

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 7, № 1
2022**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 7, № 1
2022**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 7, No. 1, 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, № 1, 2022

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- С.Р. Набиев, Л.В. Никитина, А.М. Матюшенко, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова**
Исследование влияния актин-связывающих белков на изгибную жесткость актиновой нити с помощью метода оптической ловушки9
- С.Р. Набиев, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин**
Влияние сердечного миозин-связывающего белка с на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия в миокарде 13
- И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, И.П. Генерозова, П.А. Буцанец, С.В. Васильева, М.М. Расулов**
Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами предотвращает дисфункцию митохондрий в условиях стресса..... 17
- Т.А. Яхно, С.А. Богданов, А.Г. Санин, В.Г. Яхно**
Электронная микроскопия дисперсной фазы дистиллированной воды.....25
- А.Э. Гасанова, Н.А. Мусаев, С.Я. Оджаввердиева**
Биоэлектрические эффекты отмывания клеток *Chara fragilis* от растворов фитокомпозиции одуванчик-зверобой-календулы 31
- В.В. Рощина, Н.К. Призова, Л.М. Хайбулаева**
Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр36
- П.О. Вардеванян, М.А. Шагинян, М.С. Микаелян, С.В. Григорян**
Исследование влияния ММ ЭМВ на комплексообразование НОЕСНСТ 33258 с биомакромолекулами..... 40
- П.Ф. Котюк, В.О. Корниенко**
Влияние сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (СГТ) на онтогенез и морфометрию кукурузы сахарной45

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- А.В. Кузнецов, В.М. Курченко, Д.П. Воронин, О.С. Завьялова**
Особенности связывания салициловой кислоты и аспирина с кислото-чувствительными ионными каналами *Trichoplax adhaerens* 50
- В.В. Костюков, С.В. Леонтьева, Е.С. Савенко, Е.В. Савченко, К.А. Рыбакова, Д.П. Воронин**
Coumarin 337 in aqueous solution: interplay between excitation and hydration 61

Л.И. Исмаилова, Р.М. Аббаслы, Н.А. Ахмедов Трехмерная структура пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro	70
Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов Трехмерная структура молекулы бета-лакторфина.....	76
Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Р.М. Аббаслы, Л.И. Исмаилова Пространственная структура молекулы альфа-лакторфина.....	81
Н.А. Захаров, Е.М. Коваль, Л.В. Гоева, Е.В. Шелехов, А.Д. Алиев, М.Р. Киселев, В.В. Матвеев, Т.В. Захарова Влияние альбумина яичного белка на биоминерализацию карбоната кальция в водных растворах.....	87
С.А. Муслов, Н.В. Зайцева, А.А. Корнеев, А.А. Синицын Измерение и расчет характеристик упругости стенки общего желчного протока человека	92
Л.А. Краснобаева, Л.В. Якушевич Особенности структуры потенциального поля плазмиды pRF1 и их влияние на характер движения нелинейных конформационных возмущений – кинков	99
МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ	
С.А. Муслов, П.Ю. Сухочев Упругие свойства кристаллов биосовместимых сплавов на основе TiNi с памятью формы.....	105
Н.Е. Беликов, О.В. Демина, И.И. Левина, А.Ю. Лукин, А.Я. Сафинова, Л.Е. Петровская, С.Д. Варфоломеев, А.А. Ходонов Фотохромные лиганды для модификации катионов металлов и квантовых точек.....	113
А.Л. Ткаченко Аспекты применения информационных приложений в биофизической медицине.....	123
Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина, А.О. Симонян Нейролептики подавляют Ca ²⁺ -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах	127
М.Г. Холявка, И.Ю. Ковалева, М.С. Бруева, Д.Ю. Богомолов, С.М. Панкова, В.А. Королева, В.Г. Аргюхов <i>In silico</i> анализ особенностей пространственной организации молекул целлюлаз из различных продуцентов.....	137
Е.Е. Текуцкая, Л.Р. Гусарук, И.И. Павлюченко Степень окислительного повреждения ДНК и полиморфизм rs652438 гена MMR-12 при мультифакториальных заболеваниях в условиях оксидативного стресса.....	147
Л.В. Жорина, И.Д. Матвеев, В.Н. Аникеев Действие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм на биообъекты <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	152

