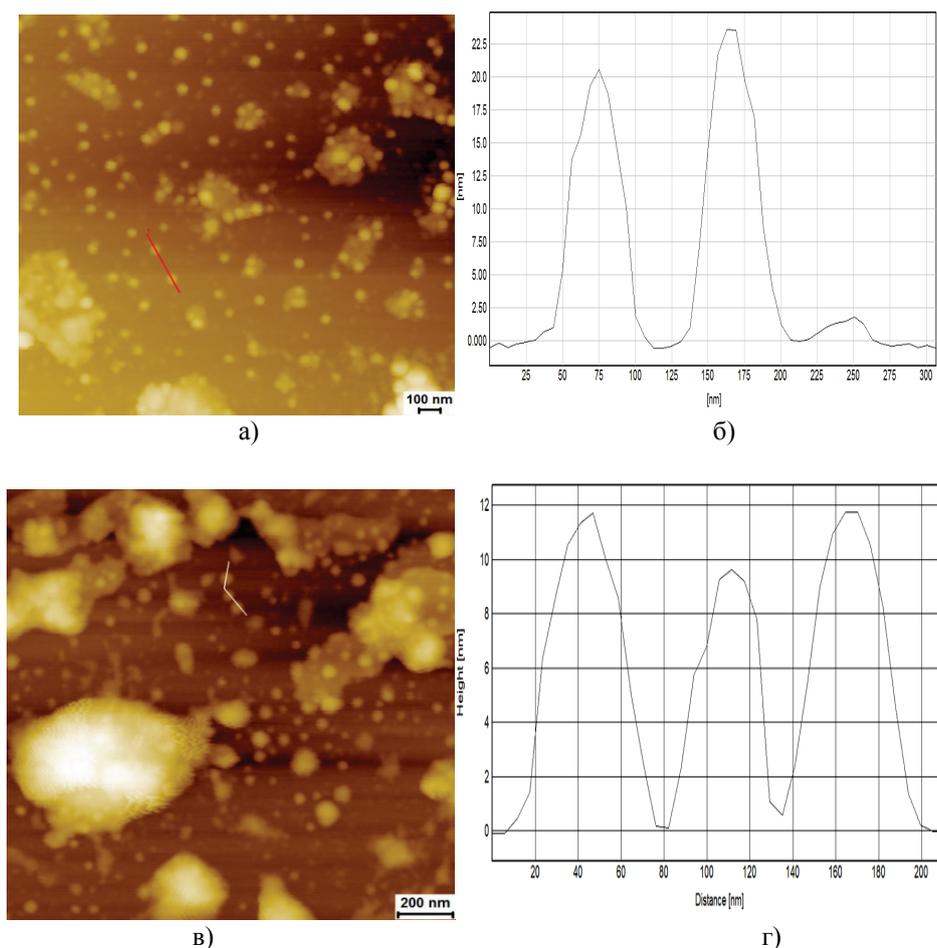


Рисунок 1. АСМ-изображения образцов КТ и КТ-порина в поддерживающем липидном бислое (SLB) на слюде: а) SLB с нанесенными КТ (SLB+КТ); б) профиль единичных структур (а); в) SLB с внесенной пориновой матрицей, меченной КТ (SLB+КТ-YpsOmpF); г) профиль единичных структур (в). Белой пунктирной линией отмечены области измерения профилей единичных структур

диапазоне (455 нм), что указывает на формирование точек одинакового размера, т.е. определяется размером «ячеек» сетчатой матрицы, ограничивающих размер КТ.

При проведении измерений методом флуоресцентной спектроскопии, оказалось, что интенсивность излучения полученных биоконплексов существенно зависит от используемого препарата биополимера. Показано, что при одинаковой концентрации интенсивность люминесценции КТ, синтезированных в растворах ЛПС, была в два раза выше, чем у остальных образцов (рис. 3).

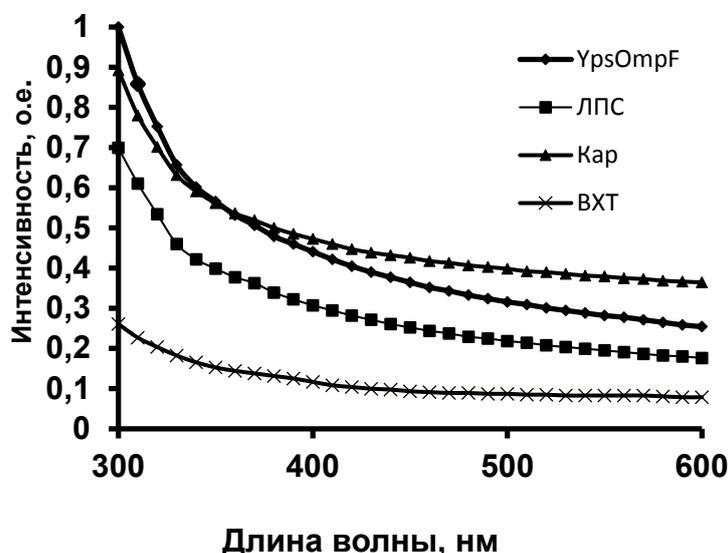


Рисунок 2. Спектры возбуждения флуоресценции конъюгатов, меченных КТ, приготовленных в растворах белковой и полисахаридных матриц

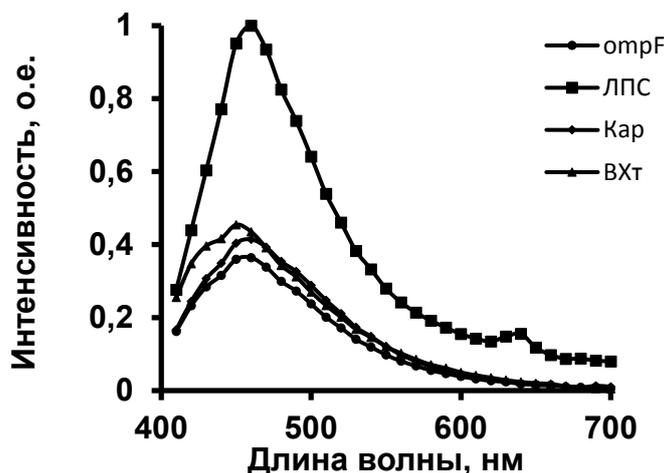


Рисунок 3. Спектры люминесценции конъюгатов с КТ, приготовленных в растворах белковой и полисахаридных матриц.

Достаточно четко выраженный длинноволновый максимум на спектрах возбуждения люминесценции исследуемых комплексов соответствует 1S-1S переходу в КТ, что позволяет использовать его энергию для определения среднего размера КТ по методу эффективных масс [13]. Рассчитанные размеры КТ приведены в таблице.

В используемой нами методике синтеза квантовых точек биополимеры выступают в качестве своеобразного лиганда, компенсирующего избыточную поверхностную энергию синтезированных частиц. Применение лиганда обусловлено необходимостью остановить рост частиц в коллоиде за счет Оствальдского созревания – формирования крупных частиц за счет агрегации мелких – и направлено на получение частиц с узким распределением по размерам. Именно вследствие Оствальдского созревания невозможно получить стабильный раствор низкоразмерных частиц, который в дальнейшем мог бы использоваться в качестве образца сравнения при исследованиях влияния типа биополимера на оптические и сенсорные свойства частиц. В этой связи в качестве образца сравнения нами использовались квантовые точки сульфида кадмия, синтезированные по аналогичной методике с меркаптоянтарной кислотой в качестве лиганда.

Как видно из данных таблицы, размеры КТ CdS, определенные разными методами (ДРС и метода эффективных масс) для КТ-УрОmpF, несколько отличаются друг от друга. По данным ДРС значительная доля частиц этого конъюгата имеет размер 20 нм, что в 10 раз превосходит размер частиц, приведенный в таблице. Кроме того, как было сказано выше, методом ДРС было выявлено также присутствие крупных частиц. Этот факт можно объяснить тем, что данный метод определяет размеры рассеивающих центров, а не самих КТ. Наночастицы CdS в водном растворе расположены в мицеллах, в состав которых входят молекулы стабилизатора и поляризованные молекулы воды. Именно такие образования, состоящие из наночастиц CdS, стабилизирующего слоя и сольватной оболочки из молекул дисперсионной среды, представляют собой рассеивающие центры. Следует также отметить, что различия в размерах квантовых точек, получаемых в матрице УрОmpF, могут быть связаны не только с диаметром пор белка, но и с зарядом его молекулы. Например, наиболее крупные частицы получаются в присутствии каррагинана (имеющего избыточный отрицательный заряд), а одни из самых мелких частиц – в присутствии хитозана (имеющего избыточный положительный заряд).

Апробация биосенсора на основе порина показала, что взаимодействие его с IgG, специфичными к УрОmpF, приводит к существенному увеличению интенсивности люминесценции комплекса КТ-порин (рис. 4). Подобного изменения люминесценции в случае комплекса КТ-BSA не наблюдалось, что наглядно демонстрирует специфичность взаимодействия комплекса КТ-порин с антителами.

Таблица 1. Средний диаметр квантовых точек, рассчитанный по методу эффективных масс электрона и дырки

Лиганды полученных биоконъюгатов, меченных КТ	Энергия перехода, эВ	Средний размер, нм
<i>Меркатоянтарная</i>	4,711	1,996
<i>ОmpF У.psdт</i>	4,21	2,264
<i>ЛПС</i>	4,239	2,246
<i>Каррагенан</i>	4,176	2,288
<i>Хитозан</i>	4,434	2,131

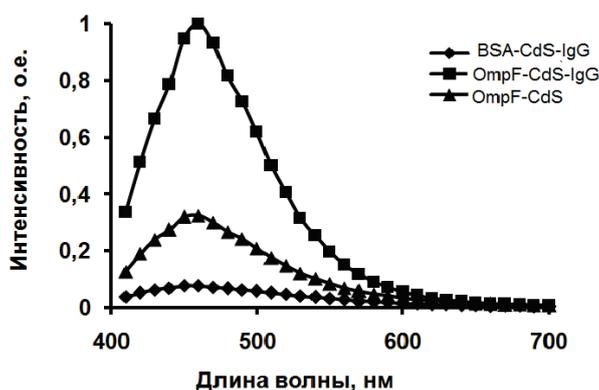


Рисунок 4. Взаимодействие с IgG, специфичными к OmpF порину. Спектры флуоресценции образцов: порина, меченного КТ (OmpF-CdS), порина, меченного КТ с антителами (OmpF-CdS-IgG), бычьего сывороточного альбумина, меченного КТ с антителами (BSA-CdS-IgG)

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан эффективный способ получения биоконъюгатов на основе природных биополимеров. Показано, что состав матрицы существенно влияет на оптические свойства КТ в биоконъюгатах. Показано, что люминесценция КТ в составе полученных комплексов определяется количеством поверхностных дефектов конкретной биоматрицы, что представляет значительный интерес с точки зрения химической сенсорики. Обнаружено, что люминесценция КТ в составе комплекса OmpF-CdS значительно увеличивается в присутствии специфических антител к белку, что открывает перспективы его использования для целей иммунодиагностики.

Список литературы/References:

- Новикова О.Д., Набережных Г.А., Сергеев А.А. Наноструктурные биосенсоры на основе компонентов бактериальных мембран. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 4, с. 668-683. [Novikova O.D., Naberezhnykh G.A., Sergeev A.A. Nanostructural biosensors based on bacterial membrane components. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 668-683, doi: 10.31857/S0006302921040062. (In Russ.)]
- Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, pp. 8706-8715, doi: 10.1021/ja00072a025.
- Rosenthal S.J., McBride J., Pennycook S.J., Feldman L.C. Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals. *Surf. Sci. Rep.*, 2007, vol. 62, pp. 111-157, doi: 10.1016/j.surfrep.2007.02.001.
- Akerman M.E., Chan W., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *PNAS*, 2002, vol. 99, no. 20, pp. 12617-12621, doi: 10.1073/pnas.1524633993.
- Abdellatif A.A.H., Younis M.A., Alsharidah M., Rugaie O., Tawfeek H.M. Biomedical Applications of Quantum Dots: Overview, Challenges, and Clinical Potential. *Int. J. Nanomedicine*, 2022, vol. 17, pp. 1951-1970, doi: 10.2147/IJN.S357980.
- Yang G., Qin D., Zhang L. Controllable synthesis of protein-conjugated lead sulfide nanocubes by using bovine hemoglobin as a capping agent. *J Nanopart. Res.*, 2014, vol. 16, no. 6, pp. 2438-2441, doi: 10.1007/s11051-014-2438-7.
- Dickerson M.B., Sandhage K.H., Naik R.R. Protein- and Peptide-Directed Syntheses of Inorganic Materials. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, no. 11, pp 4935-497, doi: 10.1021/cr8002328.
- Набережных Г.А., Сергеев А.А., Портнягина О.Ю., Чистюлин Д.К., Сидорин Е.В., Новикова О.Д. Биоконъюгирование коллоидных квантовых точек сульфидов кадмия и надмолекулярных структур белка-порина из бактерий рода *Yersinia*. Получение и характеристика. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 4, с. 652-658. [Naberezhnykh G.A., Sergeev A.A., Portnyagina O.Yu., Chistyulin D.K., Sidorin E.V., Novikova O.D. Bioconjugation of colloidal quantum dots of cadmium sulfides and supramolecular structures of porin protein from bacteria of the genus *Yersinia*. Obtaining and characterization. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 652-658. (In Russ.)]
- Новикова О.Д., Вакорина Т.Н., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. Влияние условий культивирования на пространственную структуру и функциональную активность OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2008, т. 73, № 2, с. 173-184. [Novikova O.D., Vakorina T.I., Khomenko V.A., Likhatskaya G.N., Kim N.Yu., Emelyanenko V.I., Kuznetsova S.M., Solov'eva T.F. Influence of cultivation conditions on spatial structure and functional activity of OmpF like porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 173-184, doi: 10.1134/s0006297908020041. (In Russ.)]
- Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N. Interaction of Chitosans and N-acylated Chitosan Derivatives with Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *Biokhimiya*, 2008, vol. 73, no. 4, pp. 530-541, doi: 10.1134/s0006297908040081.
- Galanos O., Luderitz, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, с. 245-249, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

11. Yermak I.M., Kim Y.H., Titlyanov E.A., Isakov V.V., Solov'eva T.F. Chemical structure and gel properties of carrageenan from algae belonging to the Gigartinales and Rhodospirillales, collected from the Russian Pacific coast. *J. Applied Phycology*, 1999, vol. 11, pp. 41-48, doi: 10.1023/A:1008071925884.
12. Naberezhnykh G.A., Khomenko V.A., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Karpenko A.A. The formation of ordered structures of bacterial porins in a lipid bilayer and the analysis of their morphology by atomic force microscopy. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 6, pp. 901-907, doi: 10.1134/S0006302919060097.
13. Разумов В.Ф. Фундаментальные и прикладные аспекты люминесценции коллоидных квантовых точек. *Успехи физических наук*, 2016, т. 186, № 12, с. 1368-1376. [Razumov V.F. Fundamental and applied aspects of luminescence of colloidal quantum dots. *Advances Physical Science*, 2016, vol. 186, no. 2, pp. 1368-1376, doi: 10.3367/UFNr.2016.03.037861. (In Russ.)]

QUANTUM DOTS OF CADMIUM SULFIDE PRODUCED WITH THE USE OF PROTEINS-PORINS, CARRAGEANANS, CHITOSANS AND LIPOPOLOSACCHARIDES

Naberezhnykh G.A.¹, Sergeev A.A.², Novikova O.D.¹

¹Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
100 years of Vladivostok Ave., 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: naber1953@mail.ru

²Institute of Automation and Control Processes Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
Radio str., 5, Vladivostok, 690041, Russia

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2022.0539

Abstract. Quantum dots (QDs) are a new generation of fluorochromes with significant advantages over traditional organic dyes. QDs based on CdS are promising materials for optics, optoelectronics, biology, and medicine. QDs in the form of colloidal solutions are of great scientific and practical interest. CdS quantum dots were synthesized by chemical condensation in an aqueous solution using Yersinia pseudotuberculosis porin proteins, positively (chitosan) and negatively (carrageenan, lipopolysaccharide) charged polysaccharides. The maxima of the emission spectra for all samples were 450 nm, which indicates the same QD size; is determined by the size of the "cells" of the grid matrix, which limit the size of the QD. It was shown that the fluorescence intensity of QDs synthesized in LPS solutions was two times higher than that of other samples. The fluorescence of the samples and the maxima of the emission spectra (450 nm) are preserved during intensive dialysis against buffers, which indicates the stability of QDs and the possibility of using the obtained labeled preparations. Keeping samples at pH 3 leads to a significant decrease in fluorescence, especially for acidic polysaccharides. Anionic oxygen of phosphate, hydroxyl groups of sugar, nitrogen atoms can interact with metal ions, which are precursors (precursors) for CdS nanocrystals. It was found that the interaction with porin-specific IgG leads to a significant change in the luminescence intensity of QD-porin samples. This is of interest from the point of view of chemical sensing and opens the prospect of using QD-labeled porin-based nanostructures as biosensors.

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

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ РЕДУКТАЗ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Проскурнина Е.В.¹, Созарукова М.М.², Федорова М.В.³, Киселева М.В.⁴

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: proskurnina@gmail.com

² Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН
Ленинский просп., 31, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: s_madinam@bk.ru

³ Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
ул. Новогиреевская, 3а, г. Москва, 111123, РФ; e-mail: theklazontag@yandex.ru

⁴ МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ
2-й Боткинский пр., 3, г. Москва, 125284, РФ; e-mail: oxiscience@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0540

Аннотация. Цель исследования — изучить активность НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы (СУВ5R) и НАДФН-зависимой цитохром Р450-редуктазы (СУРОR) в тканях яичника после криоконсервации методом люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами НАДН и НАДФН, соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что в криоконсервированных тканях яичников сохраняется как активность митохондрий, так и микросомальных редуктаз. После криоконсервации уровень выработки митохондриями супероксидного анион-радикала падает в 3–10 раз, при этом наличие или отсутствие химиотерапии влияния не оказывает, также на этот параметр не оказывает влияния тяжесть заболевания. По сравнению с группой контроля (пациентки с доброкачественными новообразованиями), активность СУВ5R и СУРОR ткани яичников при злокачественном онкологическом процессе уменьшается в 1,5–10 раз в зависимости от тяжести заболевания, и наличие химиотерапии резко влияет на эти показатели — при химиотерапии активность микросомальных редуктаз падает в 50–100 раз по сравнению с группой контроля. Таким образом, активность микросомальных редуктаз является более информативным параметром для оценки функциональности криоконсервированной ткани яичников, чем супероксид-продуцирующая способность митохондрий, поскольку, во-первых, зависит от стадии заболевания и предшествующей химиотерапии, и во-вторых, аналитический сигнал НАДН/НАДФН стимулированной хемилюминесценции характеризуется примерно в 30 раз более высокой интенсивностью, чем митохондриальная хемилюминесценция, что обуславливает более высокую аналитическую чувствительность методики.

Ключевые слова: цитохром b5-редуктаза, цитохром Р450-редуктаза, яичники, криоконсервация, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее время методы диагностики и лечения рака значительно улучшились, но химиотерапия и лучевая терапия оказывают необратимое цитотоксическое воздействие на мужские и женские половые железы, что в конечном итоге приводит к гормональной и репродуктивной недостаточности. Криоконсервация и аутотрансплантация ткани яичников представляют собой наиболее эффективный вариант сохранения фертильности у детей, подростков и пациенток, которые не могут отложить противораковое лечение до проведения стимуляции яичников и забора ооцитов [1,2]. В области криоконсервации эмбрионов, ооцитов и ткани яичников достигнут значительный прогресс, и в некоторых странах криоконсервация ткани яичников выведена за рамки экспериментальных программ сохранения фертильности [3]. Согласно исследованиям, риск рецидива рака вследствие реимплантации ткани яичника низок, и восстановление эндокринной функции наблюдается практически у всех женщин, перенесших трансплантацию ткани яичников. На сегодняшний день в мире родилось более двухсот детей у женщин после аутотрансплантации яичниковой ткани [1,2].

Во всем мире ведутся исследования, направленные на решение главных проблем трансплантации ткани яичников, таких как наличие раковых клеток в аутотрансплантационной ткани [4], а также массивной потери фолликулов в раннем посттрансплантационном периоде из-за раннего ишемического повреждения, возникающего между трансплантацией и ревазуляризацией в течение нескольких дней. При этом разработка методов жизнеспособности размороженной ткани яичников является одной из ведущих стратегий поскольку раннее реперфузионное повреждение приводит к оксидативному повреждению тканей, и как следствие апоптозу ооцитов и гранулезных клеток [5]. В результате процессов криоконсервации-оттаивания тканей яичников также происходит изменение клеточного метаболизма, повреждение митохондрий и эндоплазматического ретикулума, такие как потеря митохондриями крист, набухание митохондрий и дилатация эндоплазматического ретикулума [1]. Жизнеспособность размороженных тканей, как и наличие онкологических клеток, оценивают гистологическим методом с помощью оптической или электронной микроскопии, жизнеспособные фолликулы подсчитывают с помощью флуоресцентной микроскопии [6,4].

В качестве другого перспективного подхода оценки жизнеспособности живых систем может быть контроль за функциями ключевых клеточных органелл, например, митохондрий с помощью измерения продукции ими супероксидного анион-радикала [7]. Помимо митохондрий, основными источниками активных форм кислорода в клетке являются микросомальные цепи окисления цитохрома b5 и P450. НАДН-зависимая цитохром b5-редуктаза (CYB5R) которая принимает участие в синтезе холестерина, элонгации жирных кислот, гидроксигировании ксенобиотиков и стероидных гормонов, поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат и коэнзим Q10, защищая клетку от апоптоза [12]. НАДФН-зависимая цитохром P450-редуктаза (CYPOR) восстанавливает цитохром P450, цитохром b5, гемоксигеназу, сквален-монооксигеназу, 7-дегидрохолестерол редуктазу, при этом побочными продуктами являются активные формы кислорода (АФК, супероксидный анион-радикал и пероксид водорода) [8].

Перспективным методом исследования активности CYB5R и CYPOR является люцигенин-активированная хемилюминесценция в присутствии НАДН и НАДФН, соответственно. В этом случае люцигенин напрямую восстанавливается указанными ферментами, далее в присутствии кислорода образуется супероксидный анион-радикал и возникает хемилюминесценция, интенсивность которой пропорциональна активности CYB5R и CYPOR [9,10-12].

Цель настоящего исследования — изучение возможностей определения активности микросомальных редуктаз ткани яичников после криоконсервации методом люцигенин-активированной хемилюминесценции для оценки жизнеспособности тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ткани яичников пациенток, получавших противоопухолевую терапию, были предоставлены биобанком МРНЦ им. А.Ф. Цыба филиалом ФГБУ «НМИРЦ» МЗ России, г. Обнинск. В исследование включали 17 женщин в возрасте от 28 до 45 лет с подтвержденными злокачественными новообразованиями (рак молочной железы, рак влагалища, рак матки) и доброкачественными новообразованиями, сопоставимых по возрасту ($n = 20$, группа контроля). Критерии исключения: возраст старше 45 лет, рак яичников любой стадии. Пациенткам была проведена лапароскопия, биопсия кортикального слоя яичниковой ткани с последующей криоконсервацией методом витрификации [13].

Для группы контроля образцы исследовали без криоконсервации, не позднее чем через 4 часа после интраоперационного забора материала. Для исследуемой группы образцы анализировали после размораживания.

Для регистрации активности CYB5R и CYPOR был разработан протокол, основанный на измерении хемилюминесценции ткани в присутствии люцигенина и НАДН или НАДФН, соответственно. Регистрацию хемилюминограмм проводили на приборе Lum-1200 с программным обеспечением сбора и обработки сигнала PowerGraph 3.0 (ДИСофт, Россия). Прибор позволяет регистрировать хемилюминесценцию в 12 кюветах, таким образом НАДН- и НАДФН-зависимая хемилюминесценция в трех параллельных измерениях для каждой пробы была зарегистрирована одновременно, что обеспечивало высокую воспроизводимость и сопоставимость хемилюминограмм.

В качестве буферного раствора использовали раствор Кребса-Рингера (рН 7,4), который готовили в день эксперимента. В качестве хемилюминесцентного зонда использовали люцигенин (динитрат 10,10-диметил-9,9-биакридиния, «Sigma-Aldrich» США), исходный раствор концентрацией 1 мМ готовили растворением навески в дистиллированной воде. В качестве источников восстановленных эквивалентов использовали НАДН и НАДФН («Sigma-Aldrich» США), 10 мМ растворы готовили растворением навесок в дистиллированной воде.

Анализ проводили не позднее, чем через 30 минут после размораживания. Перед измерением хемилюминесценции образцы трехкратно промывали раствором Кребса-Рингера, из образцов биопсийной иглой 20G («GTA», Италия) производили забор трех порций массой $15,5 \pm 0,5$ мг, каждую из которых помещали в кюветы с предварительно внесенным раствором Кребса-Рингера (1860 мкл) и 120 мкл 1 мМ люцигенина. Производили регистрацию хемилюминесценции при 37 °С в течение 5 минут, далее добавляли 10 мкл 10 мМ НАДН или НАДФН и регистрировали сигнал еще 20 мин. Из хемилюминограмм рассчитывали интенсивность стимулированного свечения $I_{\text{НАДН}}$ и $I_{\text{НАДФН}}$. Для трех параллельных измерений каждой пробы рассчитывали среднее значение указанных параметров.

Для регистрации образования митохондриального супероксидного анион-радикала использовали хемилюминометр SmartLum-100 («ДИСофт», Россия), дополнительно оснащенный перистальтическим насосом Pumps 323 (Watson Marlow, Великобритания). К насосу были подключены резервуары, содержащие кислородную газовую смесь (75% N₂, 20% O₂, 5% CO₂). Образец ткани яичника массой $15,5 \pm 0,5$ мг помещали в кювету хемилюминометра, содержащую 1880 мкл раствора Кребса-Рингера и 120 мкл раствора люцигенина в конечной концентрации 1 мМ. Фоновую хемилюминесценцию регистрировали в течение нескольких минут, после чего включали аэрацию (скорость потока 6 об/мин) и регистрировали хемилюминесценцию в течение 20 минут.

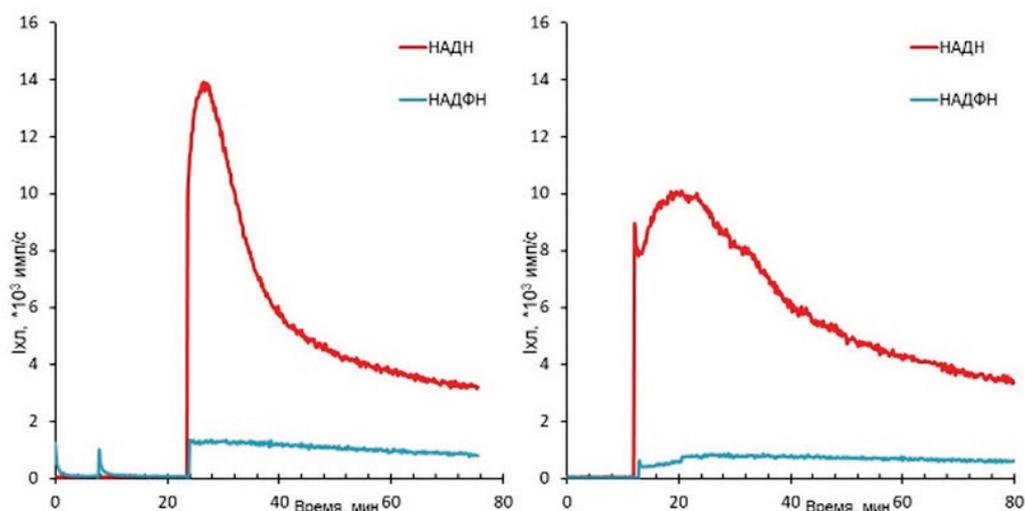


Рисунок 1. Хемилюминограммы НАДН- и НАДФН-зависимого свечения для ткани яичника из группы контроля. Слева – до криоконсервации, справа – после размораживания криоконсервированной ткани

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение НАДН- и НАДФН-зависимой хемилюминесценции ткани яичника с сохранной функцией (пациентка из группы контроля) до и после криоконсервации свидетельствует о том, что качественно характер свечения сохраняется, но интенсивность обоих сигналов падает примерно на треть (рис. 1).

Качественно, НАДФН-зависимое свечение носит стационарный характер, НАДН-зависимое свечение характеризуется на порядок большей интенсивностью и имеет вид кривой с максимумом. Такой вид хемилюминограмм сохранялся для всех изученных образцов.

В ходе исследования пациентки были разделены на подгруппы: без сопутствующей химиотерапии ($n = 10$) и при наличии сопутствующей химиотерапии ($n = 7$). Результаты обработки хемилюминограмм приведены в таблице 1: интенсивности собственного люцигенин-активированного свечения, отражающего продукцию супероксидного анион-радикала митохондриями, и интенсивности НАДН- и НАДФН-стимулированной хемилюминесценции, отражающие активность СУВ5R и СУРOR, соответственно.

Результаты свидетельствуют о том, в криоконсервированных тканях яичников сохраняется как активность митохондрий, так и микросомальных редуктаз. После криоконсервации уровень выработки митохондриями супероксидного анион-радикала падает в 3–10 раз, при этом наличие или отсутствие химиотерапии оказывает слабое влияние, также на этот параметр не оказывает влияния тяжесть заболевания. По сравнению с группой контроля, активность СУВ5R и СУРOR ткани яичников при злокачественном онкологическом процессе уменьшается в 1,5–10 раз в зависимости от тяжести заболевания, и наличие химиотерапии резко влияет на эти показатели — при химиотерапии активность микросомальных редуктаз падает в 50–100 раз по сравнению с группой контроля.

Таблица 1. Параметры хемилюминограмм, определенные для исследуемых подгрупп и группы контроля, данные представлены в виде медианы и значений первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3)

	$I_{\text{собств, усл.ед.}}$ (митохондриальное свечение)	$I_{\text{НАДН, усл.ед.}}$ (активность СУВ5R)	$I_{\text{НАДФН, усл.ед.}}$ (активность СУРOR)
Группа контроля, доброкачественные новообразования ($n = 20$)	0,75 (0,30;1,02)	21,9 (15,12;28,50)	3,5 (3,02;5,45)
Пациентки со злокачественными новообразованиями без химиотерапии ($n = 10$)	0,15 (0,07;0,25)	9,09 (2,53; 14,10)	1,57 (0,84;3,10)
Пациентки со злокачественными новообразованиями, прошедшие химиотерапию ($n = 7$)	0,09 (0,02;0,19)	0,36 (0,15; 2,32)	0,12 (0,08; 0,90)

ОБУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитохром b5-редуктаза является флавопротеином, существующим в двух изоформах. Функцией этого фермента является восстановление цитохрома b5 – конечной точки НАДН-зависимой микросомальной дыхательной цепи. Микросомальная изоформа встроена в цитоплазматическую мембрану и мембраны эндоплазматического ретикулума и митохондрий, аппарата Гольджи, пероксисом, ядра, саркоплазматического ретикулума и нейрональных синапсов. Совместно с цитохромом b5 этот фермент выполняет огромное число метаболических функций, включая окисление ксенобиотиков и канцерогенов, биодеградацию противоопухолевых препаратов, элонгацию жирных кислот, анаболизм холестерина, редокс-сигнализацию в нейронах [14]. Хотя основным субстратом восстановления является цитохром b5, в его отсутствие CYP5R переносит электроны на другие акцепторы, поддерживая коэнзим Q10 и аскорбат в восстановленном состоянии [15]. При помощи аскорбата система НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы защищает гормоны от оксидативной деградации [16], а восстановленный коэнзим Q10 предотвращает липидную пероксидацию в плазматических мембранах и, как следствие, апоптоз [15]. Таким образом, можно считать систему НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы звеном внутриклеточной антиоксидантной системы.

Цитохром P450-редуктаза переносит электроны от НАДФН на цитохром P450, однако акцепторами электронов могут быть другие вещества: хиноны, [17], цитохром b5, гемоксигеназа и другие ферменты [8]. НАДФН-зависимую систему цитохрома P450 считают основным внутриклеточным источником АФК (супероксидный анион-радикал и пероксид водорода) наряду с митохондриальной дыхательной цепью. Нарушения в работе цитохром P450-зависимой цепи приводят к серьезному изменению АФК-гомеостаза, вызывая липидную пероксидацию и апоптоз, поэтому работа этой системы жестко контролируется экспрессией генов, белковыми взаимодействиями, окислительным стрессом по механизму обратной связи [18]. АФК, продуцируемые НАДФН-зависимой системой цитохрома P450, играют значимую роль в канцерогенезе [19]. Важно, что повышение экспрессии CYPOR сопровождается повышением продукции АФК [20]. Таким образом, как CYP5R, так и CYPOR принимают участие в ключевых биохимических процессах жизнедеятельности клетки, и есть основания считать их активность маркером функциональности клеточной системы в целом.

Работы по изучению влияния витрификации на эндоплазматический ретикулум единичны, например, в [21] продемонстрировано отсутствие влияния витрификации на экспрессию генов маркеров стресса эндоплазматического ретикулума. Существенно больше работ касаются функции митохондрий ооцитов. Так, показано, что в процессе витрификации/оттаивания ооцитов митохондриальный потенциал может временно динамически изменяться в течение 2 ч после оттаивания, но полностью восстанавливается после 4 ч культивирования в среде [22]. В исследовании более чем 600 ооцитов человека показано, что витрификация смещает внутриклеточный редокс-потенциал в сторону окисления, но не изменяет митохондриальный потенциал или уровень внутриклеточных активных форм кислорода, что подтверждают и наши данные. Однако есть подтверждения тому, что витрификация вызывает частичное повреждение митохондрий, обусловленное оксидативным стрессом, которое может быть снижено добавлением ресвератрола или N-ацетилцистеина в среду инкубирования [23-25]. Несмотря на то, что экспрессия мРНК ряда генов, связанных с функцией митохондрий, была снижена в результате витрификации, авторы отмечают, что это не повлияло на потенциал развития ооцитов [26]. В целом, при оценке жизнеспособности можно ориентироваться на функционал митохондрий, однако по нашим данным аналитическая чувствительность метода невысока, поэтому более перспективным является оценка активности микросомальных редуктаз.

Ограничением исследования является отсутствие катамнестической информации о последующей трансплантации ткани и ее приживаемости, а также отсутствие данных, полученных независимыми гистологическими методами. При последующих исследованиях мы планируем учесть эти аспекты и расширить выборку.

ВЫВОДЫ

Таким образом, люцигенин-активированная хемиллюминесценция в присутствии доноров электронов может быть использована для оценки активности систем микросомального окисления ткани после криоконсервации, поскольку ткань после криоконсервации сохраняет активность микросомальных систем. По сравнению с супероксид-продуцирующей способностью митохондрий, активность микросомальных редуктаз является более информативным параметром для оценки функциональности криоконсервированной ткани яичников, поскольку, во-первых, зависит от стадии заболевания и предшествующей химиотерапии, и во-вторых, аналитический сигнал НАДН/НАДФН стимулированной хемиллюминесценции характеризуется примерно в 30 раз более высокой интенсивностью, чем митохондриальная хемиллюминесценция, что обуславливает более высокую аналитическую чувствительность методики, при этом активность CYP5R является более чувствительным параметром, чем активность CYPOR.

Список литературы / References:

1. Rodrigues A.Q., Picolo V.L., Goulart J.T., Silva I.M.G., Ribeiro R.B., Aguiar B.A., Ferreira Y.B., Oliveira D.M., Lucci C.M., de Bem A.F. et al. Metabolic activity in cryopreserved and grafted ovarian tissue using high-resolution respirometry. *Sci Rep*, 2021, vol. 11, p. 21517, doi: 10.1038/s41598-021-01082-z.
2. Wietcovsky L., Til D., Salvador R.A., Amaral N.L.L., Senn, A.P., Amaral V.L.L. Ovarian tissue vitrification and heterotopic autologous transplantation in prepubertal Wistar rats. *JBRA Assist Reprod*, 2018, vol. 22, pp. 116-122, doi: 10.5935/1518-0557.20180019.
3. Poirot C., Fortin A., Lacorte J.M., Akakpo J.P., Genestie C., Vernant J.P., Brice P., Morice P., Leblanc T., Gabarre J. et al. Impact of cancer chemotherapy before ovarian cortex cryopreservation on ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod*, 2019, vol. 34, pp. 1083-1094, doi: 10.1093/humrep/dez047.
4. Nguyen T.Y.T., Cacciottola L., Camboni A., Ravau J., De Vos M., Demeestere I., Donnez J., Dolmans M.M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with central nervous system tumours. *Hum Reprod*, 2021, vol. 36, pp. 1296-1309, doi: 10.1093/humrep/deaa353.
5. Wang D., Geng M., Gan D., Han G., Gao G., Xing A., Cui Y., Hu Y. Effect of resveratrol on mouse ovarian vitrification and transplantation. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, vol. 19, no. 54, doi: 10.1186/s12958-021-00735-y.
6. Cheng J., Ruan X., Zhou Q., Li Y., Du J., Jin F., Gu M., Mueck A.O. Long-time low-temperature transportation of human ovarian tissue before cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 2021, vol. 43, pp. 172-183, doi: 10.1016/j.rbmo.2021.05.006.
7. Matveeva N.S., Liubitskii O.B., Osipov A.N., Vladimirov Iu A. Lucigenin-enhanced chemiluminescence of the animal tissues. *Бiofizika*, 2007, vol. 52, pp. 1120-1127.
8. Wisniewska A., Jagiello K., Mazerska Z. NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450. *Postepy Biochem*, 2009, vol. 55, pp. 272-278.
9. Schepetkin I.A. Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases. *Biochemistry (Mosc)*, 1999, vol. 64, pp. 25-32.
10. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., Hetherington L., Aitken R.J. Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biol Reprod*, 2005, vol. 73, pp. 334-342, doi: 10.1095/biolreprod.104.037960.
11. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., McLaughlin E.A., Aitken R.J. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biol Reprod*, 2004, vol. 71, pp. 307-318, doi: 10.1095/biolreprod.104.027748.
12. Rezende F., Prior K.K., Lowe O., Wittig I., Strecker V., Moll F., Helfinger V., Schnutgen F., Kurrle N., Wempe F., et al. Cytochrome P450 enzymes but not NADPH oxidases are the source of the NADPH-dependent lucigenin chemiluminescence in membrane assays. *Free Radic Biol Med*, 2017, vol. 102, pp. 57-66, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.019.
13. Yuzhakov V.V., Malinova I.V., Kiseleva M.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Komarova E.V., Sevan'kaeva L.E., Ingel I.E., Yakovleva N.D., Kaprin A.D. Effect of Vitrification on Functional Morphology and Viability of the Ovarian Tissue. *Bull Exp Biol Med*, 2018, vol. 164, pp. 502-507, doi: 10.1007/s10517-018-4021-1.
14. Elahian F., Sepehrizadeh Z., Moghimi B., Mirzaei S.A. Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, vol. 34, pp. 134-143, doi: 10.3109/07388551.2012.732031.
15. Villalba J.M., Navarro F., Gomez-Diaz C., Arroyo A., Bello R.I., Navas P. Role of cytochrome b5 reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane. *Mol Aspects Med*, 1997, vol. 18, pp. 7-13.
16. Nakamura M., Ohtaki S. Formation and reduction of ascorbate radicals by hog thyroid microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1993, vol. 305, pp. 84-90, doi: 10.1006/abbi.1993.1396.
17. Shimamoto N. A pathophysiological role of cytochrome p450 involved in production of reactive oxygen species. *Yakugaku Zasshi*, 2013, vol. 133, pp. 435-450, doi: 10.1248/yakushi.12-00263.
18. Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, vol. 199, pp. 316-331, doi: 10.1016/j.taap.2004.01.018.
19. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*, 2015, vol. 74, pp. 35-84, doi: 10.1016/bs.apha.2015.03.003.
20. Pillai V.C., Snyder R.O., Gumaste U., Thekkumkara T.J., Mehvar R. Effects of transient overexpression or knockdown of cytochrome P450 reductase on reactive oxygen species generation and hypoxia reoxygenation injury in liver cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, vol. 38, pp. 846-853, doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05622.x.
21. Frank L.A., Rose R.D., Anastasi M.R., Tan T.C.Y., Barry M.F., Thompson J.G., Brown H.M. Artificial blastocyst collapse prior to vitrification significantly improves Na(+)/K(+)-ATPase-dependent post-warming blastocoele re-expansion kinetics without inducing endoplasmic reticulum stress gene expression in the mouse. *Reprod Fertil Dev*, 2019, vol. 31, pp. 294-305, doi: 10.1071/RD17500.
22. Chen C., Han S., Liu W., Wang Y., Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 2012, vol. 29, pp. 1045-1050, doi: 10.1007/s10815-012-9848-1.
23. Hara T., Kin A., Aoki S., Nakamura S., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PLoS One*, 2018, vol. 13, p. 0204571, doi: 10.1371/journal.pone.0204571.

24. Matilla E., Martin-Cano F.E., Gonzalez-Fernandez L., Sanchez-Margallo F.M., Alvarez I.S., Macias-Garcia B. N-acetylcysteine addition after vitrification improves oocyte mitochondrial polarization status and the quality of embryos derived from vitrified murine oocytes. *BMC Vet Res*, 2019, vol. 15, no. 31, doi: 10.1186/s12917-018-1743-2.

25. Gao Z., Yao G., Zhang H., Liu H., Yang Z., Liu, C., Li W., Zhao X., Wei Q., Ma, B. Resveratrol protects the mitochondria from vitrification injury in mouse 2-cell embryos. *Cryobiology*, 2020, vol. 95, pp. 123-129, doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.05.007.

26. Saadeldin I.M., Moulavi F., Swelum A.A., Khorshid S.S., Hamid H.F., Hosseini S.M. Vitrification of camel oocytes transiently impacts mitochondrial functions without affecting the developmental potential after intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, vol. 27, pp. 44604-44613, doi: 10.1007/s11356-020-11070-x.

ANALYSIS OF MICROSOMAL REDUCTASE ACTIVITY IN OVARIAN TISSUE AFTER CRYOPRESERVATION BY ENHANCED CHEMILUMINESCENCE

Proskurnina E.V.¹, Sozarukova M.M.², Fedorova M.V.³, Kiseleva M.V.⁴

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechye St, 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: proskurnina@gmail.com

² Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Leninsky av., 31, Moscow, 119991, Russia; e-mail: s_madinam@bk.ru

³ Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Novogireevskaya str., 3a, Moscow, 111123, Russia; e-mail: theklazontag@yandex.ru

⁴ National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation

Botkinskii pr-d, 3, Moscow, 125284, Russia; e-mail: oxiscience@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0540

Abstract. The aim of the study was to investigate the activity of NADH-dependent cytochrome b5 reductase (CYB5R) and NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CYPOR) in ovarian tissues after cryopreservation by lucigenin-enhanced chemiluminescence with NADH and NADPH stimulation, respectively. The results indicate that both mitochondrial and microsomal reductase activities are preserved in cryopreserved ovarian tissues. After cryopreservation, the level of production of superoxide anion radical by mitochondria drops by 3–10 times, while the presence or absence of chemotherapy has no effect, and this parameter is also not affected by the severity of the disease. Compared to the control group (patients with benign tumors), the activity of CYB5R and CYPOR of ovarian tissue in a malignant cancer process decreases 1.5–10 times depending on the disease severity, and the presence of chemotherapy dramatically affects these parameters — the activity of microsomal reductases decreases by 50–100 times in chemotherapy compared to the control group. Thus, microsomal reductase activity is a more informative parameter for assessing the functionality of cryopreserved ovarian tissue than superoxide-producing capacity of mitochondria, because, firstly, it depends on the stage of disease and prior chemotherapy, and secondly, the analytical signal of NADH/NADPH stimulated chemiluminescence is characterized by approximately 30 times higher intensity than mitochondrial chemiluminescence, which leads to higher analytical sensitivity of the technique.

Key words: cytochrome b5 reductase, cytochrome P450 reductase, ovaries, cryopreservation, chemiluminescence.

ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА, И ИХ РЕГУЛИРОВАНИЕ

Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Старикова Т.И., Сараджи Н.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394006, РФ; e-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0541

Аннотация. В работе изучены изменения маркерных показателей апоптотической гибели клеток: уровня функциональной активности инициирующих каспаз-8, -9, -12, мембранных рецепторов смерти Fas, внутриклеточных активных форм кислорода, цитозольного кальция, митохондриального потенциала лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированные воздействием пероксида водорода в конечных концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} моль/л. Обнаружена активация инициирующей каспазы-8, ассоциированной с мембранными рецепторами смерти Fas, после воздействия на лимфоциты пероксида водорода в концентрации 10^{-6} моль/л. Выявлено значительное повышение функциональной активности инициирующей каспазы-9, уровня Fas-рецепторов и внутриклеточных активных форм кислорода, а также снижение концентрации цитозольного кальция и величины мембранного потенциала митохондрий через 1 и 2 ч после модификации клеток пероксидом водорода в концентрации 10^{-5} моль/л по сравнению с таковыми для интактных иммуноцитов. Установлено, что апоптоз лимфоцитов в условиях воздействия экзогенного пероксида водорода реализуется с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого механизмов. Выявлено защитное действие ресвератрола (10^{-6} моль/л) на лимфоциты после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л), которое обусловлено его способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и модифицированных пероксидом водорода иммуноцитах, а также дезактивировать пероксид водорода.

Ключевые слова: апоптоз, лимфоциты, пероксид водорода, каспазы.

Изучение механизмов и способов регулирования запрограммированной клеточной смерти — одна из ключевых проблем биофизики клетки, физико-химической биологии и биомедицины [1-3].

В настоящее время сложилось представление о свободнорадикальном механизме инициации апоптоза в различных типах клеток [2-6]. Установлена взаимосвязь между образованием в клетках (или воздействием на клетки) активных форм кислорода (АФК) и активированных кислородных метаболитов и индукцией в них апоптоза. АФК участвуют в запуске апоптоза путем инициации митохондриального механизма, увеличения концентрации внутриклеточного кальция, образования цАМФ, окисления ДНК с последующей активацией p53, окисления фосфатидилсерина плазматической мембраны и инактивации скрамблазы, усиления фосфорилирования белков, приводящего к изменению регуляции экспрессии генов.

Наиболее стабильной из АФК – редокс-активных молекул – является пероксид водорода. В зависимости от концентрации пероксид водорода способен стимулировать пролиферацию, вызывать задержку роста клеток и индуцировать апоптоз [6,7]. Окончательно не решены вопросы о концентрационной границе между сигнальным и токсическим действием пероксида водорода, а также о пути гибели клеток в условиях оксидативного стресса.

Ранее нами была исследована динамика маркерных показателей (индикаторов) апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека в условиях воздействия пероксида водорода в концентрации 10^{-6} моль/л [8-11]. Установлено, что после 20 часов инкубации лимфоцитов, модифицированных воздействием H_2O_2 , происходит образование фрагментов ДНК, размеры которых составляют 1500-4000 п. н. Обработка клеток H_2O_2 через 4 и 6 ч приводила к статистически значимому повышению количества фосфатидилсерин-позитивных клеток по отношению к таковому для интактных лимфоцитов. В течение 1-5 ч после воздействия H_2O_2 на клетки наблюдалось повышение уровня экспрессии мембранных рецепторов смерти – Fas (CD95) – по сравнению с таковым для интактных клеток, обусловленное демаскированием ранее скрытых (предсуществующих) и синтезом новых молекул Fas. Через 4 ч после воздействия пероксида водорода на лимфоциты регистрировали значительный рост величины функциональной активности ведущей эффекторной каспазы-3 по отношению к таковой для интактных клеток. Обнаружено повышение по сравнению с контролем уровня транскрипционного фактора p53 в лимфоцитах через 6 ч после добавления к их суспензии раствора H_2O_2 . Сразу после обработки лимфоцитов раствором пероксида водорода наблюдали образование ДНК-комет класса C1, через 6 и 20 ч инкубации модифицированных клеток соответственно – комет C2/C3 и C3/C4 классов. Наибольший объем повреждений ДНК приходился на время 6 ч после обработки лимфоцитов H_2O_2 .

На основании анализа полученных результатов было сделано заключение о реализации в условиях воздействия пероксида водорода в концентрации 10^{-6} моль/л на лимфоциты человека рецепторного каспазного и p53-зависимого пути ядерного механизмов апоптоза. В то же время не было получено убедительных доказательств участия митохондриального механизма в процессах осуществления запрограммированной клеточной смерти лимфоцитов. Представлялось актуальным исследование возможности реализации путей

апоптоза лимфоцитов, связанных с нарушением уровня вторичного мессенджера – цитозольного кальция. Также необходимо было изучить некоторые маркерные показатели апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия пероксида водорода в более широком диапазоне концентраций (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} моль/л).

В этой связи нами были исследованы изменения уровня функциональной активности иницирующих каспаз-8, -9, -12, мембранных рецепторов смерти Fas, внутриклеточных активных форм кислорода, цитозольного кальция, митохондриального потенциала лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированные воздействием пероксида водорода.

В качестве объекта исследования использовали лимфоциты, полученные не позднее двух часов после забора крови. Забор крови производили в стеклянные центрифужные пробирки с добавлением раствора гепарина (25 ед./мл). Донорами были здоровые мужчины 18-45 лет, у которых брали кровь в филиале Воронежской городской клинической больницы скорой медицинской помощи № 1 БУЗ ВО Воронежской областной станции переливания крови.

Лимфоциты получали путем центрифугирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/см³) [12]. Число жизнеспособных клеток во взвешках определяли методом эксклюзии трипанового синего [12].

Лимфоциты модифицировали пероксидом водорода в конечных концентрациях 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} моль/л и инкубировали в течение 1, 2, 3 ч при температуре 37 °С. Растворы пероксида водорода готовили с использованием молярного коэффициента поглощения $H_2O_2 - 43,6$ л·моль⁻¹·см⁻¹ при длине волны 240 нм.

Функциональную активность каспаз-8, -9, -12 в нативных и модифицированных лимфоцитах определяли с помощью люминесцентного метода [13] на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 в соответствии с протоколами фирм-производителей используемых флуоресцентных субстратов: для каспазы-8 – acetyl-isoleucyl-glutamyl-threonyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-IETD-AFC, «Biovision», США), для каспазы-9 – acetyl-leucine-glutamic acid-histidine-aspartic acid-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-LEHD-AFC, Abcam, США), для каспазы 12 – acetyl-alanyl-threonyl-alanyl-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-ATAD-AFC, «Biovision», США).

Уровень экспрессии CD95 на поверхности лимфоцитов определяли с помощью набора FITC Mouse Anti-Human CD95 («BD Pharmingen™», США) на проточном цитометре Guava Easy Cyte 8HT (Merck Millipore), обработку данных проводили при помощи программы In Cyte.

Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [14].

Уровень активных форм кислорода (АФК) в интактных и модифицированных лимфоцитах исследовали флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA) на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [15].

Регистрацию уровня мембранного потенциала митохондрий осуществляли с помощью флуоресцентного зонда – родамина 123 («Fluka», Германия) на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 [16].

Антирадикальную активность ресвератрола регистрировали по изменению интенсивности хемилюминесценции люминола на биохемилюминометре БХЛ-07.

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Stadia: определяли среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал сравниваемых показателей. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

Классическая иницирующая каспаза-8 передает сигнал от рецепторов смерти на ведущую эффекторную каспазу-3 и выполняет регуляторную роль в рецепторзависимой передаче сигналов апоптоза [2,3,17,18].

На рисунке 1 представлены результаты определения уровня активности каспазы-8 сразу после добавления к суспензии лимфоцитов пероксида водорода в конечной концентрации 10^{-6} моль/л и через 1, 2, 3 ч после модификации клеток. За 100% принята активность каспазы-8 инкубированных соответственно в течение 1-3 ч нативных клеток. Статистически достоверное повышение уровня функциональной активности каспазы-8 по отношению к контролю обнаружено сразу после модификации клеток H_2O_2 . Через 1, 2 и 3 ч после воздействия на иммунциты пероксида водорода зафиксировано статистически значимое снижение уровня исследуемого параметра соответственно на 28, 12 и 19% по отношению к величине такового для нативных лимфоцитов. Следовательно, нами обнаружено, что добавление H_2O_2 (10^{-6} моль/л) к суспензии лимфоцитарных клеток индуцирует активацию иницирующей каспазы-8, ассоциированной с рецепторами смерти Fas. Снижение величины активности каспазы-8 по сравнению с таковой нативных иммунцитов через 1, 2 и 3 ч после воздействия пероксида водорода на лимфоциты может быть связано с ее ингибированием IAP (Inhibitors of Apoptosis), A1/Bfl1 (членом семейства белков Bcl-2), FLIP (FADD-like inhibitory protein) либо с активацией других путей апоптоза.

Механизм апоптоза, запускающийся при стрессе эндоплазматического ретикула, реализуется несколькими путями [2,3], что можно показать в виде схем 1 и 2.

Схема 1: стресс ЭПР (нарушения процессов сворачивания, укладки, гликозилирования белков и их транспорта к аппарату Гольджи) → сенсор состояния ЭПР — белок IRE-1 α → JNK-киназа → активация белка TRAF-2 → активация прокаспазы-12 → каспаза-12 → активация прокаспазы-9 → каспаза-9 → прокаспаза-3 → каспаза-3 → самоуничтожение клетки.

Схема 2: взаимодействие белка IRE-1 α с проапоптозными Bax и Bak → формирование пор в мембране ЭПР → выход Ca²⁺ из ЭПР в цитозоль → активация m-кальпаина → активация прокаспазы-12 → каспаза-12 → ... → самоуничтожение клетки.

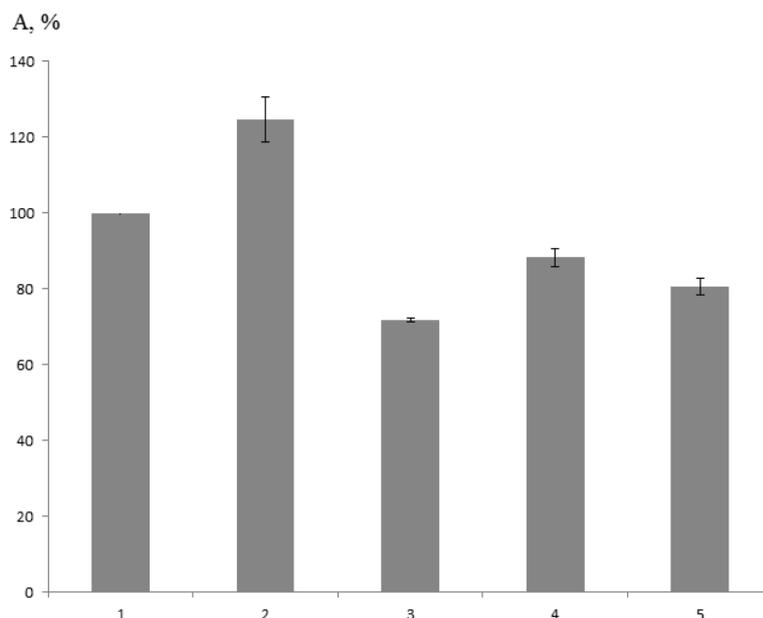


Рисунок 1. Изменения уровня функциональной активности (А) каспазы-8 лимфоцитов человека после воздействия на клетки пероксида водорода (10^{-6} моль/л) и инкубации модифицированного образца. Обозначения: 1 – активность каспазы-8 интактных лимфоцитов (100%); 2, 3, 4, 5 – активность каспазы-8 лимфоцитов соответственно сразу и через 1, 2, 3 ч после воздействия пероксида водорода

Иницирующая каспаза-12 участвует в функционировании сигнального каскада, реализующегося при нарушениях гомеостаза кальция, фолдинга белков и их накоплении в ЭПР, гипоксии, гипогликемии [2,3]. Данные о функционировании каспазы-12 в клетках человека противоречивы. Полагают [2], что у человека в гене каспазы-12 присутствует делеция, в результате чего этот белок не экспрессируется, либо образуется в укороченной форме и не обладает ферментативной активностью, а его функцию выполняет каспаза-4. В то же время активация каспазы-12 в условиях апоптоза была показана и для клеток человека [19].

При исследовании изменений уровня активности каспазы-12 лимфоцитов после их модификации пероксидом водорода в концентрации 10^{-6} моль/л и через 1, 2 и 3 ч не обнаружены статистически значимые отличия величин исследуемого параметра от таковых для нативных иммунцитов. Вероятно, в этих условиях путь апоптоза, связанный со стрессом эндоплазматического ретикулума и каспазой-12, не функционирует, а передача апоптозного сигнала идет по другим путям.

Рецепторный (рецепторопосредованный) механизм апоптоза реализуется по следующей схеме [18]: проапоптотический лиганд смерти CD95L (мембранная форма) → рецептор смерти CD95 (Fas) в олигомерном (тримеризованном) состоянии → адаптер FADD → иницирующая прокаспаза -8 или -10 → активная каспаза -8 или -10 → эффекторная прокаспаза-3 → активная каспаза-3 → белки-мишени (в т.ч. ингибитор ДНКазы) → расщепление клеточных белков, активация ДНКазы и «разрезание» ДНК на фрагменты.

Нами с использованием проточно-цитометрического метода был исследован уровень экспрессии CD95 лимфоцитов через 1, 2, 3 ч после добавления H_2O_2 в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} моль/л (рис. 2). За 100% принят уровень экспрессии CD95 нативных клеток, инкубированных в течение 1, 2 и 3 ч при 37 °С. Выявлено, что пероксид водорода в концентрации 10^{-5} моль/л вызывает статистически достоверное повышение уровня экспрессии CD95 лимфоцитов через 1 ч на 17% и через 2 ч на 76% по отношению к таковому для интактных клеток (100%). После воздействия пероксида водорода в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} моль/л и инкубации в течение 1, 2, 3 ч не обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии CD95 по сравнению с таковым для интактных лимфоцитов.

Полученные данные свидетельствуют в пользу представления о том, что H_2O_2 в концентрации 10^{-5} моль/л индуцирует Fas-зависимый путь апоптоза.

В дальнейших экспериментах мы модифицировали лимфоциты пероксидом водорода в конечной концентрации 10^{-5} моль/л.

Митохондриальный механизм апоптоза связан с выходом апоптогенных факторов из митохондрий в цитоплазму [2,3,18]. Он реализуется по следующей схеме: индукторы апоптоза → увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны и снижение мембранного потенциала → образование (открытие) пор (каналов) в митохондриальной мембране с участием проапоптотических белков семейства Bcl-2 (Bax, Bak, Bad и др.) → высвобождение из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму апоптогенных факторов (цитохрома с, прокаспаз -2, -3, -9, эндонуклеазы G и фактора, индуцирующего апоптоз, - AIF) → образование в цитоплазме апоптосомы с участием цитохрома с, цитоплазматического фактора APAF-1, иницирующей прокаспазы-9 и АТФ → активная каспаза-9 → прокаспазы -3, -6, -7 → активация эффекторных каспаз -3, -6, -7 → расщепление белков-мишеней и фрагментация ДНК.

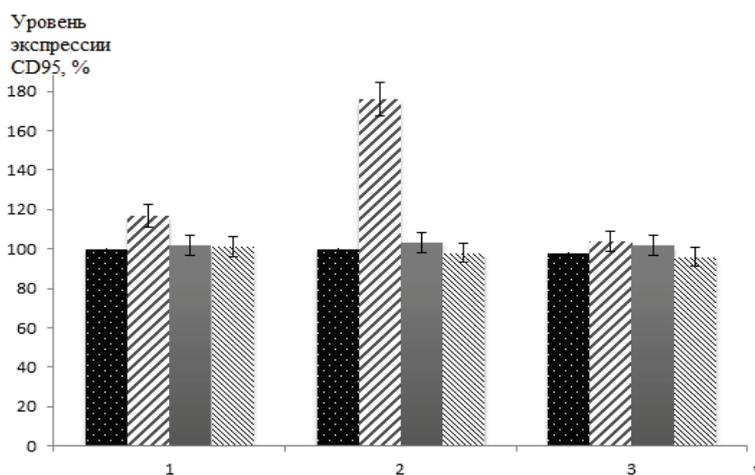


Рисунок 2. Уровень экспрессии CD95 лимфоцитов после воздействия пероксида водорода.

Обозначения:

■ — контроль;

▨ — лимфоциты + H_2O_2 (10^{-5} моль/л);

■ — лимфоциты + H_2O_2 (10^{-4} моль/л);

▩ — лимфоциты + H_2O_2 (10^{-3} моль/л).

Нами обнаружено существенное повышение в 2,6 раза по сравнению с контролем (интактные иммунциты) активности, инициирующей каспазы-9, участвующей в запуске митохондриального каспазного пути апоптоза через 1 и 2 ч после модификации лимфоцитов H_2O_2 (10^{-5} моль/л).

Выявлено статистически значимое повышение уровня внутриклеточных активных форм кислорода через 1 и 2 ч. после модификации лимфоцитов H_2O_2 (10^{-5} моль/л) по сравнению с таковым для интактных клеток (рис. 3). Стимуляция образования активных кислородных метаболитов в клетках в условиях воздействия индуцирующих активных форм кислорода называется феноменом АФК-индуцированного образования АФК. Небольшие количества индуцирующих АФК вызывают падение трансмембранного потенциала митохондрий и генерацию вторичных активных форм кислорода, что приводит к развитию «окислительного взрыва». В ходе АФК-индуцированного образования АФК происходит окисление белков и регуляторных тиолов, которые изменяют редокс-статус клеток, инициируя неспецифическую проницаемость мембран митохондрий: происходит нарушение функционирования электрон-транспортной цепи и изменение свойств митохондриальной мембраны.

Воздействие пероксида водорода в той же концентрации на лимфоциты индуцировало сначала повышение уровня цитозольного кальция до 150 ± 18 нмоль/л по отношению к таковому для интактных клеток (81 ± 15 нмоль/л); через 1 и 3 часа – снижение соответственно до 45 ± 8 и 34 ± 10 нмоль/л по сравнению с таковым для нативных иммунцитов (67 ± 10 и 59 ± 8 нмоль/л). Возможно, в клетках в этих условиях происходят процессы перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами – цитозолем, митохондриями и ядром. Захват цитозольного кальция митохондриями способствует инициации митохондриального механизма апоптоза [2,3,18].

Обнаружено статистически значимое снижение на 32% интенсивности флуоресценции «митохондриального» флуоресцентного зонда – родамина 123 – по сравнению с таковой для нативных клеток (100%) для лимфоцитов через 1 ч после модификации пероксидом водорода, что является показателем нарушения функционального состояния митохондрий.

Активация инициирующей каспазы-9, увеличение концентрации в цитоплазме активных форм кислорода, нарушение мембранного потенциала митохондрий, изменения уровня цитозольного кальция после воздействия на лимфоциты пероксида водорода (10^{-5} моль/л) являются маркерами митохондриального механизма апоптоза, реализующегося с участием каспазы-9.

В настоящее время внимание исследователей привлекает проблема взаимосвязи процессов апоптоза, клеточного старения и функционирования теломеразы [3]. Укорочение теломерных повторов до критических величин вследствие концевой недорепликации ДНК вызывает прекращение деления клеток, дестабилизацию и потерю функций теломер, хромосомные нарушения. В результате активируется система ответа клетки на повреждения ДНК и запускается апоптоз. Укороченные теломеры обнаруживаются при окислительном стрессе. Укорочению хромосом в процессе репликации препятствует теломераза, удлиняющая 3'-выступающие концы ДНК путем добавления теломерных повторов. К активаторам теломеразы относят ресвератрол. Это соединение фенольной природы, обладающее антиканцерогенными, гепатопротекторными и противовоспалительными свойствами. Возможное модулирующее действие ресвератрола на структурно-функциональное состояние лимфоцитов человека и процессы их гибели исследовано недостаточно.

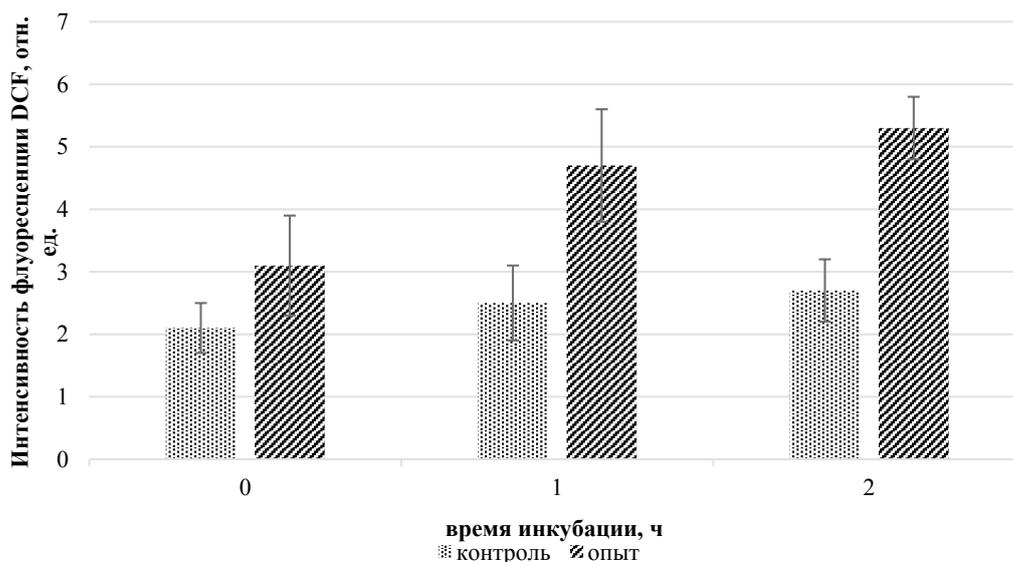


Рисунок 3. Изменения уровня активных форм кислорода в цитозоле лимфоцитов после воздействия пероксида водорода в концентрации 10^{-5} моль/л

Нами выявлено защитное действие транс-ресвератрола (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай) в концентрации 10^{-6} моль/л по отношению к уровню жизнеспособности лимфоцитов после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л). Предварительная инкубация лимфоцитов с ресвератролом индуцировала снижение на 37 и 47% уровня АФК в цитозоле модифицированных H_2O_2 и интактных клеток соответственно по отношению к таковому для иммуноцитов в отсутствие ресвератрола. С помощью метода хемилуминолзависимой люминесценции в модельной системе обнаружена антирадикальная активность ресвератрола по отношению к пероксиду водорода: интенсивность люминесценции в отсутствие ресвератрола составляла 2900 ± 20 отн. ед., а в его присутствии - 172 ± 20 отн. ед. В условиях генерации гидроксильного радикала по механизму Фентона интенсивность люминесценции люминола в присутствии ресвератрола повышалась по отношению к величине исследуемого параметра в отсутствие ресвератрола, т.е. ресвератрол не проявлял антирадикальную активность в отношении гидроксильного радикала. Следовательно, ресвератрол является регулятором процессов апоптотической гибели лимфоцитов, связанных с воздействием экзогенного пероксида водорода и интенсификацией образования активных кислородных метаболитов.

Обобщая настоящие и ранее полученные нами результаты, можно заключить, что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах периферической крови доноров процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого пути ядерных механизмов апоптоза. Причем митохондриальный механизм с участием каспазы-9 является «быстродействующим», а его медиаторы – активные формы кислорода и ионы кальция. Следовательно, системы генерации активных форм кислорода и пути перераспределения свободных ионов кальция между клеточными компартментами могут выступать в качестве «сайтов» регулирования H_2O_2 -индуцированного апоптоза лимфоцитарных клеток.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020—2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Список литературы / References:

1. Nagata S., Masato Tanaka. Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2017, vol. 17, no. 5, pp. 333-340, doi: 10.1038/nri.2016.153.
2. Savitskaya M.A., Onishchenko G.E. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc.)*, 2015, vol. 80, no. 11, pp. 1393-1405, doi: 10.1134/S0006297915110012.
3. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. *Механизмы клеточной гибели: апоптоз, аутофагия, некроз. Учебное пособие.* Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2019, 164 с. [Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. *Mechanisms of cell death: apoptosis, autophagy, necrosis. Textbook.* Voronezh: VSU Publishing House, 2019, 164 p. (In Russ.)]
4. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, vol. 32, pp. 157-170, doi: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.

5. Riazantseva N.V., Novitskii V.V., Chasovskikh N.Iu., Kaigorodova E.V., Starikova E.G., Starikov Iu.V., Radzivil T.T., Krat N.V. The role of redox-dependent signal systems in the regulation of apoptosis under oxidative stress condition. *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 329-334. (In Russ.)
6. Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms. *Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal. Navuk*, 2013, vol. 1, pp. 92-108. (In Russ.)
7. Nadeev A.D., Zinchenko V.P., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Avdonin P.V., Goncharov N.V. Dual proapoptotic and pronecrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells. *Cell and Tissue Biology*, 2015, vol. 57, no. 12, pp. 909-916, doi: 10.1134/S1990519X16020097.
8. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V., Lidokhova O.V. Ways of realizing apoptosis of human lymphocytes induced by UV-light and reactive oxygen species. *Radiats Biol Radioecol*, 2011, vol. 51, no. 4, pp. 425-443. (In Russ.)
9. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Solov'eva E.V. DNA Fragmentation of Human Lymphocytes in Dynamics of Development of Apoptosis Induced by Action of UV Radiation and Reactive Oxygen Species. *Cell and Tissue Biology*, 2011, vol. 5, no. 2, pp. 127-135, doi: 10.1134/S1990519X11020039.
10. Artyukhov V.G., Trubitsyna M.S., Nakvasina M.A., Lidokhova O.V., Ryazantsev S.V. The ways for realization of human lymphocyte apoptosis, induced by hydrogen peroxide. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2013, no. 7, pp. 7-16. (In Russ.)
11. Nakvasina M.A., Popova L.I., Lidokhova O.V., Artyukhov V.G. Modulation of Structural and Functional Properties of Human Lymphocytes by Reactive Oxygen Species. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, vol. 166, no. 4, pp. 481-486, doi: 10.1007/S10517-019-04377-4.
12. Клаус Дж. *Лимфоциты. Методы*. Москва, Мир, 1990, 395 с. [Klaus J. *Lymphocytes. Methods*. Moscow, Mir, 1990, 395 p. (In Russ.)]
13. Kaufmann S., Lee Sun-Hee, Meng X., Loegering D., Kottke T., Heinzing A.J., Ruchaud S., Samejima K., Earnshaw W. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*, 2008, vol. 44, pp. 262-272, doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.005.
14. Hirst R.A., Harrison C., Hirota K., Lambert D.G. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol. Biol.*, 2005, vol. 312, pp. 37-45, doi: 10.1385/1-59259-949-4:037.
15. Rastogi R.P., Singh S.P., Hader D.P., Sinha R.P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, vol. 397, no. 3, pp. 603-607, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006.
16. Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Medicinskaya immunologiya*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 461-482. (In Russ.)
17. Julien O., Wells I.A. Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation. Advance online publication*. 2017, doi: 10/1038/cdd.2017.44.
18. Green D.R., Llambi F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
19. Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: The story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, dec., vol. 1010, pp. 186-194, doi: 10.1196/annals.1299.032.

WAYS OF REALIZATION OF APOPTOSIS OF HUMAN LYMPHOCYTES INDUCED BY HYDROGEN PEROXIDE AND THEIR REGULATION

Nakvasina M.A., Artyukhov V.G., Starikova T.I., Saradzhi N.G.

Voronezh State University

Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394006, Russia; e-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0541

Abstract. The changes in marker indicators of apoptotic cell death were studied: the level of functional activity of initiating caspases-8, -9, -12, membrane death receptors Fas, intracellular reactive oxygen species, cytosolic calcium, mitochondrial potential of peripheral blood lymphocytes of donors induced by exposure to hydrogen peroxide at final concentrations of 10^{-6} and 10^{-5} mol/l. Activation of initiating caspase-8 associated with membrane death receptors Fas was detected after exposure to hydrogen peroxide lymphocytes at a concentration of 10^{-6} mol/l. There was a significant increase in the functional activity of initiating caspase-9, the level of Fas receptors and intracellular reactive oxygen species, as well as a decrease in the concentration of cytosolic calcium and the value of the mitochondrial membrane potential 1 and 2 hours after modification of cells with hydrogen peroxide at a concentration of 10^{-5} mol/l compared with those for intact immunocytes. It was found that apoptosis of lymphocytes under the influence of exogenous hydrogen peroxide is realized with the participation of receptor-mediated caspase, mitochondrial (with activation of caspase-9) and p53-dependent mechanisms. The protective effect of resveratrol (10^{-6} mol/l) on lymphocytes after exposure to hydrogen peroxide (10^{-5} mol/l), which is due to its ability to reduce the level of reactive oxygen species in intact and modified hydrogen peroxide immunocytes, as well as deactivate hydrogen peroxide.

Key words: apoptosis, lymphocytes, hydrogen peroxide, caspases.

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Соловьева А.Г.

Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России
пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603005, РФ; e-mail: sannag5@mail.ru
Поступила в редакцию 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0542

Аннотация. Комбинированная термическая травма (КТТ), включающая термоингаляционное воздействие и ожоги кожных покровов, часто встречается у пострадавших, поступающих в ожоговые центры. Наличие ингаляционной травмы отягощает течение КТТ, вызывая развитие легочных осложнений, нарушение окислительного метаболизма и полиорганную недостаточность. Целью исследования было изучение особенностей регуляции ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной комбинированной термической травме под воздействием оксида азота. Эксперимент проведен на 30 белых крысах-самцах линии Wistar. Животных разделили на 3 равные по численности группы: 1 – интактные крысы; 2 – контрольная – животные с КТТ; 3 – опытная – животные с КТТ, получавшие ингаляции NO. Крысам под наркозом (Золетил 100 (60 мг/кг) + Ксила (6 мг/кг)) наносили контактный ожог (20% поверхности тела) и термоингаляционное воздействие. Животных выводили из эксперимента после КТТ на 10 сутки. В эритроцитах крови определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-фДГ). Ингаляционно-наружное воздействие NO при КТТ осуществляли ежедневно в течение 10 дней по 10 мин, скорость подачи газовой смеси – 2 л/мин. Рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции. Статистическую обработку результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA). Показано, что на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов в крови при КТТ наибольшее ингибирование отмечено для каталазы. Кинетическим методом анализа впервые установлен характер ингибирования ферментов при КТТ: для СОД и каталазы в эритроцитах – двухпараметрически согласованное, для ГР и Гл-6-фДГ – каталитическое. Ингаляции NO при КТТ активировали СОД, каталазу, ГР и Гл-6-фДГ.

Ключевые слова: комбинированная термическая травма, оксид азота, ферменты антиоксидантной защиты.

Термическая травма – один из наиболее распространенных видов бытового травматизма, учащающийся в условиях обострения военной обстановки. Комбинированная термическая травма (КТТ), включающая термоингаляционное воздействие и ожоги кожных покровов, встречается у 58% пострадавших, поступающих в ожоговые центры РФ [1]. Наличие ингаляционной травмы отягощает течение КТТ, особенно в первые сутки, вызывая развитие легочных осложнений, в итоге – летальный исход в 50% случаев [2]. В условиях чрезмерного образования токсических продуктов при ожоговой болезни (ОБ) развивается недостаточность естественной системы детоксикации, приводящая к возникновению гипоксии органов вплоть до полиорганной недостаточности [3,4]. При КТТ изменения оксидоредуктаз, регулирующих окислительный метаболизм и биотрансформацию высокотоксичных метаболитов играют ведущую роль. Важное значение при этом следует отнести ферментам антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазе (СОД), каталазе, глутатионредуктазе (ГР)) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе (Гл-6-фДГ).

Кроме того, недостаточно изучены биохимические механизмы лечебных технологий, используемых при КТТ. NO является как средством терапии, так и мишенью для фармакологического воздействия, в том числе в условиях гипоксии и ишемии. В медико-биологических исследованиях проблема увеличения резистентности организма при гипоксии и ишемии очень актуальна, так как эти состояния сопровождают течение многих заболеваний, в том числе ОБ [5]. Несмотря на большое количество работ, роль оксида азота (NO) в системной регуляции гомеостаза клеток и тканей до сих пор вызывает научные дискуссии, а выявление биохимических механизмов действия NO требует дальнейшего анализа с целью обоснования возможности и практической целесообразности их фармакологической регуляции [6,7].

Цель исследования – изучить особенности регуляции ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной комбинированной термической травме под воздействием оксида азота.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 30 белых крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (г. Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными

соответствовали принципам биологической этики, а именно, правилам Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ЕТ/С 129 (Страсбург, 18 марта 1986), директивам 86/609 ESC [8]. Протоколы эксперимента одобрены и утверждены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол №5).

Животные были разделены путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела и возрасту. В исследование были включены крысы массой 200–250 г. в возрасте 5–7 месяцев. После 14 – дневной адаптации к условиям местного вивария и карантина животных разделили на 3 равные по численности группы: 1 – интактные крысы; 2 – контрольная – животные с КТТ; 3 – опытная – животные с КТТ, получавшие ингаляции NO (иNO).

При моделировании КТТ крысам под наркозом (Золетил 100 (60 мг/кг) + Ксила(6 мг/кг)) наносили контактный термический ожог (20% поверхности тела) и оказывали термоингаляционное воздействие горячим воздухом и продуктами горения в течение 20–30 секунд в условиях камеры ингаляции [9].

Животных выводили из эксперимента после КТТ путем декапитации с предварительной перерезкой сонной артерии под наркозом (Золетил 100 (Zoletil 100; Virbac S.A., VIRBAC, France) + XylaVET (Pharmamagist Ltd., Венгрия) на 10 суток. Кровь крыс для исследований забирали из шейной артерии и стабилизировали раствором цитрата натрия (3,8%) в соотношении 9:1. В эритроцитах крови определяли активность СОД по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [10], каталазы спектрофотометрическим методом, основанным на определении скорости разложения H_2O_2 каталазой исследуемого образца с образованием воды и O_2 [11], ГР [11] и Гл-6-фДГ [12], применяя спектрофотометрический анализ. Концентрацию белка в мг/мл рассчитывали по методу V.F. Jr. Kalb, R.W. Bernlohr [13]. Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости (V от t), используя математический метод, рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции (K_t , V_{max} , V_{max}/K_t) [14], где: K_t – время полупревращения субстрата для ферментативной реакции (мин); V_{max} – максимальная скорость накопления продукта реакции при полном расходе субстрата (мкмоль/мин); V_{max}/K_t – коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин²). Характер ингибирования и активации ферментов определяли по В.И. Крупянко [15].

Ингаляционно-наружное воздействие NO (концентрация 20ppm) на животных с КТТ осуществляли в эксикаторе ежедневно в течение 10 дней по 10 мин, скорость подачи газовой смеси – 2 л/мин. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO, разработанного в РФЯЦ-ВНИИЭФ (г. Саров).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Biostat 4.3, Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA). Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению применяли критерий Шапиро-Уилка. Данные представлены как среднее значение \pm среднее квадратичное отклонение ($M \pm \sigma$). Сравнение средних величин двух независимых групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони. Различия между сравниваемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В эритроцитах выявлено падение активности антиоксидантных ферментов на 10 суток после КТТ по сравнению с интактными животными: СОД – на 25% ($p=0,021$) (рис. 1), каталазы – на 48% ($p=0,011$) (рис. 2), ГР – на 30% ($p=0,026$) (рис. 3), Гл-6-фДГ – на 29% ($p=0,033$) (рис. 3), что может быть связано с усилением окислительно-восстановительных процессов и снижением энергетического обмена в митохондриях при КТТ и конформационной модификацией молекул ферментов в условиях окислительного стресса (ОС).

Большое значение имеют реакции, катализируемые ГР, так как способствуют поддержанию оптимального уровня GSH, необходимого для стабилизации, прежде всего, энзимов, в активном центре которых имеется каталитически значимый остаток цистеина с реакционно-активной SH-группой [16].

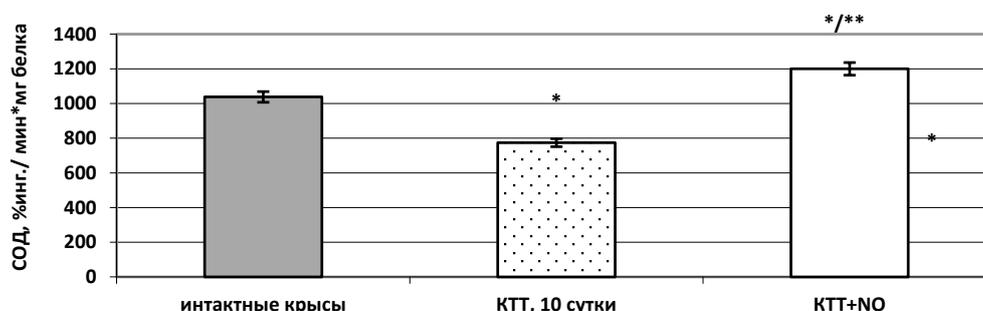


Рисунок 1. Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови крыс с КТТ после воздействия иNO. Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$) ** - различия статистически значимы по сравнению с КТТ ($p < 0,05$)

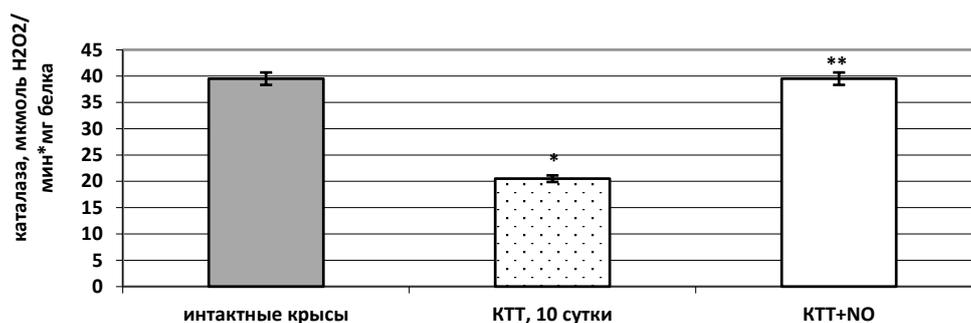


Рисунок 2. Активность каталазы в эритроцитах крови крыс с КТТ после воздействия иNO

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$)

** – различия статистически значимы по сравнению с КТТ ($p < 0,05$)

Ингибирование активности ГР в условиях патологии, с одной стороны, вероятно, вызвано воздействием на энзим полиненасыщенных жирных кислот [17], с другой стороны, обусловлено высвобождением отдельных фракций мембраносвязанных ферментов, в том числе ферментов антиоксидантной системы. Депрессия глутатионовой защиты крови больных с КТТ может быть обусловлена нарушением пентозофосфатного пути, и, в частности, снижением активности Гл-6-фДГ, что приводит к уменьшению содержания НАДФН, который в эритроцитах включается в реакцию восстановления глутатиона, катализируемую ГР. Низкая активность ГР нарушает соотношение окисленных и восстановленных форм глутатиона и является одной из причин срыва целого ряда метаболических реакций организма при ожоге [17]. Поскольку посредством GSH эритроцит защищает SH-группы своих структурных элементов от дестабилизирующего воздействия свободных радикалов, при его недостатке наступает окисление, денатурация и отложение в мембране Hb (тельца Гейнца-Эрлиха).

Постожоговое снижение активности Гл-6-фДГ в эритроцитах периферической крови следует рассматривать как индикатор перенапряжения физиологической глутатионовой системы в условиях ОС [18]. Глубокая морфологическая и энзиматическая перестройка эритроцитарной популяции стимулирует эритрофагоцитоз в костном мозге, легких, печени, селезенке [18], что приводит к снижению содержания эритроцитов и Hb в периферической крови, наиболее интенсивному в течение первой недели ожоговой токсемии.

Уменьшение удельной активности СОД и каталазы в эритроцитах при КТТ сопровождалось снижением сродства ферментов к субстратам реакции и V_{max}/K_t . При КТТ K_t увеличилось для СОД в 2,2 раза ($p < 0,001$), для каталазы – в 2,4 раза ($p < 0,001$), V_{max}/K_t уменьшилась для СОД в 3,2 раза ($p < 0,001$), для каталазы – в 3,6 раза ($p < 0,001$) по сравнению с показателями интактных животных (табл. 1).

Используя кинетический метод анализа, выявили характеристику типов ингибирования антиоксидантных ферментов эритроцитов при КТТ: для СОД и каталазы – двухпараметрически согласованное, для ГР и Гл-6-фДГ – каталитическое.

В эритроцитах при КТТ выявлена активация СОД под влиянием иNO по сравнению с показателями крыс с КТТ и интактных крыс на 55,03% ($p = 0,014$), 15,61% ($p = 0,017$) (рис. 1), что препятствует образованию $ONOO^-$. Показано, что экзогенная NO-терапия активирует удельную активность ГР на 45,91% ($p = 0,016$) (рис. 3), нормализуя каталитические свойства фермента и приводя к повышению содержания НАДН или НАДФН. Ингаляции NO при КТТ вызвали в эритроцитах рост удельной активности каталазы на 92,71% ($p < 0,001$) по сравнению с показателем крыс с КТТ (рис. 2), оказав нормализующее действие. иNO привел к росту активности Гл-6-фДГ в эритроцитах при КТТ по сравнению с показателями крыс с ожогом без лечения на 99,34% ($p < 0,001$) (рис. 3). Активация СОД, Гл-6-фДГ, ГР в эритроцитах при КТТ под влиянием иNO обусловлена ростом сродства

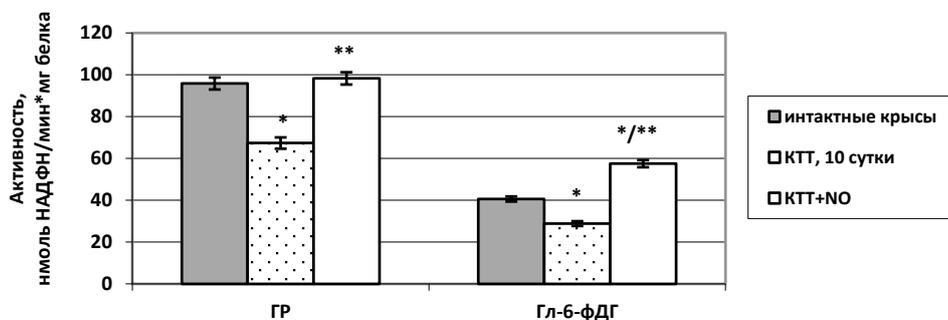


Рисунок 3. Активность ГР и Гл-6-фДГ в эритроцитах крови крыс с КТТ после воздействия иNO

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$)

** - различия статистически значимы по сравнению с КТТ ($p < 0,05$)

Таблица 1. Кинетические показатели антиоксидантных ферментов крови крыс с комбинированной термической травмой после воздействия иNO

Фермент	Кинетический показатель	здоровые животные	КТТ	КТТ+NO
СОД	Kt, мин	2,63±0,09	5,85±0,16*	2,04±0,07 */**
	Vmax, мкмоль/мин	9,88±0,17	6,94±0,13*	10,63±0,28 */**
	Vmax/Kt, мкмоль/мин ²	3,76±0,11	1,19±0,07*	5,21±0,13 */**
Каталаза	Kt, мин	0,79±0,05	1,86±0,05*	0,84±0,05 **
	Vmax, мкмоль/мин	7,85±0,08	5,07±0,12*	7,99±0,14 **
	Vmax/Kt, мкмоль/мин ²	9,94±0,15	2,73±0,10*	9,51±0,16 **
ГР	Kt, мин	1,17±0,04	1,23±0,13	0,74±0,02 */**
	Vmax, мкмоль/мин	8,59±0,08	6,14±0,13*	5,68±0,09 */**
	Vmax/Kt, мкмоль/мин ²	7,34±0,12	4,99±0,17*	7,68±0,15 **
Гл-6-фДГ	Kt, мин	0,58±0,03	0,65±0,10	0,39±0,02 */**
	Vmax, мкмоль/мин	7,65±0,12	4,92±0,21*	9,05±0,17 */**
	Vmax/Kt, мкмоль/мин ²	13,19±0,06	7,57±0,14*	23,21±1,05 */**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с КТТ ($p < 0,05$).

фермента к субстрату реакции и Vmax/Kt (табл. 1). При КТТ в эритроцитах Vmax/Kt увеличилась под влиянием ингаляций NO для СОД – в 4,4 раза ($p < 0,001$), для Гл-6-фДГ – в 3,1 раза ($p < 0,001$) по сравнению с показателями крыс с КТТ без лечения. Активация каталазы в эритроцитах при КТТ под влиянием иNO сопровождалось повышением Vmax и Vmax/Kt. Kt и Vmax для каталазы нормализовались под влиянием ингаляций NO при КТТ. Под влиянием иNO Vmax/Kt ГР нормализовалась (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов в крови при КТТ наибольшее ингибирование отмечено для каталазы. Кинетическим методом анализа впервые установлен характер ингибирования ферментов при КТТ: для СОД и каталазы в эритроцитах – двухпараметрически согласованное, для ГР и Гл-6-фДГ – каталитическое. иNO при КТТ активировал СОД, каталазу, ГР и Гл-6-фДГ.

Список литературы/References:

1. Крылов К.М., Орлова О.В., Шлык И.В. Алгоритм действий по оказанию медицинской помощи пострадавшим с ожогами на догоспитальном этапе. *Скорая медицинская помощь*, 2010, № 2, с. 55-59. [Krylov K.M., Orlova O.V., Shlyk I.V. The algorithm of actions for providing medical care to victims with burns at the pre-hospital stage. *Skoraya medicinskaya pomoshch'*, 2010, no. 2, pp. 55-59. (In Russ.)]
2. Глуткин А.В., Ковальчук В.И. *Термический ожог кожи у детей раннего возраста (опыт эксперимента и клиники)*. Монография. Гродно: ГрГМУ, 2016, 180 с. [Glutkin A.V., Koval'chuk V.I. *Thermal skin burn in young children (experimental and clinical experience)*. Monograph. Grodno: GrGMU, 2016, 180 p. (In Russ.)]
3. Шень Н.П. *Ожоги у детей*. М.: Триада-Х, 2011, 148 с. [Shen' N.P. *Burns in children*. М.: Triada-H, 2011, 148 p. (In Russ.)]
4. Mendonca Machado N., Gragnani A., Masako Ferreira L. Burns, metabolism and nutritional requirements. *Nutr. Hosp.*, 2011, vol. 26, no. 4, pp. 692-700, doi: 10.1590/S0212-16112011000400005.
5. Mokline A., Abdenneji A., Rahmani I., Gharsallah L., Tlaili S., Harzallah I., Gasri B., Hamouda R., Messadi A.A. Lactate: prognostic biomarker in severely burned patients. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 2017, vol. 30, no. 1, pp. 35-38.
6. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*, 2015, т. 14, № 4, с. 35-41. [Pozhilova E.V., Novikov V.E. Nitric oxide synthase and endogenous nitric oxide in cell physiology and pathology. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 35-41. (In Russ.)]
7. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Карелин В.И., Селемир В.Д. Влияние NO-содержащего газового потока на некоторые параметры энергетического метаболизма эритроцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2014, т. 158, № 7, с. 40-42. [Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Karelin V.I., Selemir V.D. The effect of the NO-containing gas flow on some parameters of the energy metabolism of red blood cells. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*, 2014, vol. 158, no. 7, pp. 40-42. (In Russ.)]
8. Перетягин С.П., Мартусевич А.К., Гришина А.А., Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. *Лабораторные животные в экспериментальной медицине*. Монография. Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России, 2011, 300 с. [Peretyagin S.P., Martusevich A.K., Grishina A.A., Soloveva A.G., Zimin YU.V. *Laboratory animals in experimental medicine*. Monograph. Nizhnij Novgorod: FGU «NNIITO» Minzdravsocrazvitiya Rossii, 2011, 300 p. (In Russ.)]
9. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. Влияние динитрозильных кооплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой. *Биофизика*,

2014, т. 59, № 6, с. 1173-1179. [Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Davyduk A.V. The influence of dinitrosyl iron complexes on blood metabolism in rats with thermal trauma. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 6, pp. 954-959. (In Russ.)]

10. Сирота Т.В. Стандартизация и регуляция скорости супероксидгенирующей реакции автоокисления адреналина, используемой для определения про/антиоксидантных свойств различных материалов. *Биомедицинская химия*, 2016, т. 62, № 6, с. 650-655. [Sirota T.V. Standardization and regulation of the rate of the superoxide-generating epinephrine autooxidation reaction used to determine the pro/antioxidant properties of various materials. *Biomedical Chemistry*, 2016, vol. 62, no. 6, pp. 650-655, doi: 10.18097/PBMC20166206650. (In Russ.)]

11. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений. Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011, 61 с. [Sibgatullina G.V., Naertdinova L.R., Gumerova E.A., Akulov A.N., Kostyukova YU.A., Nikonorova N.A., Romyanceva N.I. *Methods for determining the redox status of cultured plant cells. Educational and methodical manual*. Kazan': Kazanskij (Privolzhskij) Federal'nyj universitet, 2011, 61 p. (In Russ.)]

12. Кочетов Г.А. *Практическое руководство по энзимологии*. М.: Высшая школа, 1980, 272 с. [Kochetov G.A. *Practical guide to enzymology*. М.: Vysshaya shkola, 1980, 272 p. (In Russ.)]

13. Kalb V.F. Jr, Bernlohr R.W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem.*, 1977, vol. 82, no. 2, pp. 362-371, doi: 10.1016/0003-2697(77)90173-7.

14. Kostir J. Prime stanoveni michaelisovy konstanty. *Chemicke Listy*, 1985, vol. 79, no. 9, pp. 989-991.

15. Крупянко В.И. Векторный метод представления ферментативных реакций. М.: Наука, 1990, 146 с. [Krupyanko V.I. *Vector method of representation of enzymatic reactions*. М.: Nauka, 1990, 146 p. (In Russ.)]

16. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*, 2009, т. 55, № 3, с. 255-277. [Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S. Glutathione system I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases. *Biomedical Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 3, pp. 211-220. (In Russ.)]

17. Коржов В.И., Жадан В.Н. Влияние полиненасыщенных жирных кислот на активность глутатионзависимых ферментов в цитозоле печени и эритроцитах крови крыс в норме и при экспериментальном хроническом бронхите. *Украинский биохимический журнал*, 2003, т. 75, № 4, с. 115-119. [Korzhev V.I., Zhadan V.N. The effect of polyunsaturated fatty acids on the activity of glutathione-dependent enzymes in the liver cytosol and red blood cells of rats in normal and experimental chronic bronchitis. *Ukrainskij biokhimicheskij zhurnal*, 2003, vol. 75, no. 4, pp. 115-119. (In Russ.)]

18. Spolarics Z., Siddiqi M., Siegel J.H., Garcia Z.C., Stein D.S., Ong H., Livingston D.H., Denny T., Deitch E.A. Increased incidence of sepsis and altered monocyte functions in severely injured type A-glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient African American trauma patients. *Crit. Care Med.*, 2001, vol. 29, pp. 728-736, doi: 10.1097/00003246-200104000-00005.

THE INFLUENCE OF NITRIC OXIDE ON KINETIC PROPERTIES OF ANTIOXIDANT PROTECTION ENZYMES IN THE BLOOD DURING EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Soloveva A.G.

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Minin and Pozharsky square, 10/1, Nizhny Novgorod, 603005, Russia; e-mail: sannag5@mail.ru

Received 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0542

Abstract. Combined thermal trauma (CTT), including thermal inhalation exposure and burns of the skin, is often found in victims entering burn centers. The aim of the study was to study the peculiarities of regulation of antioxidant protection enzymes in the blood during experimental CTT under the influence of NO. The experiment was carried out on 30 white male rats of the Wistar line. The animals were divided into 3 groups of equal numbers: 1 – intact rats; 2 – control – animals with CTT; 3 – experimental – animals with CTT who received inhalation NO. Rats under anesthesia were subjected to contact burn (20% of the body surface) and thermal inhalation exposure. The animals were removed from the experiment after CTT for 10 days. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6-PDH) was determined in red blood cells. Inhalation-external exposure to NO during CTT was carried out daily for 10 days for 10 minutes. Kinetic parameters of the enzymatic reaction were calculated. Statistical processing of the results was carried out using Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA). It was shown that against the background of a decrease in the activity of antioxidant enzymes in the blood during CTT, the greatest inhibition was noted for catalase. The kinetic method of analysis for the first time established the nature of enzyme inhibition in CTT: for SOD and catalase in erythrocytes – two-parametrically consistent, for GR and G6-PDH – catalytic. Inhalations of NO during CTT activated SOD, catalase, GR and G6-PDH.

Key words: combined thermal injury, nitric oxide, antioxidant protection enzymes.