**М.А. Большаков, А.В. Самойлова, А.А. Гостюхина, О.С. Дорошенко,
О.П. Кутенков, К.В. Зайцев, В.В. Ростов**

Наносекундные микроволновые импульсы влияют на скорость пролиферации
стволовых клеток156

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

Л.Н. Шишкина, А.С. Дубовик, М.В. Козлов, А.Ю. Повх, В.О. Швыдкий

Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на
биологические объекты160

Э.А. Иванова

Эко-генетическая стресс-устойчивость растений, как стратегия и тактика: *супер-*
молекулярно-протеомного, морфо-динамического дизайна физико-химической
природы биологии развития166

CONTENTS

Volume 7, No. 1, 2022

GENERAL BIOPHYSICS

- S.R. Nabiev, L.V. Nikitina, A.M. Matyushenko, D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova**
Study of the effect of actin-binding proteins on the bending stiffness of actin filament using the optical trap method9
- S.R. Nabiev, G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin**
Effects of cardiac myosin-binding protein c on the characteristics of a single actin-myosin interaction in the myocardium 13
- I.V. Zhigacheva, N.I. Krikunova, I.P. Generozova, P.A. Butsanets, S.V. Vasilyeva, M.M. Rasulov**
Etranitrosyl iron complex with thiosulfate ligands prevents mitochondrial dysfunction under stress 17
- T.A. Yakhno, S.A. Bogdanov, A.G. Sanin, V.G. Yakhno**
Electron microscopy of the dispersed phase of distilled water25
- A.E. Hasanova, N.A. Musaev, S.Y. Ojagverdiyeva**
Bioelectric effects of washing of the *Chara fragilis* cells from solutions of phytocomposition of dandelion- hypericum-calendula 31
- V.V. Roshchina, N.K. Prizova, L.M. Khaibulaeva**
Azulenes of leaf surface as a protective optical filter36
- P.O. Vardevanyan, M.A. Shahinyan, M.S. Mikaelyan, S.V. Grigoryan**
Study of the effect of MM EMW on complex-formation of HOECHST 33258 with biomacromolecules 40
- P.F. Kotyuk, V.O. Kornienko**
influence of the combined action of an AC magnetic field with Fe₃O₄ nanoparticles (CIT) on ontogenesis and morphometry of sugar corn45

MODELLING IN BIOPHYSICS

- A.V. Kuznetsov, V.M. Kurchenko, D.P. Voronin, O.S. Zavyalova**
Peculiarities of salicylic acid and aspirin binding to acid-sensitive ion channels of *Trichoplax adhaerens*..... 50
- V.V. Kostjukov, S.V. Leontieva, E.S. Savenko, E.V. Savchenko, K.A. Rybakova, D.P. Voronin**
Coumarin 337 in aqueous solution: interplay between excitation and hydration 61