ЦИСТАМИН И ЦИСТИН ПОДАВЛЯЮТ ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹,
Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199033, РФ; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ

Поступила в редакцию 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0543

Аннотация. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na^+ в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено. С помощью метода фиксации потенциала исследовано влияние дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистина и цистамина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Впервые показано, что обработка кожи лягушки *Rana temporaria* цистамином или цистином в концентрации 10 мкг/мл снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ . Обнаружено также, что предварительная инкубация с дитиотреитолом, восстанавливающим дисульфидные связи в белках, предотвращает ингибирующий эффект цистамина и цистина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется дисульфидсодержащими окисляющими агентами, такими как цистамин или цистин, а также о том, что влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки опосредовано их взаимодействием с функционально важными остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , цистамин, цистин, дитиотреитол, эпителий кожи лягушки.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Для практической медицины большой интерес имеет изучение транспорта ионов в почке, являющейся уникальным органом по разнообразию, интенсивности и избирательности транспортных процессов, а также по многообразию механизмов их селективного регулирования. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевого пузырь амфибий. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки [1].

Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. В реабсорбирующих эпителиях ключевую роль в транспорте Na^+ играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах ENaC, определяют его редокс-чувствительность и являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов [2,3]. Внеклеточные фрагменты ENaC содержат CRD1 и CRD2 домены, богатые остатками цистеина, которые являются высококонсервативными среди членов семейства дегенерины/ENaC. Эти внеклеточные цистеиновые остатки, вероятно, участвуют в образовании дисульфидных связей, важных для правильного фолдинга белка [3] и транслокации каналов к плазмалемме [2,3]. Трансмембранные сегменты и N- и C-терминальные фрагменты α , β и γ субъединиц ENaC также содержат остатки цистеина, которые доступны для окисляющих и восстанавливающих агентов со стороны цитозоля [4]. Согласно двухмембранной модели активного транспорта Na^+ эпителиальными клетками, предложенной Кефед-Джонсеном и Уссингом, Na^+ удаляется из клетки при помощи Na^+/K^+ -АТФазы, локализованной во внутренней (базолатеральной или серозной) мембране эпителиальных клеток [5]. Na^+/K^+ -АТФаза, как и другие ион-транспортирующие системы, чувствительна к действию окисляющих и восстанавливающих агентов [6]. Однако, большая часть данных о редокс-регуляции Na^+/K^+ -АТФазы получена для очищенного фермента или ферментного комплекса, экспрессированного в гетерологичных системах. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na^+ в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено.

Дисульфидсодержащие агенты цистин (цистеин дисульфид) и цистамин (цистинамин) – важные внутриклеточные антиоксиданты и радиопротекторы [7-9]. Цистин (цистеина дисульфид) является важным антиоксидантом. Увеличение внутриклеточной концентрации цистина наблюдается при наследственном аутосомно-рецессивном лизосомальном заболевании цистинозе, при котором нарушаются функции почек [7,9]. Цистамин (цистинамин) – радиопротекторное средство, повышает устойчивость организма к воздействию ионизирующей радиации. Кроме того, цистамин действует как антиоксидант и используется в терапии нейродегенеративного заболевания – болезни Хантингтона (Huntington's disease) [8,9]. В связи с этим, целью настоящего исследования являлось изучение влияния дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

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 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. 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 конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Для восстановления дисульфидных связей в молекулах белков использовали (2S,3S)-1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол – дитиотреитол (ДТТ). ДТТ добавляли за 20 мин до введения в раствор цистамина или цистина.

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: $I_{SC} = 13,57 \pm 2,28$ мкА; $V_{OC} = -37,88 \pm 1,94$ мВ; $g_T = 0,36 \pm 0,01$ мСм.

Показано, что обработка кожи лягушки дисульфидсодержащими окисляющими агентами цистином и цистамином снижает транспорт Na^+ в коже лягушки (табл. 1, рис. 1).

Стрелками обозначено уменьшение (\downarrow) значений электрических характеристик кожи после приложения цистамина или цистина по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов n (число измерений) = 10.

Полученные данные свидетельствуют также о том, что степень и кинетика ингибирующего действия цистамина и цистина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи и более выражено при приложении агентов со стороны апикальной поверхности кожи (табл. 1, рис. 1). Можно предположить, что влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Наиболее вероятно, что действие дисульфидсодержащих агентов на транспорт Na^+ в коже лягушки связано с их способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na^+ -транспортирующих

Таблица 1. Влияние цистамина и цистина на электрические характеристики кожи лягушки

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи лягушки, %	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
<u>Цистамин</u> , 10 мкг/мл	I_{SC}	$\downarrow 38,54 \pm 9,34$	$\downarrow 16,23 \pm 1,87$
	V_{OC}	$\downarrow 40,05 \pm 11,03$ %	$\downarrow 19,48 \pm 2,36$
	g_T	$\downarrow 2,34 \pm 0,15$	$\downarrow 2,51 \pm 0,12$
<u>Цистин</u> , 10 мкг/мл	I_{SC}	$\downarrow 48,34 \pm 12,26$	$\downarrow 12,86 \pm 3,05$
	V_{OC}	$\downarrow 45,11 \pm 9,64$	$\downarrow 12,23 \pm 3,77$
	g_T	$\downarrow 3,24 \pm 0,18$	$\downarrow 1,94 \pm 0,08$

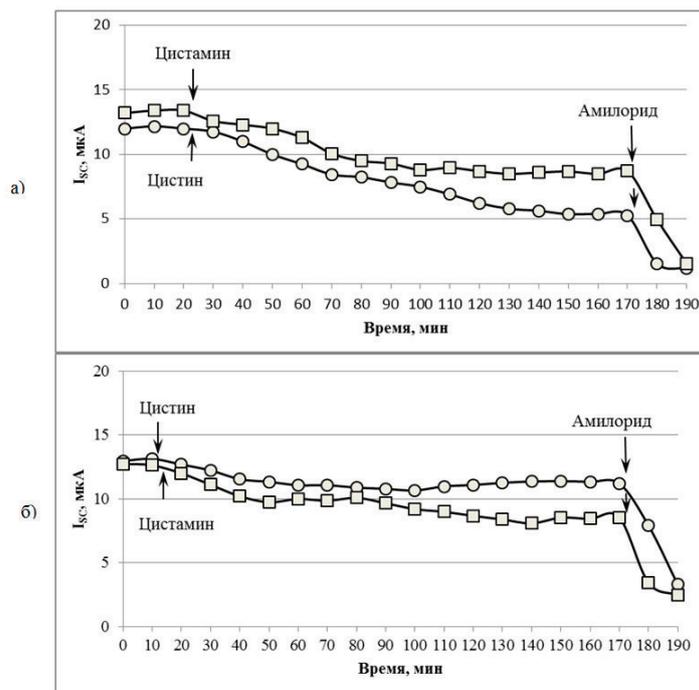


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на действие цистина или цистамина в концентрации 10 мкг/мл при приложении дисульфидсодержащих окислителей к апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи

белков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать влияние дитиотреитола (ДТТ), восстанавливающего дисульфидные связи в белках, на эффект цистина и цистамина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Обнаружено, что предварительная обработка кожи лягушки в течение 20 мин ДТТ в концентрации 1 мМ, существенно снижает ингибирующее действие цистина и цистамина на трансэпителиальный транспорт Na^+ (табл. 2, рис. 2). Это свидетельствует о том, что влияние цистамина или цистина на транспорт Na^+ опосредовано взаимодействием этих окисляющих агентов с функционально важными остатками цистеина транспортных или регуляторных белков, участвующих в транспорте Na^+ в коже лягушки.

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

Известно, что ключевые Na^+ -транспортирующие белки (ENaC, Na^+ - K^+ -АТФазы и Na^+ / H^+ -обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для действия внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2-4]. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1, 2). Кроме того, полученные нами результаты о том, что ингибирующий эффект цистамина и цистина значительно менее выражен при приложении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи,

Таблица 2. Влияние цистамина и цистина на электрические характеристики кожи лягушки, предварительно обработанной 1 мМ ДТТ

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи лягушки, %	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Cистамин, 10 мкг/мл	I_{sc}	↓ 8,24 ± 2,35	↓ 5,32 ± 1,48
	V_{oc}	↓ 10,12 ± 3,96	↓ 8,04 ± 1,16
	g_T	—	↓ 1,63 ± 0,08
Cистин, 10 мкг/мл	I_{sc}	↓ 15,12 ± 6,32	↓ 9,21 ± 3,12
	V_{oc}	↓ 17,29 ± 8,11	↓ 12,34 ± 3,79
	g_T	—	↓ 1,87 ± 0,09

Стрелками обозначено уменьшение (↓) значений электрических характеристик кожи после приложения цистамина или цистина по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов n (число измерений) = 10

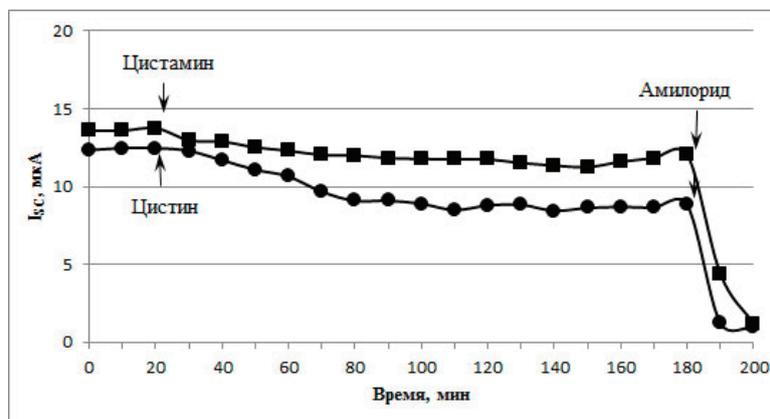


Рисунок 2. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на действие цистина или цистамина в концентрации 10 мкг/мл при приложении дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 20 мин дитиотрептолом (ДТТ) в концентрации 1 мМ

также свидетельствуют о том, что основные мишени для действия цистамина и цистина на транспорт Na^+ локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки. Наиболее вероятно предположить, что эффект цистамина и цистина на транспорт Na^+ обусловлен, в основном, модуляцией активности ENaC, экспрессируемых в апикальных мембранах полярных клеток эпителия.

В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ). Сходные данные были получены при приложении дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной ДТТ (табл. 2).

По-видимому, исследуемые дисульфидсодержащие соединения – цистамин и цистин, приложенные со стороны апикальной поверхности кожи, взаимодействуют с богатыми цистеином экстраклеточными доменами ENaC (CRD₁ и CRD₂), что приводит к ингибированию активности ENaC и подавлению транспорта Na^+ в коже лягушки.

Кроме того, цистин и цистамин могут также проникать в эпителиальные клетки. Цистамин, будучи незаряженным, хорошо проникает через мембрану. Цистин может транспортироваться в клетку с участием гетеромерных переносчиков аминокислот: $b^{0,+}$ переносчика, обнаруженного в апикальной мембране эпителиальных клеток, или в результате обращенного режима работы переносчика LAT2/4F2hc, локализованного в базолатеральной мембране эпителиальных клеток [10]. Таким образом, ингибирующее влияние цистина и цистамина на транспорт Na^+ , по-видимому, является результатом сочетанного действия этих дисульфидсодержащих агентов как на экстраклеточные, так и на расположенные со стороны цитозоля функционально важные остатки цистеина ENaC и/или других Na^+ -транспортирующих белков.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Обнаружено, что ENaC лягушки *X. laevis*, крысы и человека, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*, быстро и обратимо ингибируются внутриклеточными агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина: производными метантиосульфата (0,1–0,5 мМ) [4, 11], катионами металлов (500 мкМ Cd^{2+} или 500 мкМ Zn^{2+}), а также Cu^{2+} фенантролином $Cu(Phe)_3$, мягким окисляющим агентом, который способствует образованию S-S связей [4]. С использованием метода пэтч-клэмп показано, что эти окисляющие агенты ингибируют активность ENaC, вызывая длительные закрывания канала, что свидетельствует о влиянии на воротный механизм каналов. Амплитуда токов через одиночные каналы при этом не изменяется. Восстанавливающий агент 10 мкМ ДТТ практически полностью обращает ингибирующее действие всех тиол-модифицирующих соединений [4].

Эти данные убедительно показывают, что ENaC чувствительны к изменению редокс-состояния цитозоля и что изменение внутриклеточного редокс-потенциала может регулировать транспорт Na^+ в эпителиальных системах. Физиологическую значимость модуляции ENaC и других Na^+ -транспортирующих белков внутриклеточными остатками цистеина еще предстоит установить. Однако уже сейчас ведется интенсивный поиск и разработка новых и эффективных средств модуляции активности таких белков различными окислительно-восстановительными и сульфгидрильными реагентами.

Интересные данные были получены при исследовании влияния чеснока (*Allium sativu*) и его характерных сероорганических соединений на активность ENaC. Обнаружено, что экстракт чеснока дозозависимо ингибирует ENaC человека, гетерологически экспрессируемых в ооцитах *Xenopus*. Действие экстракта чеснока блокировалось ДТТ и L-цистеином, что указывает на участие тиол-реактивных соединений [12]. В дальнейшем было установлено, что ингибирующий эффект экстракта чеснока связан с наличием в нем тиол-реактивного соединения - аллицина, который в концентрации 100 мкМ снижал активность ENaC на 77%. Предполагается, что эффект аллицина может быть обусловлен как непосредственным взаимодействием этого тиол-реактивного соединения с цистеиновыми остатками ENaC, изменяющими активность канала, так и за счет модификации аллицином различных сигнальных белков или ферментов, которые, в свою очередь, модулируют активность

ENaC, что хорошо согласуется с медленной кинетикой действия экстракта чеснока на ENaC. Так, известно, что модификация остатков цистеина аллицином ингибирует активность некоторых ферментов, таких как цистеиновые протеазы [13].

Известно, что протеолитический процессинг ENaC различными протеазами важен для активации канала [14,15]. Неадекватная активация ENaC протеазами может способствовать патофизиологии муковисцидоза и может быть связана с задержкой натрия и патогенезом артериальной гипертензии при почечной недостаточности. Протеазы активируют ENaC, расщепляя специфические сайты во внеклеточных доменах α -, γ - и δ -субъединицы, но не β -субъединицы [14]. Также сообщалось, что протеазы могут косвенно влиять на активность ENaC [16]. Помимо сериновых протеаз, в протеолитической активации ENaC могут участвовать и другие группы протеаз, в том числе, металлопротеиназы [17] и катепсиновые протеазы [18].

Как известно, протеазы классифицируют в соответствии с их каталитическим активным центром на шесть групп: аспаргатные, глутаминовые, металло-, сериновые, треониновые и цистеиновые протеазы. Цистеиновые протеазы, такие как катепсины, играют важную роль в различных воспалительных/иммунных заболеваниях и обладают широким спектром (пато-)физиологических эффектов [19]. Как правило, цистеиновые протеазы секретируются макрофагами и эпителиальными клетками при травмах и заболеваниях. Например, катепсиновая протеаза Cat-S экспрессируется в почках, селезенке, лимфатических узлах и легких [20], а также антигенпрезентирующими клетками и макрофагами, что обеспечивает ее секрецию в широком диапазоне различных тканей и органов [21].

Обнаружено, что Cat-S активирует токи через ENaC в ооцитах, экспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -ENaC человека и в культуре клеток собирательных трубочек мыши M-1 [18]. Приложение Cat-S (2 мкМ) со стороны апикальной поверхности приводило к устойчивому увеличению чувствительного к амилориду I_{sc} , в среднем, на 24%, что свидетельствует о том, что Cat-S может стимулировать ENaC-опосредованный трансэпителиальный транспорт натрия в дифференцированных почечных эпителиальных клетках. Предполагается, что цистеиновая протеаза Cat-S активирует ENaC, скорее всего, путем протеолитического расщепления ее γ -субъединицы на поверхности клетки. Таким образом, стимуляция ENaC локально высвобождаемым Cat-S может играть патофизиологическую роль при самых различных воспалительных заболеваниях, например, при колите или нефрите.

Как уже упоминалось нами ранее, дисульфидсодержащие окисляющие агенты, в том числе, цистамин, широко используются в терапии нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Хантингтона [7,9]. В данном случае, в основе терапевтического эффекта цистамина лежит его способность ингибировать некоторые тиолзависимые ферменты, такие как трансклутаминазы [22] или цистеиновые протеазы – каспазы [7]. В связи с этим, можно предположить, что эффект цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки также может быть опосредован модуляцией этими тиол-реактивными соединениями активности некоторых ферментов, таких как, например, протеазы, которые в свою очередь, влияют на активность широкого спектра Na^+ -транспортирующих белков.

Таким образом, в настоящей работе впервые исследовано влияние дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистина и цистамина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Нами показано, что транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется дисульфидсодержащими окисляющими агентами, такими как цистамин и цистин. Обнаружено, что дисульфидсодержащие окисляющие агенты, приложенные со стороны апикальной поверхности кожи, существенно подавляют транспорт Na^+ , при этом наибольшее ингибирующее действие на транспорт Na^+ оказывает цистин. Цистин и цистамин, добавленные со стороны базолатеральной поверхности кожи, вызывают некоторое снижение транспорта Na^+ . Показано также, что регуляторное влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки опосредовано их взаимодействием с функционально важными остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков.

Полученные нами данные о влиянии цистамина и цистина на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия этих аминокислот, широко применяемых в клинической практике для смягчения окислительного стресса, купирования процессов воспаления, и усиления врожденных нейропротекторных механизмов при лечении нейродегенеративных и нервно-психических заболеваний. Кроме того, открытие новых соединений, влияющих на активность ENaC и других Na^+ -транспортирующих белков, актуально для биомедицинских исследований многих патологий и является предпосылкой для разработки новых фармакологических средств терапии подобных состояний.

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. Benos D.J., Stanton B.A. Functional domains within the degenerin/epitelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol.*, 1999, vol. 520, pp. 631-644.

3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Kellenberger S., Gautschi I., Pfister Y., Schild L. Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, pp. 7739-7747.
5. Koefoed-Johnsen V., Ussing H.H. The nature of the frog skin potential. *Acta. Physiol. Scand.*, 1958, vol. 42, pp. 298-308.
6. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
7. Coor C., Salmon R.F., Quigley R., Marver D., Baum M. Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaKATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *J. Clin. Invest.*, 1991, vol. 87, pp. 955-961.
8. Lesort M., Lee M., Tucholski J., Johnson G.V.W. Cystamine inhibits caspase activity. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 3825-3830.
9. Paul B.D., Snyder S.H. Therapeutic applications of cysteamine and cystamine in neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *Front. Neurol.*, 2019, vol. 10, art. 1315.
10. Wagner C.A., Lang F., Broer S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Amer. J. Physiol.*, 2001, vol. 281, pp. C1077-C1093.
11. Sheng S.H., Li J.Q., McNulty K.A., Kieber-Emmons T., Kleyman T.R. Epithelial sodium channel pore region. Structure and role in gating. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 1326-1334.
12. Krumm P., Giraldez T., Alvarez de la Rosa D., Clauss W.G., Fronius M., Althaus M. Thiol-reactive compounds from garlic inhibit the epithelial sodium channel (ENaC). *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, vol. 20, pp. 3979-3984.
13. Waag T., Gelhaus C., Rath J., Stich A., Leippe M., Schirmeister T. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, vol. 20, pp. 5541-5543.
14. Kleyman T.R., Carattino M.D., Hughey R.P. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 20447-20451.
15. Rossier B.C., Stutts M.J. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu. Rev. Physiol.*, 2009, vol. 71, pp. 361-379.
16. Bengrine A., Li J., Hamm L.L., Awayda M.S. Indirect activation of the epithelial Na⁺ channel by trypsin. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 26884-26896.
17. Garcia-Caballero A., Ishmael S.S., Dang Y., Gillie D., Bond J.S., Milgram S.L., Stutts M.J. Activation of the epithelial sodium channel by the metalloprotease meprin β -subunit. *Channels (Austin)*, 2011, vol. 5, pp. 14-22.
18. Haerteis S., Krappitz M., Bertog M., Krappitz A., Baraznenok V., Henderson I., Lindstrom E., Murphy J.E., Bunnett N.W., Korbmayer C. Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the cysteine protease cathepsin-S. *Eur. J. Physiol.*, 2012, vol. 464, pp. 353-365.
19. Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 2008, vol. 90, pp. 194-207.
20. Kirschke H., Wiederanders B., Bromme D., Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.*, 1989, vol. 264, pp. 467-473.
21. Zavasnik-Bergant T., Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*, 2006, vol. 67, pp. 349-355.
22. Lorand L., Conrad S.M. Transglutaminase. *Mol. Cell Biochem.*, 1984, vol. 58, pp. 9-35.

CYSTAMINE AND CYSTINE SUPPRESS Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN EPITHELIUMMelnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badyulina V.I.¹¹ Saint Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, St. Petersburg, 199033, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

²S.M. Kirov Military Medical Academy

st. Academician Lebedeva, 6, St. Petersburg, 194044, Russia

Received 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0543

Abstract. Amphibian skin and other isolated epithelial systems are classical model objects for studying the mechanisms of transepithelial ion transport. Na^+ transport in osmoregulatory epithelium is a complex, multicomponent system, which involves Na^+ transporting proteins and signaling cascades localized in various cell membranes. The protein components of this system may be a target for oxidative stress. At the same time, the effect of oxidizing and reducing agents on Na^+ transport in native epithelial systems, such as frog skin epithelium, practically has not been studied. Using voltage-clamp technique the effect of disulfide-containing oxidizing agents cystine and cystamine on Na^+ transport in frog skin was investigated. It has been shown for the first time that the treatment of the skin of the *Rana temporaria* frog with cystamine or cystine at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ suppresses the transepithelial Na^+ transport. It was also found that the preincubation with dithiothreitol, which reduces disulfide bonds in proteins, prevents the inhibitory effect of cystamine and cystine. The obtained results indicate that Na^+ transport in the frog skin is sensitive to oxidative stress and is modulated by disulfide-containing oxidizing agents, such as cystamine or cystine, and also that the effect of cystamine and cystine on Na^+ transport in the frog skin epithelium is mediated by their interaction with functionally important cysteine residues of Na^+ -transporting proteins.

Key words: Na^+ transport, cystamine, cystine, dithiothreitol, frog skin epithelium.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА САЛЬМОНЕЛЛЫ НА ДИФФУЗИЮ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В АЛЬГИНАТНОМ ГИДРОГЕЛЕ

Новаковская М.В., Игнатъева М.М., Черенков И.А.

Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: gvomavl@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0544

Аннотация. В работе рассматриваются данные электрохимических экспериментов по исследованию диффузии толуидинового синего в альгинатном гидрогеле с непосредственным добавлением липополисахарида разных концентраций в систему. С помощью метода циклической вольтамперометрии были зафиксированы изменения силы тока, протекающего через электрохимическую ячейку, на которую накладывалось напряжение, изменяющееся во времени. Была выявлена зависимость окислительно-восстановительных превращений фенотиозинового красителя в модельных растворах эндотоксина. Показано, что присутствие бактериального токсина в альгинатном гидрогеле оказывает значительное влияние на электрохимическое поведение красителя - в диапазоне концентраций липополисахарида 0,1-10 мкг/мл. На всех полученных вольтамперограммах зафиксированы качественные изменения по сравнению с контрольным образцом. Внесённый липополисахарид, выделенный из бактерий *Salmonella typhi* способствовал повышению и анодного, и катодного токов, а также сдвигу значений потенциалов как при непосредственном его добавлении в ячейку, так и через 30 минут диффузии. В зависимости «ток-время» для восстановительного процесса замечено повышение катодных пиковых значений с увеличением концентрации эндотоксина в электрохимической системе. Полученные данные указывают на важность учёта качественного состава гидрогелевой среды, а также вводимых в неё дополнительных компонентов при проведении биоэлектрохимического эксперимента.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, альгинат, гидрогель, толуидиновый синий, липополисахарид.

Применение электрохимических методов анализа для решения биомедицинских задач является перспективным современным направлением. Используя подходы электрохимии, можно количественно оценить внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы [1], определить активность ферментов [2,3], исследовать взаимодействие биологически значимых молекул на поверхности электрода [4]. Современные электрохимические методы позволяют без существенного повреждающего воздействия на образец провести качественное и количественное определение электроактивных компонентов, их распределение и окислительно-восстановительное состояние в модельном гидрогелевом матриксе [5,6].

Многие клеточные популяции реагируют на присутствие ЛПС активацией окислительно-восстановительных процессов [7], которые можно оценить электрохимическими методами. Перспективным выглядит использование ЛПС как стимулятора в клеточных биоэлектрохимических модельных системах. Однако известна способность ЛПС непосредственно связываться с фенотиозиновыми красителями, в частности с толуидиновым синим [8], что может оказать влияние на результат биоэлектрохимического эксперимента не связанное с клеточной активностью. Целью настоящей работы стало исследование влияния бактериального липополисахарида на электрохимическое поведение толуидинового синего в среде альгинатного гидрогеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались планарные электродные системы (ООО «КолорЭлектроникс»), включающие рабочий и вспомогательный электроды (графитовые), а также электрод сравнения – хлорсеребряный. Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов +1000...-1000 мВ в среде ФР для стабилизации характеристик. Для формирования гидрогелевой среды на поверхности рабочего электрода использовали альгинат натрия на физиологическом растворе (ФР, рН = 6,83, ООО «Гротекс»), которые готовили непосредственно перед экспериментом. В готовые образцы добавляли ЛПС *Salmonella typhi* («Пиругенал») различной концентрации. Для полимеризации альгината использовали 2 М раствор хлорида кальция, наносимый непосредственно на рабочий электрод при подготовке. Избыток раствора через некоторое время удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Наличие и локализацию гелевой капли на рабочем электроде контролировали с помощью цифрового микроскопа «Биолаб В-3 LCD». Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовался диапазон потенциалов 0...-450 мВ (отн. Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала 35 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 30 минут с интервалами в 5 минут. Концентрация толуидинового синего во всех измерениях была постоянной и составила 0,1 мМ. Фоновым электролитом служил ФР. Согласно рекомендациям традиционной номенклатуры, на графиках ЦВА отрицательные токи соответствуют процессам электроокисления, а положительные – процессам электровосстановления [9].

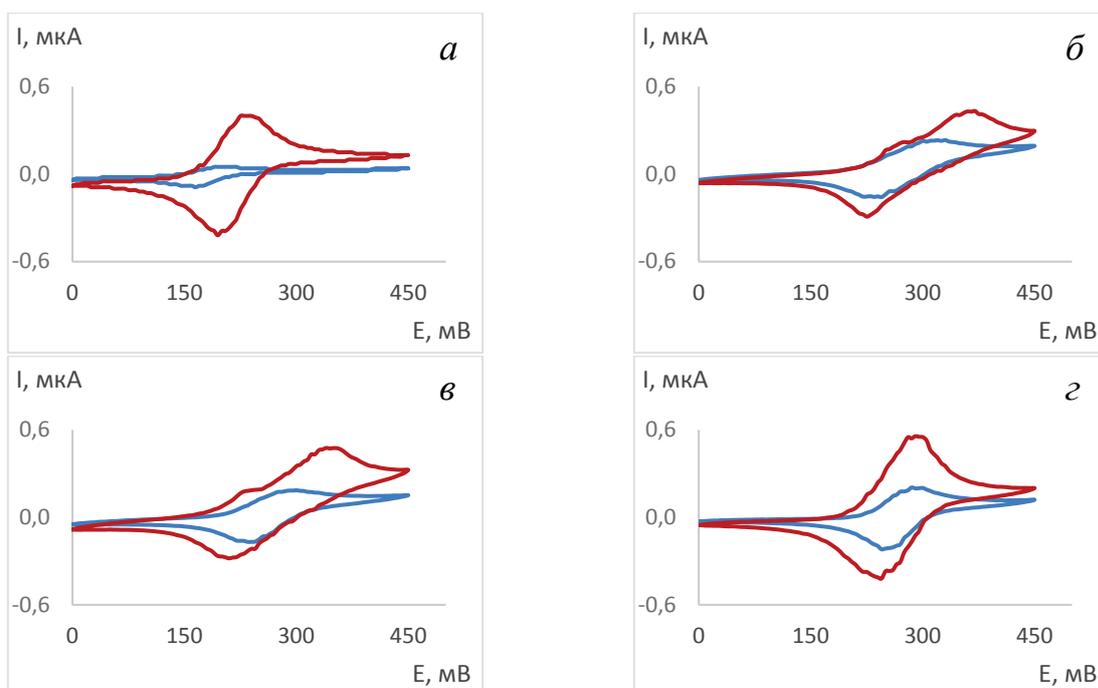


Рисунок 1. Вольтамперограммы ЦВА толуидинового синего в момент начала измерения (синий) и через 30 минут (красный) в среде альгинатного гидрогеля 2% без добавления ЛПС (а), в присутствии ЛПС разных концентраций: 0,1 мкг/мл (б), 1 мкг/мл (в), 10 мкг/мл (г). Графитовый электрод. Фоновый электролит ФР рН 6,83. Скорость развертки потенциала 35 мВ/с. Усреднённые данные по 5 экспериментам

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В серии экспериментов ЛПС добавляли в ячейку непосредственно перед измерениями. Такая схема имитирует стимуляцию клеток на электроде *in situ*. Анализируемыми параметрами были пиковые значения силы тока, отражающие окисление или восстановление ТС, соответствующие им значения потенциалов, а также изменения токов во времени - показатель диффузионных свойств гидрогелевой среды. В контрольном эксперименте (рис. 1а) без добавления ЛПС получена вольтамперограмма, отражающая близкое к обратимому поведение ТС – к 30 минуте эксперимента на ЦВА отчетливо фиксируется пик восстановления (при $E = +200$ мВ) и пик окисления ($E = +164,8$ мВ) абсолютные значения токов относительно базовой линии оказались равными, а значения потенциалов сближены ($\Delta E = 35,2$ мВ), что соответствует критериям обратимого электрохимического поведения ТС в условиях эксперимента. Диффузия в гидрогелевой среде обуславливает рост катодных токов в процессе измерений с $+0,05$ мкА до $+0,4$ мкА, а анодных – с $-0,08$ мкА до $-0,45$ мкА (табл. 1).

На всех циклических вольтамперных кривых после добавления ЛПС наблюдались качественные изменения по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). Внесение липополисахарида, по нашим данным, способствует повышению значений катодного и анодного тока на первых секундах эксперимента, что может быть вызвано формированием комплексов ТС и ЛПС [8,10] на электродной поверхности, облегчающих электрохимические превращения ТС. Возможность формирования полимерных комплексов ЛПС-ТС может объяснить и сдвиги потенциалов, наблюдаемые в экспериментах.

На 30-й минуте эксперимента отмечено более выраженное влияние ЛПС на электрохимические показатели превращений ТС. Пиковые значения катодных токов оказались ниже контрольных для концентраций ЛПС 0,1 и 1 мкг/мл, а при добавлении 10 мкг/мл – выше (табл. 2). Существенно ниже оказались анодные токи при содержании ЛПС в ячейке 0,1 и 1 мкг/мл. При этих концентрациях наблюдали максимальное значение разности потенциалов пиков (ΔE). Такие показатели приближают процесс электрохимических превращений ТС в

Таблица 1. Пиковые значения силы тока для процессов электровосстановления (I_{pc}) и электроокисления (I_{pa}) и соответствующие потенциалы при добавлении ЛПС

Концентрация ЛПС	I_{pc} , мкА	I_{pa} , мкА	I_{pc}/I_{pa}	E_{pc} , мВ	E_{pa} , мВ	ΔE
0	0,05	-0,08	0,63	200	164,8	35,2
0,1 мкг/мл	0,17	-0,19	0,89	315	235	80
1 мкг/мл	0,15	-0,17	0,88	290	244,8	45,2
10 мкг/мл	0,19	-0,21	0,9	290	250,3	39,7

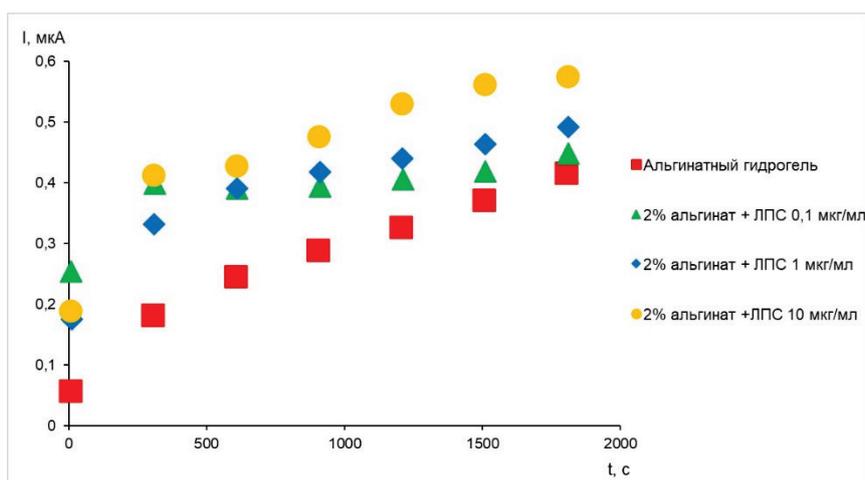


Рисунок 2. Изменения пиковых значений силы тока восстановления ТС (0,1 мМ) в среде альгината с ЛПС Графитовый электрод. Фоновый электролит ФР рН 6,83. Скорость развертки потенциала 35 мВ/с. Усреднённые данные по 5 измерениям

Таблица 2. Пиковые значения силы тока для процессов электровосстановления (I_{pc}) и электроокисления (I_{pa}) и соответствующих потенциалов при непосредственном добавлении ЛПС разных концентраций спустя 30 минут диффузии красителя

Концентрация ЛПС	I_{pc} , мкА	I_{pa} , мкА	I_{pc}/I_{pa}	E_{pc} , мВ	E_{pa} , мВ	ΔE
0	0,4	- 0,45	0,89	235	194,7	40,3
0,1 мкг/мл	0,35	- 0,18	1,94	365,1	225,3	139,8
1 мкг/мл	0,36	-0,15	2,4	340	214,9	125,1
10 мкг/мл	0,53	-0,42	1,26	290	244,8	45,2

присутствии малых концентраций ЛПС с критериями необратимости. При относительно высоких концентрациях ЛПС (10 мкг/мл) электрохимические показатели приближаются к контрольным значениям (табл. 2).

Обращает на себя внимание увеличение токов, характеризующих процесс электровосстановления ТС в присутствии ЛПС с концентрациями 0,1 и 1 мкг/мл. Возможным объяснением асимметрии вольтамперных кривых может быть большее сродство окисленной – катионной формы ТС к липополисахариду.

Зависимость «ток-время» для пиковых значений токов восстановления показала заметное превышение их значений на начальных этапах эксперимента в присутствии липополисахарида, не зависящее от его концентрации. К 15-й минуте эксперимента показатели токов сближаются с контрольными значениями, а с 20-й минуты заметно зависят от концентрации ЛПС.

Таким образом, присутствие липополисахарида сальмонеллы в модельном альгинатном гидрогеле оказывает существенное влияние на параметры электрохимических превращений толуидинового синего. Присутствие ЛПС повышает значения токов электровосстановления ТС, что необходимо учитывать при расчете эффективного коэффициента диффузии ТС по данным электрохимического эксперимента. Полученные данные говорят о важности учета качественного состава гидрогелевой среды при проведении биоэлектрохимического эксперимента.

Список литературы / References:

1. Rawson F.J., Downard A.J., Baronian K.H. Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, p. 5216.
2. Shumyantseva V.V., Bulko, T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods in biomedical studies. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 228-243.
3. Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г. Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле при воздействии пепсина. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3, с. 481-485. [Cherenkov I.A., Berezina L.S., Krivilyov M.D., Sergeev V.G. Diffusion of toluidine blue in alginate-gelatin hydrogel under the influence of pepsin. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 481-485. (In Russ.)]
4. Lopes P., Dyrnesli H., Lorenzen N., Otzen D., Ferapontova E.E. Electrochemical analysis of the fibrillation of Parkinson's disease α -synuclein. *Analyst*, 2014, vol. 139, no. 4, pp. 749-756.
5. Mozumder M.S., Mairpady A., Mourad A.H.I. Polymeric nanobiocomposites for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res., Part B Appl. Biomater.*, 2017, vol. 105, no. 5, pp. 1241-1259.
6. Черенков И.А. Кривилев М.Д., Игнатьева М.М., Вахрушева Е.В., Сергеев В.Г. Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толуидинового синего в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипсина. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 5, с. 865-870. [Cherenkov I.A., Krivilev M.D., Ignat'eva M.M., Vahrusheva E.V., Sergeev V.G.

Bioelectrochemical modeling of toluidine blue diffusion in a hydrogel in the presence of peroxidase and trypsin. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 5, pp. 733-737. (In Russ.)]

7. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и Клетки*, 2016, т. 11, № 1, с. 9-17. [Sarbaeva N.N., Ponomareva J.V., Milyakova M.N. Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. *Genes and Cells*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]

8. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. The Interaction of Lipopolysaccharides with Phenothiazine Dyes. *Lasers Surg. Med.*, 2003, vol. 33, no. 5, pp. 311-319.

9. *Электроаналитические методы*. Ред. Шольц Ф., М.: Бинوم "Лаборатория знаний", 2010, 326 с. [*Electroanalytical methods*. ed. Sholz F., M.: Binom "Laboratorija znaniy", 2010, 326 p. (In Russ.)]

10. Ribatti D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, vol. 176, no. 1., pp. 55-60.

INFLUENCE OF SALMONELLA LIPOPOLYSACCHARIDE ON THE DIFFUSION OF TOLUIDINE BLUE IN ALGINATE HYDROGEL

Novakovskaya M.V., Ignatieva M.M., Cherenkov I.A.

Udmurt State University

Universitetskaya str., 1, Izhevsk, 426034, Russia; e-mail: gvomavl@gmail.com

Received 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0544

Abstract. The paper considers the data of electrochemical experiments to study the diffusion of toluidine blue in an alginate hydrogel with the direct addition of lipopolysaccharide of different concentrations into the system. Using the method of cyclic voltammetry, changes in the strength of the current flowing through an electrochemical cell were recorded, on which a voltage varying over time was applied. The dependence of redox transformations of phenothiazine dye in model solutions of endotoxin was revealed. It has been shown that the presence of bacterial toxin in alginate hydrogel has a significant effect on the electrochemical behavior of the dye - in the range of lipopolysaccharide concentrations of 0.1-10 mcg/ml. Qualitative changes in comparison with the control sample were recorded on all received voltammograms. The introduced lipopolysaccharide isolated from *Salmonella typhi* bacteria contributed to an increase in both the anode and cathode currents, as well as a shift in potential values both when it was directly added to the cell and after 30 minutes of diffusion. Depending on the "current-time" for the recovery process, an increase in cathode peak values was observed with an increase in the concentration of endotoxin in the electrochemical system. The data obtained indicate the importance of taking into account the qualitative composition of the hydrogel medium, as well as the additional components introduced into it during the bioelectrochemical experiment.

Key words: cyclic voltammetry, alginate, hydrogel, toluidine blue, lipopolysaccharide.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ АНАЛИЗА ИК СПЕКТРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Бутяев Р.В.¹, Чернышев Д.А.¹, Михайлец Э.С.¹, Плотникова Л.В.¹, Гарифуллин А.Д.², Кувшинов А.Ю.², Волошин С.В.², Поляничко А.М.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет
ул. Ульяновская, 1, г. Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, e-mail: st069812@student.spbu.ru

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России
ул. 2-я Советская, 16, г. Санкт-Петербург, 191024, РФ
Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0545

Аннотация. Множественная миелома и хронический лимфолейкоз являются онкологическими заболеваниями крови, которые на сегодняшний день остаются неизлечимыми. В работе предложен метод классификации образцов сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом и здоровых доноров на основе анализа их спектров в среднем инфракрасном (ИК) диапазоне. ИК спектры сыворотки крови регистрировали с помощью ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 в растворе D₂O. Для анализа полученных спектров в данной работе был реализован алгоритм машинного обучения – метод главных компонент. Использование метода главных компонент позволило существенно упростить представление массива спектральных данных. В работе проанализировали 45 образцов сыворотки крови. В результате применения данного подхода исследованный набор образцов разбивается на три непересекающихся множества, соответствующих образцам сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом и здоровых доноров. Таким образом, метод главных компонент может быть успешно применен для классификации образцов сыворотки крови пациентов с диагнозами множественная миелома и хронический лимфолейкоз. Универсальность предложенного алгоритма позволяет ожидать, что в будущем возможно применение аналогичного подхода и для других онкогематологических заболеваний.

Ключевые слова: метод главных компонент, онкогематологические заболевания, ИК-спектроскопия, множественная миелома, хронический лимфолейкоз.

Множественная миелома (ММ) и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) являются широко распространёнными и в настоящее время неизлечимыми онкологическими заболеваниями крови (4-5 случаев на 100000) [1]. ММ характеризуются накоплением злокачественных плазматических клеток, которые продуцируют избыточное количество моноклональных иммуноглобулинов [2]. Это, помимо прочего, приводит к тому, что в сыворотке крови изменяется соотношение двух самых распространённых белков - альбуминов и иммуноглобулинов. Так как иммуноглобулины и альбумины имеют разную вторичную структуру, то следить за изменением их соотношения возможно, анализируя ИК-спектры сыворотки крови, как это было продемонстрировано ранее [3,4].

Упомянутый подход, однако, требует индивидуальной, по сути, ручной, обработки огромного количества спектров, а потому плохо применим для скрининга ММ. В качестве альтернативы мы применили некоторые из методов машинного обучения, в частности, метод главных компонент (МГК) [5]. МГК позволяет упростить представление массива данных и изобразить этот массив в существенно меньшем по размерности пространстве главных компонент. Этот метод, в отличие от большинства методов машинного обучения, решает проблему “проклятия размерности” [6], то есть проблему экспоненциального роста сложности задачи по мере увеличения количества переменных. Это очень важно при обработке спектральных данных, размерность которых очень высока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы сыворотки крови пациентов с диагнозами ММ и ХЛЛ, находящихся под наблюдением специалистов НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России. Все образцы сыворотки крови были получены по описанной ранее методике [4].

В работе исследовали 45 образцов сыворотки крови: 12 образцов больных множественной миеломой, 10 образцов больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и 23 образца здоровых доноров. Регистрацию спектров ИК поглощения проводили в растворах D₂O с использованием ИК Фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker). Спектральное разрешение составило 2 см⁻¹, представленные спектры получены путем усреднения по 128-ми последовательным накоплениям. В работе использовали жидкостную разборную кювету с тефлоновым спейсером толщиной 50 мкм и окнами BaF₂. Для достижения полного изотопного замещения образцы сыворотки крови подвергали трехкратной лиофильной сушке с последующим перерастворением в D₂O (99.9% Sigma) согласно описанной ранее методике [7].

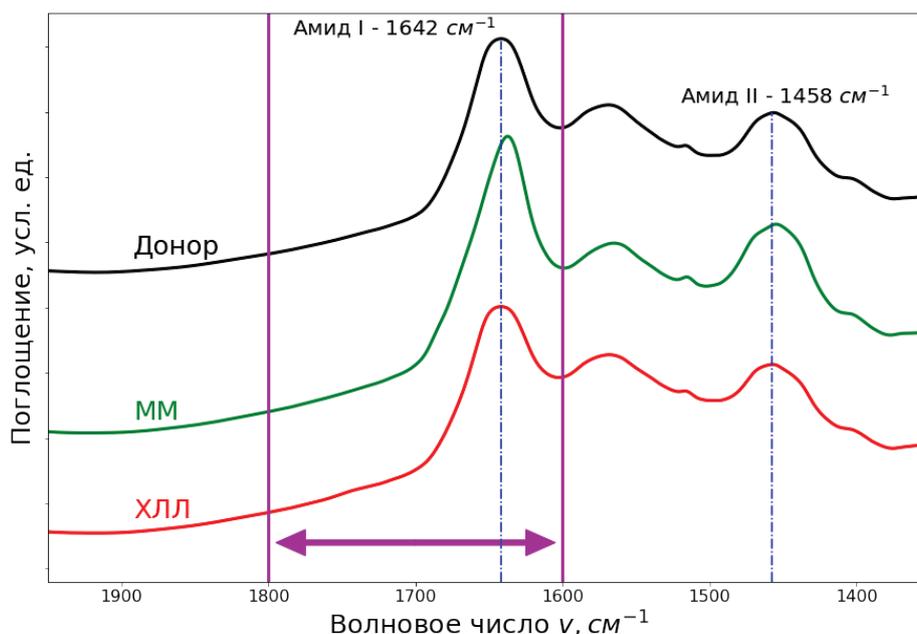


Рисунок 1. Характерные спектры образцов сыворотки крови людей трёх групп: ММ – множественная миелома, ХЛЛ – хронический лимфолейкоз, доноры. 1) – полосы поглощения амид I (пик – 1642 см^{-1}), отвечающие колебанию С=О связи. 2) – полосы поглощения амид II (пик – 1458 см^{-1}), отвечающие суперпозиции колебаний N-D и C-N связей. Стрелками выделен диапазон, к которому применялся МГК

МГК реализовали на языке Python (3.10) [8] в вычислительной среде Jupyter Notebook (версия 6.4.10-4) [9]. Программа написана на основе алгоритма NIPALS (нелинейный итеративный частичный метод наименьших квадратов) [5]. Перед применением алгоритма, спектры были нормированы и центрированы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были получены и проанализированы ИК спектры сыворотки крови больных ММ, ХЛЛ и здоровых доноров. На рисунке 1 представлены характерные спектры образцов сыворотки крови больных ММ, больных ХЛЛ и здоровых доноров в диапазоне ($1950\text{-}1350\text{ см}^{-1}$). На всех спектрах наблюдаются полосы поглощения пептидной группы: полоса амид I ($1600\text{-}1700\text{ см}^{-1}$), отвечающая колебанию С=О связи и полоса амид II ($1500\text{-}1400\text{ см}^{-1}$), отвечающая суперпозиции колебаний N-D и C-N связей.

Анализируя ИК спектры белков, можно получить информацию об их вторичной структуре. Наиболее часто, для определения вторичной структуры белка, используется полоса амид I [7], однако другие полосы тоже могут нести важную информацию. Поэтому для анализа спектров мы применили метод главных компонент.

Для анализа полученных спектров, весь набор данных можно представить в виде матрицы X размера

$$M \times N,$$

где M – количество образцов; N – количество точек в спектре. МГК представляет спектральные данные (матрицу X) как набор линейно независимых векторов в новом пространстве. Эти вектора называются главными компонентами.

Согласно МГК [10] матрицу X можно разложить на две матрицы существенно меньшей размерности: матрицу T, которая является матрицей проекций точек на главные компоненты и называется матрицей счётов, и матрицу P, которая является матрицей главных компонент и называется матрицей нагрузок. При чём матрица счётов T, обладая намного меньшей размерностью относительно матрицы X, будет иметь практически всю информацию о спектральных данных.

$$X = TP^t \quad (1)$$

где T – матрица проекций точек на главные компоненты; P^t – транспонированная матрица, состоящая из главных компонент в старых координатах

Каждая из главных компонент отвечает за какой-либо скрытый параметр, характеризующий данные, при чём, чем старше главная компонента, тем за больший процент информации об исходной системе она отвечает.

Для оптимизации работы алгоритма необходимо сузить спектральный диапазон до области, содержащей информацию о вторичной структуре белка. Оптимального разделения точек удалось достичь при анализе диапазона $1800\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ (см. рис. 2).

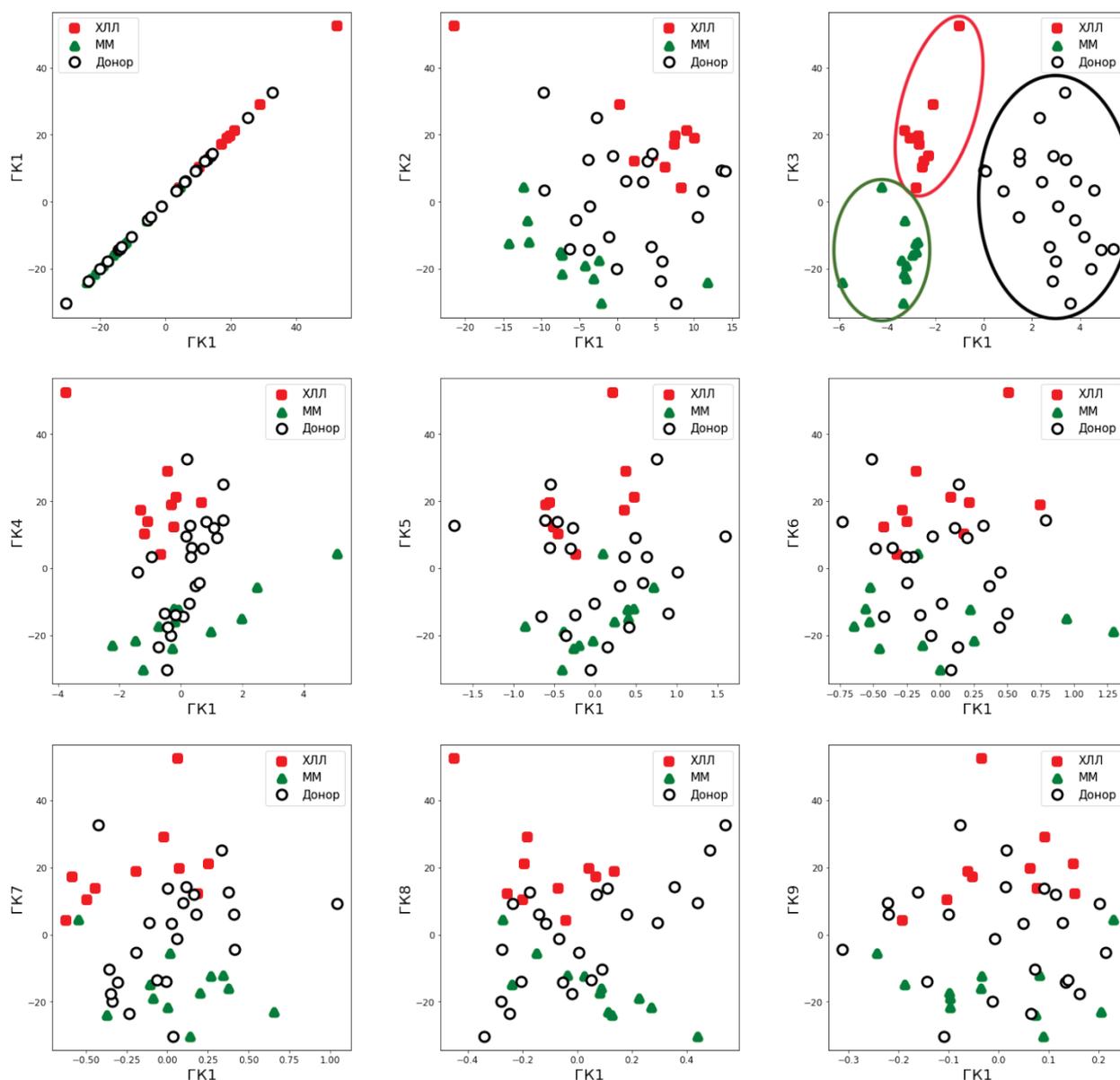


Рисунок 2. Зависимости первой главной компоненты от девяти первых главных компонент. Образцы на диаграмме обозначены следующим образом: ХЛЛ – красные квадраты, ММ – зеленые треугольники, здоровые доноры – черные окружности. На диаграмме ГК3-ГК1 точки, принадлежащие разным группам, выделяются наилучшим образом, поэтому группировки точек дополнительно обведены эллипсами соответствующего цвета – для наглядности

Применение МГК к выбранному диапазону дало следующие результаты. На рисунке 2 представлены первые девять главных компонент, отвечающие за 99,994% информации о системе.

Каждая из диаграмм представляет собой зависимость первой главной компоненты от одной из девяти главных компонент, а каждая точка отражает расположение одного образца в пространстве главных компонент. Для удобства, все точки раскрашены в один из трёх цветов, в зависимости от принадлежности образца: красные квадраты – больные ХЛЛ, зелёные треугольники – больные ММ, чёрные окружности – здоровые доноры.

Главные компоненты отражают поведение точек, вызванное каким-либо скрытым фактором, характеризующим данные. На всех диаграммах мы можем наблюдать по-разному распределённые точки. На диаграммах ГК4-ГК1 и ГК2-ГК1 наблюдается плотно лежащий набор точек, соответствующих образцам больных ХЛЛ. На диаграмме ГК4-ГК1 довольно плотно лежат точки ММ.

Однако наилучшим образом точки разделяются на диаграмме ГК3-ГК1. Там можно наблюдать три группы точек, соответствующих образцам ММ, ХЛЛ и здоровых доноров. Для удобства восприятия все точки выделены эллипсом цвета соответствующей группы.

Таким образом, опираясь на результат, представленный на диаграмме ГК3-ГК1, можно заключить, что МГК позволил разделить имеющиеся образцы на три группы в соответствии с диагнозом. Теперь, когда образцы из имеющегося набора классифицированы по трем группам, в соответствии с диагнозом, можно попробовать решить обратную задачу. Применим подход к спектру образца, не входившего в первоначальный, обучающий

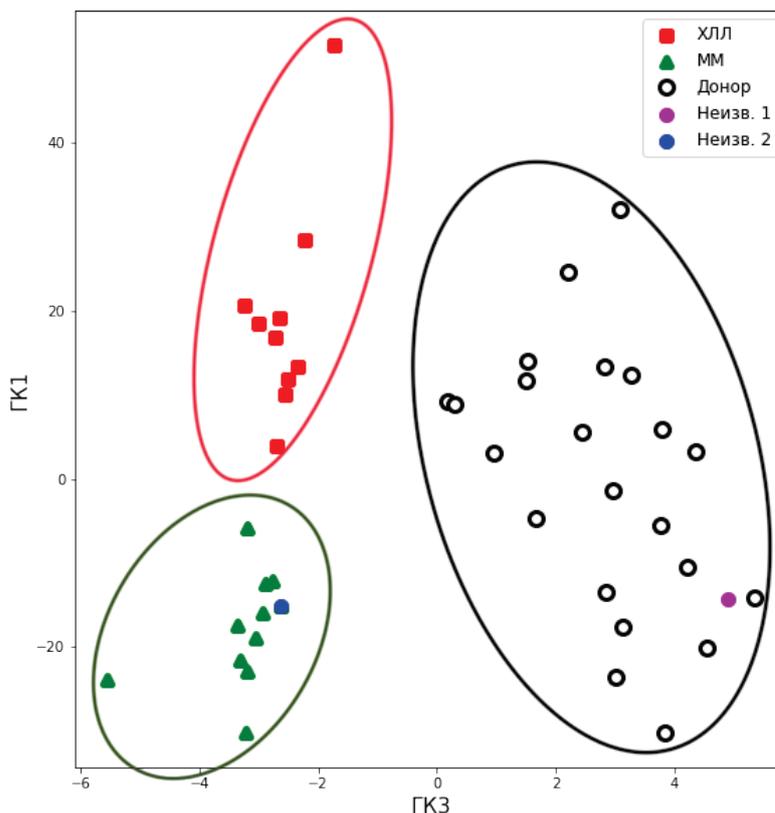


Рисунок 3. Зависимость первой главной компоненты от третьей. Образцы на диаграмме обозначены следующим образом: ХЛЛ – красные квадраты, ММ – зеленые треугольники, здоровые доноры – черные окружности, два случайных образца из набора: неизв. 1 – пурпурная точка, неизв. 2 – синяя точка

набор и рассмотрим его принадлежность к одной из групп. Для этого ИК-спектр такого образца X_{new} спроецируем в пространство главных компонент:

$$T_{new} = X_{new} P. \quad (2)$$

Мы получим матрицу счетов T_{new} . Отложив получившиеся счета в пространстве главных компонент на рисунке 2, мы сможем оценить принадлежность образца к той или иной группе по близости соответствующей точки к группам на диаграмме ГК3-ГК1.

Для примера, попробуем применить описанный алгоритм к двум случайным образцам. Результат показан на рисунке 3.

На рисунке 3 мы можем наблюдать, что один из случайных образцов (неизв. 1) попал в группу доноров, а второй (неизв. 2) попал в группу ММ. Отсюда, для обоих образцов можно дать оценку: образец неизв. 2, вероятно, взят у пациента, больного ММ, а образец неизв. 1 от здорового донора. Эта оценка совпадает с информацией о происхождении двух случайных образцов.

Таким образом, сочетание ИК-спектроскопии и МГК позволяет классифицировать спектры образцов сыворотки крови больных ХЛЛ и ММ и разделять их по группам. Такой подход в будущем, вероятно, можно будет применять и для других онкогематологических патологий, с целью их профилактики или раннего обнаружения признаков наличия заболеваний.

Часть работ выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества» «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанoeлектроники», «Криогенный отдел»).

Список литературы / References:

1. Barlogie B., Gale R.P. Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Commonalities and Differences in Biology and Therapy. *Leukemia & Lymphoma*, 1991, vol. 5, no. 1, pp. 27-32.
2. Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I., Richardson P.G., Anderson K.C. *Multiple myeloma*. 2009, vol. 374, 16 p.
3. Mikhailets E.S., Chernyshev D.A., Telnaya E.A., Plotnikova L.V., Garifullin A.D., Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Polyanchko A.M. Protein secondary structure analysis of serum from patients with oncohematological diseases. *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, vol. 2103, p. 012053, doi: 10.1088/1742-6596/2103/1/012053.
4. Тельная Е.А., Плотникова Л.В., Гарифуллин А.Д., Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Поляничко А.М. Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови больных онкогематологическими заболеваниями. Санкт-

Петербургский государственный университет. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 6, с. 1154-1160. [Telnaya E.A., Plotnikova L.V., Garifullin A.D., Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Polyanichko A.M. Infrared spectroscopy of blood serum of patients with oncohematological diseases. St. Petersburg State University. *Biophysica*, 2020, vol. 65, no. 6, pp. 1154-1160. (In Russ.)]

5. Dunn K. *Process Improvement Using Data*, 2010.

6. Powell W.B. *Approximate Dynamic Programming: Solving the curses of dimensionality*. John Wiley & Sons, 2007, vol. 703.

7. Поляничко А.М., Романов Н.М., Старкова Т.Ю. и др. Анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 по спектрам инфракрасного поглощения. *Цитология*, 2014, т. 56, № 4, с. 316-322. [Polyanichko A.M., Romanov N.M., Starkova T.Y. et al. Analysis of the secondary structure of the linker histone H1 by infrared absorption spectra. *Tsitologiya*, 2014, vol. 56, no. 4, pp. 316-322. (In Russ.)]

8. Python 3.10.0.

9. Jupyter Notebook.

10. Родионова О.Е., Померанцев А.Л. *Хемометрика в аналитической химии*. 2006. [Rodionova O.E., Pomerantsev A.L. *Chemometrics in analytical chemistry*. 2006. (In Russ.)]

APPLICATION OF THE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS TO IR SPECTRA OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

Butyaev R.V.¹, Chernyshev D.A.¹, Mikhailets E.S.¹, Plotnikova L.V.¹, Garifullin A.D.², Kuvshinov A.Yu.², Voloshin S.V.², Polyanichko A.M.¹

¹ St. Petersburg State University

Ulyanovskaya str., 1, Peterhof, St. Petersburg, 198504, Russia; e-mail: robertmag@mail.ru

² Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the FMBA of Russia.

2nd Sovetskaya str., 16, St. Petersburg, 191024, Russia

Received 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0545

Abstract. Multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia are oncological diseases of the blood, which remain incurable today. The paper proposes a method for classifying blood serum samples from patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia and healthy donors based on the analysis of their spectra in the mid-infrared (IR) range. IR spectra of blood serum were recorded using a Tensor 27 IR Fourier spectrometer in D2O solution. To analyze the obtained spectra in this work, a machine learning algorithm was implemented – the principal component analysis. The use of the principal component analysis made it possible to significantly simplify the representation of the array of spectral data. 45 samples of blood serum were analyzed in the work. As a result of applying this approach, the studied set of samples is divided into three disjoint sets corresponding to blood serum samples of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia and healthy donors. Thus, the principal component method can be successfully applied to classify blood serum samples of patients with diagnoses of multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. The universality of the proposed algorithm allows us to expect that in the future it is possible to apply a similar approach for other oncohematological diseases.

Key words: *Principal Component Analysis, oncohematological diseases, IR spectroscopy, multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia.*

ОСОБЕННОСТИ БЕЛОК-ИНДУЦИРОВАННЫХ АССОЦИАТОВ ПРИ СВЕРХВЫСОКОМ РАЗВЕДЕНИИ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ- γ

Масленникова О.М.¹, Сибирев А.Л.², Шипко М.Н.², Степович М.А.³

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации
ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина
ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0546

Аннотация. Изучены возможности использования каналирования низкоэнергетических (9-13 кэВ) электронов для определения характера изменений позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов воды и белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ без и в присутствии вспомогательных веществ. Использован метод газоразрядной визуализации, позволяющий регистрировать параметры лавиностримерного разряда, вызванного полевой эмиссией электронов, проходящих через объёмную часть и поверхность капли исследованных растворов. Исследования структурной организации растворов лекарственных средств осуществляли на растворах поликлональных афинно-очищенных человеческих антител к интерферону- γ . Растворы получали путем многократного разведения антител в очищенной воде. Использовали растворы, соответствующие четырем концентрационным точкам антител. Анализ картин газоразрядного изображения растворов позволил определить стереографические проекции каналов движения электронов, сформированных молекулярными комплексами растворов, а также энергию и среднюю концентрацию электронов, их распределение по энергиям, связанных с особенностями ближнего порядка, спецификой процессов самоорганизации. Полученные результаты указывают на значительные изменения водно-дисперсной среды в процессе её разбавления человеческими антителами к интерферону- γ .

Ключевые слова: растворы лекарственных средств, каналирование электронов, газоразрядная визуализация, сверхвысокое разведение антител к интерферону.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в медицинской практике широкое распространение получили противовирусные препараты, действие которых основано на изменении конформации мишени при влиянии на них сверхвысоких разведениях антител к интерферону- γ [1-3].

Предполагается, что их эффект связан с наличием в растворе белок-индуцированных субмиллиметровых кластеров [4]. В результате химические свойства и терапевтические показатели лекарственного средства определяются не только параметрами основного препарата в растворе, но и особенностями других составляющих такой гетерогенной системы, в частности растворителя, и внешним воздействием. В водной системе с веществом в высоком разведении могут формироваться локальные структуры, обладающие определенной динамикой взаимных переходов, которые, в свою очередь, могут быть синхронизированы с квантовыми переходами между различными состояниями молекулярных комплексов или их наноассоциатов.

Ранее было показано, что добиваться синхронности как внутри молекулярных, так и межмолекулярных превращений в водных растворах поверхностно-активных веществ, можно в результате энергетически слабых воздействий (магнитоимпульсного, кавитационного и др.) [5-7]. Такие воздействия обеспечивают существенную активацию гидратационных фазовых превращений и способствуют формированию устойчивых полиморфных модификаций растворённого вещества, которые характеризуются различным позиционным порядком молекулярных ассоциатов, широким спектром их геометрических параметров и специфических свойств [8-10]. Управлять свойствами подобных квазиравновесных воднодисперсных систем можно, изменяя концентрацию компонентов в системе или параметры многократного механического разведения. На это указывает и работа [4], согласно данным которой в результате многократного механического разведения антител к интерферону- γ наблюдается образование гигантских гетерогенных кластеров со специфическим размерным спектром и кинетикой распада. Поэтому дисперсные системы, возникающие при разведении в водном растворе белковых наночастиц (а именно антител к интерферону- γ) являются уникальными объектами для наблюдения белок-индуцированных субмиллиметровых кластеров, а также специфики трансформации их позиционного порядка. Ввиду высокой временной стабильности кластеров, к таким растворам не вполне применимы модели поведения вещества в классическом жидком состоянии. Используемые же до настоящего времени экспериментальные методы изучения ближнего порядка (кроме ядерной гамма-резонансной спектроскопии и нейтронографии) также не применимы, так как основаны на изучении явных изменений структурно-чувствительных свойств растворов

[11]. В связи с этим нужны прямые экспериментальные «зондовые» методы оценки ближнего порядка молекулярных комплексов дисперсных водных систем при сверхвысоких разведениях.

Действительно, использование динамического рассеяния света, лазерной фазовой микроскопии для анализа дисперсного состава белковых растворов не позволяет определить не только молекулярный состав неоднородностей, но и особенности их пространственной локализации [12]. Это указывает на необходимость разработки и использования физико-химических методов, способных регистрировать коллективные эффекты, вызванные процессами трансформации структурного состояния воднодисперсной системы, водных ассоциатов, основанных на визуализации объекта и отображающих особенности межмолекулярного взаимодействия, локальной симметрии ближнего порядка молекулярных комплексов [12,13]. Такая информация может быть получена электронозондовым способом, малоугловой рентгеновской дифракцией. Однако, из-за отсутствия надёжной интерпретации результатов исследования и специфики этих методов структурные особенности водной среды остаются неоднозначными и дискуссионными [13].

Учитывая, что терапевтическая эффективность многих лекарственных средств определяется процессами переноса зарядов ионами или электронами, динамика которых зависит от ближнего порядка молекул, а также локальных электрических полей [15,16], для изучения состояния молекулярных комплексов воды или водных ассоциатов может быть использован метод каналирования ионов или низкоэнергетических электронов [17-19]. Метод позволяет выявить особенности состояния молекулярных комплексов, формирующих стенки каналов (по которым осуществляется облегчённый транспорт ионов или электронов), а также наличие градиентов локальных электрических полей, стимулирующих кинетические процессы. Данный метод можно реализовать в условиях фиксации инициированного свечения раствора или его газоразрядной визуализации (ГРВ) [20,21]. Возможность применения ГРВ для изучения структурной организации сверхвысоких разведений лекарственных средств основывается на известном тезисе о том, что биофизические и биохимические процессы, протекающие в биологической среде, во многом определяются позиционным порядком молекулярных комплексов [22,23], параметрами локальных электромагнитных полей, создаваемых электрическими и магнитными диполями воды и белковых ассоциатов. По изменению энергии и угловому распределению электронов, проходящих через каплю растворов лекарственных препаратов, можно судить не только о характере ближнего порядка в пространственном расположении ассоциатов, но и об особенностях межмолекулярного взаимодействия, об их изменении по сравнению с аналогичными параметрами для очищенной воды, используемой в качестве растворителя [21,24].

Целью настоящей работы было выяснение возможности использования результатов каналирования низкоэнергетических электронов для определения характера изменений позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов воды в белок-индуцированных ассоциатах при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ , без и в присутствии вспомогательных веществ. Для исследования особенностей каналирования низкоэнергетических электронов использовали метод ГРВ, позволяющий регистрировать параметры лавинностримерного разряда, вызванного полевой эмиссией электронов, проходящих через объёмную часть капли раствора и через её поверхность [24,25]. При этом подразумевали, что пространственная координация разрядных треков и их параметры связаны с каналами облегчённого движения электронов, с локальными неоднородностями структуры объёмной части и поверхности капли, которые изменяют локальные поляризационные и электрические свойства водной среды (диэлектрическую проницаемость и удельную электропроводность).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление экспериментальных образцов. Для анализа структурной организации лекарственных средств использовали следующие группы экспериментальных образцов:

1) первая группа: водные растворы поликлональных аффиноочищенных кроличьих антител к интерферону- γ (исходная концентрация 2,5 мг/мл). Раствор антител получали путём многократного разведения в очищенной воде по стандартной технологии. Рассчитанная концентрация антител в конечных разведениях составляла $2,5 \times 10^{-24}$ мг/мл. Следует учитывать тот факт, что конечная концентрация антител в растворе может быть выше или ниже рассчитанной, т.к. в разбавленных растворах могут присутствовать агрегаты исходных антител с газовыми нанопузырьками, которые сохраняются после многократного разбавления за счёт флотаций [14,21]. Контролем растворителя выступала вода очищенная;

2) вторая группа – таблетированные формы. Таблетированные образцы получены нанесением растворов антител и фосфатно-солевого буфера (далее по тексту – таблетированное плацебо) на носитель (89 % солевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Растворы антител и фосфатно-солевого буфера получали аналогично образцам из первой группы. В качестве антител выступал интактный таблетированный носитель (далее по тексту – вспомогательное вещество).

Все образцы были предоставлены компанией ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг».

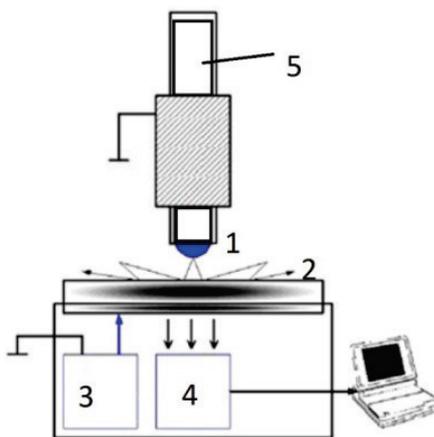


Рисунок 1. Схема портативного аппаратно-программного комплекса с прибором газоразрядной визуализации (ГРВ-камера): 1 – мениск капли раствора; 2 – кварцевый электрод с токопроводящим покрытием; 3 – генератор импульсов напряжения; 4 – оптическая система; 5 – металлический индифферентный электрод

Из таблетированных образцов были приготовлены растворы с различной концентрацией вещества с целью определить оптимальную для исследования концентрацию. Для анализа использовали растворы, соответствующие 4 концентрационным точкам. Каждая концентрационная точка соответствовала тому количеству таблетированного образца, которое было растворено в 10 мл воды. То есть концентрационной точке 1 соответствовала одна растворённая таблетка, концентрационной точке 2 – две таблетки и т.д. Затем растворы настаивали в течении 24 часов при 293К до установления равновесия. Раствор, используемый для исследования, фильтровали с помощью бумажного фильтра для удаления нерастворённой фракции.

Метод и методики исследования. Анализ состояния водных растворов осуществляли методом ГРВ, основанным на оптоэлектронной эмиссии и реализуемом в приборе «ГРВ-камера» медицинского назначения [24,25], см. также [18,19,26,27]. Блок-схема установки показана на рисунке 1.

В модифицированный инсулиновый шприц, в котором находился индифферентный металлический электрод 5, являющийся эмиттером электронов, набирали исследуемый раствор. Мениск капли жидкости объёмом 8 мкл располагали на расстоянии 2 мм над прозрачным токопроводящим покрытием кварцевого электрода 2. Между электродами 5 и 2 подавали электрические биполярные импульсы амплитудой 9 кВ и длительностью 2×10^{-6} с от генератора 3. Электрические импульсы стимулировали эмиссию электронов из металлического электрода 5, которые проходили через каплю раствора и ее поверхность. Прошедшие через каплю раствора электроны имели энергию, достаточную для ионизации воздуха, и формировали на электроде 2 скользящий газовый разряд. Его свечение регистрировали фотокамерой 4, оцифровывали видеопреобразователем и визуализировали на экране компьютера в виде светящегося диска и стримеров, представляющих картину стереографических проекций следов движения электронов через объёмную часть капли раствора и ее поверхности. Параметрический анализ картин газоразрядного изображения раствора выполнен с использованием программы GDV Scientific Laboratory, которая позволяла определить угловое распределение электронов, воспроизводящее стереографические проекции каналов движения электронов, сформированных молекулярными комплексами раствора.

Информация о растворах фиксировалась на газоразрядном изображении за счет воздействия раствора на характеристики лавинных актов: интенсивность, длительность, частоту следования и их пространственное распределение. Для уменьшения влияния электромагнитного поля прибора и самого разряда на состояние исследуемого раствора разработчиками прибора [24,25] экспериментально определены оптимальные значения амплитуды, длительности и частоты биполярных электрических импульсов на газоразрядном промежутке, которые обеспечили слабовозмущающий характер влияния измерения на неравновесное состояние исследуемых растворов. Для нивелирования этого влияния время измерения составляло 0,1 с, и измерения выполнялись не менее чем на 10 каплях раствора. В результате статистическая выборка каждого из параметров составляла не менее 100. Это важно, прежде всего ввиду наличия в растворах полярных молекул вспомогательных веществ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 в качестве примера показаны увеличенные электрограммы в энергетической палитре свечения в стереографической проекции и картины углового распределения электронов после их прохождения через капли растворов лекарственных средств.

Видно, что электрограммы стандартно очищенной (используемой для медицинских целей) воды (верхняя часть рис. 2а) представляет однородно-светящийся диск, что указывает на преимущественное изотропное движение эмитируемых электронов через поверхность капли и через неупорядоченную среду в ее объеме.

Электрограммы водных растворов антител к интерферону- γ (верхняя часть рис. 2б), и вспомогательных веществ, используемых в таблетированных образцах (верхняя часть рис. 2в), кроме деформированного диска отличаются наличием радиальных треков свечения слабой интенсивности и малой длины (2000-3500) мкм. Последний факт является следствием наличия в объеме капли каналов облегченного движения электронов. На это указывают и различия картин углового распределения электронов (нижняя часть рис. 2а, 2б, 2в) для изученных растворов.

Отличие от картины углового распределения испускаемых каплей воды электронов (нижняя часть рис. 2а) на аналогичных картинах водных растворов антител к интерферону- γ (нижняя часть рис. 2б), присутствует 3 узких максимума малой интенсивности. Их положение, соответствующее углам $70-80^\circ$, $230-240^\circ$, $300-320^\circ$, сохраняется также в растворах таблетированных образцов, содержащих антитела. Малая ширина и интенсивность максимумов обусловлена особенностями ближнего порядка белок-индуцированных водных ассоциатов на локальных участках раствора, их геометрическими параметрами и электрическим зарядом.

Для раствора вспомогательных веществ, а также таблетированных образцов, содержащих антитела, наблюдается 4 дополнительных широких максимума. Высокая степень изрезанности склонов этих максимумов указывает на интенсивное взаимодействие каналируемых электронов с молекулярными ассоциатами, образуемыми молекулярными комплексами воды в присутствии вспомогательных веществ и индуцированных белковыми молекулами антител. По угловому расстоянию между максимумами и их ширине можно оценить параметры каналов и, как результат, геометрические характеристики молекулярных ассоциатов, образующих стенки каналов. Учитывая тот факт, что направления облегченного движения электронов образованы плоскостями наиболее плотной упаковки молекулярных ассоциатов, наличие трех максимумов на картине углового распределения электронов, наблюдаемых для водного раствора антител, указывает на присутствие только трех таких плоскостей. Отсутствие эквидистантности между ними и различие в их ширине указывает на существенное различие геометрических параметров белок-индуцированных ассоциатов и на относительно низкую симметрию их ближнего порядка [28]. Это может быть причиной понижения симметрии пространственного заряда, что обеспечивает относительно большие градиенты локальных электрических полей. Такие поля способны вызвать упорядочение как отдельных, так и ассоциированных диполей воды, находящихся не только в первой координационной сфере белок-индуцированного ассоциата, но и на значительном удалении от него. В результате при растворении белковых молекул, в нашем случае – антител, в растворе создаются условия для проявления коллективных эффектов, обеспечивающих изменения системно-структурной организации растворителя [29,30]. Наличие четырех максимумов углового распределения для растворов вспомогательных веществ указывает на более высокую симметрию ближнего порядка в расположении молекулярных водных ассоциатов или гидратированных комплексов этих соединений, что оказывает ощутимое воздействие на структурное состояние раствора. Это отчетливо проявляется на параметрах картин ГРВ.

Процессы, связанные с изменением системно-структурной организации растворов, проявляются на трансформации их локальных физико-химических свойств и, как следствие, на энергетических характеристиках электронных лавин, каналирующих в водной среде. Учитывая тот факт, что энергия электронов эмиссии связана с длиной стримеров [31] по положению максимумов распределения стримеров по длине можно судить о потерях энергии каналированных электронов и, как следствие, о геометрических особенностях и о зарядовом состоянии водных ассоциатов, присутствующих в растворе. Картины распределения стримеров по длине приведены на рисунке 3.

Видно, что на картине распределения стримеров по длине для фармакологически очищенной воды (рис. 3, кривая 1) наблюдаются 2 максимума: низкоэнергетический (2700-2800) мкм и высокоэнергетический (3100-3200) мкм. Если пользоваться представлениями квазикристаллических моделей структуры воды, то наличие двух максимумов можно связать с присутствием в растворителе 2-х фаз: полимерной, содержащей водные ассоциаты, стабилизированные микропримесями (3100-3200) мкм и мономерной, содержащей водные ассоциаты, стабилизированные водородными связями (2700-2800) мкм. Это предположение подтверждается совпадением положения максимума энергетического распределения электронов, соответствующего мономерной воде с максимумом такого распределения для бидистиллированной воды (2600-2700) мкм.

Для раствора антител (рис. 3, кривая 2) наблюдается интенсивный максимум, положение которого соответствует длине стримеров (2150-2400) мкм и максимум малой интенсивности, положение которого (2700-2800) мкм совпадает с положением максимума для мономерной воды. Соотношение площадей максимумов составляет примерно 9:1. Сдвиг основного максимума для раствора антител относительно максимума, наблюдаемого для бидистиллированной воды, свидетельствует об усилении взаимодействия каналируемых электронов с электрическим полем белок-индуцированных водных ассоциатов. Действительно, кулоновское

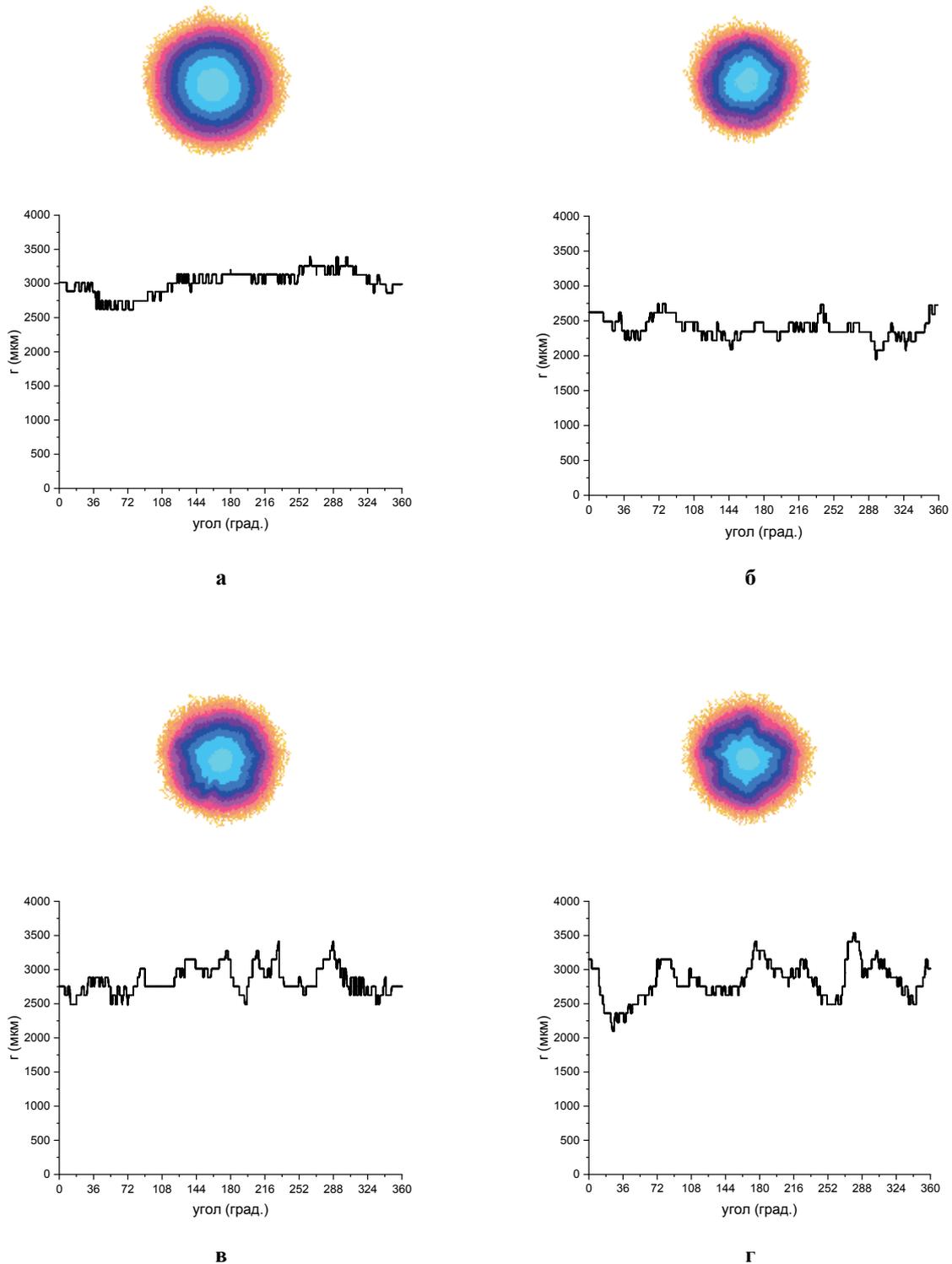


Рисунок 2. Усреднённые электрограммы для растворов (вверху каждого из рисунков а, б, в, г), увеличение 4х и угловые распределения электронов (внизу каждого из рисунков а, б, в, г), проходящих через каплю раствора: а – очищенная вода; б – раствор антител к интерферону- γ ; в – раствор таблетированного образца вспомогательных веществ; г – раствор таблетированного образца антител к интерферону- γ и вспомогательных веществ

взаимодействие электронов с электрическим полем внутри микроканалов, формируемых такими ассоциатами, может вызвать существенные потери энергии электронов [32]. Так как расчет потерь энергии электронов в результате их взаимодействия с электрическим полем молекулярных комплексов из-за специфики приближенных классических и полуклассических моделей затруднен, то можно лишь качественно судить об особенностях водных ассоциатов, присутствующих в растворе. Несмотря на то, что концентрация антител в растворе составляет примерно 10^{-24} мг/мл и недостаточна для внесения существенных изменений в его материально-энергетический баланс, более 90 % молекулярных комплексов растворителя обеспечили

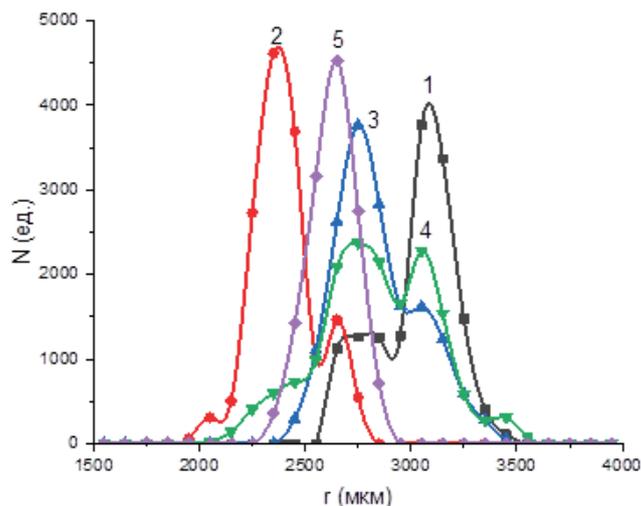


Рисунок 3. Распределение стримеров поверхностного заряда по длине, определяющее распределение электронов по энергиям для воды (кривая 1); водного раствора антител к интерферону- γ (кривая 2); раствора таблетированных форм вспомогательных веществ (кривая 3); раствора одной таблетки препарата, содержащего антитела к интерферону- γ (кривая 4); бидистиллированной воды (кривая 5)

формирование специфических водных ассоциатов. Размеры таких частиц, исходя из сдвига положения максимума распределения электронов по энергиям в сторону более низкой энергии, существенно больше размеров молекулярных комплексов в мономерной воде. Следовательно, активация растворов антител к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок – индуцированных молекулярных комплексов. Существенную роль в таких процессах играют гидратированные молекулы белков, обеспечивающие высокие значения градиентов локальных электрических полей и, как следствие, активирующих коллективные эффекты, связанные с формированием устойчивого позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов среды. Действительно, даже после растворения в воде вспомогательных веществ (в основном лактозы), обладающих полярными молекулами, наблюдается незначительный сдвиг максимумов энергетического распределения эмитируемых электронов относительно максимумов такого распределения для растворителя (рис. 3, кривая 3). Однако площадь максимума, положение которого совпадает с положением мономерной воды, в 10 раз превышает площадь максимума, связанного с ассоциатами, образованными вспомогательными веществами и молекулярными комплексами воды. Количество таких ассоциатов существенно повышается в результате присутствия в растворе таблетированного образца белковых антител к интерферону- γ (рис. 3, кривая 4). На картине энергетического распределения электронов для этого образца наблюдаются уширенные максимумы, положение которых совпадает с положением максимумов, характерных для раствора вспомогательных веществ (2700-2800) мкм и (3100-3200) мкм и участок кривой малой интенсивности, положение которого совпадает с максимумом для белок – индуцированных ассоциатов (2150-2400) мкм. Из соотношения площадей максимумов для раствора таблетированного образца с антителами следует, что около 8 % молекулярных комплексов растворителя принимают участие в формировании белок – индуцированных ассоциатов, около 70-85 % образуют ассоциаты с вспомогательными веществами, а около 7-10 % – молекулярные комплексы воды, стабилизированные примесями или растворенными газами. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами водных белок-индуцированных ассоциатов, сформированных в процессе разведения. Положение, а также большая ширина максимумов распределения электронов по энергиям, связанных с белок-индуцированными ассоциатами, свидетельствуют об их существенном отличии по размерам, ближнему порядку и зарядовому состоянию от других ассоциатов, присутствующих в растворе таблетированных образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом каналирования электронов в условиях газоразрядной визуализации показано, что сверхвысокое разведение антител к интерферону- γ обеспечивает формирование белок-индуцированных водных ассоциатов, ближний порядок в расположении которых отличается низкой симметрией, в отличие от ассоциатов, образованных вспомогательными веществами. Это обеспечивает активацию коллективных эффектов, стимулируемых локальными электрическими полями, градиенты которых обеспечивают упорядочение как

отдельных, так и ассоциированных диполей воды. Интенсивность процессов самоорганизации существенно снижается из-за наличия в растворе довольно крупных ассоциатов воды и вспомогательных веществ, а также из-за высокой степени симметрии их ближнего порядка.

Список литературы / References:

1. Tarasov Sergey A., Gorbunov Evgeniy A., Don Elena S., Emelyanova Alexandra G., Kovalchuk Alexander L., Yanamala Naveena A., Schleker Sylvia S., Klein-Seetharaman Judith, Groenestein Reno, Tafani Jean-Pierre, van der Meide Peter and Epstein Oleg I. Insights into the mechanism of action of highly diluted biologics. *The Journal of Immunology*, 2020, vol. 205, iss. 5, pp. 1345-1354, doi: 10.4049/jimmunol.2000098.
2. Don E., Van der Meide N., Egorov V., Putilovskiy M., Tarasov S. The level of natural anionantibodies to IFN-gamma in varicella infection treated with antiviral drug Anaferon for children: A pilot Study. *Immunology Letters*, 2020, vol. 222, pp. 90-94, doi: 10.1016/j.imlet.2019.10.015.
3. Эпштейн О.И. *Сверхмалые дозы (история одного исследования)*. М: РАМН, 2008, 334 с. [Epshteyn O.I. *Sverkhmalyye dozy (istoriya odnogo issledovaniya)*. М: RAMN, 2008, 334 s. (In Russ.)]
4. Сыроешкин А.В., Плетнева Т.В., Морозова М.А. Успенская Е.В., Титорович О.В., Лесников Е.В., Добровольский В.И. О возможности применения лазерного метода для контроля качества высоких разведений жидких лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*, 2016, № 3, с. 31-36. [Syroyeshkin A.V., Pletneva T.V., Morozova M.A. Uspenskaya Ye.V., Titorovich O.V., Lesnikov Ye.V., Dobrovolskiy V.I. O vozmozhnosti primeneniya lazernogo metoda dlya kontrolya kachestva vysokikh razvedeniy zhidkikh lekarstvennykh sredstv. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*, 2016, no. 3, pp. 31-36. (In Russ.)]
5. Шипко М.Н., Степович М.А., Сибирев А.Л., Усольцева Н.В., Масленникова О.М., Смирнова А.И. Магнитоимпульсное воздействие на структурное состояние растворов поверхностно-активных веществ. *Известия РАН. Серия физическая*, 2018, т. 82, № 8, с. 1058-1062. [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Usoltseva N.V., Maslennikova O.M., Smirnova A.I. Magnitoimpul'snoye vozdeystviye na strukturnoye sostoyaniye rastvorov poverkhnostno-aktivnykh veshchestv. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 1058-1062, doi: 10.1134/S0367676518080367 (In Russ.)]
6. Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L. Usoltzeva N.B., Maslennikova O.M. and Smirnova A.I. Impact of Magnetic Pulse on the Structural State of Surfactant Solutions. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 956-960, doi: 10.3103/S1062873818080361.
7. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Фармакологическое действие водных препаратов, водных растворов лекарственных средств и воды модифицированной электромагнитным полем. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: Научные труды VIII международного конгресса*, СПб, 2015, т. 7, с. 31-32. [Gorbunov A.M., Il'yenko V.A., Vladimirova Ye.S. Farmakologicheskoye deystviye vodnykh preparatov, vodnykh rastvorov lekarstvennykh sredstv i vody modifitsirovannoy elektromagnitnym polem. *Slabye i sverkhslabye polya i izlucheniya v biologii i meditsine: Nauchnyye trudy VIII mezhdunarodnogo kongressa*, SPb, 2015, vol. 7, pp. 31-32. (In Russ.)]
8. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л. Масленникова О.М., Смирнова А.И., Степович М.А., Габдулсадыкова Г.Ф. Влияние импульсных электромагнитных полей на позиционный и ориентационный порядок в водных растворах цетилтриметиламмония бромистого. *Жидкие кристаллы и их практическое использование*, 2018, т. 18, № 1, с. 47-54. [Shipko M.N., Usoltseva N.V., Sibirev A.L. Maslennikova O.M., Smirnova A.I., Stepovich M.A., Gabdulsadykova G.F. Vliyaniye impul'snykh elektromagnitnykh poley na pozitsionnyy i oriyentatsionnyy poryadok v vodnykh rastvorakh tsetiltrimetilammoniya bromistogo. *Zhidkiye kristally i ikh prakticheskoye ispol'zovaniye*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 47-54, doi: 10.18083/LCAppl.2018.1.47. (In Russ.)]
9. Шипко М.Н., Степович М. А., Сибирев А.Л., Мельникова О.С., Смирнова А.И., Усольцева Н.В. Ориентационные эффекты при каналировании киловольтных электронов в жидких средах. *Известия РАН. Серия физическая*, 2020, т. 84, № 7, с. 994-997. [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Mel'nikova O.S., Smirnova A.I., Usoltseva N.V. Oriyentatsionnyye efekty pri kanalirovanii kilovol'tnykh elektronov v zhidkikh sredakh. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2020, vol. 84, no. 7, pp. 994-997, doi: 10.31857/S0367676520070273. (In Russ.)]
10. Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Melnikova O.S., Smirnova A.I., Usoltzeva N.B. Orientational Effects of Kilovolt Electron Channeling in Liquid Media. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2020, vol. 84, no. 7, pp. 820-823, doi: 10.3103/S1062873820070266.
11. Успенская Е.В., Сыроешкин А.В., Смирнов А.И. Гончарук В.В., Плетнева Т.В., Лапшин В.Б. Структура воды и лазерные экспресс-методы определения подлинности. *Фармация*, 2007, № 5, с. 21-23. [Uspenskaya E.V., Syroyeshkin A.V., Smirnov A.I. Goncharuk V.V., Pletneva T.V., Lapshin V.B. Struktura vody i lazernyye ekspress-metody opredeleniya podlinnosti. *Farmatsiya*, 2007, no. 5, pp. 21-23. (In Russ.)]
12. Bunkin N., Shkirin A.V., Penkov N.V., Chirikov S., Ignatiev P.S., Kozlov V.A. The Physical Nature of Mesoscopic Inhomogeneities in Highly Diluted Aqueous Suspensions of Protein Particle. *Physical of Wave Phenomena*, 2019, vol. 27, no. 2, pp. 102-112, doi: 10.3103/S1541308X19020043.
13. Сыроешкин А.В., Смирнов А.Н., Гончарук В.В., Успенская Е.В., Николаев Г.М., Попов П.И., Кармазина Т.В., Самсонов-Тодоров А.О., Лапшин В.Б. Вода как гетерогенная структура. *Исследовано в России. Электронный журнал*, 2006, с. 843-854. [Syroyeshkin A.V., Smirnov A.N., Goncharuk V.V., Uspenskaya E.V.,

- Nikolayev G.M., Popov P.I., Karmazina T.V., Samsoni-Todorov A.O., Lapshin V.B. Voda kak geterogennaya struktura, *Issledovano v Rossii. Elektronnyy zhurnal*, 2006, pp. 843-854. (In Russ.)]
14. Ульянцев А.С., Успенская Е.В., Плетнева Т.В., Попов П.И., Самсоны-Тодоров А.О., Гончарук В.В., Сыроешкин А.В. Экспресс-метод определения подлинности водных растворов лекарственных средств. *Химико-терапевтический журнал*, 2009, т. 43, № 12, с. 47-51. [Ul'yantsev A.S., Uspenskaya E.V., Pletneva T.V., Popov P.I., Samsoni-Todorov A.O., Goncharuk V.V., Syroyeshkin A.V. Ekspress-metod opredeleniya podlinnosti vodnykh rastvorov lekarstvennykh sredstv. *Khimiko-terapevticheskiy zhurnal*, 2009, vol. 43, no. 12, pp. 47-51. (In Russ.)]
15. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71. [Vysotskiy V.I., Karlash A.YU. Osobennosti selektivnogo transporta i kanalirovaniya ionov v vodnoy srede v kanalah biologicheskikh membran. *Poverkhnost'. Rentgenovskiy, sinkhrotronnyye i neytronnyye issledovaniya*, 2010, no. 12, pp. 64-71. (In Russ.)]
16. Мельникова К.Н., Вислобоков А.И., Колпакова М.Э., Борисова В.А., Игнатов Ю.Д. Калиевые ионные каналы клеточных мембран. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2009, т. 7, № 1, с. 3-27. [Mel'nikova K.N., Vislobokov A.I., Kolpakova M.E., Borisova V.A., Ignatov Yu.D. Kaliyevyye ionnyye kanaly kletochnykh membran. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*, 2009, vol. 7, no. 1, pp. 3-27. (In Russ.)]
17. Рябов В.А. *Эффект каналирования*. М.: Энергоатомиздат, 1994, 239 с. [Ryabov V.A. *Effekt kanalirovaniya*. М.: Energoatomizdat, 1994, 239 p. (In Russ.)]
18. Масленникова О.М., Шипко М.Н., Сибирев А.Л., Степович М.А., Никонорова В.Г. О диагностическом потенциале метода газоразрядной визуализации в оценке эффективности препаратов для лечения сердечно-сосудистой патологии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*, 2021, № 4, с. 91-96. [Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Stepovich M.A., Nikonorova V.G. O diagnosticheskom potentsiale metoda gazorazryadnoy vizualizatsii v otsenke effektivnosti preparatov dlya lecheniya serdechno-sosudistoy patologii. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik*, 2021, no. 4, pp. 91-96. (In Russ.)]
19. Шипко М.Н., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Степович М.А. Использование каналирования киловольтных электронов для изучения структуры жидких объектов. *Сб. научных трудов VI съезда биофизиков России*, 2019, т. 1, с. 395-396. [Shipko M.N., Sibirev A.L., Maslennikova O.M., Stepovich M.A. Ispol'zovaniye kanalirovaniya kilovol'tnykh elektronov dlya izucheniya struktury zhidkikh ob'yektov. *Sb. nauchnykh trudov VI s"yezda biofizikov Rossii*, 2019, vol. 1, pp. 395-396. (In Russ.)]
20. Шеин А.А., Хлебный Е.С., Кершенгольц Б.М. Газоразрядная визуализация – перспективы количественного и качественного определения веществ в жидкофазных растворах и смесях. *Успехи современного естествознания*, 2004, № 7, с. 43. [Shein A.A., Khlebnyy Ye.S., Kershengol'ts B.M. Gazorazryadnaya vizualizatsiya - perspektivy kolichestvennogo i kachestvennogo opredeleniya veshchestv v zhidkofaznykh rastvorakh i smesyakh, *Uspekhi sovremennoye yestestvoznaniya*, 2004, no. 7, pp. 43. (In Russ.)]
21. Яковлева Е.Г. Диагностические возможности метода ГРВ-биоэлектрографии (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*, 2013, № 1, с. 8. [Yakovleva E.G. Diagnosticheskiye vozmozhnosti metoda GRV-bioelektrografii (obzor literatury). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2013, no. 1, p. 8. (In Russ.)]
22. Клеман М., Лаврентович О.Д. *Основы физики частично упорядоченных сред: жидкие кристаллы, коллоиды, фрактальные структуры, полимерные биологические объекты*: пер. с англ. Физматлит, 2007, 680 с. [Kleman M., Lavrentovich O.D. *Osnovy fiziki chastichno uporyadochennykh sred: zhidkiye kristally kolloidy, fraktal'nyye struktury, polimernyye biologicheskiye ob'yekty*: per. s angl. Fizmatlit, 2007, 680 p. (In Russ.)]
23. Zhou Y.F., Morais-Cabral J., Kaufman A., MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 2001, vol. 414, no. 6859, pp. 43-48, doi: 10.1038/35102009.
24. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Изв. вузов, Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46. [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Primeneniye metoda gazorazryadnoy vizualizatsii dlya analiza razlichnykh zhidkostey. *Izv. vuzov, Priborostroyeniye*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 40-46. (In Russ.)]
25. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Printsipy analiza GRV bioelektrografii*. Sankt-Peterburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)]
26. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Chrishtop V.V. The Use of Gas Discharge Visualization for Identifying Structured Peculiarities of Blood Components: Plasma, Platelets, and Erythrocytes. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Therapy*, 2018, vol. 9, iss. 4, art. no. 555770.
27. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Криштоп В.В., Шипко М.Н., Степович М.А., Ленчер О.С. Исследование эффективности транспорта ионов K⁺ по каналам ионных обменников в присутствии лекарственных средств – активаторов калиевых каналов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 269-274. [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Krishtop V.V., Shipko M.N., Stepovich M.A., Lencher O.S. Issledovaniye effektivnosti transporta ionov K⁺ po kanalam ionnykh obmennikov v prisutstvii lekarstvennykh sredstv – aktivatorov kaliyevykh kanalov. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 269-274. (In Russ.)]
28. Шаскольская М.П. *Кристаллография*. М.: Высшая школа, 1976, 390 с. [Shaskol'skaya M.P. *Kristallografiya*. М.: Vysshaya shkola, 1976, 390 p. (In Russ.)]

29. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., Penkov N.V., Kozlov V.A., Gudkov S.V. Shaking-Induced Aggregation and Flotation in Immunoglobulin Dispersions: Difference between Water and Water-Ethanol Mixtures. *Amer. Chem. Soc.*, 2020, vol. 5, no. 24, pp. 14689-14701, doi: 10.1021/acsomega.0c01444.

30. Бадеников А.В., Власов В.А., Волокитин Г.Г., Горленко Н.П., Клопотов А.А., Саркисов Ю.С. *Активированная вода и модифицированные водные растворы в технологических процессах*. Томск: ТГАСУ, 2017, 276 с. [Badenikov A.V., Vlasov V.A., Volokitin G.G., Gorlenko N.P., Klopotov A.A., Sarkisov Yu.S. *Aktivirovannaya voda i modifitsirovannyye vodnyye rastvory v tekhnologicheskikh protsessakh*. Tomsk: TGASU, 2017, 276 p. (In Russ.)]

31. Эфендиев А.З., Эфендиев К.А. Каналирование газовых разрядов. *Прикладная физика*, 2007, № 1, с. 78-84. [Efendiyev A.Z., Efendiyev K.A. Kanalirovaniye gazovykh razryadov. *Prikladnaya fizika*, 2007, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]

32. Кощеев В.П., Штанов Ю.Н., Моргун Д.А. Правило распределения электронных и ядерных потерь энергии каналированных частиц. *Известия РАН. Серия физическая*, 2018, т. 82, № 2, с. 205-209. [Koshcheyev V.P., Shtanov Yu.N., Morgun D.A. Pravilo raspredeleniya elektronnykh i yadernykh poter' energii kanalirovannykh chastits. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2018, vol. 82, no. 2, pp. 205-209, doi: 10.7868/S036767651802014X. (In Russ.)]

FEATURES OF PROTEIN-INDUCED ASSOCIATES AT SUPERHIGH DILUTION OF ANTIBODIES TO INTERFERON- γ

Maslennikova O.M.¹, Sibirev A.L.², Shipko M.N.², Stepovich M.A.³

¹Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs,
st. Marshal Timoshenko, 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

²Lenin Ivanovo State Power Engineering University,
Rabfakovskaya st. 34, Ivanovo, 153025 Russia; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³Tsiolkovsky Kaluga State University,
Stepan Razin st. 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

Received 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2022.0546

Abstract. The possibilities of using the channeling of low-energy (9-13 keV) electrons to determine the nature of changes in the positional order in the arrangement of molecular complexes of water and protein-induced associates at ultrahigh dilution of antibodies to interferon- γ without and in the presence of excipients were studied. We used the method of gas-discharge visualization, which makes it possible to record the parameters of the avalanche-streamer discharge caused by the field emission of electrons passing through the bulk and surface of the drop of the studied solutions. Studies of the structural organization of drug solutions were carried out on solutions of polyclonal affinity-purified human antibodies to interferon- γ . Solutions were obtained by repeated dilution of antibodies in purified water. Used solutions corresponding to four concentration points of antibodies. An analysis of the patterns of the gas-discharge image of solutions made it possible to determine the stereographic projections of the channels of electron motion formed by molecular complexes of solutions, as well as the energy and average concentration of electrons, their energy distribution associated with the features of the short-range order, the specifics of self-organization processes. The results obtained indicate significant changes in the water-dispersed medium during its dilution with human antibodies to interferon- γ .

Key words: drug solutions, electron channeling, gas discharge imaging, ultrahigh dilution of antibodies to interferon- γ .

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 1,1-БИС(1*H*-ИМИДАЗОЛ-1-ИЛ)МЕТАНИМИНА

Гребешкова Н.А.¹, Глотов А.А.¹, Роденко Н.А.^{1,2}

¹ Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королёва
Московское шоссе, 34, г. Самара, 443086, РФ; e-mail: nadya.greb@yandex.ru

² Самарский федеральный исследовательский центр РАН
Студенческий переулок, 3А, г. Самара, 443001, РФ

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0547

Аннотация. В работе рассматривается воздействие импульсного магнитного поля на биологическую активность вновь синтезированного противогрибкового препарата на основе имидазола 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина. Для проведения исследования последовательно использовано два экспериментальных метода: обработка противогрибкового препарата посредством магнитно-импульсной установки и анализ результатов обработки с помощью диско-диффузионного метода. В ходе экспериментов проверялась гипотеза об увеличении антимикотической активности противогрибкового препарата под воздействием импульсного магнитного поля. Контрольными объектами эксперимента являлись штаммы *Penicillium adametzioides* и *Aspergillus flavus*. Обработку препарата осуществляли на магнитно-импульсной установке при напряженностях электромагнитного поля $H=(0,09\pm 0,27)\cdot 10^6$ А/м при частоте $f=40$ кГц с числом импульсов $n=1$. Анализ результатов эксперимента показал, что импульсное магнитное поле оказывает влияние на противогрибковый препарат, происходит ингибирование роста колонии *Aspergillus flavus* на 71%. При этом в процессе изучения влияния необработанного препарата на выросшие колонии *Aspergillus flavus* зоны лизиса зафиксированы не были. При исследовании влияния обработанного препарата на ингибирование роста колонии *Penicillium adametzioides* не было зафиксировано достоверного увеличения зон лизиса. Однако при изучении влияния обработанного импульсным магнитным полем противогрибкового препарата на выросшие колонии гриба *Penicillium adametzioides* было установлено максимальное достоверное увеличение зон лизиса на 13%.

Ключевые слова: 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимин, импульсное магнитное поле, спектр биологической активности, антимикотическая активность.

Повышение резистентности плесневых грибов к антимикотическим препаратам в настоящее время является серьёзной проблемой, затрагивающей различные сферы безопасности жизнедеятельности человека. Есть два основных пути решения данной проблемы: синтез новых веществ или усиление их активности, например, при воздействии магнитным полем. В настоящее время появляется все больше работ, связанных с воздействием магнитного поля на различные вещества. Существуют данные, которые говорят о достоверном влиянии магнитного поля на биологическую активность разнообразных живых организмов. В частности, большое количество исследований посвящено изучению воздействия импульсных электромагнитных полей на жизнедеятельность организмов, а также применению магнитных полей в различных областях медицины. Кроме того, исследуется влияние инфранизкочастотных магнитных полей на рост колоний микроорганизмов, ранний онтогенез растений и эмбриогенез млекопитающих [1].

В ряде работ исследуется влияние магнитного поля на активность ферментов, есть данные об увеличении активности фермента овотрансферрина в растворе при обработке его импульсным магнитным полем [2]. При этом железосвязывающая способность достигает максимума по сравнению с необработанным ферментом. В другом случае при обработке лактатдегидрогеназы переменным магнитным полем происходило увеличение скорости реакции по сравнению с необработанным ферментом [3]. Достоверно установлено влияние магнитного поля на антибактериальную активность антибиотиков и усиление активности на 20% [4]. Кроме того, существуют данные об усилении активности противоопухолевых препаратов [5]. Исследователи Калининского медицинского института предприняли попытку проследить воздействие постоянного магнитного поля на барбамил (снотворное вещество). Лабораторные мыши, которые получали предварительно «намагниченный» препарат, спали дольше, чем животные из контрольной группы, получившие такую же дозу «не намагниченного» препарата [6].

Таким образом, можно сделать обоснованное предположение о возможном проявлении влияния импульсного магнитного поля (ИМП) на антимикотические вещества имидазольного ряда по аналогии с рассмотренными выше результатами. Исследования такого типа актуальны, поскольку препараты Клотримазол, Миконазол и Кетоконазол, являются производными имидазола, они широко распространены в практике при лечении грибкового поражения.

Целью работы является исследование воздействия ИМП на биологическую активность 1,1-бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина. Следует отметить, что ИМП находят широкое применение в производственных процессах [7], причем источником ИМП является магнитно-импульсная установка [8], блок-схема которой приведена на рисунке 1.

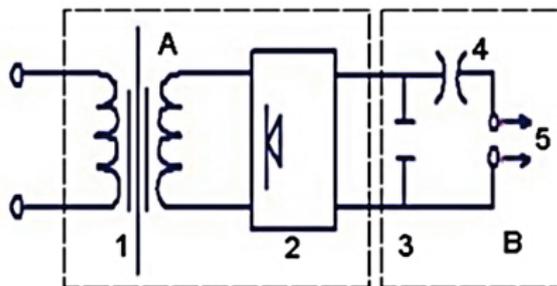


Рисунок 1. Блок-схема магнитно-импульсной установки: 1 – повышающий трансформатор, 2 – выпрямитель, 3 – батареи конденсаторов, 4 – разрядник, 5 – устройство для подключения индуктора

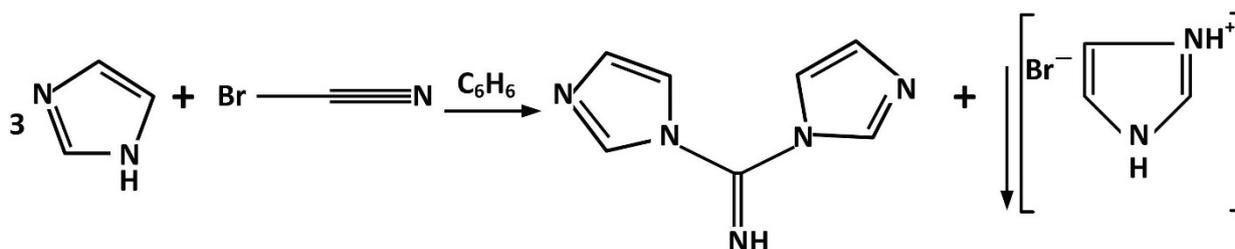


Рисунок 2. Схема синтеза 1,1-бис(1H-имидазол-1-ил)метанимина

Здесь ИМП возникает в результате разряда батареи конденсаторов на индуктор (катушку). ИМП возникает и распространяется вокруг витков токопровода индуктора.

Объектом исследования и одновременно объектом воздействия ИМП являлось производное имидазола — 1,1-бис(1H-имидазол-1-ил)метанимин. Данное вещество было синтезировано на кафедре неорганической химии Самарского университета в ходе реакции имидазола и бромциана в среде кипящего абсолютного бензола, как представлено на рисунке 2 [9]. В качестве растворителя для 1,1-бис(1H-имидазол-1-ил)метанимина был применён диметилсульфоксид (ДМСО), концентрация вещества составляла 5%.

Анализ спектра возможных биологических активностей с помощью программы PASS Online [10] проводился из-за предположения об антимикотической активности производного вещества путём ингибирования глюкан-эндо-1,3-β-D-глюкозидазы. Данный фермент участвует в одной из стадий синтеза 1,3-β-D-глюкана – важной составляющей клеточной стенки грибка [11]. Также, предполагается, что как и имидазол, 1,1-бис(1H-имидазол-1-ил)метанимин может ингибировать активность ланостерол 14-α-деметилазы, что вызывает нарушение синтеза эргостерола – важного для грибковой клеточной стенки вещества. Такой эффект свойственен веществам азольного ряда, что применяется на данный момент во множестве противогрибковых препаратов, таких как Клотримазол, Миконазол, Кетоконазол и пр.

Воздействие ИМП проводилось на магнитно-импульсной установке МИУ-15. Флакон с высушенным порошкообразным веществом помещался в одновитковый индуктор и производилась обработка ИМП при напряженностях магнитного поля $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H=0,21 \cdot 10^6$ А/м и $H=0,27 \cdot 10^6$ А/м в течение 0,002-0,005 секунд (см. табл. 1).

Для изучения фунгицидной активности использовались культуры *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) и *Penicillium adametzioides*. Грибы рода *Aspergillus* способны вызывать разнообразные заболевания человека и животных, известные как аспергиллезы. Среди факторов патогенности грибов рода *Aspergillus* выделяют инвазивный рост, способность выживать во внутренней среде человека, а также наличие ферментов- протеиназ, в частности – кератиназ и эластазы. Данный фермент способен разрушать эластические волокна легких [12]. В частности, *A. flavus* является токсигенным, выделяя экзотоксины (афлотоксины, или флавотоксины). Есть также множественные данные о том, что некоторые представители рода *Penicillium* являются патогенами растений. К примеру, *Penicillium adametzioides* вызывает гниение плодов винограда [13], *Penicillium italicum*

Таблица 1. Параметры обработки импульсным магнитным полем противогрибкового препарата на основе имидазола 1,1-Бис(1H-имидазол-1-ил)метанимина

Напряжение U, кВ	Энергия W, кДж	Частота f, кГц	Напряженность H, 10 ⁶ А/м	Количество импульсов, n
3	0,45	40,0	0,09	1
7	2,49		0,21	
9	4,11		0,27	

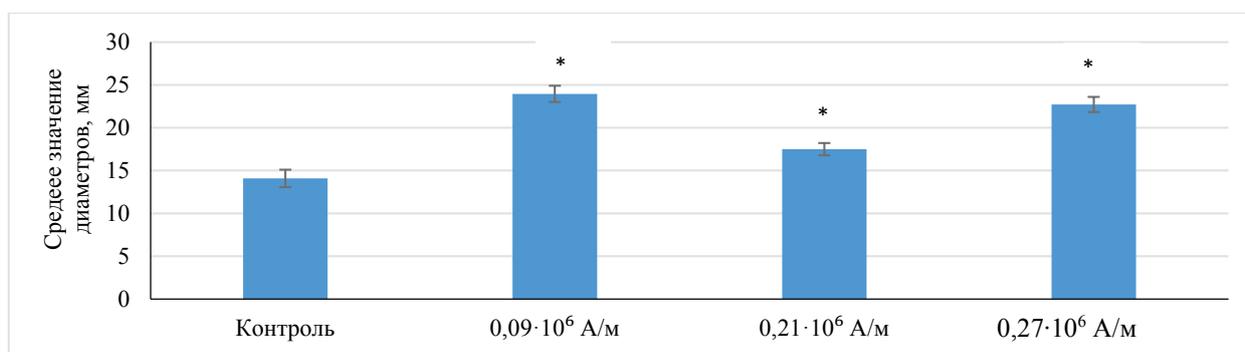


Рисунок 3. Диаметры зон подавления роста *Aspergillus flavus* при воздействии импульсным магнитным полем на 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимин

Примечание: * – отличия диаметра зоны подавления роста *Aspergillus flavus* при воздействии ИМП на 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимин достоверны от контроля с уровнем значимости $P < 0,05$

и *Penicillium digitatum* вызывают гниение плодов цитрусовых [14,15], а *Penicillium corymbiferum* вызывает гниение луковиц тюльпанов [16].

Таким образом, представители рода *Aspergillus* и *Penicillium* являются возбудителями многих заболеваний человека, животных и растений. Это делает необходимым разработку эффективных средств борьбы с ними.

Для выделения культуры *Aspergillus flavus* с территории Самарского университета были взяты пробы почвы, из которой готовилась первичная суспензия. Далее суспензия серийно разведений доводилась до концентрации 1:1000000. Полученный раствор использовался для культивирования колоний микроорганизмов.

Впоследствии антимикотическую активность определяли с помощью диско-диффузионного метода на кафедре биохимии, биотехнологии и биоинженерии Самарского университета. Суть метода заключалась в том, что при достижении равномерного роста колоний грибов на поверхность агара выкладывалось по 4 диска на которые раскапывалось по 20 мкл противогрибкового препарата. В свою очередь, в эксперименте на начальный рост, сразу после посева из жидкой среды на поверхность агара выкладывались смоченные веществом диски, и далее проводилась инкубация в термостате. Во всех опытах контролем являлся необлученный противогрибковый препарат.

По прошествии 3-х суток осуществлялся замер диаметров зоны лизиса вокруг дисков, далее производилась статистическая обработка полученных результатов. Также проводился отдельный эксперимент с ДМСО, который показал отсутствие влияния ДМСО на колонии плесневых грибов.

В процессе изучения влияния необработанного ИМП вещества на выросшие колонии *Aspergillus flavus* зоны лизиса зафиксированы не были. Однако были обнаружены зоны обесцвечивания спор. В ходе исследования влияния обработанного ИМП вещества на ингибирование роста той же колонии гриба наибольшее достоверное увеличение зон лизиса было зафиксировано при напряженности магнитного поля $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м на 71% (рис. 3).

В эксперименте по исследованию влияния обработанного ИМП препарата на выросшие колонии гриба *Penicillium adametzioides* было установлено достоверное увеличение зон лизиса при напряженностях магнитного поля $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H=0,21 \cdot 10^6$ А/м на 13% и уменьшение зон лизиса при напряженностях магнитного поля $H=0,27 \cdot 10^6$ А/м на 22%. Результаты эксперимента приведены на рисунке 4.

В ходе исследования по влиянию обработанного ИМП препарата на ингибирование роста этой же колонии плесневых грибов не было зафиксировано достоверного увеличения зон лизиса (рис. 5).

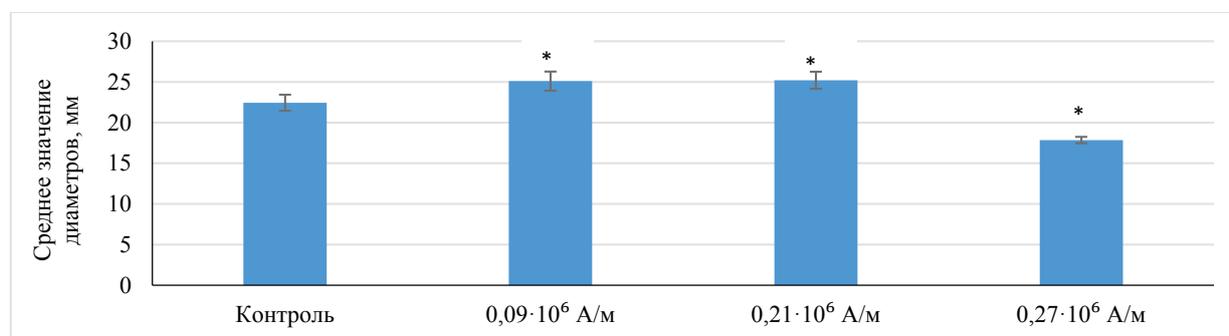


Рисунок 4. Диаметры зон лизиса после воздействия импульсным магнитным полем на 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина на уже выросший *Penicillium adametzioides*

Примечание: * – отличия диаметра зон лизиса *Penicillium adametzioides* при воздействии ИМП на 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина достоверны от контроля с уровнем значимости $P < 0,05$.

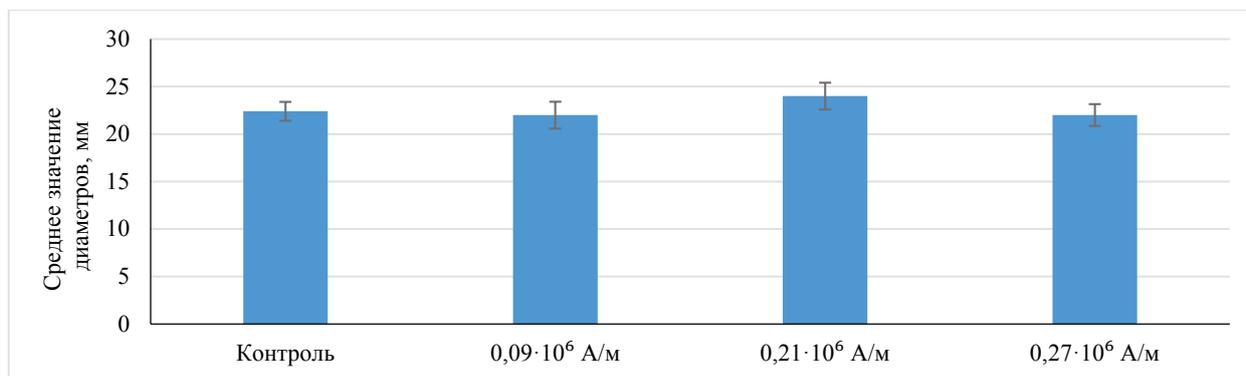


Рисунок 5. Диаметры зон подавления роста *Penicillium adametzioides* при воздействии импульсным магнитным полем на 1,1-Бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимин

На основании полученных результатов можно делать выводы о воздействии импульсного магнитного поля на антимикотическую активность данного вещества. По итогу эксперимента было выявлено как увеличение эффекта от воздействия ИМП на препарат, так и его уменьшение. В частности, при обработке ИМП препарата с напряженностью $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м, зоны лизиса растущей колонии *Aspergillus flavus* достоверно увеличились на 71 % по сравнению с контролем. Также было установлено достоверное увеличение зон лизиса на выросшей колонии гриба *Penicillium adametzioides* на 13% при обработке ИМП вещества с напряженностями $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м и $H=0,21 \cdot 10^6$ А/м. Однако, наблюдалось уменьшение эффекта препарата, заключающееся в уменьшении зон лизиса той же колонии плесневых грибов на 22%, в случае обработки вещества ИМП при напряженности $H=0,27 \cdot 10^6$ А/м. В дальнейшем, для более детального изучения эффекта планируется проводить испытания при других параметрах напряженности и с другими колониями плесневых грибов.

Список литературы / References:

1. Усанов Д.А., Скрипаль А.В., Усанов А.Д., Рытик А.П. *Биофизические аспекты воздействия электромагнитных полей: Учеб. пособие для студ. фак. нано- и биомед. технологий, обучающихся по спец. «Медицинская физика» и направлению «Биомедицинская инженерия»*. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2008, 136 с. [Usanov D.A., Skripal A.V., Usanov A.D., Rytik A.P. *Biophysical Aspects of the Effects of Electromagnetic Fields: Textbook for students of the Faculty of Nano- and Biomedical Technologies studying in the specialty "Medical Physics" and the direction "Biomedical Engineering"*. Saratov: Izd-vo Sarat. un-ta, 2008, 136 p. (In Russ.)]
2. Zhang T., Liu D., Yuan Y., Zheng J., Ye H., Xi C., Yin Y., Ahmad S. Effect of pulsed electric fields on the antibacterial activity of ovotransferrin and mechanism of action. *Advanced Materials Research*, 2013, vol. 734-737, pp. 2260-2268.
3. Чеботарева Е.Г., Бородулин В.Б., Горошинская И.А., Бабушкина И.В., Фомина Н.Ю., Моррисон В.В., Усанов А.Д., Скрипаль А.В., Усанов Д.А. Влияние магнитного поля на активность фермента лактатдегидрогеназы. *Известия высших учебных заведений Северо-Кавказский регион. Серия: естественные науки*, 2006, № 4, с. 80-83. [Chebotareva E.G., Borodulin V.B., Goroshinskaya I.A., Babushkina I.V., Fomina N.Yu., Morrison V.V., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. Influence of a magnetic field on the activity of the enzyme lactate dehydrogenase. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy Severo-Kavkazskiy region. Seriya: yestestvennyye nauki*, 2006, no. 4, pp. 80-83. (In Russ.)]
4. Glushchenkov V.A., Vasilyeva T.I., Purigin P.P., Belyaeva I.A., Rodenko N.A., Madyarova A.K., Jusupov R.J. Changes in the Antibacterial Activity of Benzylpenicillin Exposed to a Pulsed High-Intensity Magnetic Field. *Biophysics*, 2019, vol. 64, iss. 2, pp. 214-223, doi: 10.1134/S0006350919020088.
5. Kakikawa M., Yamada S. Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic fields on anticancer drugs potency. *IEEE Transactions on Magnetics*, 2012, vol. 48, pp. 2869-2872, doi: 10.1109/TMAG.2012.2200881.
6. Shaporov V. *The effect of magnetic field on the action of medicinal substances*. Medchitalka. (In Russ.)
7. Глушечков В.А. *Энергетические установки для магнитно-импульсной обработки материалов*. Самара: Издательский дом «Федоров», 2013, 123 с. [Glushchenkov V.A. *Power plants for magnetic-pulse processing of materials*. Samara: Izdatelskiy dom «Fedorov», 2013, 123 p. (In Russ.)]
8. Глушечков В.А., Стукалов С.А., Голиусов Т.А. Использование магнитно-импульсной обработки при протезировании. *Кузнечно-штамповочное производство*, 1994, вып. 2, с. 20-21. [Glushchenkov V.A., Stukalov S.A., Goliusov T.A. Use of magnetic-pulse working during prosthetic manufacture. *Kuznechno-Shtampovochnoe Proizvodstvo*, 1994, iss. 2, pp. 20-21. (In Russ.)]
9. Пурьгин П.П., Зарубин Ю.П. Синтез симметричных и несимметричных 1,1'-бис(1*H*-азол-1-ил)метаниминов. *Бутлеровские сообщения*, 2017, т. 52, № 12, с. 146-152. [Purygin P.P., Zarubin Yu.P. Synthesis of symmetrical and unsymmetrical 1,1'-bis(1*H*-azol-1-yl)methanimines. *Butlerovskiyee soobshcheniya*, 2017, vol. 52, no. 12, pp. 146-152, doi: jbc-01/17-52-12-146. (In Russ.)]
10. Глотов А.А., Пурьгин П.П., Зарубин Ю.П. Спектр возможных видов биологической активности для 1,1'-бис(азолил-1)метаниминов. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*, 2022, № 1,

- c. 62-65. [Glotov A.A., Purygin P.P., Zarubin Yu.P. Spectrum of possible types of biological activity for 1,1'-bis(azolyl-1)methanimines. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2022, no. 1, pp. 62-65. (In Russ.)]
11. Free S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*, 2013, vol. 81, pp. 33-82, doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6.
12. Федотов В.П. Глубокие микозы. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*, 2008, № 3-4 (11), с. 139-167. [Fedotov V.P. Deep mycoses. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya. Seksopatologiya*, 2008, no. 3-4 (11), pp. 139-167. (In Russ.)]
13. Deng J.X., Paul N.C., Sang H.K., Lee J.H., Hwang Y.S., Yu S.H. First Report on Isolation of *Penicillium adametzioides* and *Purpureocillium lilacinum* from Decayed Fruit of Cheongsoo Grapes in Korea. *Mycobiology*, 2012, vol. 40, no. 1, pp. 66-70, doi: 10.5941/MYCO.2012.40.1.066.
14. Kanashiro A.M., Akiyama D.Y., Kupper K.C., Fill T.P. *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. *Frontiers in microbiology*, 2020, vol. 11, pp. 1-17, doi: 10.3389/fmicb.2020.606852.
15. Yang Q., Qian X., Dhanasekaran S., Boateng N., Yan X., Zhu H., He F., Zhang H. Study on the Infection Mechanism of *Penicillium Digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus Reticulata* Blanco) Based on Transcriptomics. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 12, pp. 1-13, doi: 10.3390/microorganisms7120672.
16. Иванова О.В., Балькина Е.Б., Александрова Л.М. Биологическая эффективность фунгицида Бактофорт Ж при обработке луковиц тюльпанов перед посадкой. *Биологическое разнообразие и интродукция растений*, 2021, № 1, с. 74-78. [Ivanova O.V., Balykina E.B., Aleksandrova L.M. Biological efficiency of Baktofort Zh fungicide in the treatment of tulip bulbs before planting. *Biologicheskoye raznoobrazie i introduktsiya rasteniy*, 2021, no. 1, pp. 74-78, doi: 10.24412/cl-36598-2021-1-74-78. (In Russ.)]

CHANGES IN THE ANTIMYCOTIC ACTIVITY OF 1,1-BIS(1H-IMIDAZOL-1-YL)METHANIMIN BY THE INFLUENCE OF A PULSED MAGNETIC FIELD

Grebeshkova N.A.¹, Glotov A.A.¹, Rodenko N.A.^{1,2}

¹ Samara National Research University

Moskovskoye shosse, 34, Samara, 443086, Russia; e-mail: nadya.greb@yandex.ru

² Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

Studentskiy pereulok, 3A, Samara, 443001, Russia

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0547

Abstract. The paper is devoted to the study of pulsed magnetic field impacting at the biological activity of a newly synthesized antifungal drug based on the imidazole 1,1-Bis(1H-imidazole-1-il)metanimine. Two experimental methods were consistently used for the study like as the treatment of an antifungal drug through installation of electromagnetic pulse emission and analysis of the results of treatment with the disco-diffusion method. During the experiments, the hypothesis of an increase in the antimycotic activity of an antifungal drug under the influence of a pulsed magnetic field was tested. The monitoring objects of the experiment were strains of the *Penicillium adametzioides* and the *Aspergillus flavus*. The antifungal drug was treated on the magnetic-pulse installation at the electromagnetic field strength $H=(0.09\pm 0.27)\cdot 10^6$ A/m at frequency $f=40$ kHz with the number of pulses $n=1$. The analysis of experimental results has shown that the pulsed magnetic field has an effect on the antifungal drug, during which there is an inhibition of the growth of the colony of *Aspergillus flavus* by 71%. At the same time, in the process of studying the effect of the unirradiated antifungal drug impact at the grown colonies of the *Aspergillus flavus*, were not recorded the lysis zones increasing. Studying of the effect of the irradiated antifungal drug impact at the inhibition of the growth of the colony of the *Penicillium adametzioides*, there was not recorded lysis zones significant increasing. At the same time, during the experiment on the research of effect of the antifungal drug that was treated with a pulsed magnetic field at the grown colonies of the fungus *Penicillium adametzioides*, the maximum significant increase in lysis zones by 13% was discovered.

Key words: 1,1-Bis(1H-imidazol-1-yl)methanimine, pulsed magnetic field, spectrum of biological activity, antimycotic activity.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДНК ПЛАЗМИД СПОСОБСТВУЕТ ИХ ПРОНИКНОВЕНИЮ В ЦИТОПЛАЗМУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Конькова М.С.¹, Ершова Е.С.¹, Вейко Н.Н.¹, Кальянов А.А.¹, Малиновская Е.М.¹,
Каменева Л.В.¹, Вейко В.П.^{1,2}, Костюк С.В.¹

¹Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: mkonkova@med-gen.ru

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

Ленинский просп., 33, к. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0548

Аннотация. Хорошо известно, что действие ионизирующей радиации вызывает окислительный стресс в клетках организма и приводит к синтезу активных форм кислорода, которые приводят к множественным поражениям клеточной ДНК, в числе которых - образование окисленных оснований. В данной работе рассматривается влияние радиационно-индуцированной окислительной модификации ДНК плазмид на их проникновение в мезенхимные стволовые клетки человека. Для исследования роли окислительной модификации ДНК в проникновении в клетки была создана генетическая конструкция на основе вектора pEGFP-C1 (pC1), GenBankAccession: U55763, содержащая в качестве вставки искусственно синтезированный фрагмент ДНК, имеющий в своем составе поли-G участок (p12G), служащий мишенью для эффективного окисления клонированного фрагмента ДНК. В качестве «маркера» в составе выбранного вектора содержится ген флуоресцирующего белка EGFP (GFP). Методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии было показано, что рекомбинантные конструкции на основе вектора pEGFP, содержащие дублированные участки поли-G и повторы Gp намного эффективнее проникают в клетки, чем исходный вектор pEGFP. Воздействие радиации в дозе 50 сГр, вызывающее повышение уровня 8-oxodG в плаزمидах после облучения, приводит к более интенсивному проникновению окисленных плазмид по сравнению с аналогичным экспериментом без облучения.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, ионизирующее излучение, рекомбинантные конструкции, окисленная ДНК, 8-oxodG, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки являются недифференцированными клетками, обладающими потенциалом для неограниченного деления и дифференцировки во многие типы клеток. Поскольку стволовые клетки являются резервным пулом для пополнения разных типов клеток организма, проводятся эксперименты *in vitro* по перетрансформации стволовых клеток в соматические клетки и исследуются эффективные способы трансфекции плазмид в цитоплазму стволовых клеток.

Действие ионизирующей радиации вызывает окислительный стресс в клетках организма и приводит к синтезу активных форм кислорода (АФК); процесс формирования АФК после облучения занимает от нескольких секунд до 2-5 минут от начала экспозиции в различных типах клеток [1]. АФК приводят к множественным поражениям клеточной ДНК, в числе которых - образование окисленных оснований [2].

Ранее мы показали, что окислительная модификация внеклеточной ДНК при добавлении в среду культивирования раковых клеток линии MCF7 способствует ее проникновению в цитоплазму клеток [3]. Облучение рентгеновским излучением в дозе 10 сГр раковых клеток MCF7 после добавления ГЦ-обогащённых плазмид в среду их культивирования приводило к повышению уровня 8-oxodG в плазмиде через 30 минут после облучения и к более интенсивному проникновению окисленных плазмид по сравнению с аналогичным экспериментом без облучения [4].

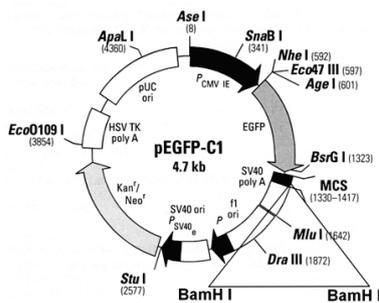
Кроме того, нами было обнаружено, что при облучении дозами радиации 10-50 сГр в результате гибели части клеток в среде культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) накапливаются окисленные фрагменты внеклеточной ДНК, которые проникают в цитоплазму МСК [5,6]. Предположили, что окислительная модификация ДНК вследствие воздействия радиации может приводить к эффективному проникновению ДНК из среды культивирования МСК внутрь клетки.

Задачей данного исследования являлось изучение роли окислительной модификации ДНК в процессе проникновения ДНК в виде плазмид через цитоплазматическую мембрану МСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования роли окислительной модификации ДНК в проникновении в клетки была создана генетическая конструкция на основе «базового» вектора pEGFP-C1 (pC1), GenBankAccession: U55763 (рис. 1А).

А



Б

Плазмида p12G

```

N S A V D G T A G P G S T G S R &
5' cgaattctgcagtcgacgggtaccgcccgggatccaccggatctagataatcgccgt
      ^BamHI
ccgcccgcgccttgggggggggggatccaccggatctagataaactgatcataatcag
      ^BamHI

```

Плазмида p13G-11G

```

A V D G T A G P G S T G S R
5' tgcagtcgacgggtaccgcccgggatccaccggatctagataatcgccgtccgcccgcgc
      ^BamHI
gccccttgggggggggggatccaccggatctagataaactgatcataatcagcc
      ^BamHI
ttgggggggggggatccaccggatctagataaactgatcataatcagcc
      ^BamHI

```

Рисунок 1. А. Структура «базового» вектора. Обозначено положение вводимого в состав плазмиды «модифицирующего» фрагмента ДНК (BamH I - BamH I). Б. Структуры «модифицирующих» вставок ДНК, клонированных в составе «базовой» плазмиды pEGFP-C1. Приведена трансляция 3'-концевой части гена GFP, жирным шрифтом выделены сайты BamHI, курсивом – поли-Г участки в структуре «модифицирующих» вставок ДНК

Следует отметить, что G/C-состав плазмиды pC1 составляет 53,4% и она содержит в своей структуре 141 участок повтора GGG и 15 участков GGGG (как наиболее легко окисляемые участки ДНК [7]). В качестве «маркера» в составе данного вектора содержится ген белка EGFP (GFP), который сайт-направленным мутагенезом (замена аминокислотных остатков Phe-64-Leu и Ser65-Thr) оптимизирован для более высокого уровня флуоресценции со сдвигом в красную область (волна возбуждения 488 нм, а волна эмиссии – 507нм). Структура гена EGFP оптимизирована для эффективной его экспрессии в клетках эукариот, что важно для выявления трансфицированных клеток даже при низком уровне трансфекции.

Для исследования функциональной роли легкоокисляемой структуры, дополнительно вводимой в состав плазмиды pEGFP-C1, был выбран искусственно синтезированный фрагмент ДНК, содержащий поли-Г участок (как мишень для эффективного окисления клонированного фрагмента ДНК). Искусственно получаемый фрагмент ДНК, содержащий участки поли-Г структур, имеет длину 121 нуклеотидных пар и его G/C-содержание составляет 73,6%. Кроме того, в его структуре имеется участок поли-Г, роль которого (в окисленной форме) в эффективности трансфекции ДНК выявлялась в данном исследовании. При получении целевых фрагментов ДНК, предназначенных для специфической модификации «базовой» плазмиды pEGFP-C1, использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры GF_601 (gggcccgggatccaccggatctagataatcgccgtcccgcgcgcctt) и C10 (tttttgatcccccccccaaggcggcggcgggacggcgca). Синтезируемые с их использованием фрагменты ДНК фланкированы сайтами эндонуклеазы рестрикции BamHI. Этот сайт является уникальным в плазмиде pEGFP-C1, что обеспечивает точную адресную «модификацию» исходного вектора клонируемым фрагментом ДНК. Сайт эндонуклеазы рестрикции BamHI входит в плазмиде pEGFP-C1 в состав мультиклонального участка (рис. 1А, MCS), кодирующего одновременно С-концевой фрагмент белка GFP, нарушать структуру которого было нежелательно. В связи с этим в структуру праймера GF_601 был введен участок нуклеотидной последовательности, копирующей таковую в исходной «базовой» плазмиде pEGFP-C1. Разработанная тактика позволяла не только точно клонировать «модифицирующий» фрагмент ДНК в составе вектора pEGFP-C1, но и не нарушить структуру функционально важных участков. После взаимной достройки с применением ПЦР, полученный фрагмент был клонирован. Во время скрининга клонов и определения нуклеотидной последовательности клонированной «модифицирующей» вставки, кроме целевой плазмиды (p12G) был дополнительно найден вариант плазмиды (p13G-11G), содержащий в своем составе дублирование поли-Г последовательности. Этот вариант был также выбран для исследований. Нуклеотидные последовательности «модифицирующих» вставок в «базовую» плазмиду приведены на рисунке 1Б.

В работе использован вектор pEGFP-C1 (pC1) и производные плазмиды pEGFP-C1:

1. p12G, содержащая участок поли-Г;
2. p13G-11G, содержащая дублированные участки поли-Г

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* МСК, полученных из пяти образцов жировой ткани, из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител на приборе CyFlow (PartecCyFlow® ML, Германия). МСК были типированы по поверхностным антигенам: HLA-ABC +, CD44 +, CD54 (low), CD90 +, CD106 +, CD29 +, CD49b (low), CD105 (low). Клетки центрифугировали (200g, 10 мин), перенесли во флаконы и культивировали при 37°C в среде AmnioMax C-100 BasalMedium ("Gibco"), содержащей AmnioMaxSupplement C-100, 20 мкмоль/л NEPEP ("ПанЭко") и антибиотики.

В МСК плазмиды вводили двумя способами: путем введения плазмид, содержащих ген флуоресцирующего белка, в среду культивирования в концентрации 100 нг/мл с последующим инкубированием

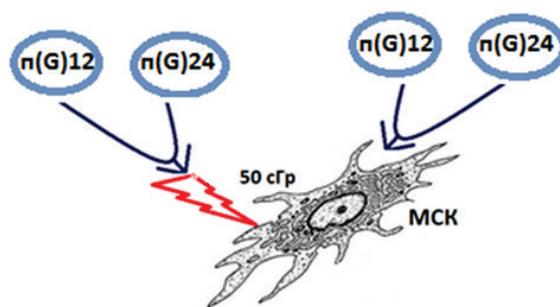


Рисунок 2. Схема эксперимента: в МСК плазмиды вводили двумя способами: путем введения плазмид, содержащих ген флуоресцирующего белка, в среду культивирования в концентрации 100 нг/мл с последующим инкубированием 24 часа в CO₂ инкубаторе при 37 °С и путем введения плазмид в концентрации 100 нг/мл с последующим облучением через 2-3 минуты рентгеновским излучением в дозе 50 сГр с инкубированием 24 часа в CO₂ инкубаторе при 37 °С

24 часа в CO₂ инкубаторе при 37 °С и путем введения плазмид в концентрации 100 нг/мл с последующим облучением через 2-3 минуты рентгеновским излучением в дозе 50 сГр при помощи импульсного рентгеновского аппарата «АРИНА-2» (ООО «Спектрофлэш, С.-Пб.) и с инкубированием 24 часа в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Схема эксперимента приведена на рис. 2. В качестве контрольного эксперимента по трансфекции плазмид в клетки и для иллюстрации способности плазмид транскрибироваться в клетках применили стандартный подход с использованием реагента для трансфекции фирмы Thermo – Turbo Fect набор, согласно протоколу.

Для анализа проникновения плазмид в клетки применили два метода: флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия) и проточной цитофлуориметрии (PartecCyFlow® ML, Германия), перед проведением анализа контрольные или обработанные плаزمидами клетки промывали раствором Versene, далее раствором трипсина (0, 25 %). Клетки промывали стандартным соевым буферным раствором (PBS) и ресуспендировали в 1 мл PBS.

Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения Carl Zeiss Microscopy, различия проверяли с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни и считали достоверными при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все использованные в работе плазмиды содержат ген флуоресцирующего белка. Если плазида проникает в клетки и происходит экспрессия белка, то интенсивность флуоресценции клеток должна возрастать пропорционально уровню экспрессии белка. Результаты анализа приведены на рисунке 3.

Средняя интенсивность флуоресценции клеток относительно интактных клеток (контроль) возрастает после их инкубирования в присутствии интактных (неокисленных) плазмид в ряду (серые и фиолетовые столбики на рис. 3):

Контроль <pC1 <pG12 <pG13-11 ≈ pG12 (Turbo Fect) ≈ pG13-11(Turbo Fect).

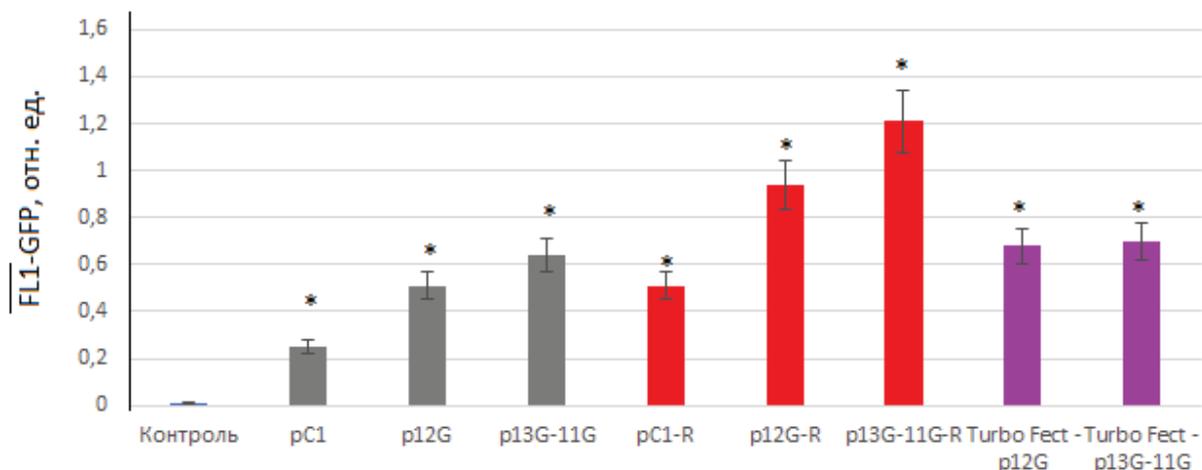


Рисунок 3. Анализ флуоресценции клеток МСК методом проточной цитофлуориметрии. Приведены медианы флуоресценции клеток в различных условиях. Условия культивирования показаны на рисунке 2. R – воздействие радиации, 50 сГр. * – достоверное увеличение флуоресценции относительно контроля ($p < 0,001$)

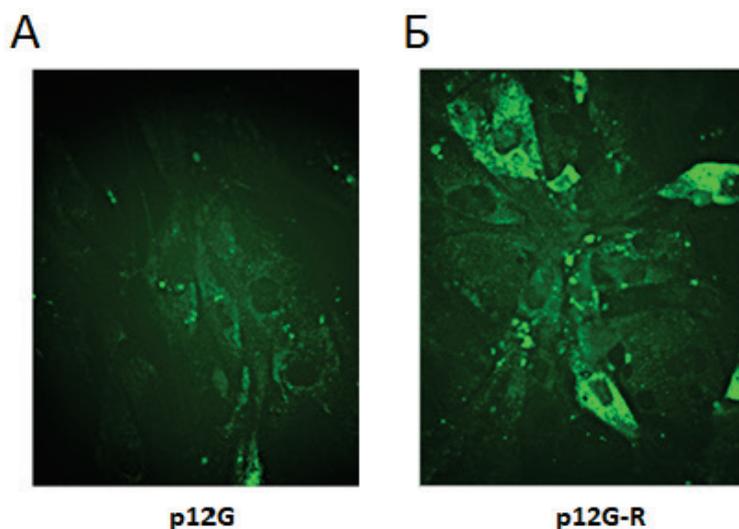


Рисунок 4. Метод флуоресцентной микроскопии: А – В среду культивирования МСК вносили генетическую конструкцию, содержащую ген флуоресцирующего белка, в концентрации 100 нг/мл, клетки инкубировали 24 часа в CO_2 инкубаторе при 37°C ; Б – после внесения в среду культивирования МСК генетической конструкции клетки облучали радиацией в дозе 50 сГр. (увеличение $\times 40$)

Можно предположить, что небольшой окислительный стресс в культуре клеток привел к увеличению проникновения плазмид, обогащенных поли-G, в клетки МСК. При этом промоторные области плазмид остаются не поврежденными и транскрибируются с последующей экспрессией флуоресцирующего белка.

При воздействии на клетки окислительного стресса, вызываемого ионизирующим излучением, обнаружили усиление проникновения плазмид в клетки (рис. 3, красные столбики) с последующей экспрессией флуоресцирующего белка по сравнению с плазмидами в отсутствие радиации. Предполагаемый механизм проникновения плазмид pG12 и pG13-11 в клетки при действии радиации включает окисление dG (в составе поли-dG участков) на поверхности клеток. В случае умеренного окисления часть молекул плазмиды содержит неизменный промоторный участок, позволяющий осуществить транскрипцию гена флуоресцентного белка. Средняя интенсивность флуоресценции при действии радиации и без нее изменяется в ряду:

Контроль < pC1 < pG12 \approx pG1-R < pG13-11 \approx pG12 (Turbo Fect) \approx pG13-11 (Turbo Fect) < pG12 << pG13-11.

При этом можно отметить, что уровень флуоресценции белка при добавлении к клеткам плазмид с легкоокисляемой вставкой при действии радиации, вызывающей окислительные модификации – повышение уровня 8-oxodG в плазмидах – выше, чем при добавлении этих же неокисленных плазмид в присутствии реагента Turbo Fect (рис. 3).