L.I. Ismailova, R.M. Abbasli, N.A. Akhmedov Threedimensional structure of the pentapeptide molecule Arg-Glu-Arg-Gly-Pro.....	70
L.N. Agayeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, N.A. Akhmedov Three-dimensional structure of the beta-lactorfin molecule	76
N.A. Akhmedov, L.N. Agayeva, R.M. Abbasli, L.I. Ismailova Spatial structure of alfa-laktorfine molecule	81
N.A. Zakharov, E.M. Koval, L.V. Goeva, E.V. Shelichov, A.D. Aliev, M.R. Kiselev, V.V. Matveev, T.V. Zakharova The effect of egg albumin on calcium carbonate biomineralization in water solution	87
S.A. Muslov, N.V. Zaitseva, A.A. Korneev, A.A. Sinitsyn Measurement and calculation of elastic characteristics of the wall of the human common bile duct	92
L.A. Krasnobaeva, L.V. Yakushevich Features of the potential field structure of the pPF1 plasmid and their influence on the character of motion of nonlinear conformational perturbations – kinks.....	99
 MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY	
S.A. Muslov, P.Yu. Sukhochev Elastic properties of crystals of biocompatible TiNi-based alloys with shape memory	105
N.E. Belikov, O.V. Demina, I.I. Levina, A.Yu. Lukin, A.Ya. Safinova, L.E. Petrovskaya, S.D. Varfolomeev, A.A. Khodonov Photochromic ligands for modification of metal cations and quantum dots	113
A.L. Tkachenko Aspects of the application of information applications in biophysical medicine	123
L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina, A.O. Simonyan Neuroleptics attenuate Ca ²⁺ responses induced by glutoxim and molixan in macrophages	127
M.G. Holyavka, I.Yu. Kovaleva, M.S. Brueva, D.Yu. Bogomolov, S.M. Pankova, V.A. Koroleva, V.G. Artyukhov <i>In silico</i> analysis of the features of the spatial organization of cellulase molecules from different producers	137
E.E. Tekutskaya, L.R. Gusaruk, I.I. Pavlyuchenko The degree of oxidative damage to DNA and MMP-12 gene rs652438 polymorphism in multifactorial diseases under oxidative stress	147
L.V. Zhorina, I.D. Matveev, V.N. Anikeev The effect of EHF radiation with a wavelength of 5.6 mm on biological objects <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	152
M.A. Bolshakov, A.V. Samoylova, A.A. Gostyukhina, O.S. Doroshenko, O.P. Kutenkov, K.V. Zaitsev, V.V. Rostov Nanosecond microwave pulses affect stem cell proliferation rate	156

ECOLOGICAL BIOPHYSICS**L.N. Shishkina, A.S. Dubovik, M.V. Kozlov, A.Yu. Povkh, V.O. Shvydkiy**

Model systems for the estimation of influence of the water medium components on the biological objects.....160

E.A. Ivanova

Eco-genetic stress-resistance of plants as strategy and tactics: supermolecular-proteomic, morpho-dynamic design of physico-chemical nature of developmental biology.....166

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ИЗГИБНУЮ ЖЕСТКОСТЬ АКТИНОВОЙ НИТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

Набиев С.Р.¹, Никитина Л.В.¹, Матюшенко А.М.², Щепкин Д.В.¹, Копылова Г.В.¹

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

ул. Первомайская, 91, г. Екатеринбург, 620041, РФ; e-mail: salavatik2003@gmail.com

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Ленинский просп., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ

Поступила в редакцию 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0475

Аннотация. Для обеспечения сократительной функции мышц важна стабильность тонкой нити, в поддержании которой принимают участие актин-связывающие белки тропомиозин и тропомодулин (Tmod). Известно, что наличие регуляторного белка тропомиозина на актиновой нити увеличивает её жёсткость. Тропомодулин представляет собой актин-кэпирующий белок, который связывается с минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку, регулирует её длину и определяет её стабильность. В сократительном аппарате поперечно-полосатых мышц экспрессируется две изоформы тропомодулина – Tmod1 и Tmod4. Изоформа Tmod1 экспрессируется в миокарде, и обе изоформы экспрессируются в быстрых скелетных мышцах. Используя метод оптической ловушки, проанализировано влияние актин-связывающих белков, тропомиозина и тропомодулина (изоформ Tmod1 и Tmod4), на изгибную жёсткость актиновой нити. Обнаружено, что присутствие регуляторных белков тропомиозин и тропонина на актиновой нити увеличивает её изгибную жёсткость. Изоформы тропомодулина по-разному влияли на неё. Изоформа Tmod4 уменьшала изгибную жёсткость тонкой нити, реконструированной из актина, тропонина и тропомиозина, а изоформа Tmod1 не влияла на неё. Полученные результаты говорят об изоформ специфическом взаимодействии тропомодулина с актином и тропомиозином.

Ключевые слова: актин, тропомиозин, тропомодулин, изгибная жесткость, оптическая ловушка.