Данные, полученные с использованием метода проточной цитофлуориметрии, были подтверждены методом флуоресцентной микроскопии. В присутствии плазмид (pC1, p12G, pG13-11) в клетках появляются слабые сигналы в области цитоплазмы (рис. 4А). Облучение дозой 50 сГр с последующим культивированием 24 часа в присутствии плазмид pC1, p12G и pG13-11 приводило к повышению уровня флуоресценции в МСК, регистрируемой методом флуоресцентной микроскопии, в 2, 6 (рис. 4Б) и 8 раз, соответственно ($p < 0,001$), что является свидетельством более активного проникновения плазмид в клетки и экспрессии флуоресцирующего белка в условиях окисления ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии мы показали, что введение в плазмиды поли-G вставки, способной к быстрому окислению в условиях окислительного стресса, приводит к эффективному проникновению плазмид в стволовые клетки. Ионизирующее излучение вызывает изменение окислительного гомеостаза в среде культивирования клеток, приводит к окислительной модификации фрагментов ДНК и способствует проникновению фрагментов ДНК в клетки.

Список литературы / References:

1. Leach, J.K., Van Tuyle G., Lin P.S., Schmidt-Ullrich R., Mikkelsen R.B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, no. 10, pp. 3894-3901.
2. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, vol. 2013, pp. 649-747.

3. Kostyuk S.V., Konkova M.S., Ershova E.S., Alekseeva A.J., Smirnova T.D., Stukalov S.V., Kozhina E.A., Shilova N.V., Zolotukhina T.V., Markova Z.G., Izhevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. An exposure to the oxidized DNA enhances both instability of genome and survival in cancer cells. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e77469.
4. Kozhina E.A., Ershova E.S., Okorokova N.A., Veiko V.P., Malinovskaya E.M., Sergeeva V.A., Konkova M.S., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Extracellular DNA containing (dG)n motifs penetrates into MCF7 breast cancer cells, induces the adaptive response, and can be expressed. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, p. 16.
5. Konkova M., Abramova M., Kalianov A., Ershova E., Dolgikh O., Umriukhin P., Izhevskaya V., Kutsev S., Veiko N., Kostyuk S. Mesenchymal Stem Cells Early Response to Low-Dose Ionizing Radiation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, vol. 8, p. 584497.
6. Sergeeva V., Ershova E., Veiko N., Malinovskaya E., Kalyanov A., Kameneva L., Stukalov S., Dolgikh O., Konkova M., Ermakov A., Veiko V., Izhevskaya V., Kutsev S., Kostyuk S. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, p. 9515809.
7. Midorikawa K., Hirakawa K., Kawanishi S. Hydroxylation of deoxyguanosine at 5' site of GG and GGG sequences in double-stranded DNA induced by carbamoyl radicals. *Free radical research*, 2002, vol. 6, no. 6, pp. 667-675.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PLASMID DNA PROMOTES THEIR PENETRATION INTO THE CYTOPLASMA OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

Konkova M.S.¹, Ershova E.S.¹, Veiko N.N.¹, Kalyanov A.A.¹, Malinovskaya E.M.¹, Kameneva L.V.¹,
Veiko V.P.^{1,2}, Kostyuk S.V.¹

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: mkonkova@med-gen.ru

² A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Science
Leninsky Prosp. 33, Build. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: vladveiko@yahoo.com

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0548

Abstract. It is well known that the action of ionizing radiation causes oxidative stress in the cells of the body and leads to the synthesis of reactive oxygen species, which lead to multiple damage to cellular DNA, including the formation of oxidized bases. In this paper, we consider the effect of radiation-induced oxidative modification of plasmid DNA on their penetration into human mesenchymal stem cells. To study the role of oxidative DNA modification in cell penetration, a genetic construct was created based on the pEGFP-C1 (pC1) vector, GenBankAccession: U55763, containing as an insert an artificially synthesized DNA fragment containing a poly-G region (p12G) serving as target for efficient oxidation of the cloned DNA fragment. As a "marker", the selected vector contains the EGFP fluorescent protein (GFP) gene. Flow cytometry and fluorescence microscopy showed that recombinant constructs based on the pEGFP vector containing duplicated poly-G regions and Gn repeats penetrate cells much more efficiently than the original pEGFP vector. Exposure to radiation at a dose of 50 cGy, which causes an increase in the level of 8-oxodG in plasmids after irradiation, leads to a more intense penetration of oxidized plasmids compared to a similar experiment without irradiation.

Key words: human mesenchymal stem cells, ionizing radiation, recombinant constructs, oxidized DNA, 8-oxodG, oxidative stress.

КОНТРОЛЬ ПАРАМЕТРОВ ТЕМПЕРАТУРНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ПРЕДПЛЕЧЬЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПРОЦЕДУРЕ УВЧ-ГИПЕРТЕРМИИ МЕТОДАМИ ПАССИВНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ ТЕРМОМЕТРИИ И ИНФРАКРАСНОЙ ТЕРМОГРАФИИ

Ерофеев А.В.^{1,2}, Грановский Н.В.¹, Селиванова П.И.¹, Шугаева А.И.¹, Шаракшанэ А.С.^{1,2}, Щербаков М.И.², Мансфельд А.Д.³, Аносов А.А.^{1,2}

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, г. Москва, 119435, РФ; e-mail: erofeev_a_v@staff.sechenov.ru

² ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН
ул. Моховая, 11, корп. 7, г. Москва, 125009, РФ

³ ИПФ РАН
ул. Ульянова, 46, Нижний Новгород, 603155, РФ; e-mail: mansfeld@appl.sci-nnov.ru
Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0549

Аннотация. В работе проводили УВЧ-нагрев электромагнитным полем частотой 40,68 МГц и мощностью 30 Вт предплечья человека и фантомов из пластизоля с имитацией кровотока в физиотерапевтических дозах 10, 15 и 20 минут. Измеряли тепловое акустическое излучение нагретых объектов многоканальным акустотермографом с полосой пропускания 1,6-2,5 МГц, временем интегрирования 10 С и пороговой чувствительностью 0,2 К. Дополнительно измеряли поверхностную температуру предплечья ИК-термометрией и внутреннюю температуру фантома электронным термометром. Получены данные о закономерностях распределения температуры в предплечье человека и в фантоме из пластизоля. Кровоток в фантоме имитирован медными, алюминиевыми и поливинилхлоридными трубками, через которые пропускалась вода из термостата. Сравнение скоростей остывания фантомов разного вида показало, что наиболее близки к мягким тканям предплечья человека теплофизические свойства фантома с трубками из алюминия. Данные объективного контроля не согласуются с субъективными ощущениями испытуемых, но хорошо согласуются друг с другом, что подтверждает необходимость и показывает возможность объективной оценки параметров температурного распределения в мягких тканях тела человека при гипертермии во время УВЧ-физиотерапии.

Ключевые слова: пассивная акустическая термометрия, тепловое акустическое излучение, акустоаэрокостная температура, ИК-термография, гипертермия, физиотерапия, фантом из пластизоля.

ВЕДЕНИЕ

При локальном нагреве тканей человека необходим неинвазивный безболезненный контроль глубинной температуры. Например, при дозиметрии УВЧ-терапии в основном руководствуются ощущениями больного, что является всего лишь субъективным фактором [1]. Для измерения глубинной температуры требуется относительно недорогая аппаратура, в то же время обеспечивающая надлежащую точность 0,5–1 К. Известны методы для подобных измерений, имеющие свои преимущества и недостатки: магниторезонансная термометрия [2], активная ультразвуковая термометрия [3], СВЧ-термометрия [4]. Мы используем пассивную акустическую термометрию (ПАТ), основанную на регистрации собственного теплового акустического излучения организма человека в мегагерцовом диапазоне [5-7]. Преимуществами ПАТ являются относительная дешевизна и миллиметровое разрешение на глубине до 5 см [8-10].

Одной из задач, которые в настоящее время стоят перед ПАТ, является отработка методики измерений в теле человека. Для этого необходимы измерения на модельных объектах. Эксперименты, проведенные в водном аквариуме, показали возможность определения глубинной температуры с требуемой точностью в говяжьей печени и пластилине [11-13]. ПАТ также использовалась для измерения температуры в модельных объектах (фантомах) из пластизоля [14]. Представляется перспективным совместное использование глубинной ПАТ и инфракрасной термографии (ИКТ), которая измеряет температуру поверхности [15,16], т.к. поверхностная температура согласуется с распределением глубинной температуры [17].

В настоящей работе проведена серия экспериментов по измерению глубинной и поверхностной температуры предплечья человека и модельных объектов на основе фантома из пластизоля (ФП) до и после их УВЧ-нагрева. Контроль глубинной температуры нагрева ФП проводился с помощью электронных и спиртовых термометров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нагрев электромагнитным полем частотой $40,68 \text{ МГц} \pm 2\%$ и мощностью $30 \pm 6 \text{ Вт}$ осуществлялся аппаратом для УВЧ-терапии УВЧ-30М (Завод электромедицинской аппаратуры «Эма», Москва, Россия) (рис. 1). Нагрев продолжался 10, 15, 20 мин. Локализация электромагнитного поля определялась индикатором настройки аппарата УВЧ (неоновой лампой).

Исследуемый фантом из пластизоля в форме цилиндра располагали между обкладками УВЧ-генератора (рис. 1). Расстояние от них до поверхности объекта составляло 5–7 мм. Пластизол (пластизол прозрачный, твердость 15–17, «Альпина Пласт», Клин, Россия) был выбран как модельный объект из-за того, что его акустические и теплофизические свойства близки свойствам мягких тканей тела человека [19,20]. Температуру в центре ФП контролировали стандартным спиртовым термометром с ценой деления $0,5^\circ\text{C}$ и электронными термометрами DS18S20P (Maxim Integrated, Сан-Хосе, США) с точностью 0,3 К.

Для измерений теплового акустического излучения был использован многоканальный акустотермограф [21,22], разработанный в ИПФ РАН (полоса пропускания 1,6–2,5 МГц, пороговая чувствительность при времени интегрирования 10 с – 0,2 К) (рис. 1). Принимаемые акустические сигналы преобразовывались в электрические, которые усиливались, проходили через квадратичный детектор и усреднялись в течение 30 мс. С выходов многоканального акустотермографа сигналы подавались на 14-ти разрядный многоканальный АЦП Е14-140 (ЗАО «L-Card», Москва, Россия) с частотой дискретизации 1 КГц на один канал. Разработанная программа проводила дальнейшее усреднение данных. Измерялась акустотермическая температура объекта – интегральная характеристика, равная температуре акустического черного тела, создающего такую же плотность потока теплового акустического излучения, как и исследуемый объект [23].

Для измерения поверхностной температуры использовался портативный компьютерный термограф ИРТИС-2000 (ООО «Иртис», Москва, Россия) с чувствительностью к перепаду температур (на уровне 30°C) 0,05 К, регистрировавший тепловое электромагнитное излучение в ИК-диапазоне 3–5 мкм [18].

Эксперименты проводили следующим образом. ИКТ проводили отдельно от акустических измерений из-за того, что нанесение холодного геля на поверхность объекта искажало ИК-термограмму. Между измерениями акустотермометрической датчик находился в кювете с медиагелем комнатной температуры. Температуру медиагеля на протяжении всего эксперимента, а также комнатную температуру контролировали цифровыми электронными термометрами DS18S20P. Сначала в течение 10 секунд проводились измерения теплового акустического излучения объекта. При этом на поверхность объекта наносили гель для УЗИ «Медиагель». После акустической термометрии начального состояния гель стирали и проводили УВЧ-нагрев в разных режимах (10, 15, 20 минут). После нагрева проводили акустотермометрию во время остывания объекта.

Надо отметить, что из-за наводок использовать акустический термометр и электронные термометры во время УВЧ-нагрева было невозможно, поэтому в процессе нагрева контролировали изменение глубинной температуры ФП только спиртовым термометром.

Основной модельный объект представляет собой фантом из пластизоля (ФП) в форме цилиндра (рис. 1). В цилиндр через два отверстия диаметром 10 мм на всю длину вставлены медные (модель №1), алюминиевые (модель №2) или поливинилхлоридные (ПВХ) (модель №3) трубки, имитирующие два кровеносных сосуда. С обеих сторон у трубок были закреплены трубки из ПВХ, которые соединялись с термостатом с водой, имитирующей кровь, прокачиваемую через трубки в модели ФП. Трубки имели внешний диаметр 10 мм. Цилиндр ФП был закреплен на деревянной подставке и не контактировал с обкладками УВЧ-генератора.

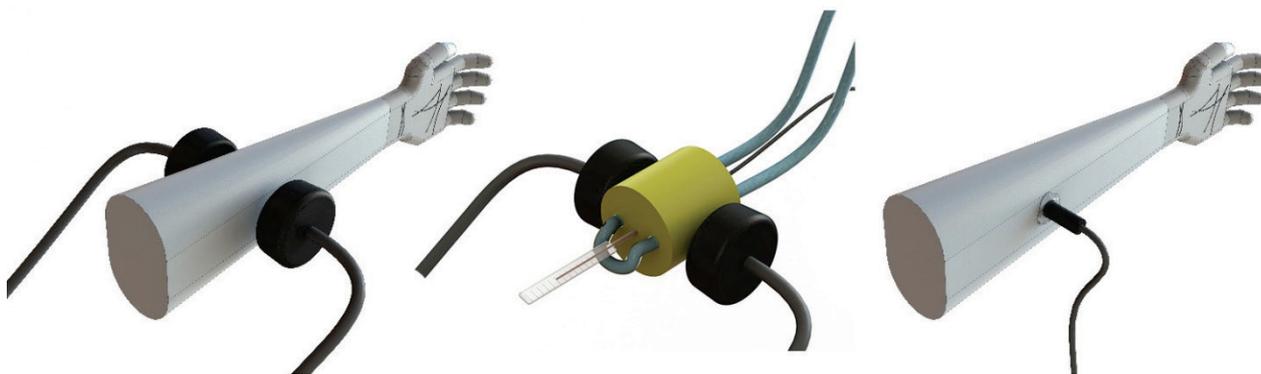


Рисунок 1. УВЧ-нагрев верхней трети предплечья человека и фантома из пластизоля с имитацией кровотока; измерение глубинной температуры предплечья нагретой области методом ПАТ

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования проводились на предплечье человека и на трех моделях ФП при трех различных режимах: 10, 15, 20 минут.

Эксперименты показали, что модели ФП остывают более длительно, чем предплечье человека. Это может быть обусловлено рядом причин, связанных с теплофизическими свойствами моделей фантома из пластиголя, которые отличаются от таковых у мягких тканей тела человека: например, в моделях ФП в качестве имитации кровотока использовались только две трубки – вероятно, для усиления имитации кровотока трубок, пропускающих холодную воду через модель ФП, должно быть больше.

По данным на рисунке 3 можно предположить, что модель №2 ФП с трубками из алюминия является наиболее схожа по теплофизическим свойствам с мягкими тканями предплечья человека, чем остальные модели. Следовательно, именно эту модель целесообразно использовать для дальнейших опытов.

На рисунке 4 представлены сравнения глубинных температур модели №2 по данным электронного термометра и акустотермографа. По графикам видно, что нагрев и остывание моделей ФП описывается сходными закономерностями. Следовательно, оба датчика зарегистрировали близкое различие температуры до и после нагрева, и в процессе остывания.

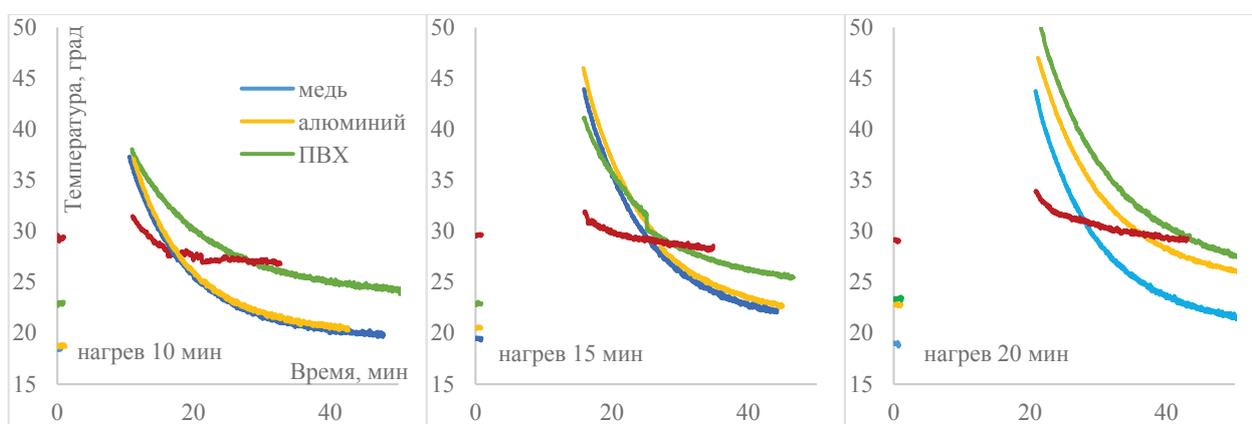


Рисунок 2. Остывание предплечья и моделей ФП из меди, алюминия и ПВХ после УВЧ-нагрева 10, 15 и 25 минут

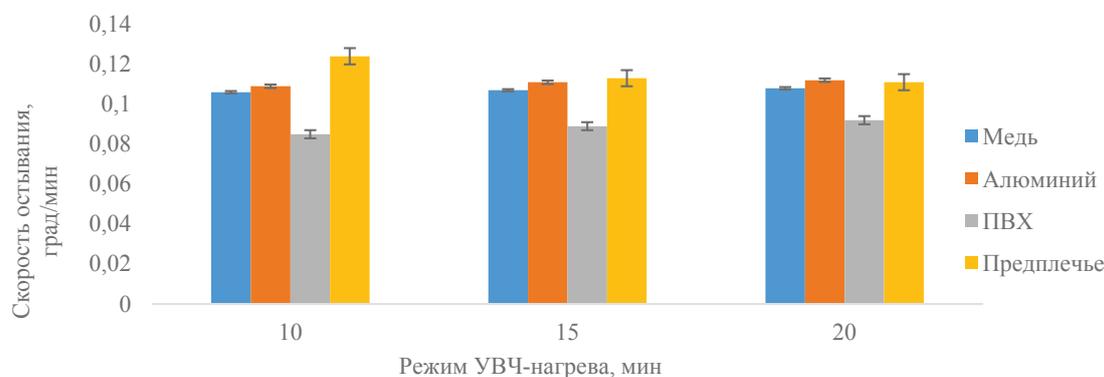


Рисунок 3. Сравнение скоростей остывания моделей ФП в различных режимах УВЧ-нагрева

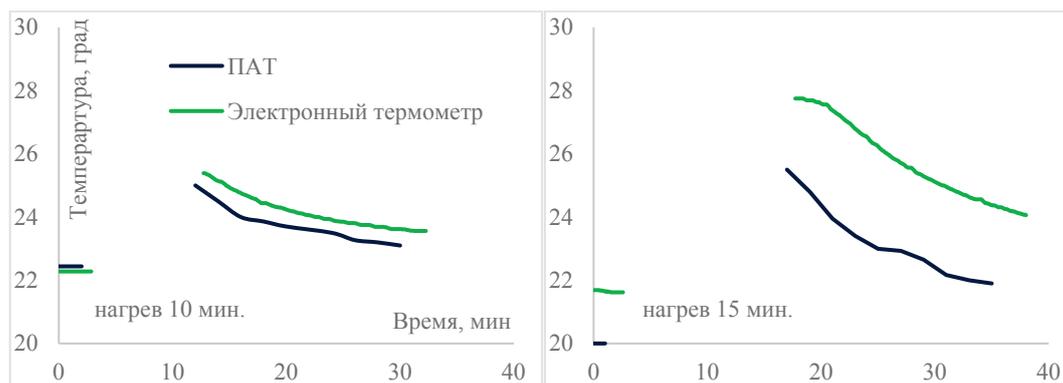


Рисунок 4. Изменение глубинной температуры на модели №2 при УВЧ-нагреве 10 и 15 минут

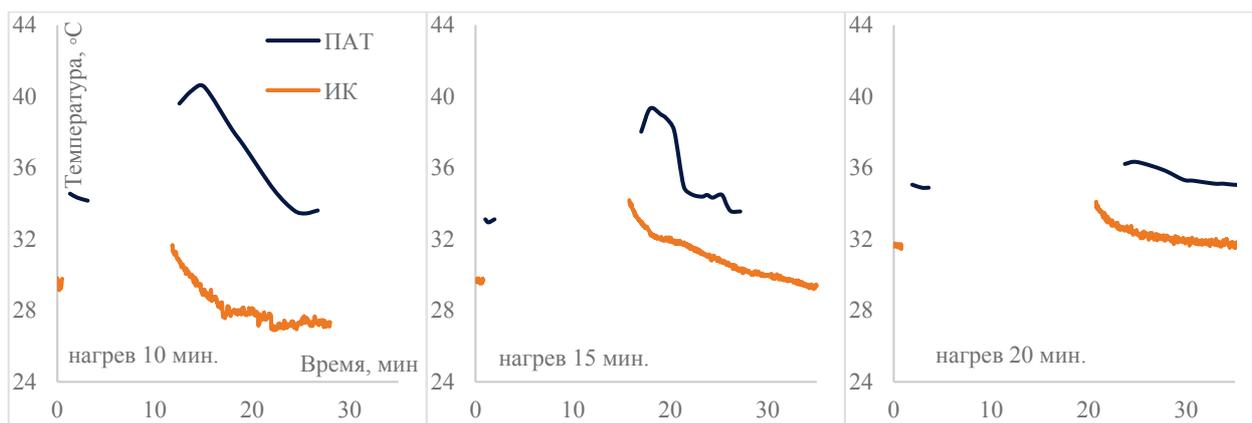


Рисунок 5. Изменение температуры верхней трети предплечья, измеренной методами ИКТ и ПАТ, до и после УВЧ нагрева 10, 15 и 20 мин

Измерение глубинной и поверхностной температуры предплечья человека. На рисунках 9–11 сравнение изменений глубинной акустояркой и поверхностной температуры верхней трети предплечья, исследуемого А до и после УВЧ-нагрева 10, 15, 20 минут.

В эксперименте основной измеряемой величиной являлась акустояркая температура. Это интегральная характеристика, равная температуре акустического черного тела, создающего такую же плотность потока теплового акустического излучения, как и исследуемый объект. Акустояркая температура в условиях эксперимента определяется выражением [21,23]:

$$T_A(t) = \int_0^d \gamma T(t, x) \exp(-\gamma x) dx, \tag{3}$$

где γ – коэффициент поглощения ультразвука (по интенсивности). В данной модели предполагается, что исследуемая среда акустически однородна, и коэффициент поглощения не зависит от температуры. Акустояркая температура определяется глубинной температурой.

Сравнение показывает, что при увеличении времени УВЧ-нагрева предплечья скорость остывания кожи и мягких тканей уменьшается. Можно предположить, что при увеличении УВЧ-нагрева в данном диапазоне тепло дольше держится внутри тканей предплечья. В физиотерапии различают дозы атермические, когда больной не ощущает тепла или еле чувствует его, олиготермические, когда больной чувствует слабое тепло, и термические, когда он ощущает выраженное тепло. В данном исследовании при различных физиотерапевтических дозах один

Таблица 1. Сравнение интенсивности нагрева и скорости остывания верхней трети предплечья при различном времени УВЧ-нагрева (10, 15 и 20 мин) методами ПАТ и ИКТ

Доза нагрева	Комнатная температура, °С	АЯ температура*, °С		ИК-температура**, °С		Константа скорости остывания АЯ, град/мин	Константа скорости остывания ИК, град/мин
		До нагрева	После нагрева	До нагрева	После нагрева		
10 мин	22	34,4	40,4	29,5	27,39	0,124	0,125
15 мин	22	33	39,3	29,5	34,19	0,113	0,111
20 мин	20,5	34,8	36,3	31,6	34,1	0,111	0,103
Средняя разница температур в верхней трети предплечья							
10 мин		6,0±0,3°С		1,8±0,1°С			
15 мин		6,3±0,3°С		4,5±0,1°С			
20 мин		2,4±0,3°С		2,6±0,1°С			

* погрешность измерения акустояркой температуры 0,3°С

** погрешность измерения ИК-температуры 0,1°С

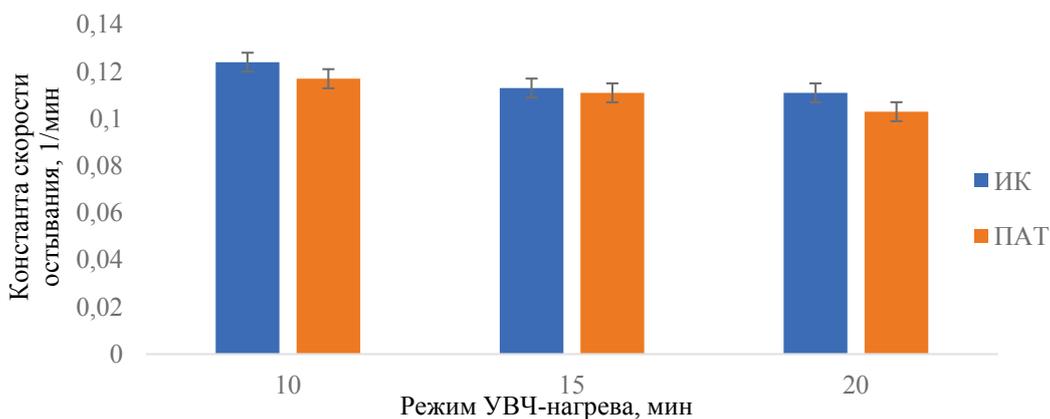


Рисунок 6. Сравнение скорости остывания верхней трети предплечья, измеренных методами ПАТ и ИКТ в разных физиотерапевтических дозах

из трех исследуемых ничего не почувствовал, а двое ощутили тепло в разной степени. Однако эти ощущения никак не коррелируют с объективными данными увеличения глубинной или поверхностной температур. Настоящая работа показывает, что такую качественную оценку можно делать с помощью ИК-термометрии, однако этот метод дает информацию только о поверхностной температуре. Поэтому глубинную температуру эффективнее измерять методом пассивной акустотермометрии. В гипертермии точность нагрева нагреваемой области до определенной температуры определяет эффективность процедуры [24], например, при физиотерапевтической гипертермии. По результатам данного исследования можно полагать, что для контроля поверхностной и глубинной температуры тела человека в физиотерапии разных гипертермических доз целесообразно использовать оба метода до и после УВЧ-нагрева.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовались изменения глубинной и поверхностной температуры верхней трети предплечья человека и в моделях на основе фантома из пластизоля методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии при УВЧ-нагреве при различных физиотерапевтических дозах.

На основании полученных результатов можно полагать, что пассивная акустическая термометрия и инфракрасная термография являются приемлемыми для контроля глубинной температуры биообъектов при их локальной гипертермии. В частности, при УВЧ-физиотерапии в разных дозах. Исследование ограничений эффективности гипертермических методов, применяемых в физиотерапии, следует продолжить.

Фантом из пластизоля с протоком воды через него является адекватной моделью для проведения различных экспериментов с имитацией кровообращения в организме человека. Из исследованных моделей ФП наибольшую схожесть по теплофизическим свойствам с мягкими тканями предплечья человека показала модель ФП с трубками из алюминия. Следовательно, именно эту модель целесообразно использовать для дальнейших опытов с имитацией кровотока в фантоме из пластизоля.

Исследования подтвердили, что совместное применение методов ПАТ и ИКТ позволяет получать объективную оценку УВЧ-нагрева мягких тканей конечностей тела человека, субъективные же ощущения не могут служить надежным показателем выбора дозы УВЧ-физиотерапии. В дальнейшем планируем продолжить исследования тепловых эффектов, которые были наблюдаемы при измерении глубинной и поверхностной температур разными способами, для выяснения возможных физиологических механизмов данных эффектов и применения полученных результатов в практической медицине и экспериментальной биологии.

Список литературы / References:

1. Сафроненко В.А., Гасанов М.З. Физиотерапия и физиопрофилактика: учеб.-метод. Пособие. ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, каф. внутренних болезней с основами общей физиотерапии № 1. Изд- во РостГМУ, 2015, с. 38-40. [Safronenko V.A., Hasanov M.Z. Physiotherapy and physioprophyllaxis: educational-methodical manual. GBOU VPO RostGMU Ministry of Health of Russia, Department of Internal Medicine with the basics of general physiotherapy no. 1. RostGMU Publishing House, 2015, pp. 38-40. (In Russ.)]
2. Winter L., Oberacker E., Paul K., Ji Y., Oezerdem C., Ghadjar P., Thieme A., Budach V., Wust P., Niendorf T. Magnetic resonance thermometry: methodology, pitfalls and practical solutions. *International Journal of Hyperthermia*, 2016, vol. 32, no. 1, pp. 63-75, doi: 10.3109/02656736.2015.1108462.
3. Pouch A.M., Cary T.W., Schultz S.M., Sehgal C.M. In vivo noninvasive temperature measurement by B-mode ultrasound imaging. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2010, vol. 29, no. 11, pp. 1595-1606, doi: 10.7863/jum.2010.29.11.1595.

4. Hand J.W., Van Leeuwen G.M.J., Mizushina S., Van de Kamer J.B., Maruyama K., Sugiura T., Azzopardi D.V., Edwards A.D. Monitoring of deep brain temperature in infants using multi-frequency microwave radiometry and thermal modelling. *Physics in Medicine & Biology*, 2001, vol. 46, no. 7, p. 1885, doi: 10.1088/0031-9155/46/7/311.
5. Буров В.А., Дариалашвили П.И., Евтухов С.Н., Румянцева О.Д. Экспериментальное моделирование процессов активно-пассивной термоакустической томографии. *Акуст. журн.*, 2004, т. 50, № 3, с. 298-310. [Burov V.A., Darialashvili P.I., Evtukhov S.N., Romyantseva O.D. Experimental modeling of the processes of active-passive thermoacoustic tomography. *Acoustical Physics*, 2004, vol. 50, no. 3, pp. 243-254, doi: 10.1134/1.1739492. (In Russ.)]
6. Миргородский В.И., Герасимов В.В., Пешин С.В. Экспериментальные исследования особенностей пассивной корреляционной томографии источников некогерентного акустического излучения мегагерцового диапазона. *Акуст. журн.*, 2006, т. 52, № 5, с. 606-612. [Mirgorodsky V.I., Gerasimov V.V., Peshin S.V. Experimental studies of passive correlation tomography of incoherent acoustic sources in the megahertz frequency band. *Acoustical Physics*, 2006, vol. 52, no. 5, pp. 606-612, doi: 10.1134/S1063771006050150. (In Russ.)]
7. Anosov A.A., Kazansky A.S., Subochev P.V., Mansfel'd A.D., Klinshov V.V. Passive estimation of internal temperatures making use of broadband ultrasound radiated by the body. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2015, vol. 137, no. 4, pp. 1667-1674, doi: 10.1121/1.4915483.
8. Anosov A.A., Subochev P.V., Mansfeld A.D., Sharakshane A.A. Physical and computer-based modeling in internal temperature reconstruction by the method of passive acoustic thermometry. *Ultrasonics*, 2018, vol. 82, pp. 336-344, doi: 10.1016/j.ultras.2017.09.015.
9. Passechnik V.I., Anosov A.A., Bograchev K.M. Fundamentals and prospects of passive thermoacoustic tomography. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 2000, vol. 28, no. 3-4, doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.v28.i34.410.
10. Amiri H., Makkiabadi B., Khani A., Irandoost S.A. A Simulation Framework for Passive Acoustic Thermometry of Homogenous Materials. *Frontiers in Biomedical Technologies*, 2019, doi: 10.18502/ftb.v6i3.1696.
11. Krotov E.V., Zhadobov M.V., Reyman A.M., Volkov G.P., Zharov V.P. Detection of thermal acoustic radiation from laser-heated deep tissue. *Applied physics letters*, 2002, vol. 81, no. 21, pp. 3918-3920, doi: 10.1063/1.1521245.
12. Аносов А.А., Пасечник В.И., Исрефилов М.Г. Восстановление двумерного распределения внутренней температуры модельного объекта методом пассивной термоакустической томографии. *Акуст. журн.*, 1999, т. 45, № 1, с. 20-24. [Anosov A.A., Pesechnik V.I., Isrefilov M.G. Reconstruction of two-dimensional distribution of internal temperature of model object by method of passive thermoacoustic tomography. *Akust. Zhurn*, vol. 45, no. 1, pp. 20-24. (In Russ.)]
13. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Дворникова М.В., Дворникова В.В., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрическое восстановление профиля глубинной температуры с использованием уравнения теплопроводности. *Акуст. журн.*, 2012, т. 58, № 5, с. 592-599. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Dvornikova M.V., Dvornikova V.V., Kazanskii A.S., Mansfel'd A.D. Acousto-thermometric recovery of the deep temperature profile using heat conduction equations. *Acoustical Physics*, 2012, vol. 58, no. 5, pp. 542-548, doi: 10.1134/S1063771012030037. (In Russ.)]
14. Аносов А.А., Ерофеев А.В., Пешкова К.Ю., Щербаков М.И., Беляев Р.В., Мансфельд А.Д. Совместное использование пассивной акустической и инфракрасной термометрии для контроля УВЧ-нагрева. *Акуст. журн.*, 2020, т. 66, № 6, с. 690-696. [Anosov A.A., Erofeev A.V., Peshkova K., Scherbakov M.I., Belyaev R.V., Mansfeld A.D. Joint Use of Passive Acoustic and Infrared Thermometry for Monitoring UHF Heating. *Akust. zhurn.*, 2020, vol. 66, no. 6, pp. 690-696. (In Russ.)]
15. Аносов А.А. и др. Определение динамики изменения температуры в модельном объекте методом акустотермографии. *Акустический журнал*, 2008, т. 54, № 4, с. 540-545. [Anosov A.A. et al. Determination of the temperature change dynamics in the model object by the acoustic thermography method. *Akust. zhurn.*, 2008, vol. 54, no. 4, pp. 540-545. (In Russ.)]
16. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрические данные о кровотоке и теплопродукции в предплечье при физической нагрузке. *Акуст. журн.*, 2013, т. 59, № 4, с. 539-544. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazansky A.S., Kuryatnikova N.A., Mansfeld A.D. Acoustothermometric data on blood flow and heat production in the forearm during physical activity. *Akust. zhurn.*, 2013, vol. 59, no. 4, pp. 539-544. (In Russ.)]
17. Аносов А.А., Ерофеев А.В., Мансфельд А.Д. Использование акустотермометрии для определения температурного поля в предплечье человека. *Акуст. журн.*, 2019, т. 65, № 4, с. 551-556. [Anosov A.A., Erofeev A.V., Mansfeld A.D. Using acoustothermometry to determine the temperature field in the human forearm. *Akust. zhurn.*, 2019, vol. 65, no. 4, pp. 551-556, doi: 10.1134/S106377101904002X. (In Russ.)]
18. Иваницкий Г.Р. Современное матричное тепловидение в биомедицине. *Успехи физических наук*, 2006, т. 176, № 12, с. 1293-1320. [Ivanitsky G.R. Modern matrix thermal imaging in biomedicine. *Advances in Physical Sciences*, 2006, vol. 176, no. 12, pp. 1293-1320. (In Russ.)]
19. Maggi L., Cortela G., von Kruger M.A., Negreira C., de Albuquerque Pereira W.C. Ultrasonic Attenuation and Speed in phantoms made of PVCp and Evaluation of acoustic and thermal properties of ultrasonic phantoms made of polyvinyl chloride-plastisol (PVCp). *In IWBBIO*, 2013, pp. 233-241.
20. Duck F.A. Physical properties of tissues: a comprehensive reference book. *Academic press*, 2013.
21. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.С. Определение динамики изменения температуры в модельном объекте методом акустотермографии. *Акуст. журн.*, 2008, т. 54,

№ 4, с. 540-545. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazanskii A.S., Mansfeld A.D., Sharakhshane A.S. Determination of temperature change dynamics in a model object by acoustothermography. *Akust. zhurn.*, 2008, vol. 54, no. 4, pp. 540-545. (In Russ.)]

22. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.С. Динамическая акустотермография. *Акуст. журн.*, 2009, т. 55, № 4-5, с. 436-444. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazanskii A.S., Mansfel'd A.D., Sharakhshane A.S. Determination of the dynamics of temperature variation in a model object by acoustic thermography. *Acoustical Physics*, 2008, vol. 54, no. 4, pp. 464-468, doi: 10.1134/S1063771008040040. (In Russ.)]

23. Аносов А.А. и др. Восстановление глубинной температуры методом акустотермометрии с учетом уравнения теплопроводности. *Радиотехника и электроника*, 2015, т. 60, № 8, с. 855-855. [Anosov A.A. et al. Reconstruction of the depth temperature by acoustothermometry taking into account the thermal conductivity equation. *Radiotekhnika i elektronika*, 2015, vol. 60, no. 8, pp. 855-855. (In Russ.)]

24. Аносов А.А. и др. Акустотермометрический контроль кисти руки человека при гипертермии и гипотермии. *Акуст. журн.*, 2013, т. 59, № 1, с. 109-114. [Anosov A.A. et al. Acoustothermometric control of human hand during hyperthermia and hypothermia. *Acoust. zhurn.*, 2013, vol. 59, no. 1, pp. 109-114. (In Russ.)]

CONTROL OF TEMPERATURE DISTRIBUTION PARAMETERS IN HUMAN FOREARM DURING UHF HYPERTHERMIA BY PASSIVE ACOUSTIC THERMOMETRY AND INFRARED THERMOGRAPHY

Erofeev A.V.^{1,2}, Granovsky N.V.¹, Selivanova P.I.¹, Shugaeva A.I.¹, Sharakhshane A.S.^{1,2}, Shcherbakov M.I.², Mansfeld A.D.³, Anosov A.A.^{1,2}

¹ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University)

Bolshaya Pirogovskaya str., 2, p.4, Moscow, 119435, Russia; e-mail: erofeev_a_v@staff.sechenov.ru

² IRE named after V.A. Kotelnikov RAS

11 Mokhovaya str., bld. 7, Moscow, 125009, Russia

³ IPF RAS

Ulyanova str., 46, Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod region, 603155, Russia; e-mail: mansfeld@appl.sci-nnov.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0549

Abstract. In this work we performed UHF heating with an electromagnetic field of frequency 40.68 MHz and power of 30 W on human forearms and phantoms made of plastisol with simulated blood flow at physiotherapeutic doses of 10, 15 and 20 minutes. Thermal acoustic radiation of heated objects measured with a multichannel acoustothermograph with a bandwidth of 1.6-2.5 MHz, an integration time of 10 C, and a threshold sensitivity of 0.2 K. Additionally, the surface temperature of the forearm measured by infrared thermometry and the internal temperature of the phantom by an electronic thermometer. We obtained data about temperature distribution patterns in the human forearm and in the plastisol phantom. Blood flow in the phantoms was simulated by copper, aluminum and polyvinyl chloride tubes, through which water from a thermostat was passed. Comparison of cooling rates of different types of phantoms showed that the thermal properties of the phantom with aluminum tubes were the closest to the soft tissues of the human forearm. The data of objective control do not agree with the subjective sensations of the subjects, but agree well with each other, which confirms the necessity and shows the possibility of objective assessment of temperature distribution parameters in the soft tissues of the human body during hyperthermia during UHF-physiotherapy.

Key words: *passive acoustic thermometry, thermal acoustic radiation, acoustic temperature, infrared thermography, hyperthermia, physiotherapy, plastisol phantom.*

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА КАТИОННЫХ TRPA1-КАНАЛОВ *TRICHOPLAX SP. H2 (PLACOOZOA)*

Фадеева М.В.¹, Сергеева Е.В.¹, Рыбакова К.А.¹, Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Севастопольский государственный университет,

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

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: kuznet61@gmail.com

Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0550

Аннотация. Механорецепторы способны преобразовывать силовые воздействия в электрохимические сигналы, которые инициируют волну деполяризации, распространяющуюся по поверхности клетки. В *Drosophila melanogaster* известен канал механотрансдукции TRPN1/NompC в составе которого находятся анкириновые повторы, выполняющие роль стробирующей спирали [1]. В этой работе мы впервые представляем семейство катионных TRPA1-каналов у *Trichoplax sp. H2* (Placozoa), состоящее из 42 гомологов длиной от 468 до 3240 аа. Внутри семейства выделено три обособленных кластера с разной длиной полипептидной цепи и различным содержанием анкириновых повторов. Реконструирована пространственная структура TRPA1-канала RDD36842.1, проведён докинг аспирина – возможного блокатора TRP-каналов. Анализируется структура членов семейства, рассматривается механическая модель работы канала, а также обсуждается вероятная функция и физиология этих белковых молекул и их роль в поведении трихоплакса. Вариации числа анкириновых повторов на N-конце исследованных TRP-протеинов и обнаруженные различия на C-конце могут свидетельствовать о полифункциональности данных белков у Placozoa. Возможно, TRP-каналы возникли в ходе ранней эволюции до появления многоклеточности, но диверсифицировали в многоклеточных животных с усложнением структурной организации последних.

Ключевые слова: Placozoa, механотрансдукция, TRP-каналы, пространственная реконструкция, докинг.

ВВЕДЕНИЕ

Около 30 лет назад в лаборатории Чарльза Цукера (Charles Zuker) из университета Колумбии в Нью-Йорке (США) были обнаружены мутанты мушек *Drosophila melanogaster*, которые не реагировали на механическое раздражение [2]. Мутантные личинки *pompC* демонстрировали недостаточную реакцию на прикосновения, а у взрослых особей произошла утрата чувствительности механорецепторных щетинок в результате отсутствия механосенсорной сигнализации [3]. Позднее был идентифицирован и клонирован ген *NompC* [4], а также определена атомарная структура механорецептора TRPN1/NompC с применением криоэлектронной микроскопии [1], что открыло путь к изучению наномеханики тактильных сенсоров. Помимо результатов на плодовой мушке были получены подтверждения и на других лабораторных моделях, как например, нематода *C. elegans* и аквариумная рыбка *Danio rerio* [5].

Оказалось, что каналы переходного рецепторного потенциала (Transient Receptor Potential channels, TRP-channels) представляют собой группу ионных каналов, обычно расположенных на плазматической мембране многих типов клеток животных. Большинство из них сгруппированы в две большие группы: группа 1 включает TRPC, TRPV, TRPVL, TRPM, TRPS, TRPN и TRPA, а группа 2 состоит из TRPP и TRPML каналов, где последняя буква обозначает структурную или функциональную особенность канала [6,7]. Например, для ионного канала TRPA-типа, метка "A" обозначает анкирин [8]. Многие из этих каналов опосредуют у человека различные чувства, такие как боль, температура, давление и разные вкусовые ощущения [9-12]. TRPA-каналы экспрессируются у самых разных животных, как позвоночные, членистоногие и моллюски [13]. TRPA1-каналы также существуют у различных видов, но они менее изучены [14].

Возможно, механочувствительные рецепторы играют важную роль и в жизни модельного морского животного трихоплакса (тип Пластинчатые), который является базальным многоклеточным живым объектом [15], напоминает по форме и типу движения одноклеточную амёбу [16] и представляет собой наглядный пример взаимодействия группы клеток в едином организме [17,18]. Механика движения трихоплакса интенсивно изучалась с помощью цейтраферной видеосъёмки и активно моделировалась с помощью различных математических подходов [19,20]. Недавно в геномах трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax sp. H2* идентифицированы по одному гену, кодирующему пьезопротеины, построены пространственные модели соответствующих белков XP_002112008.1 и RDD46920.1, соответственно, и установлена связь с другими белками в сети протеин-протеиновых взаимодействий, которые отвечают на силовые воздействия окружающей среды и соседних клеток. В частности, были найдены функциональные связи с TRP-каналами переходного рецепторного потенциала, которые являются гомологами *pompC* канала *D. melanogaster* [21]. Таким образом, подробное изучение TRP-каналов у *Trichoplax sp. H2* и их роли в механотрансдукции является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислотные последовательности TRPA1-каналов *Trichoplax* sp. H2 найдены в базе данных NCBI – National Center for Biotechnology Information с помощью программы BLASTP [22].

Идентификацию анкириновых повторов в исследуемых белках осуществляли на основе функциональной классификации протеиновых доменов с привлечением базы аннотированных консервативных доменов CDD [23-26].

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли с помощью процедуры COBALT (Constraint-based Multiple Alignment Tool) [27]. Визуализацию осуществляли с помощью NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer, Version 1.22.0.

3D-модели белков строили на Phyre2-сервере методом сравнения гомологичных аминокислотных последовательностей с известными пространственными структурами протеинов [28]. Докинг осуществляли на SwissDock-сервере [29].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [30].

Статистический анализ проводили с применением языка R. Использовали элементарные статистические оценки, корреляционный и регрессионный анализ, а также кластеризацию полученных данных [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск гомологов TRP-каналов в геноме *Trichoplax* sp. H2 [32] осуществляли по аминокислотной последовательности NompC-механорецептора *D. melanogaster* [1]. Было идентифицировано 42 катионных TRP-канала с очень низкой вероятностью ошибочного предсказания E от $4e^{-50}$ до $2e^{-24}$ (табл. 1). Длина обнаруженных катионных TRP-каналов варьировала от 468 аа до 3240 аа со средним значением 1215,5 аа, а также значениями асимметрии и эксцесса распределения по длинам 3,2 и 11,6, соответственно (рис. 1).

Таблица 1. Семейство катионных каналов переходного рецепторного потенциала подсемейства A1 (TRPA1) из *Trichoplax* sp. H2

№	Идентификатор	Макс. счёт	Тот. счёт	Покрытие запроса, %	Ожидание, значение E	Идентичность, %	Длина, аа	Анкириновые повторы
1	RDD36842.1	195	739	63	4e-50	26,49	1160	10
2	RDD41198.1	194	724	68	5e-50	25,63	1138	16
3	RDD38699.1	186	1118	62	1e-47	27,08	1062	14
4	RDD39975.1	186	471	58	3e-47	28,05	1212	18
5	RDD42063.1	183	635	62	1e-46	28,45	1010	17
6	RDD37563.1	179	442	77	4e-45	24,42	1244	15
7	RDD37564.1	177	578	58	1e-44	29,31	1079	13
8	RDD42068.1	177	938	58	1e-44	29,12	1182	14
9	RDD38686.1	175	719	58	5e-44	24,79	1126	15
10	RDD43947.1	174	909	58	6e-44	27,60	1113	15
11	RDD43876.1	176	910	54	6e-44	28,69	2387	26
12	RDD41720.1	174	668	57	9e-44	27,76	1143	14
13	RDD38695.1	171	573	58	1e-42	25,47	1115	12
14	RDD41723.1	166	739	58	2e-41	27,09	1114	15
15	RDD38683.1	164	699	59	9e-41	28,11	1128	12
16	RDD41570.1	164	790	58	1e-40	26,30	1154	13
17	RDD39278.1	163	620	61	2e-40	27,12	1138	13
18	RDD38141.1	163	790	58	2e-40	30,77	1125	13
19	RDD43978.1	164	2200	62	3e-40	28,88	3240	48
20	RDD43879.1	163	380	57	4e-40	26,77	1299	13
21	RDD38700.1	160	753	58	1e-39	26,34	1107	15
22	RDD43877.1	159	701	58	4e-39	29,26	1101	14

Продолжение таблицы 1

23	RDD41930.1	156	544	59	3e-38	28,86	1137	14
24	RDD43955.1	156	420	50	4e-38	28,09	1088	15
25	RDD43953.1	154	1250	50	3e-37	27,43	2508	30
26	RDD41699.1	146	337	58	5e-35	26,59	1177	14
27	RDD39282.1	144	282	54	2e-34	26,09	1138	15
28	RDD42062.1	144	515	59	2e-34	29,16	1148	14
29	RDD39281.1	144	279	53	2e-34	27,76	1136	13
30	RDD41697.1	140	707	59	2e-33	25,82	1156	12
31	RDD41717.1	140	459	65	3e-33	26,96	1148	13
32	RDD41696.1	135	496	59	3e-33	27,76	468	9
33	RDD43956.1	138	671	58	9e-33	26,13	1100	14
34	RDD38687.1	137	638	58	2e-32	27,79	1036	12
35	RDD44631.1	137	354	59	2e-32	25,63	859	12
36	RDD38685.1	135	474	59	8e-32	28,54	1074	17
37	RDD41722.1	133	543	58	5e-31	24,06	1193	15
38	RDD41715.1	132	467	58	6e-31	24,96	1061	13
39	RDD41598.1	132	416	58	1e-30	25,66	1150	15
40	RDD41599.1	131	564	58	2e-30	24,86	1147	14
41	RDD41571.1	126	572	57	6e-29	24,57	1142	13
42	RDD38691.1	111	297	53	2e-24	27,51	808	10

Примечание: серым цветом выделены протеины с наилучшим счётом, а также наименьшей и наибольшей длиной полипептидной цепи

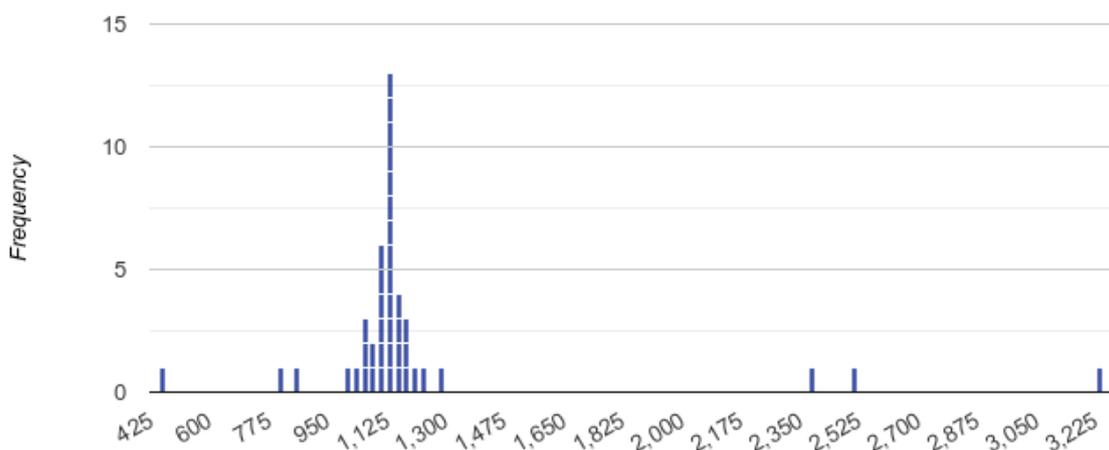


Рисунок 1. Распределение представителей семейства катионных TRPA1-каналов из *Trichoplax* sp. H2 по длине аминокислотной цепи, абсцисса – длина аминокислотной последовательности, aa, ордината – частота встречаемости белков в семействе

Ввиду значительного разброса длин полипептидных цепей TRPA1-каналов трихоплакса H2, имело смысл проанализировать доменную структуру представителей этого семейства. Так, например, на рис. 2 представлен результат выявления 10 анкириновых повторов в протеине RDD36842.1. Полный анализ семейства TRPA1-каналов из *Trichoplax* sp. H2 показал, что количество анкириновых повторов на белок составляет от 9 до 48 при среднем значении $15,2 \pm 3,1$ (табл. 1). Выявлена высокая корреляция $R=0,94$ ($p < 0,001$) между длиной аминокислотных последовательностей TRPA1-каналов и числом анкириновых повторов в них. Выведено

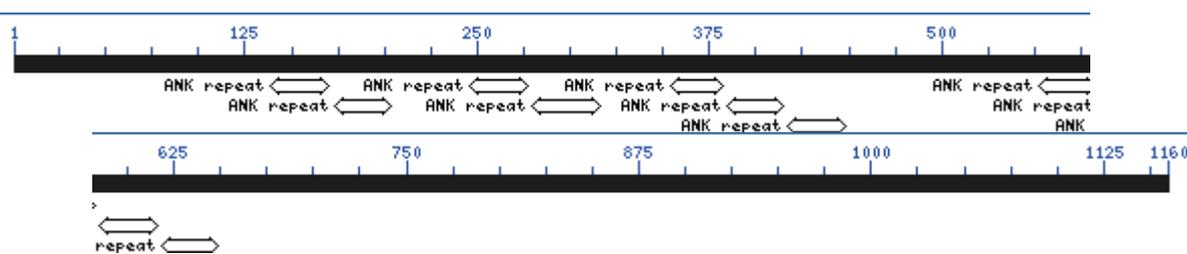


Рисунок 2. Доменная структура белка RDD36842.1 - катионного TRPA1-канала из *Trichoplax* sp. H2, расположенные в N-концевой части полипептидной цепи, анкириновые повторы отмечены двойными стрелками под размерной шкалой белка

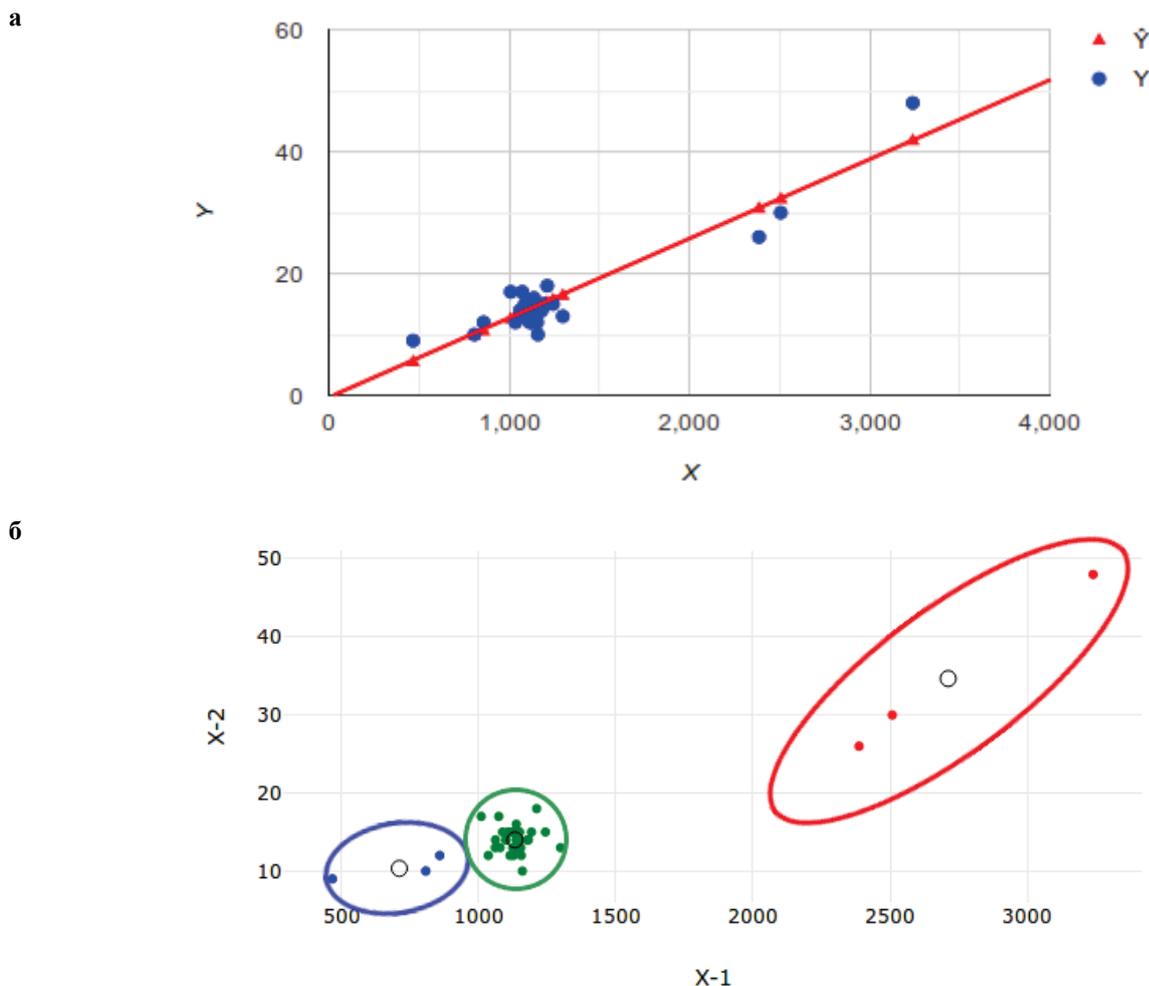


Рисунок 3. Статистический анализ семейства катионных TRPA1-каналов из *Trichoplax* sp. H2, линейная регрессия (а) и кластерный анализ (б) зависимости: число анкириновых повторов (Y) от числа аминокислотных остатков (X), объяснения в тексте

уравнение линейной регрессии $\hat{Y} = -0,7385 + 0,01312X$ (рис. 3а), где X – это число аминокислотных остатков в протеине, а \hat{Y} – это расчётное число анкириновых повторов (рис. 3). Вдоль линии регрессии обнаружено 3 кластера, обозначенных как «малые» (голубой), «средние» (зелёный) и «большие» (красный) катионные TRPA1-каналы с координатами центров кластеров (712, 10), (1147, 14) и (2711, 35), соответственно (рис. 3б).

Для уточнения полученных данных провели дальнейшую аннотацию катионного TRPA1-канала RDD36842.1 с наибольшим максимальным счётом 195 (табл. 1). Белок RDD36842.1 имеет длину 1160 аминокислотных остатка, что не позволяет получить целостную структурную модель на Phyre2-сервере [28] и поставить задачу на сервер SwissDock [29]. Поэтому из соответствующего pdb-файла были удалены координаты атомов первых 400 аминокислотных остатков, образующих начало длинной анкириновой спирали и в дальнейшем исследовании использовали усечённую реконструированную пространственную структуру белка RDD36842.1 (рис. 4а), что напоминает часть отдельной субъединицы (рис. 5) тетрамерного NompC-механорецептора *D. melanogaster* [1]. В структуре полученной усечённой 3D-модели присутствует трансмембранный C-концевой домен, образующий ионселективную пору канала при взаимодействии с другими

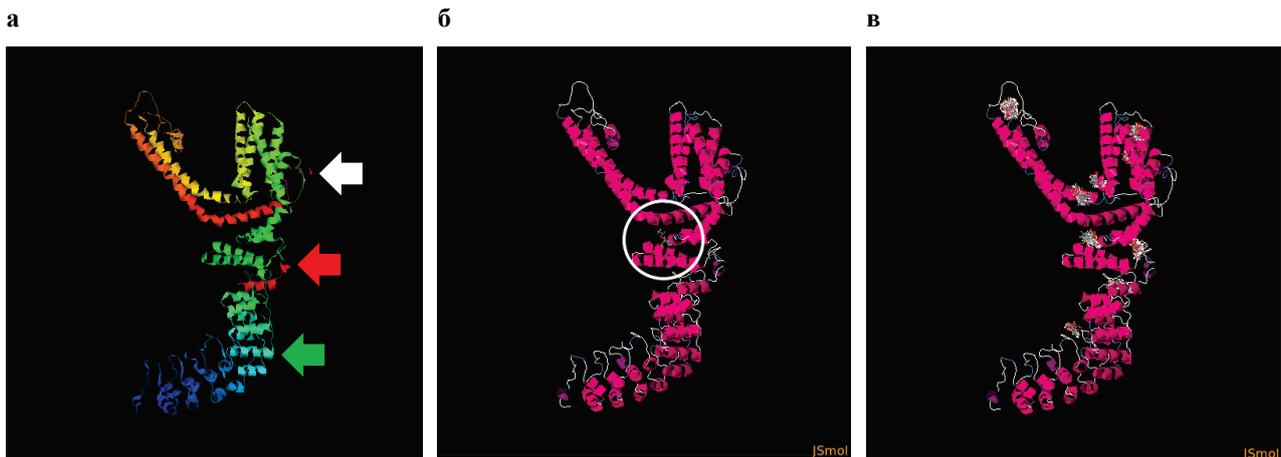


Рисунок 4. Усечённые 3D-модели RDD36842.1 протеина из *Trichoplax* sp. H2, где изображены спектрально окрашенная субъединица (а), докинг одной молекулы аспирина с наибольшим счётом (б), суперпозиция молекул аспирина в сайтах связывания на поверхности белка (в), белая стрелка – трансмембранный домен (ТМ), красная – область шейки, зелёная – анкириновая спираль (AR), белым кружком обведён сайт связывания молекулы аспирина

субъединицами, и хорошо различима укороченная N-концевая полианкириновая спираль, которая образует механочувствительную часть тактильного рецептора в составе тетрамерного комплекса (рис. 4а, 5). Наглядное представление о надмолекулярной структуре тетрамерного комплекса типичного TRP-канала даёт сравнение с известной структурой NompC-механорецептора (5vkq) *D. melanogaster* [1].

Дальнейший докинг с аспирином показал, что этот ингибитор TRP-каналов предпочтительно связывается в одном сайте внутренней части канала RDD36842.1 (рис. 4б), а также имеет 8 других сайтов-мишеней на поверхности макромолекулы белка RDD36842.1 (рис. 4в). Данная теоретическая находка открывает перспективу управления TRP-каналами трихоплакса с помощью низкомолекулярных лигандов.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей семейства катионных TRPA1-каналов из *Trichoplax* sp. H2 осуществляли, используя информацию о сходстве консервативных доменов [26]. Результат выравнивания (рис. 6) демонстрирует наличие анкириновых доменов в N-концевом участке всех изученных белков, однако их число значительно отличается у разных представителей TRP-семейства. Теоретически, это может быть обусловлено молекулярными механизмами рекомбинации, приводящими к удвоению и inserции новых анкириновых доменов в стробирующую спираль. Средняя часть всех белков TRP-семейства состоит из консервативного кора, который представляет собой единый для всех членов семейства ионселективный канал. С-концевая область TRP-протеинов, менее консервативна, а отдельные представители семейства демонстрируют некоторые отличия. В совокупности, различия в N- и С-областях катионных TRP-каналов обеспечивают их структурное и функциональное разнообразие у трихоплакса *Trichoplax* sp. H2.

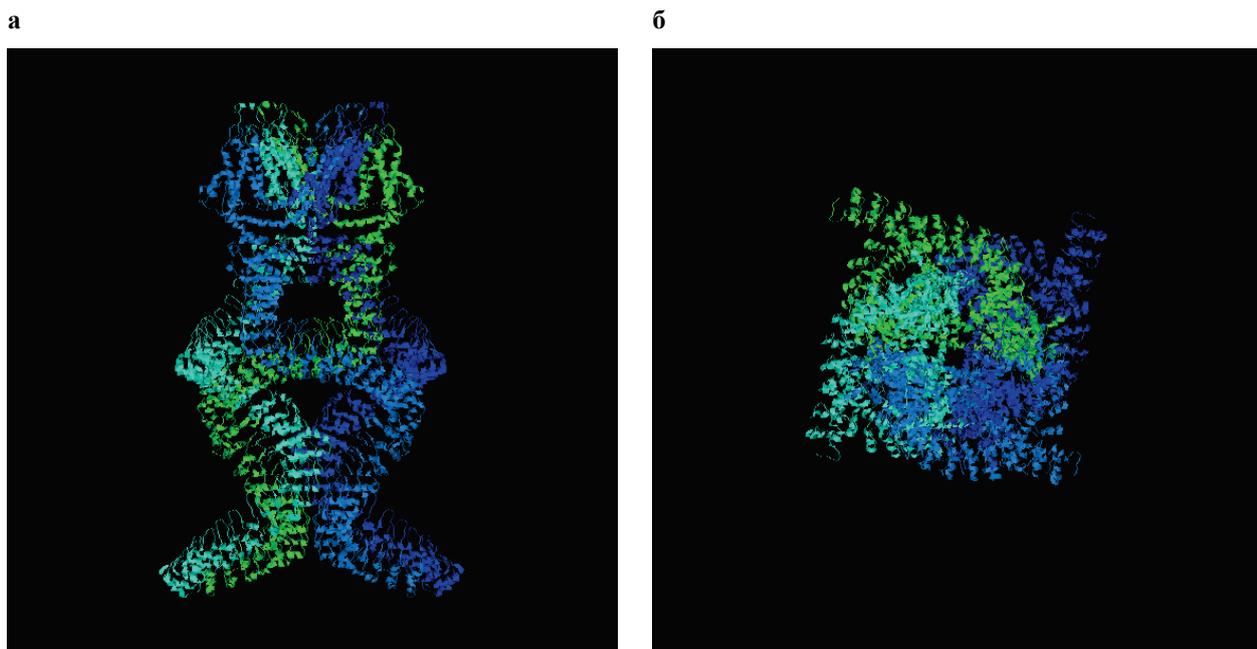


Рисунок 5. Структура NompC-механорецептора (5vkq) *D. melanogaster* [Jin et al., 2017], вид сбоку (а), вид сверху (б), каждая из четырёх субъединиц окрашена своим цветом от голубого до зелёного

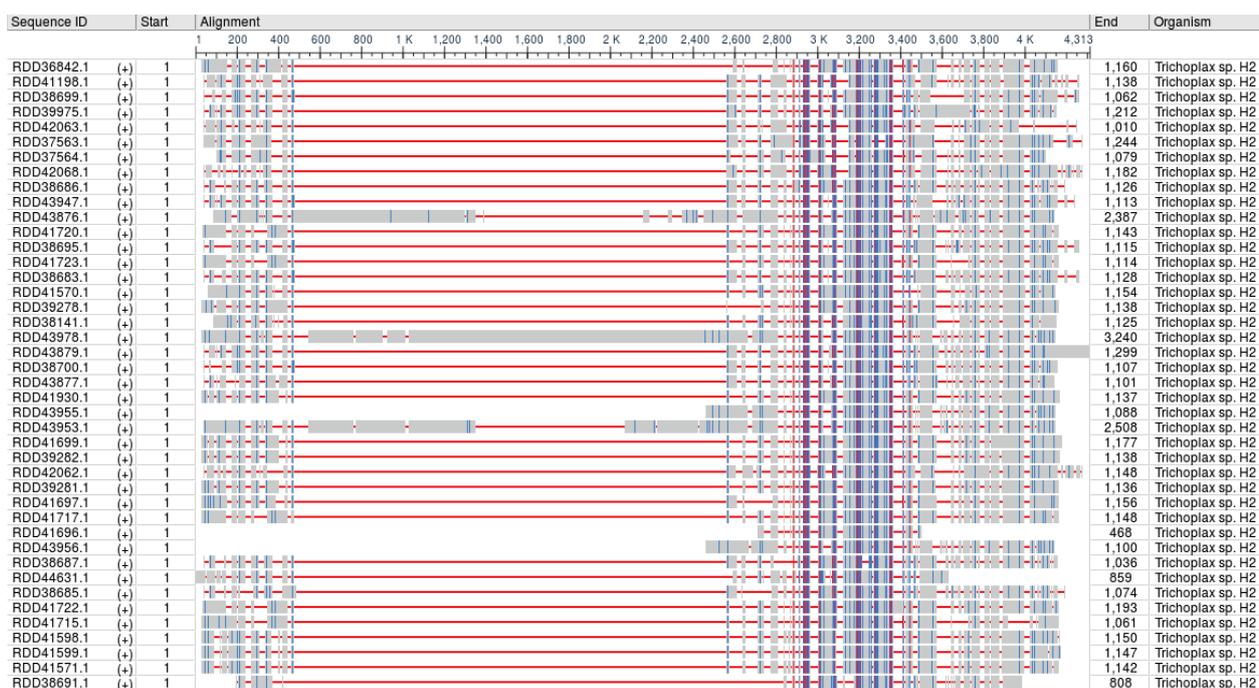


Рисунок 6. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей гомологов TRPA1-каналов из *Trichoplax sp. H2*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пионерское исследование катионного NompC-канала из *D. melanogaster* с атомарным разрешением [1] показало, что NompC образует гомотетрамерный белковый комплекс, который состоит из трех основных частей, а именно, трансмембранного домена (ТМ), области шейки и анкирин-повторяющихся доменов (АР), а также неструктурированных С- и N-концевых последовательностей (рис. 5). Механизм стробирования NompC до конца не изучен. Уникальной особенностью NompC является то, что он напрямую связывается с микротрубочками [33,34]. В своих рассуждениях мы придерживаемся "привязанной" модели (tethered model), в которой анкириновые спирали/пружины опираются на внутриклеточный цитоскелет и деформируются при нормальных нагрузках на клетку, что ведёт к изменению конформации белкового комплекса и к открыванию поры канала, т.е. при сжатии клетки, усилие от цитоскелета передаётся через анкириновую спираль на трансмембранную область канала, что приводит к его стробированию [35,36].

Ранее было показано, что NompC имеет значительное сходство с TRP-суперсемейством ионных каналов [3], что было использовано для поиска TRP-каналов у *Trichoplax sp. H2* в этой работе. Полученные данные указывают с высокой надёжностью предсказания на обнаружение в трихоплаксе *Trichoplax sp. H2* обширного семейства катионных TRP-каналов, отличающихся друг от друга числом анкириновых повторов (табл. 1, рис. 1) и, следовательно, длиной анкириновой спирали. Причём удалось выделить 3 обособленных кластера белков по этому признаку, а именно с короткими, средними и длинными анкириновыми стробирующими спиралями (рис. 3б), что, указывает на их разные функции в клетках организма. Можно предположить, что катионные TRP-каналы *Trichoplax sp. H2* с короткими анкириновыми пружинами выполняют функцию температурных сенсоров, а белки с длинными анкириновыми пружинами – функцию тактильных рецепторов, т.к. их резонансные частоты должны сильно отличаться друг от друга, несмотря на демпфирование [37-39]. Наиболее представительна часть TRP-каналов с числом анкириновых доменов в узком диапазоне от 12 до 16, которые слегка отличаются трансмембранной частью, за счёт присутствия дополнительных петель на С-конце полипептидной цепи. Возможно, эти петли модулируют активность TRP-каналов, которые способны участвовать в восприятии колебаний состояния среды [40], реализованных в виде «ощущений» от зрения и слуха до вкусовых сигналов [7,41,42], поступающих к телу трихоплакса. Видится, что эволюция сенсорных систем у животных является удивительной и многоплановой, в особенности, на её начальных этапах, а наши знания о ней, к сожалению, пока имеют достаточно иллюзорный характер [43].

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ тема № 0828-2018-0002 и в ходе проекта Сириус «Трихоплакс для бионики II».

Список литературы / References:

1. Jin P., Bulkley D., Guo Y., Zhang W., Guo Z., Huynh W., Wu S., Meltzer S., Cheng T., Jan L.Y., Jan Y.N., Cheng Y. Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nature*, 2017, vol. 547, no.

7661, pp. 118-122, doi: 10.1038/nature22981.

2. Kernan M., Cowan D., Zuker C. Genetic dissection of mechanosensory transduction: mechanoreception-defective mutations of *Drosophila*. *Neuron*, 1994, vol. 12, no. 6, pp. 1195-1206, doi: 10.1016/0896-6273(94)90437-5.

3. Walker R.G., Willingham A.T., Zuker C.S. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science*, 2000, vol. 287, no. 5461, pp. 2229-2234, doi: 10.1126/science.287.5461.2229.

4. Cheng L.E., Song W., Looger L.L., Jan L.Y., Jan Y.N. The role of the TRP channel NompC in *Drosophila* larval and adult locomotion. *Neuron*, 2010, vol. 67, no. 3, pp. 373-380, doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.004.

5. Kang L., Gao J., Schafer W.R., Xie Z., Xu X.Z.C. *elegans* TRP family protein TRP-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. *Neuron*, 2010, vol. 67, no. 3, pp. 381-391, doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.032.

6. Ramsey I.S., Delling M., Clapham D.E. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.*, 2006, vol. 68, pp. 619-647, doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431.

7. Venkatchalam K., Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.*, 2007, vol. 76, pp. 387-417, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

8. Himmel N.J., Cox D.N. Transient receptor potential channels: current perspectives on evolution, structure, function and nomenclature. *Proc Biol Sci.*, 2020, vol. 287, no. 1933, p. 20201309, doi: 10.1098/rspb.2020.1309.

9. Ishimaru Y., Matsunami H. Transient receptor potential (TRP) channels and taste sensation. *J Dent Res.*, 2009, vol. 88, no. 3, pp. 212-218, doi: 10.1177/0022034508330212.

10. Chung M.K., Jung S.J., Oh S.B. Role of TRP channels in pain sensation. *Adv Exp Med Biol.*, 2011, vol. 704, pp. 615-636, doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_33.

11. Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2013, vol. 29, pp. 355-384, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833.

12. Sun S., Dong X. Trp channels and itch. *Semin Immunopathol.*, 2016, vol. 38, no. 3, pp. 293-307, doi: 10.1007/s00281-015-0530-4.

13. Kadowaki T. Evolutionary dynamics of metazoan TRP channels. *Pflugers Arch.*, 2015, vol. 467, no. 10, pp. 2043-2053, doi: 10.1007/s00424-015-1705-5.

14. Himmel N.J., Letcher J.M., Sakurai A., Gray T.R., Benson M.N., Cox D.N. *Drosophila* menthol sensitivity and the Precambrian origins of transient receptor potential-dependent chemosensation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2019, vol. 374, no. 1785, p. 20190369, doi: 10.1098/rstb.2019.0369.

15. Schierwater B., DeSalle R. *Placozoa*. *Curr Biol.*, 2018, vol. 28, no. 3, pp. R97-R98, doi: 10.1016/j.cub.2017.11.042.

16. Neff E.P. What is a lab animal? *Lab Anim (NY)*, 2018, vol. 47, no. 9, pp. 223-227, doi: 10.1038/s41684-018-0135-3.

17. Kuznetsov A.V., Halaimova A.V., Ufimtseva M.A., Chelebieva E.S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020, vol. 35, no. 4, pp. 473-482, doi: 10.1080/17445760.2020.1753188.

18. Kuznetsov A.V., Vainer V.I., Volkova Y.M., Kartashov L.E. Motility disorders and disintegration into separate cells of *Trichoplax* sp. H2 in the presence of Zn²⁺ ions and L-cysteine molecules: A systems approach. *Biosystems*, 2021, vol. 206, p. 104444, doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104444.

19. Armon S., Bull M.S., Aranda-Diaz A., Prakash M. Ultrafast epithelial contractions provide insights into contraction speed limits and tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, vol. 115, no. 44, pp. E10333-E10341, doi: 10.1073/pnas.1802934115.

20. Smith C.L., Reese T.S., Govezensky T., Barrio R.A. Coherent directed movement toward food modeled in *Trichoplax*, a ciliated animal lacking a nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, vol. 116, no. 18, pp. 8901-8908, doi: 10.1073/pnas.1815655116.

21. Кузнецов А.В. Компьютерные модели пьезопротейнов и сетей белок-белковых взаимодействий у животных *Трихоплакс* (Placozoa). *IV Международная Черноморская научно-практическая конференция МГУ «Проблемы информатики, управления и искусственного интеллекта», 17-27 мая 2022 года, Севастополь, Россия.* [Kuznetsov A.V. Computer models of piezoproteins and networks of protein-protein interactions in *Trichoplax* (Placozoa) animals. *IV International Black Sea Scientific and Practical Conference of Moscow State University "Problems of Informatics, Control and Artificial Intelligence", May 17-27, 2022, Sevastopol, Russia. (In Russ.)*]

22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403-410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

23. Marchler-Bauer A., Bryant S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. W327-331, doi: 10.1093/nar/gkh454.

24. Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, pp. D225-259, doi: 10.1093/nar/gkq1189.

25. Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales N.R. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, pp. D222-226, doi: 10.1093/nar/gku1221.

26. Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C.J. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45, no. D1, pp. D200-D203, doi: 10.1093/nar/gkw1129.

27. Papadopoulos J.S., Agarwala R. COBAL: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences.

- Bioinformatics*, 2007, vol. 23, no. 9, pp. 1073-1079, doi: 10.1093/bioinformatics/btm076.
28. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*, 2015, vol. 10, no. 6, pp. 845-858, doi: 10.1038/nprot.2015.053.
29. Bitencourt-Ferreira G., de Azevedo W.F. Jr. Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol.*, 2019, vol. 2053, pp. 189-202, doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7_12.
30. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, p. 374, doi: 10.1016/s0968-0004(00)89080-5.
31. Cotton R. *Learning R: A Step-by-Step Function Guide to Data Analysis*. O'Reilly Media; 1st edition, 2013, 400 p.
32. Kamm K., Osigus H.J., Stadler P.F., DeSalle R., Schierwater B. Trichoplax genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11168, doi: 10.1038/s41598-018-29400-y.
33. Liang X., Madrid J., Gartner R., Verbavatz J.M., Schiklenk C., Wilsch-Brauninger M., Bogdanova A., Stenger F., Voigt A., Howard J. A NOMPC-dependent membrane-microtubule connector is a candidate for the gating spring in fly mechanoreceptors. *Curr Biol.*, 2013, vol. 23, no. 9, pp. 755-763, doi: 10.1016/j.cub.2013.03.065.
34. Liang X., Madrid J., Howard J. The microtubule-based cytoskeleton is a component of a mechanical signaling pathway in fly campaniform receptors. *Biophys J.*, 2014, vol. 107, no. 12, pp. 2767-2774, doi: 10.1016/j.bpj.2014.10.052.
35. Zanini D., Gopfert M.C. Mechanosensation: tethered ion channels. *Curr Biol.*, 2013, vol. 23, no. 9, pp. R349-51, doi: 10.1016/j.cub.2013.03.045.
36. Gillespie P.G., Walker R.G. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 2001, vol. 413, no. 6852, pp. 194-202, doi: 10.1038/35093011.
37. Howard J., Bechstedt S. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol.*, 2004, vol. 14, no. 6, pp. R224-226, doi: 10.1016/j.cub.2004.02.050.
38. Sotomayor M., Corey D.P., Schulten K. In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure*, 2005, vol. 13, no. 4, pp. 669-682, doi: 10.1016/j.str.2005.03.001.
39. Lee G., Abdi K., Jiang Y., Michaely P., Bennett V., Marszalek P.E. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature*, 2006, vol. 440, no. 7081, pp. 246-249, doi: 10.1038/nature04437.
40. Zhang W., Yan Z., Jan L.Y., Jan Y.N. Sound response mediated by the TRP channels NOMPC, NANCHUNG, and INACTIVE in chordotonal organs of *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, vol. 110, no. 33, pp. 13612-13617, doi: 10.1073/pnas.1312477110.
41. Montell C. *Drosophila* visual transduction. *Trends Neurosci.*, 2012, vol. 35, no. 6, pp. 356-363, doi: 10.1016/j.tins.2012.03.004.
42. Zhang K., Julius D., Cheng Y. Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 20, pp. 5138-5150.e12, doi: 10.1016/j.cell.2021.08.012.
43. Oteiza P., Baldwin M.W. Evolution of sensory systems. *Curr Opin Neurobiol.*, 2021, vol. 71, pp. 52-59, doi: 10.1016/j.conb.2021.08.005.

CHARACTERISTICS OF THE CATIONIC TRPA1-CHANNELS FAMILY IN *TRICHOPLAX* SP. H2 (PLACOZOA)

Fadeeva M.V.¹, Sergeeva E.V.¹, Rybakova K.A.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² Institute of Biology of the South Seas named after A.O. Kovalevsky RAS
Nakhimov Avenue, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: kuznet61@gmail.com

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0550

Abstract. Mechanoreceptors can transform external mechanical forces into electrochemical signals that induce cell membrane depolarization and initiate waves propagating along the cell surface. The TRPN1/NompC mechanotransduction channel is known to contain ankyrin repeats that act as a gating helix in *Drosophila melanogaster* [Jin et al., 2017]. In this work, we present for the first time a family of cationic TRPA1-channels in *Trichoplax* sp. H2 (Placozoa), which consists of 42 homologs ranging from 468 to 3240 aa in length. Three isolated clusters with different polypeptide chain lengths and various contents of ankyrin repeats were identified within the family. The spatial structure of TRPA1-channel RDD36842.1 was reconstructed, and aspirin, a possible TRP-channel blocker, was docked. The structure of the family members is analyzed, the mechanical model of channel operation is considered, and the probable function and physiology of these protein molecules and their role in the behavior of trichoplax are discussed. Variations in the number of ankyrin repeats at the N-terminus of TRP-proteins studied, and the differences detected at the C-terminus can indicate the polyfunctionality of these proteins in Placozoa. Perhaps TRP channels arose in early evolutionary stages before the appearance of multicellularity, but diversified in multicellular animals as the structural organization of those became more complex.

Key words: *Placozoa, mechanotransduction, TRP-channels, protein 3D-reconstruction, docking.*

БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРИСУТСТВИИ *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1 И НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Гасюк О.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Самков А.А., Худокормов А.А.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: olgagasyuk2000@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0551

Аннотация. Высокая антропогенная нагрузка на внешнюю среду вынуждает разрабатывать новые способы очистки окружающей среды. Одним из перспективных методов в процессах ремедиации является использование живых организмов. Так практически для каждого загрязнителя возможно подобрать соответствующий штамм микроорганизмов, способный разлагать те или иные поллютанты. В исследовании использовались микробные топливные элементы бентосного типа, как перспективные биоинженерные системы, которые можно будет применять в различных сферах человеческой жизни – медицина, очистка и мониторинг окружающей среды, в «интернете вещей» и т.д. К тому же электрогенный потенциал, создаваемый при помощи МТЭ будет способствовать миграции тяжёлых металлов в сторону анода, что позволит упростить процесс их изъятия из окружающей среды или же включения в пищевые цепи анодофильной микробиоты. В результате проведенного исследования было выяснено, что наиболее эффективными в конструкции МТЭ являются электроды горизонтального типа. Так же поллютанты со временем начинают оказывать негативное влияние на биоэлектрогенез микробных топливных элементов и соответственно на местную микробиоту.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, микробные топливные элементы, электроды, биоремедиация, биоэлектрогенез.

На сегодняшний день окружающая среда подвержена сильной антропогенной нагрузке. Различные поллютанты (СПАВ, углеводороды, тяжёлые металлы, пестициды и т.д.) постоянно поступают во внешнюю среду в различных концентрациях. Среди загрязнителей особую опасность представляют тяжёлые металлы (ТМ), так как относятся к рекальцитрантным ксенобиотикам и из окружающей среды полностью не удаляются. Поэтому актуальной задачей является разработка методов по удалению ТМ из окружающей среды. Ведущим направлением в очистке окружающей среды является использование живых организмов в процессах ремедиации. В настоящее время в биоремедиации могут использоваться грибы, бактерии, растения, беспозвоночные животные. Одним из перспективных направлений являются микробиологический метод по удалению поллютантов из среды, так как последние могут быть включены в пищевые цепи бактерий.

Микробные топливные элементы (МТЭ) являются перспективными биоинженерными системами. Данные устройства могут быть использованы как источник энергии, в процессах мониторинга и очистки окружающей среды, в медицине, в «интернете вещей» и т.д. МТЭ могут стать незаменимым компонентом в процессах биоремедиации окружающей среды за счёт происходящих в них биоэлектрохимических процессов. К тому же благодаря создающемуся в МТЭ электрогенному потенциалу возможна миграция катионов тяжёлых металлов в сторону анода, что позволит анодофильной микробиоте использовать их в процессе своей жизнедеятельности, также катионы ТМ могут быть извлечены из окружающей среды. Однако, в свою очередь вещества-токсиканты могут подавлять активность электрогенной микрофлоры, поэтому важно изучить влияние различных поллютантов на биоэлектрогенез.

В данном исследовании использовались микробные топливные элементы бентосного типа с электродами горизонтальной и вертикальной конструкции. В качестве соединений-поллютантов использовались Pb^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} в концентрации 7 ПДК для иона каждого металла. В качестве донного грунта использовался песок поймы р. Кубань. Электроды изготавливались из углеродного войлока «Карбопон» и графитовых стержней. Анодный электрод пропитывался суспензией микробной культуры *Shewanella oneidensis* MR-1 (ВКПРМ № В-9861), известной своими электрогенными свойствами. Так же известно, что данный штамм способен использовать тяжёлые металлы в анаэробных условиях в качестве акцепторов электронов, восстанавливая их до менее токсичных соединений. Электрический потенциал, создаваемый в микробных топливных элементах (под нагрузкой в 1 кОм), фиксировался автоматическим вольтметром авторской конструкции А.А. Лазукина.

Средние значения потенциала, полученное за 10 суток с МТЭ с горизонтальными электродами в присутствии свинца составило 250,1 мВ, никеля – 380,8 мВ, меди – 413,2 мВ (рисунок 1). Максимальный вольтаж, полученный с данных устройств, был для: Pb^{2+} – 416,9 мВ, Ni^{2+} – 488,3 мВ, Cu^{2+} – 590,6 мВ. При этом наиболее негативный эффект на биоэлектрогенез оказывал свинец.

За 10 суток среднее значение напряжение МТЭ с вертикальными электродами составило: для свинца – 124,7 мВ, никеля – 65,1 мВ, меди – 43,7 мВ. Наибольшее значение биоэлектрогенеза, полученное с данных устройств составило: Pb^{2+} – 191,4 мВ, Ni^{2+} – 158,6 мВ, Cu^{2+} – 70,5 мВ. В данных устройствах наиболее выраженный негативный эффект на электрогенез МТЭ был оказан катионами меди, что видно из рисунка 2.

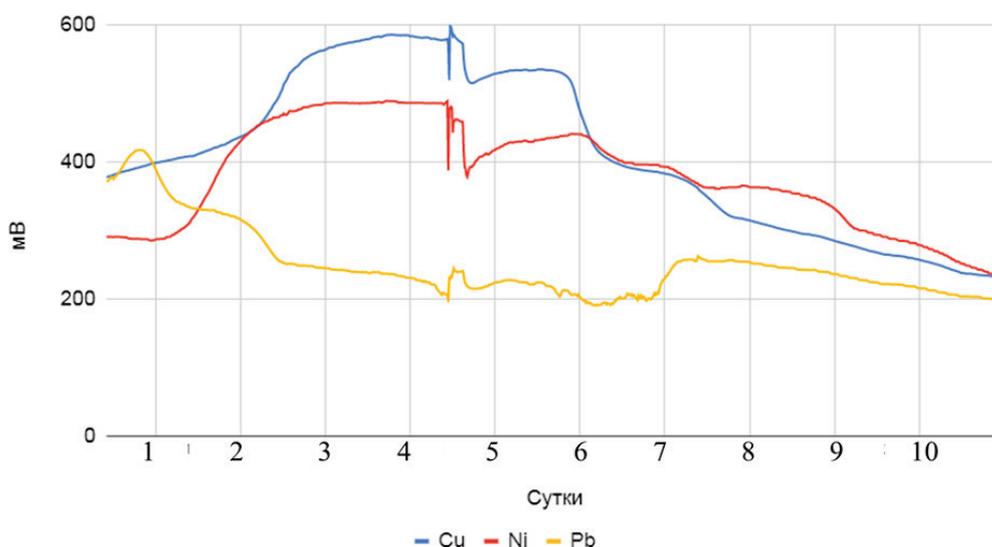


Рисунок 1. Биоэлектродгенез МТЭ с горизонтальными электродами, с внесением *S. oneidensis* MR-1, в присутствии тяжелых металлов в течение первых 10 суток

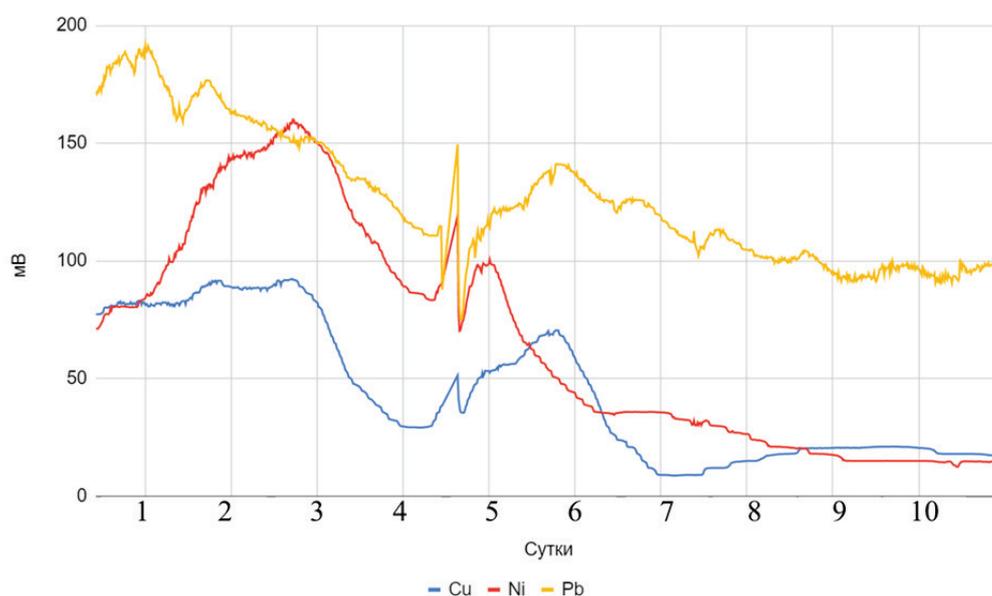


Рисунок 2. Биоэлектродгенез МТЭ с вертикальными электродами, с внесением *S. oneidensis* MR-1 в присутствии тяжелых металлов в течение первых 10 суток

По прошествии месяца в МТЭ с горизонтальными электродами среднее значение биоэлектродгенеза за 10 суток составил: в присутствии свинца – 102,8 мВ, никеля – 202,5 мВ, меди – 68,9 мВ (рис. 3). Максимальное напряжение в присутствии поллютантов составило: для Pb^{2+} – 122,1 мВ, Ni^{2+} – 335,4 мВ, Cu^{2+} – 75,9 мВ. Наибольшее падение электродгенеза (в 7,8 раз) наблюдается в присутствии ионов меди, что говорит о сильном негативном воздействии данного металла на микробиоту МТЭ.

Среднее значение биоэлектродгенеза (10 суток) МТЭ с вертикальными электродами спустя месяц составило: для свинца – 14,2 мВ, никеля – 5,3 мВ, меди – 2,7 мВ. Максимальный электродгенез для данных устройств составил: для Pb^{2+} – 18,1 мВ, Ni^{2+} – 6,4 мВ, Cu^{2+} – 3,1 мВ. В данных МТЭ самый низкий электродгенез сохраняется в присутствии ионов меди, а наибольший сохранился в присутствии солей свинца. Полученные данные представлены на рисунке 4.

Таким образом, наибольший электродгенез был получен с МТЭ с горизонтальными электродами. При этом с горизонтальными электродами наибольшие показатели электрического потенциала дали микробные топливные элементы, где в качестве поллютанта использовались ионы никеля, тогда как МТЭ с вертикальными электродами наилучшие значения показали в присутствии ионов свинца. При этом самые низкие значения биоэлектродгенеза было выявлено с ионами меди, как в МТЭ с горизонтальными, так и вертикальными электродами. Медь оказывала наиболее негативный эффект на электродгенез микробных топливных элементов и можно предположить, что и на микробиоту данных устройств. Так величина электродгенеза в присутствии того или иного иона металла зависит от типа электродов и так же от микробиоты микробного топливного элемента.

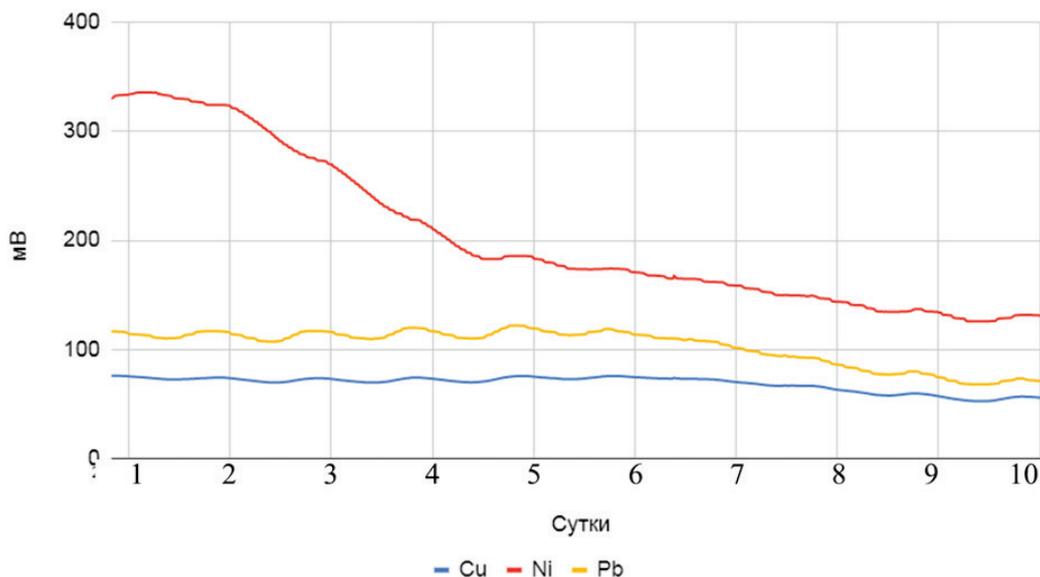


Рисунок 3. Биоэлектрогенез МТЭ с горизонтальными электродами и штаммом *S. oneidensis* MR-1 в присутствии тяжелых металлов в течение 10 суток спустя месяц эксперимента

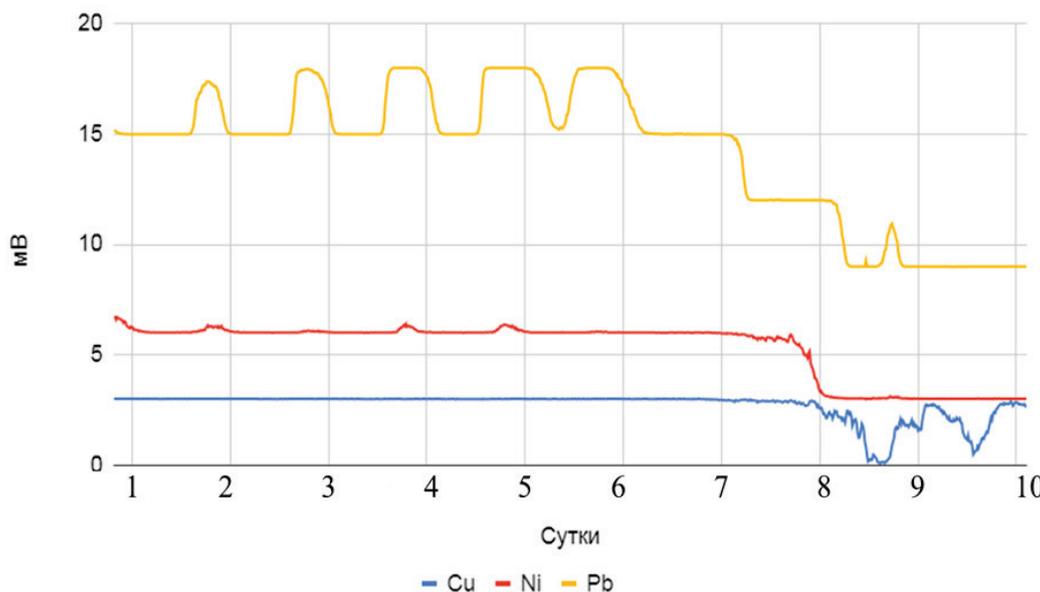


Рисунок 4. Биоэлектрогенез МТЭ с вертикальными электродами и лабораторным штаммом *S. oneidensis* MR-1 в присутствии тяжелых металлов в течение 10 суток спустя месяц эксперимента

Так же значения электрогенеза с течением времени значительно снизились по сравнению с первыми 10 сутками эксперимента. Уменьшение электрогенеза может быть связано с уменьшением свободных катионов металлов в среде, в результате метаболической активности штамма *S. oneidensis* MR-1, так как из некоторых литературных источников известно, что некоторых катионом ТМ могут оказывать стимулирующее воздействия на электрогенез МТЭ и максимальная величина напряжения регистрируется при восстановительных процессах катионов металлов из растворимого состояние в нерастворимое.

Таким образом, биотопливные элементы бентосного типа способны функционировать в присутствии загрязнения донных осадках тяжелыми металлами как минимум в концентрации до 7 ПДК. Факт частичного подавления биоэлектрогенеза может быть использован в дальнейшем для применения МТЭ в режиме неселективного биосенсора непрерывного действия, расположенного постоянно в окружающей среде. В рамках дальнейших исследований будет определено влияние биоэлектрических процессов на пространственное распределение тяжелых металлов в донном грунте.

Список литературы / References:

1. Fadzli F.S., Rashid M., Yaqoob A., Mohamad Ibrahim M.N. Electricity generation and heavy metal remediation by utilizing yam (*Dioscorea alata*) waste in benthic microbial fuel cells (BMFCs). *Biochemical Engineering Journal*, 2021, vol. 172, doi: 10.1016/j.bej.2021.108067.