ВВЕДЕНИЕ

В сократительном аппарате саркомера кардиомиоцита актин связан с актин-связывающими белками, к которым относятся тропомиозин и тропомодулин, определяющие стабильность тонкой нити, что является важным условием для осуществления сократительной функции саркомера. Тропомиозин вместе с тропонином принимает участие в кальциевой регуляции сокращения миокарда. Молекула тропомиозина представляет собой двойную супер-спираль. Соседние молекулы тропомиозина взаимодействуют N- и C-концами, образуя непрерывный тяж на поверхности актиновой нити.

Тропомодулин (Tmod) является кэпирующим белком, который связывается с медленно растущим минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку и присоединение новых глобул актина [1], тем самым регулируя её длину [2], а также определяя стабильность актиновой нити [3,4]. В сократительном аппарате поперечно-полосатых мышц экспрессируется две изоформы тропомодулина Tmod1 и Tmod4. N-концевая часть Tmod1 содержит два тропомиозин-связывающих сайта и один тропомиозин-зависимый сайт кэпирования актина [5,6]. Благодаря наличию двух сайтов связывания молекула Tmod1 связывает две молекулы тропомиозина на минус конце актиновой нити [7].

Для поддержания нормальной длины тонкой нити саркомера необходимо взаимодействие Tmod и другого белка семейства тропомодулинов, лейомодина, с минус-концом тонкой нити. Важную роль в этом взаимодействии играет N-терминальная часть молекулы тропомиозина [8]. Взаимодействие Tmod с тропомиозином предотвращает деполимеризацию тонкого филамента. Тропомиозин в 1000 раз усиливает связывание Tmod1 с минус концом актиновой нити [6].

Тропомодулин является одним из белков, который одновременно взаимодействует с актиновой нитью и тропомиозином, и для нормального функционирования саркомера важна координация взаимодействия этих трех белков. В работе с помощью метода оптической ловушки исследовано влияние сердечной изоформы тропомиозина, альфа-тропомиозина, и двух изоформ тропомодулина – Tmod1 и Tmod4, на изгибную жёсткость актиновой нити.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Скелетно-мышечный актин и сердечный тропонин выделены из *m. psoas* кролика и миокарда левого желудочка быка, соответственно, с помощью стандартных методов [9,10]. Tmod1, Tmod4 и сердечный альфа-Трп человека экспрессированы в *E. coli* [11]. Для визуализации во время эксперимента в оптической ловушке актиновая нить метится TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich Inc.).

Измерение изгибной жёсткости актиновой и реконструированной тонкой нити с помощью метода оптической ловушки. Метод оптической ловушки позволяет провести прямое измерение изгибной жёсткости

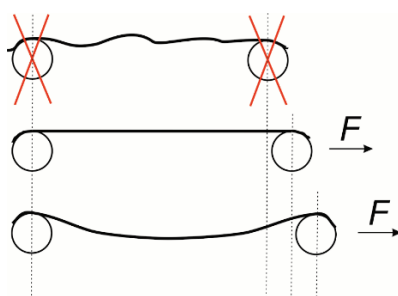


Рисунок 1. Растяжение «гантели» с помощью оптической ловушки. Процедура растяжения начинается из состояния провисшей нити. Увеличение растягивающей силы приводит к одновременному вращению полистироловых шариков в ловушках и изгибу исследуемой нити

актиновой нити, ассоциированной с актин-связывающими белками. Описание экспериментальной установки и подробная методика измерения изгибной жесткости тонких нитей с помощью метода оптической ловушки описаны в нашей предыдущей работе [12]. Экспериментальная установка двухлучевой оптической ловушки построена на базе инвертирующего флуоресцентного микроскопа (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). Суть метода заключается в следующем. Для вычисления изгибной жёсткости актиновой и реконструированной тонкой нити экспериментально регистрируется кривая «удлинение-сила». Для этой цели, два полистироловых шарика диаметром 0,9 мкм захватываются и удерживаются в двух независимых лучах инфракрасного лазера (Ventus, Laser Quantum, США), сфокусированных высокоапертурным объективом (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). К этим шарикам с помощью NEM-модифицированного миозина, который необратимо связывается с актином, приклеивается фрагмент актиновой или реконструированной тонкой нити длиной 5-7 мкм. Формируется так называемая «гантель». Смещением одного из ИК лучей вдоль оси нити с шагом 50 нм гантель растягивается из состояния провисшей нити (рис. 1). После каждого шага растяжения записывается броуновский шум колебаний шарика в неподвижном луче, который с учетом жёсткости оптической ловушки, является мерой силы, растягивающей гантель.