2. Yu-Shang Xu, Tao Zheng, Xiao-Yu Yong, Dan-Dan Zhai, Rong-Wei Si, Bing Li, Yang-Yang Yu, Yang-Chun Yong. Trace heavy metal ions promoted extracellular electron transfer and power generation by *Shewanella* in microbial fuel cells. *Journal Bioresource Technology*, 2016, vol. 211, doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.144.

BIOELECTROGENESIS OF MICROBIAL FUEL CELLS IN THE PRESENCE OF *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1 AND SOME HEAVY METALS

Gasyuk O.A., Volchenko N.N., Lazukin A.A., Samkov A.A., Khudokormov A.A.

Kuban State University

st. Stavropolskaya, 149, Krasnodar, 350040, Russia; E e-mail: olgagasyuk2000@yandex.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0551

Abstract. The high anthropogenic load on the environment makes it necessary to develop new ways of cleaning the environment. One of the promising methods in remediation processes is the use of living organisms. So, for almost every pollutant, it is possible to select the appropriate strain of microorganisms capable of decomposing certain pollutants. The study used benthic-type microbial fuel cells as promising bioengineering systems that can be applied in various areas of human life - medicine, cleaning and environmental monitoring, in the Internet of Things, etc. In addition, the electrogenic potential created by MFC will facilitate the migration of heavy metals towards the anode, which will simplify the process of their removal from the environment or inclusion in the food chains of anodophilic microbiota. As a result of the study, it was found that the most effective in the design of the MFC are horizontal electrodes. Also, pollutants eventually begin to have a negative impact on the bioelectrogenesis of microbial fuel cells and, accordingly, on the local microbiota.

Key words: *heavy metals, microbial fuel cells, electrodes, bioremediation, bioelectrogenesis.*

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ КРОНЫ И СТРОЕНИЯ ПОБЕГОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ РАЗНОЙ СЕКСУАЛИЗАЦИИ

Бажина Е.В., Стасова В.В.

Сибирский федеральный университет, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Академгородок 50/28, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0552

Аннотация. Одним из основных факторов, оказывающих влияние на строение и функционирование земных организмов, является гравитация. Пихта сибирская оказалась чрезвычайно чувствительной к действию силы тяжести - крона взрослых деревьев дифференцирована по типу половых побегов по оси «верх-низ», протяженность половых ярусов по оси дерева существенно различается. Исследования проводились на территории национального парка «Красноярские Столбы», расположенном на северо-западных отрогах Восточного Саяна, на Куйсумском (Красноярском) хребте, территория относится к Восточно-Саянскому горно-таежному району сосново – кедрово-пихтовых лесов. Определение анатомо-морфологических характеристик побегов и хвои проводили на средних по таксационным показателям и не имеющих внешних признаков повреждения модельных деревьях. Исследования показали различия структурно-функциональных показателей побегов пихты разной «сексуализации». Изменения биометрических показателей генеративных и вегетативных побегов и хвои обусловлены особенностями их анатомического строения. Предполагается, что эти особенности строения побегов разной сексуализации обусловлены их функциональной ролью. Более мощные генеративные побеги на вершине дерева уже в первый год развития (формирование генеративных почек) обеспечивают максимальный приток питательных веществ к органам репродукции. Обсуждается роль физического импринта в особенностях строения особой вида на клеточном и тканевом уровнях.

Ключевые слова: *Abies sibirica* Ledeb., дифференциация кроны, побеги, морфолого-анатомические показатели.

Гравитация, оказывающая влияние на все материальные тела, определяет множество природных процессов и явлений. В массивных телах (планет и звезд) в гравитационном поле возникает сила тяжести, энергия которой переходит в теплоту и в недрах возникает и поддерживается соответствующая температура, в организмах – возникает полярность, т.е. асимметризация их по оси «верх-низ» [1-3]. Важнейшую роль гравитация играет в распределении и круговоротах веществ внутри организмов, возврате в цикл круговорота энергии, клеточной дифференцировке и процессах воспроизводства, определяющих устойчивость биологических объектов [4,5]. Семязачаток в цветке и яйцеклетка в семязачатке ориентированы вдоль силовых линий гравитационного поля, внутри яйцеклетки вакуоли как более легкие структуры находятся сверху. Древесные растения чувствительны к гравитации – распределение в них веществ и, прежде всего, фитогормонов, локализация генеративных органов в кроне и на побеге, морфология и функционирование особи в той или иной степени определяется действием силы тяжести [3-5]. Пихта сибирская оказалась чрезвычайно чувствительной к действию силы тяжести: строение кроны (генеративная ярусность), дорзовентральная асимметрия побегов, распределение структурных веществ, макро- и микроэлементов, фитогормонов по оси «верх-низ» наблюдаются во всех условиях произрастания вида, при нарушении гомеостаза у деревьев прежде всего утрачивается диагеотропизм скелетных ветвей [6-9]. Полярность в локализации половых побегов предполагает дифференциацию не только по распределению веществ, но и особенностям структурно-функциональной организации спорофита.

Цель настоящих исследований – анализ структурно-функциональных особенностей побегов пихты сибирской разной «сексуализации».

Исследования проводились на территории национального парка «Красноярские Столбы», который расположен на северо-западных отрогах Восточного Саяна, на Куйсумском (Красноярском) хребте, вплотную подходящем к правому берегу р. Енисей. Территория относится к Восточно-Саянскому горно-таежному району сосново – кедрово-пихтовых лесов и граничит со Среднесибирским плоскогорьем и Западно-Сибирской низменностью [10,11].

Определение анатомо-морфологических характеристик побегов и хвои пихты проводили на средних по таксационным показателям и не имеющих внешних признаков повреждения модельных деревьях. У одно- и двухлетних побегов вегетативного, мужского и женского ярусов каждого дерева от основания отрезали по 2см и фиксировали этанолом. Поперечные срезы фиксированного материала окрашивали метиленовым синим и заключали в глицерин. Хвою отбирали с средней части тех же побегов. Образцы фиксировали в 50%-ном этаноле. Измеряли длину каждой хвоинки, поперечные срезы из средней части хвои и от основания побегов делали вручную, не окрашивали и заключали в глицерин. Ранее нами было выявлено, что, хвоя, взятая с одно- и двухлетних побегов, достоверно не различались по анатомическим характеристикам, поэтому образцы хвои одного дерева объединялись. Всего было выполнено и обработано около 170 срезов побегов и 1500 срезов хвои. Препараты фотографировали с помощью светового микроскопа с цифровым окуляром DCM-900, изображения обрабатывали в программах ScopePhoto 3.0 for Scope technology и PhotoMaster 1.31.

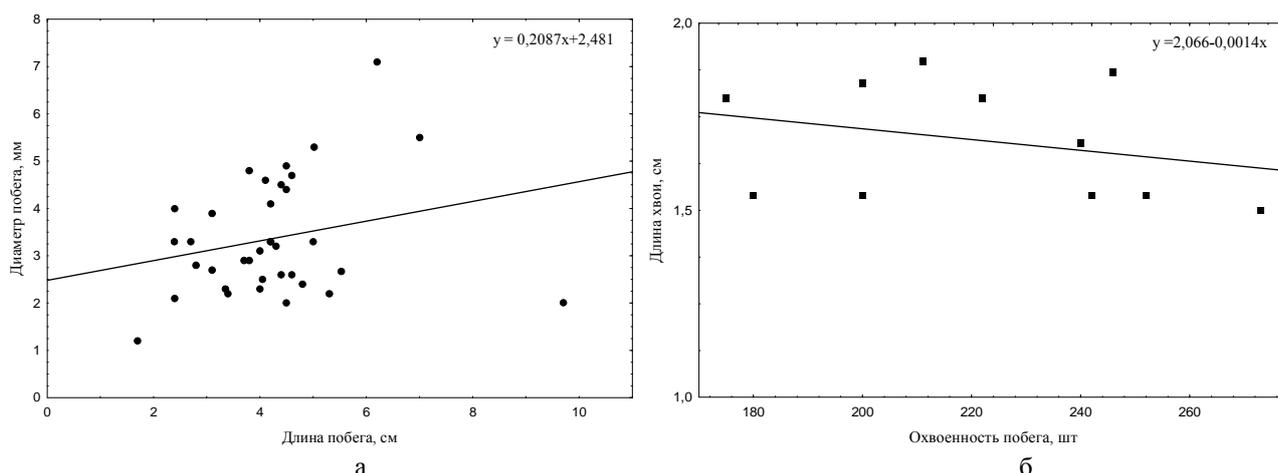


Рисунок 1. Регрессия между длиной и диаметром побегов (а), длиной хвои и охвоенностью «женских» генеративных побегов (б), $p \leq 0,05$

Крона взрослых деревьев пихты сибирской дифференцирована по типу половых побегов по оси «верх-низ». На вершине дерева (0,4-2,3м, чаще до 1,5м в зависимости от возраста дерева) локализируются генеративные побеги, несущие женские шишки – «женские», ниже по стволу располагаются мужской (побеги, несущие микростробилы, протяженность по оси ствола - 0,1-13,0м), а затем и вегетативный (протяженность - 4,3-22,8м) ярусы [9]. Исследования показали, что морфологические показатели побегов разной сексуализации различаются, при этом они в большей или меньшей степени скоррелированы, однако, связи показателей могут носить разнонаправленный характер (табл. 1, рис. 1).

Изменения биометрических показателей генеративных и вегетативных побегов обусловлены особенностями их анатомического строения. Отдельные морфолого-анатомические показатели побегов женского генеративного

Таблица 1. Корреляции морфологических показателей 1-3-летних побегов ($n > 175$)

Показатель	Среднее значение показателя	Диаметр побега, мм	Число хвои на 10 см побега, шт.*	Длина хвои, см	Ширина хвои, мм	Масса хвои, г
«Женские» генеративные побеги						
Длина побега, см	3,1±0,83	0,65	-0,43	0,22	-0,18	0,85
Диаметр побега, мм	3,8±0,55		-0,61	0,63	-0,45	0,24
Число хвои, шт	231±32,7			-0,96	-0,43	0,11
Длина хвои, см	1,7±0,17				0,38	-0,32
Ширина хвои, мм	1,25±0,21					-0,43
Масса хвои, г	435,6±42,8					
«Мужские» генеративные побеги						
Длина побега, см	4,2±1,87	0,57	0,71	-0,34	0,59	-0,02
Диаметр побега, мм	3,0±1,41		0,15	0,40	0,57	0,14
Число хвои, шт	236±38,9			-0,40	0,40	-0,50
Длина хвои, см	2,0±0,41				-0,36	-0,17
Ширина хвои, мм	1,26±0,18					0,03
Масса хвои, г	421,5±84,4					
Вегетативные побеги						
Длина побега, см	4,2±0,75	0,55	-0,40	-0,39	0,70	0,99
Диаметр побега, мм	2,4±0,15		-0,95	-0,98	0,98	0,47
Число хвои, шт	205±49,0			-0,69	0,38	-0,48
Длина хвои, см	2,3±0,23				0,38	-0,48
Ширина хвои, мм	1,5±0,10					-0,03
Масса хвои, г	430±54,7					

Примечание: * - усредненные данные для среднегорья Восточного и Западного Саян, жирный шрифт – корреляции достоверны при $p \leq 0,05$

яруса («женской сексуализации») уже в первый год развития больше, чем у побегов мужского яруса («мужской сексуализации») и вегетативных. У побегов, несущих шишки, достоверно больше площади поперечного сечения побегов и первичной коры, сердцевин и флоэмы (табл. 2), площадь древесины 1 года у генеративных побегов проявляла тенденцию к уменьшению от побегов женского яруса к мужскому и вегетативному. Существенно различаются и относительные показатели. Необходимо отметить, что ряд показателей варьирует достаточно сильно, однако, различия статистически недостоверны. Так, например, площади сердцевин побегов и древесины второго года варьировали почти в два раза в зависимости от сексуализации побегов, но наблюдаемые различия статистически не подтверждены. Отмечена также тенденция к снижению площади всей древесины и площади флоэмы от побегов женской сексуализации к вегетативным. Мы полагаем, что эти особенности строения побегов разной сексуализации обусловлены их функциональной ролью. Женские генеративные побеги пихты сибирской выполняют функции удержания и обеспечения питательными веществами значительного количества весьма компактно (верхние 0,5-1,5м) локализованных женских шишек, которые являются сильнейшими акцепторами. Ранее показано ([12], что в урожайные годы количество женских шишек на дереве может превышать 100-130 шт., на одном побеге может развиваться до 2-7 штук. Очевидно, более мощные генеративные побеги на вершине дерева уже в первый год развития (формирование генеративных почек) обеспечивают максимальный приток питательных веществ к органам репродукции.

Морфолого-анатомические показатели хвои на побегах ярусов разной «сексуализации» также достоверно различаются (табл. 3). Хвоя вегетативных побегов более длинная, но менее широкая и толстая. Площадь её поперечного сечения меньше, чем у хвои побегов, несущих генеративные органы. Хвоя на побегах, несущих женские шишки по длине практически равна хвое на побегах, несущих микростробилы, однако, ширина, толщина и площадь поперечного сечения хвоинок «женских» побегов достоверно больше, центральный цилиндр, проводящие пучки и смоляные ходы - более крупные (почти на 30%). Очевидно, наблюдаемые структурные различия морфолого-анатомического строения хвои связаны с необходимостью обеспечить приток ассимилятов к генеративным органам и, прежде всего, к формирующимся крупным женским почкам/шишкам. В тоже время, формирование микростробил ограничено во времени (развиваются с июня по май следующего года), несмотря на большее количество размеры их существенно меньше, развитие их, очевидно, требует меньшего количества структурных и пластических веществ.

Таблица 2. Морфолого-анатомические характеристики одно- (числитель) и двулетних (знаменатель) побегов разной сексуализации, среднегорье Восточного Саяна

Площади поперечного сечения, мм ²	Побеги, несущие стробилы		Вегетативные побеги	p
	женские	мужские		
побега	<u>8,77±1,23</u> 14,0±3,00	<u>5,90±1,19</u> 9,2±1,15	<u>2,68±0,50</u> 4,7±1,12	0,01
сердцевин	<u>0,26±0,07</u> 0,35±0,10	<u>0,25±0,07</u> 0,29±0,05	<u>0,14±0,05</u> 0,18±0,07	<u>0,37</u> 0,56
древесины 1 года	<u>0,35±0,14</u> 0,46±0,17	<u>0,21±0,05</u> 0,26±0,15	<u>0,17±0,05</u> 0,18±0,06	<u>0,40</u> 0,01
древесины 2 года	0,95±0,63	0,44±0,10	0,45±0,26	0,28
всей древесины, мм ²	1,41±0,79	0,70±0,13	0,63±0,31	0,29
флоэмы, мм ²	<u>0,21±0,06</u> 0,69±0,33	<u>0,20±0,04</u> 0,33±0,06	<u>0,12±0,04</u> 0,27±0,10	<u>0,63</u> 0,08
первичной коры, мм ²	<u>7,94±1,13</u> 12,00±2,12	<u>5,23±1,11</u> 7,91±1,02	<u>2,25±0,38</u> 3,65±0,70	0,01
сердцевин/ поперечного сечения	<u>0,03±0,004</u> 0,02±0,005	<u>0,04±0,001</u> 0,03±0,006	<u>0,05±0,007</u> 0,05±0,01	0,02 0,03
флоэмы/ древесины	<u>0,41±0,12</u> 0,65±0,29	<u>0,57±0,24</u> 0,5±0,06	<u>0,81±0,09</u> 0,57±0,08	0,03 0,60

Примечание: жирный шрифт – различия достоверны при p≤0,05

Таблица 3. Анатомические характеристики хвои пихты сибирской на побегах разной сексуализации

Показатель	Женский	Мужской	Вегетативный	F	p
Длина хвоинки, см	1,57±0,05	1,60±0,06	2,00±0,08	12,62	0,001
Ширина поперечного сечения, мкм	1363,15±26,19	1249,89±19,23	1264,15±19,37	4,82	0,01
Толщина поперечного сечения, мкм	643,01±22,07	562,55±12,15	500,5±10,46	7,26	0,01
Площадь поперечного сечения, мкм ²	666398±26728	541493±18606	510057±14432	4,00	0,05
Площадь центрального цилиндра, мкм ²	86750±3677	72559±2401	69051±2014	7,14	0,03
Площадь проводящего пучка, мкм ²	8787± 470	7810±557	7383±369	5,32	0,05
Площадь смоляного хода, мкм ²	11670±1097	9123±1057	8065±753	3,19	0,05

Взаимодействия на уровне элементарных частиц накладывают физический импринт на каждое биологическое явление. Седиментация статолитов (амилопластов) в гравитационном поле вызывает повышение давления на клеточные стенки в стеблях и корнях, влияет на активность гормона роста, клеточную дифференцировку, репродуктивные процессы, тем самым определяя и эволюцию растений [3,4,13]). Согласно принципу функциональной конвергенции структура, физиология и фенология растений отражает условия среды, в которых они растут [14,15]. Строение кроны пихты сибирской идеально адаптировано для произрастания в физическо-химических и биоценологических условиях горных районов Сибири. Крайне устойчивый генетический признак – полярность расположения генеративных органов по оси (в кроне) и на побегах пихты сибирской определяется физическим импринтом. Локализация шишек в верхней части кроны во влажных условиях произрастания горных районов [16,17], способствует эффективному перекрестному опылению, поддерживая тем самым, генетический полиморфизм популяций. Пыльца под действием вихревых потоков и ветра поднимается вверх, откуда под действием силы тяжести падает сверху вниз на воронкообразное микропиле женских шишек. Количество пыльцы может определять перспективы (стабилизацию или, напротив, дестабилизацию) популяций [13].

Большие затраты на транспорт питательных веществ к шишкам, сосредоточенным на вершине дерева в условиях высокой влажности, оправдываются эффективностью репродуктивной системы. Питание и функционирование генеративных органов обеспечивают анатомо-морфологические особенности организации побегов разной сексуализации, «половая принадлежность» является фактором, определяющим, до некоторой степени, амплитуду варьирования анатомо-морфологических признаков побегов и хвои. Решающее значение имеет их функциональная роль: «женские» генеративные, наиболее мощные побеги – обеспечивают морфогенез, удержание и питание в течение всего вегетационного периода довольно крупных женских шишек. «Мужские» генеративные побеги менее мощные, более тонкие и длинные, несут значительное количество микростробиллов, пик развития которых приходится на апрель-июнь. Питательные вещества интенсивно расходуются в это время на микроспорогенез и формирование пыльцы, в июле-августе - на заложение и дифференциацию микростробиллов (до шт. 38 на побег) – в связи с чем у них наблюдается снижение ростовых процессов [12]. После опыления и отпада микростробиллов (начало-середина июня), побеги (за исключением побегов текущего года) функционируют как вегетативные. Вегетативные побеги – наиболее тонкие и длинные, несут максимально длинную хвою, главная их функция – фотосинтез. Однако, высокая амплитуда варьирования признаков побегов не всегда позволяет выявить достоверные корреляции между отдельными показателями.

Живые организмы представляют собой целостные системы, развивающиеся и функционирующие под действием комплекса факторов среды [18]. Действие гравитации – через экологию, физиологию и потоки веществ, определяет не только строение кроны и репродуктивные процессы пихты сибирской, но и особенности структурно-функционального строения побегов разной сексуализации на клеточном и тканевом уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты № 11-04-00281, 20-05-00540.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare that there is no conflict of interest.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS. This paper does not describe any research using humans and animals as objects.

Список литературы / References:

1. Вавилов С.И. *Исаак Ньютон*. М.-Л.: Ан СССР, 1945, 230 с. [Vavilov S.I. *Isaac Newton*. Moscow-Leningrad: Academy of Science of USSR, 1945, 230 p. (In Russ.)]
2. Гаджиев С.Ш. Гравитация и ее физическая сущность. *Вестник социально-педагогического института*, 2014, т. 3, № 11. [Gadzhiev S.Sh. Gravitacia i ieio phusucheskaya sushchnost'. *Vestnik social'no-pedagogoshcheskogo instituta*, 2014, vol. 3, no 11. (In Russ.)]
3. Геодакян В.А. Асинхронная асимметрия. *Журн. высшей нервной деятельности*, 1993, т. 43, вып. 3, с. 543-561. [Geodakyan V.A. Asinchronnaya assimetriya. *Zurnal visshei nervnoi deztel'nosti*, 1993, vol. 43, no. 3, pp. 543-561. (In Russ.)]
4. Уоринг Ф., Филлипс И. *Рост и дифференцировка растений*. М.: Мир, 1982, 512 с. [Woring F., Phillips I. *Rost i differencirovka rastenii*. Moscow: Mir, 1982, 512 p. (In Russ.)]
5. Меркис А.И. *Геотропическая реакция растений*. Вильнюс, 1973, 263 с. [Merkis A.I. *Geotropicheskaia reakciia rastenii*. Vil'nus, 1973, 263 p. (In Russ.)]
6. Минина Е.Г., Беляев В.В. Изучение ростовых веществ в связи с дорсовентральностью и сексуализацией побегов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ldb.). *Физиология растений*, 1972, т. 19, вып. 3, с. 658-661. [Minina E.G., Belyaev V.V. The study of substances in connection with dorsoventrality and sexualization of Siberian fir shoots. *Russian journal of Plant physiology*, 1972, vol. 19, no. 3, pp. 658-661. (In Russ.)]
7. Третьякова И.Н., Бажина Е.В. Морфоструктура кроны и состояние генеративной сферы у пихты сибирской в нарушенных лесных экосистемах близ озера Байкал. *Известия РАН. Сер. Биологическая*, 1995, № 6, с. 685-692. [Tretyakova I.N., Bazhina E.V. Morphostructure of crown and the state of reproductive sphere in the Siberian fir in disturbed forest ecosystems near Lake Baikal. *Izv. Akad. Nauk, Ser. Biol.*, 1995, vol. 121, no. 6, pp. 685-692. (In Russ.)]
8. Бажина Е.В. Состояние древостоев пихты сибирской (*Abies sibirica*) и распределение химических элементов по ярусам ее кроны в лесных экосистемах ООПТ Красноярского края, Россия. *Nature Conservation Research. Заповедная наука*, 2018, т. 3, № 2, с. 40-53. [Bazhina E.V. Siberian fir (*Abies sibirica*) state and chemical element allocation in tree crown in forest ecosystems of protected areas in south of Krasnoyarsk region (Russia). *Nature Conservation Research*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 40-53, doi: 10.24189/ncr.2018.064. (In Russ.)]
9. Бажина Е.В. Изменения архитектуры кроны деревьев пихты сибирской при нарушении гомеостаза. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 4, с. 753-759. [Bazhina E.V. Changes in Siberian Fir Crown Architecture under Impaired Homeostasis. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 642-648, doi: 10.1134/S0006350920040041. (In Russ.)]
10. Буторина Т.Н. К характеристике лесорастительных условий государственного заповедника «Столбы». *Труды гос. заповедника «Столбы»*, Красноярск, 1961, № 3, с. 247-282. [Butorina T.N. To characteristic of forest-forming conditions of natural reseraved Stolby. *Proceedens of natural reseraved Stolby*, Krasnoyarsk, 1961, no. 3, pp. 247-282. (In Russ.)]
11. *Летопись природы заповедника «Столбы»*. Красноярск, 2013, с. 148-160. [Letopis' prirodii of natural reseraved Stolby, Krasnoyarsk, 2013, pp. 148-160. (In Russ.)]
12. Бажина Е.В. *Половая репродукция пихты сибирской в лесных экосистемах оз. Байкал*. Автореф. дисс на соиск. канд. биол наук, Красноярск, 1997, 18 с. [Bazhina E.V. *Polovaya reproductciya pihitii sibirskoi v lesnih ecosystemah ozera Baikal*. PhD thesis, Krasnoyarsk, 1997, 18 p. (In Russ.)]
13. Геодакян В.А. Количество пыльцы как передатчик экологической информации и регулятор эволюционной пластичности растений. *Журн. общ. Биологии*, 1978, т. 39, № 5, с. 743-753. [Geodakyan V.A. Kolichestvo piltsii kak peredatchik plastichnosti rastenii. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 1978, vol. 39, no. 5, pp. 743-753. (In Russ.)]
14. Assmann E. *The principles of forest yield study*. Pergamon Press, Oxford, 1970.
15. Walter H. *Die Hydratur der Pflanzen und ihre physiologisch-ökologische Bedeutung*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1931. (In Germ.)]
16. Поликарпов Н.П., Чебакова Н.М., Назимова Д.И. *Климат и горные леса Южной Сибири*. Новосибирск, Наука, 1986, 226 с. [Polikarpov N.P., Tchebakova N.M., Nazimova D.I. *The Climate and Mountain Forests of Southern Siberia mountains*. Nauka, Novosibirsk, 1986, 178 p. (In Russ.)]
17. Протопопов В.В. *Средообразующая роль темнохвойного леса*. Новосибирск, Наука, 1975, 328 с. [Protopopov V.V. *Sredoobrazuyushchaia rol' temnochvojnogo lesa*. Novosibirsk, Nauka, 1975, 328 p. (In Russ.)]
18. Шмальгаузен И.И. *Пути и закономерности эволюционного процесса*. Избранные труды. М., Наука, 1983, 360 с. [Shmal'gauzen I.I. *Puti i zakonoternostii evolutcionnogo processa*. Izbranniye trudii. Moscow, Nauka, 1983, 360 p. (In Russ.)]

CROWN STRUCTURE AND MORPHOLOGY PECULIARITIES OF ABIES SIBIRICA SHOOTS WITH DIFFERENT SEXUALIZATION**Bazhina E.V., Stasova V.V.**Siberian Federal University, V.N. Sukachev Institute of Forest, Krasnoyarsk
Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: ksc.krasn.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0552

Abstract. One of the main effects influencing the structure and functioning of terrestrial organisms is gravity. Siberian fir turned out to be extremely sensitive to the action of gravity - the crown of adult trees is differentiated according to the type of sexual shoots along the "top-down" axis, the length of the sexual tiers along the tree axis varies significantly. The research was conducted in the territory of the National Park "Krasnoyarskie Stolby", located on the northwestern spurs of the Eastern Sayan, on the Kuysum (Krasnoyarsk) Ridge, the territory belongs to the Eastern Sayan mountain taiga region of pine-cedar fir forests. The study has shown differences in the structural and functional parameters of fir shoots of different "sex". Changes in the biometric parameters of generative and vegetative shoots and needles are due to the peculiarities of their anatomical structure. Determination of anatomical and morphological parameters of shoots and needles was performed on model trees with average taxonomic characteristics and without visual signs of damage. It is assumed that the peculiarities of shoots structure of different sexualization are caused by their functional role. More powerful generative shoots at the tree top already in the first year of development (formation of generative buds) provide the maximum inflow of nutrients to reproductive organs. The role of the physical imprint in the structural features of individuals of the species at the cellular and tissue levels is discussed.

Key words: *Abies sibirica Ledeb., crown differentiation, shoots, morphological and anatomical parameters.*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ В ДОННЫХ ОСАДКАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ И ГЛУБИНЫ (НА ПРИМЕРЕ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ СЕВАСТОПОЛЯ, КРЫМ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)

Бурдиян Н.В.

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: burdiyan@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0553

Аннотация. В данной работе показано распределение тионовых (ТБ), денитрифицирующих (ДНБ) и сульфатредуцирующих (СРБ) групп бактерий, обитающих в донных осадках прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море), в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины. Отбор проб и последующая обработка материала осуществлены на основе стандартных методов гидробиологии и общей микробиологии. Исследуемые группы бактерий выделены из донных осадков с различными показателями окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) Eh: от + 356 до -189 (мВ) и с глубин от 1 до 20 м. Между величиной ОВП и численностью анализируемых бактерий выявлена отрицательная корреляционная зависимость. Коэффициент корреляции для СРБ составил $r = -0,5$, для ТБ и ДНБ, соответственно, $r = -0,47$ и $-0,51$ ($P < 0,05$). Достоверная зависимость между значениями pH среды и численностью наблюдаемых микроорганизмов отсутствует. Высокая численность тионовых и сульфатредуцирующих бактерий выявлена при обозначенном диапазоне глубин: от 1 до 20 м. Наибольшее количество денитрифицирующих бактерий чаще наблюдалось на глубинах от 1 до 10 м. Определено, что восстановительные условия среды, характеризующие большинство донных осадков рассматриваемой акватории, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, а их численность возрастает с уменьшением глубины.

Ключевые слова: донные осадки, тионовые, сульфатредуцирующие, денитрифицирующие бактерии, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Донные осадки представляют собой динамическую систему со сложными физико-химическими условиями, от которых зависит бактериальное население. Негативное антропогенное воздействие на морскую экосистему приводит к тому, что в донных отложениях начинают преобладать восстановительные условия среды, крайне неблагоприятные для жизнедеятельности аэробной микробиоты. Как следствие, процесс самоочищения акватории начинает протекать за счёт деятельности анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, в том числе сульфатредуцирующих, тионовых и денитрифицирующих групп бактерий, которые также принимают участие и в процессах преобразования углеводородов нефти в морской среде [1-5]. Большое влияние на развитие микробиологических процессов оказывают окислительно-восстановительные условия, характеристикой которых служат окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и активная реакция среды (pH).

Целью работы было исследовать распределение анаэробных бактерий в донных осадках в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины, используя количественные показатели тионовых, сульфатредуцирующих и денитрифицирующих групп бактерий, полученных в пробах донных осадков бухт Севастополя и прилегающей акватории.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Донные осадки отбирали в бухтах и районе внешнего рейда акватории Севастополя, в каждой пробе определяли количественный состав тионовых (ТБ), сульфатредуцирующих (СРБ) и денитрифицирующих (ДНБ) групп бактерий. Окислительно-восстановительный потенциал измеряли ионометром И-102. Количество микроорганизмов в пробе определяли методом предельных разведений [6] с последующим посевом 1 мл из каждого разведения в соответствующие питательные среды. При приготовлении сред учитывали солёность морской воды. Численность сульфатредукторов определяли на среде Постгейта [7]. В качестве восстановителя в среду добавляли 3 % раствор сернистого натрия. Количество тионовых бактерий учитывали на среде Сорокина [8]. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди (в трёх повторностях), основанной на методе вариационной статистики [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство донных отложений в прибрежной зоне Севастополя обладают восстановительными условиями среды и пониженным, по сравнению с чистыми морскими осадками, pH среды. В то же время пески, ракушняки

с примесью песка имеют положительный Eh и повышенный pH среды [9]. Исследуемые группы бактерий выделены из донных осадков с различными показателями окислительно-восстановительного потенциала [9], Eh: от +356 до -189 (мВ). На примере Севастопольской бухты проанализировано распределение микроорганизмов в зависимости от показателей ОВП и pH в донных осадках. Между величиной ОВП и численностью анализируемых бактерий выявлена отрицательная корреляционная зависимость. Коэффициент корреляции для СРБ составил $r = -0,5$, для ТБ и ДНБ, соответственно, $r = -0,47$ и $-0,51$ ($n = 10$, $P < 0,05$). Достоверная зависимость между значениями pH среды и численностью наблюдаемых микроорганизмов отсутствует.

Для определения взаимосвязи между анализируемыми бактериями и вышеуказанными параметрами среды (ОВП и pH) мы использовали показатель гН2, рассчитанный в [9] для донных осадков акватории Севастополя. Объединенные формулой Кларка показатели pH и Eh трансформируются в один показатель $гН2 = Eh / 30 + 2$ pH (отрицательный логарифм количества газообразного водорода), колеблющийся от 11-16 в донных осадках с восстановительными условиями среды и до 19-28 с окислительными [9].

Отношение численности бактерий к показателю гН2 иллюстрирует рисунок 1 (а, б, в).

Рассматриваемые микробные группы развиваются при широком диапазоне (от 11 до 28) показателя гН2 (рис. 1). Корреляционный анализ показал слабую взаимосвязь исходного параметра с численностью сульфатредуцирующих, отсутствие достоверной зависимости – с тионовыми и денитрифицирующими

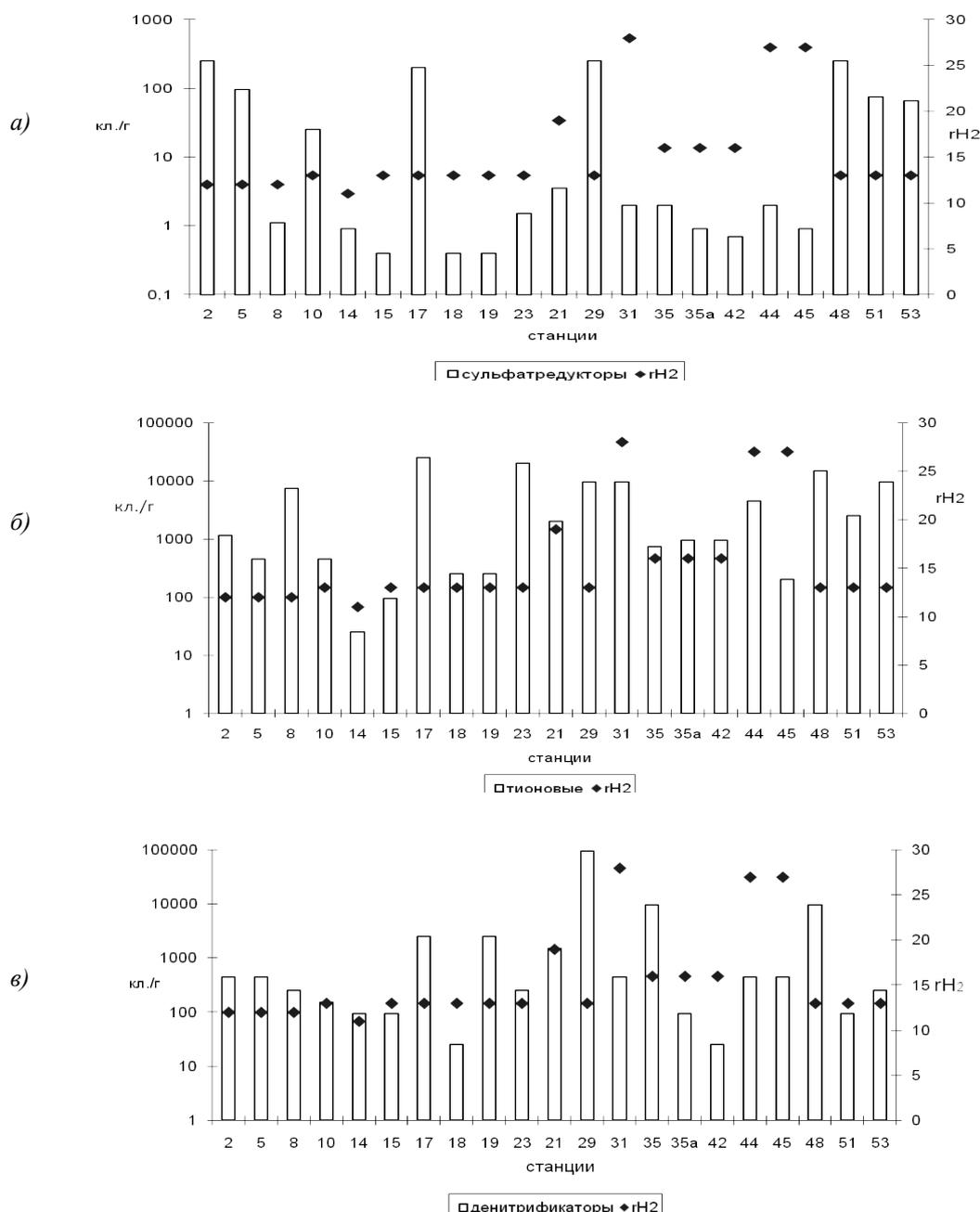


Рисунок 1. Отношение численности бактерий к параметру гН2 на исследуемых станциях (а – сульфатредуцирующие; б – тионовые; в – денитрифицирующие)

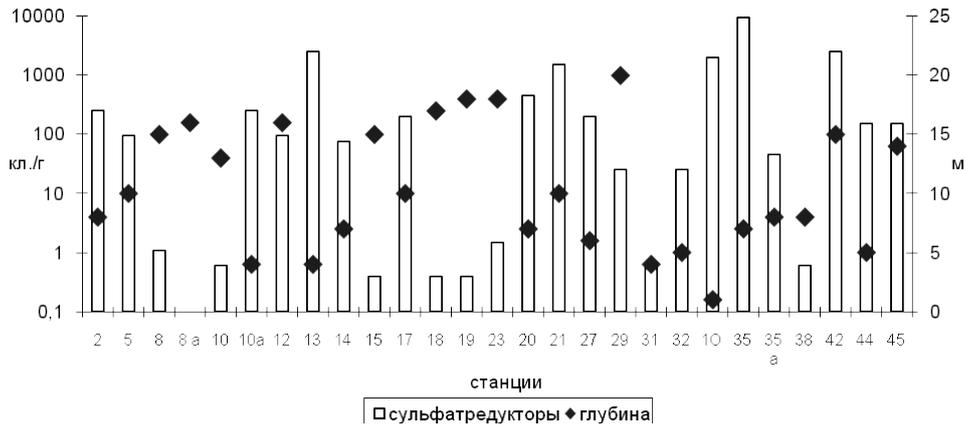


Рисунок 2. Отношение численности сульфатредуцирующих бактерий к глубине на станциях отбора

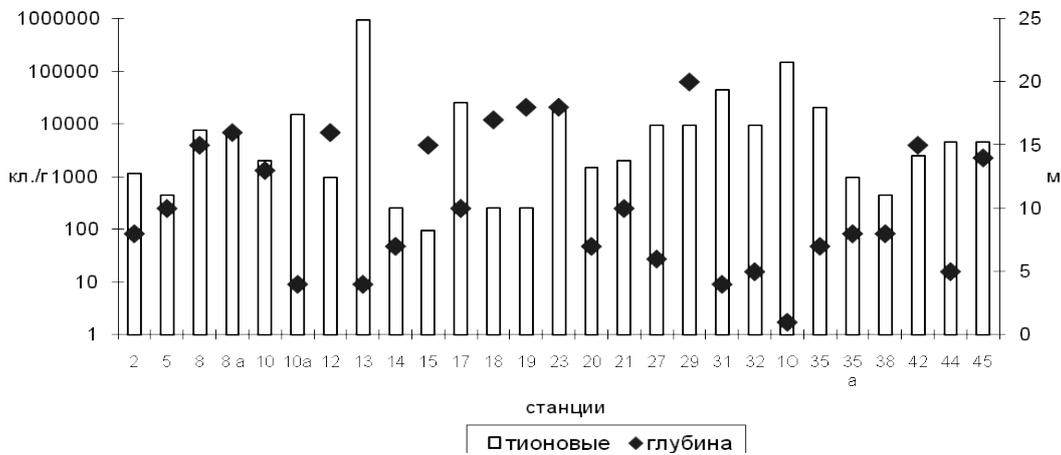


Рисунок 3. Отношение численности тионовых бактерий к глубине на станциях отбора

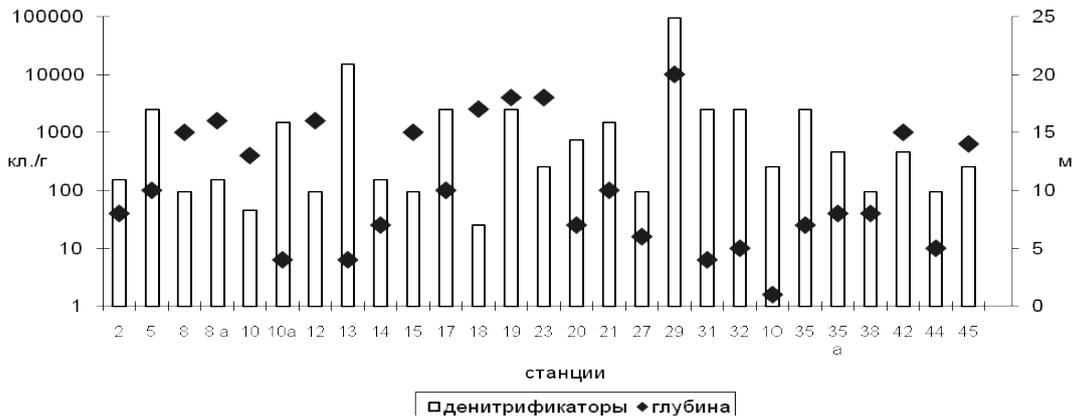


Рисунок 4. Отношение численности денитрифицирующих бактерий к глубине на станциях отбора

микроорганизмами (соответственно, $r = -0,34; -0,1; -0,11; n = 21, P < 0,05$). В то же время в большинстве проб численность анаэробов выше при низких значениях $гН_2$.

Пробы донных осадков отбирали на исследуемых станциях с глубин от 1 до 20 м.

Высокая численность тионовых и сульфатредуцирующих бактерий выявлена при обозначенном диапазоне глубин: от 1 до 20 м (рис. 2, 3).

Наибольшее количество ДНБ чаще наблюдалось на глубинах от 1 до 10 м (рис. 4). На примере Севастопольской бухты проанализировано распределение микроорганизмов в зависимости от глубины на станциях отбора. Между исследуемыми параметрами выявлена обратная взаимосвязь. Коэффициент корреляции для сульфатредуцирующих бактерий составил: $r = -0,57$; тионовых: $r = -0,48$; денитрифицирующих: $r = -0,51$ ($n = 14, P < 0,05$). Иными словами, численность анализируемых групп бактерий возрастает с уменьшением глубины. Отсутствие денитрифицирующих бактерий на больших глубинах и повышенное

содержание тионовых микроорганизмов в прибрежных грунтах в пределах кислородной зоны, по сравнению с глубоководными грунтами в Чёрном море, отмечено в работах Ю. И. Сорокина [8,10]. А. А. Лебедь [11], исследуя западный шельф Чёрного моря, также обнаружила отсутствие как ДНБ, так и СРБ на глубоководных, удалённых от берега станциях. Вышеназванные авторы пришли к выводу, что данные группы бактерий приурочены к донным осадкам прибрежных и припортовых станций, которые больше всего подвержены антропогенному воздействию. Как показано О. Г. Мироновым с соавторами [12], содержание органических загрязнителей антропогенного происхождения и нефтяных углеводородов в донных осадках большинства мелководных станций в прибрежной акватории Севастополя превышает таковые на глубоководных станциях указанной акватории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследований свидетельствовали о том, что восстановительные условия среды, характеризующие большинство донных осадков рассматриваемой акватории, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, а их численность возрастала с уменьшением глубины.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ: №121031500515-8 «Молисмологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем».

Список литературы / References:

1. Belyakova E.V., Rozanova E.P., Borzenkov I.A. et al. The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field. *Microbiology*, 2006, vol. 75, no. 2, pp. 161-171.
2. Shelton T.B., Hunter I.V. Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. *J. Wat. Pollut. Contr. Feder*, 1975, vol. 47, no. 9, pp. 2256-2270.
3. Spormann A.M., Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 2000, vol. 11, no. 2-3, pp. 85-105.
4. Schocher R.J., Seyfried B., Vazquez I. F. et al. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 1991, vol. 157, no. 1, pp. 7-12.
5. Бурдиян Н.В. Способность бактерий тионовой группы использовать углеводороды нефти как единственный источник углерода и энергии. *Экология моря*, 2009, вып. 79, с. 67-69. [Burdian N.V. Ability of thionic bacteria to use petroleum hydrocarbons as the sole source of carbon and energy. *Ecologiya moray*, 2009, vol. 79, pp. 67-69. (In Russ.)]
6. *Практикум по микробиологии*. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005, 608 с. [*Workshop on Microbiology*. Ed. by A.I. Netrusov. M.: Publishing center "Academy", 2005, 608 p. (In Russ.)]
7. Романенко В.И., Кузнецов С.И. *Экология микроорганизмов пресных водоемов*. Л.: Наука, 1974, 194 с. [Romanenko V.I., Kuznetsov S.I. *Ecology of Freshwater Microorganisms*. Leningrad: Nauka, 1974, 194 p. (In Russ.)]
8. Сорокин Ю.И. Микрофлора грунтов Чёрного моря. *Микробиология*, 1962, вып. 5, № 31, с. 899-903. [Sorokin Yu.I. Soil Microflora of the Black Sea. *Mikrobiologiya*, 1962, vol. 5, no. 31, pp. 899-903. (In Russ.)]
9. Кирюхина Л.Н., Миронов О.Г. Химическая и микробиологическая характеристика донных осадков Севастопольских бухт в 2003 г. *Экология моря*, 2004, вып. 66, с. 53-58. [Kirjukhina L.N., Mironov O.G. Chemical and microbiological characteristics of bottom sediments of the Sevastopol bays in 2003. *Ecologiya moray*, 2004, vol. 66, pp. 53-58. (In Russ.)]
10. Сорокин Ю.И. *Чёрное море*. М.: Наука, 1982, 216 с. [Sorokin Yu.I. *Black Sea*. Moscow: Nauka, 1982, 216 p. (In Russ.)]
11. Лебедь А.А. Микробиологическая характеристика донных осадков западного шельфа Чёрного моря. *Экология моря*, 1987, вып. 26, с. 48-51. [Lebed A.A. Microbiological Characteristics of the Bottom Sediments of the Black Sea Western Shelf. *Ecologiya moray*, 1987, vol. 26, pp. 48-51 (In Russ.)]
12. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алёмов С.В. *Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003, 185 с. [Mironov O.G., Kirjukhina L.N., Alyomov S.V. *Sanitary-biological aspects of the Sevastopol bays ecology in XX century*. NAS of the Ukraine, the Institute of Biology of Southern Seas. - Sevastopol, 2003, 185 p. (In Russ.)]

DISTRIBUTION OF ANAEROBIC BACTERIA IN BOTTOM SEDIMENTS DEPENDING ON REDOX CONDITIONS AND DEPTH (BY THE EXAMPLE OF THE COASTAL WATER AREA OF SEVASTOPOL, CRIMEA, BLACK SEA)

Burdiyan N.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: burdiyan@mail.ru
Received 26.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0553

Abstract. The present work covers a distribution of thionic (TB), denitrifying (DNB) and sulfate reducing (SRB) groups of bacteria inhabiting the bottom sediments of the coastal water area of Sevastopol (Black Sea), depending on the redox conditions and depth. Sampling and subsequent treatment of the material were conducted using standard methods of hydrobiology and general microbiology. The studied groups of bacteria are isolated from bottom sediments with different indicators of redox potential (ORP) Eh: from + 356 to -189 (mV). A negative correlation was found between the ORP value and the number of bacteria analyzed. The correlation coefficient for SRB was $r = -0.5$, for TB and DNB, respectively, $r = -0.47$ and -0.51 ($P < 0.05$). There is no reliable relationship between the pH values of the medium and the number of microorganisms observed. A high number of thionic and sulfate reducing bacteria was detected at the designated depth range: from 1 to 20 m. The greatest number of denitrifying bacteria was more often observed at depths from 1 to 10 m. It is determined that the restorative environmental conditions characterizing the majority of bottom sediments in the water area under consideration contribute to the development of the analyzed groups of bacteria, and their number increases with decreasing depth.

Key words: *bottom sediments, thionic, sulphate-reducing, denitrifying bacteria, Black Sea.*

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 7, № 3, 2022

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 7, No. 3, 2022

Рубрики в соответствии с номенклатурой научных специальностей:

Биологические науки (1.5)
1.5.2. Биофизика
1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

Адрес редакции:

ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация
Тел. +7(8692) 43-51-10, e-mail: journal@sevbprc.ru

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе
ИП Крыховецкий-Кошечев Александр Андреевич
ОГРНИП 318920400019241
COLOR CITY Цифровая типография
ул. Борисова, 4, г. Севастополь, 299059, Российская Федерация

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018, выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Публикуемые материалы прошли процедуру рецензирования и экспертного отбора. Авторы несут ответственность за добросовестность фактов, цитат, имен собственных, географических названий и другой информации. Редакция не несет ответственности за нарушение авторами исключительных прав на результаты интеллектуальной деятельности третьих лиц. Мнение редакции может не совпадать с мнением автора. При перепечатке материалов ссылка на журнал «Актуальные вопросы биологической физики и химии» обязательна.

Учредитель:

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

Издатель:

ООО «Издательский центр РИОР»
ул. Полярная, д. 31в, стр. 1, Москва, 127214
(по договору № 66-22/ЭЗК-223 от 15.06.2022)

Главный редактор: Евстигнеев М.П.

Компьютерная верстка: Д.П. Воронин, В.А. Кальпа, Л.А. Глухов