Изменения расстояния между шариками вычисляется по микрофотографии шариков, записанных с видекамеры высокого разрешения (CoolSnap HQ2, Photometrics, Великобритания) в режиме светлого поля, с помощью специально написанной для этих целей программы анализа изображения. Полученная экспериментальная кривая «удлинение-сила» (рис. 2) аппроксимируется численным решением механической задачи изгиба тонкого упругого стержня, из которого получаем значение изгибной жёсткости исследуемого объекта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе с помощью метода оптической ловушки измерена изгибная жёсткость актиновой нити (F-актин), а также тонкой нити, реконструированной из актина, тропонина и тропомиозина, без тропомодулина и в присутствии двух его изоформ – Tmod1 и Tmod4. Полученные значения изгибной жёсткости приведены в таблице 1 и представлены на рисунке 3. Обнаружено, что наличие регуляторных белков тропонина и тропомиозина на актиновой нити увеличивает изгибную жёсткость F-актина, что согласуется с ранее полученными данными [12]. Изоформы тропомодулина по-разному влияют на изгибную жёсткость тонкой нити. Tmod4 уменьшает изгибную жёсткость, а Tmod1 не влияет на неё. Этот результат говорит о том, что взаимодействие разных изоформ тропомодулина с тропомиозином отличается. Ранее было показано, что изоформы Tmod1 и Tmod3 с разной аффинностью связывают изоформы немышечных тропомиозинов и альфа-тропомиозин [13]. Аминокислотная последовательность N-терминальной части изоформ Tmod1 и Tmod4 имеет значительные отличия [14], что определяет особенности взаимодействия тропомодулина с тропомиозином.

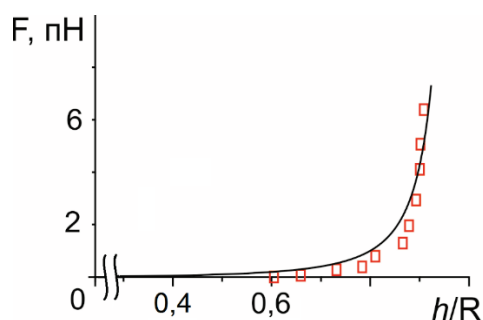


Рисунок 2. Экспериментальная зависимость «удлинение-сила» и её аппроксимация численным решением механической задачи изгиба тонкого упругого стержня. По оси абсцисс отложено безразмерное удлинение, которое определяется отношением изменения полурасстояния между центрами шариков (h) к радиусу шарика (R)

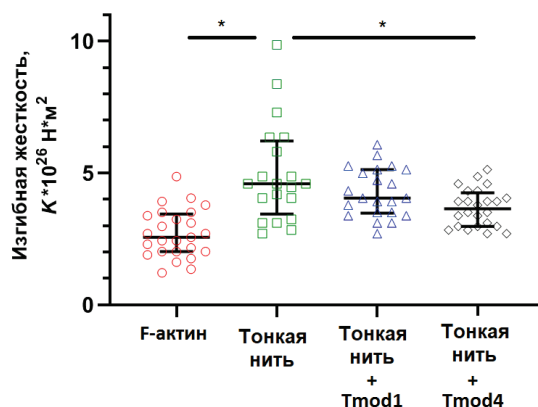


Рисунок 3. Изгибная жёсткость актиновой и тонкой нити, реконструированной из F-актина, тропонина и тропомиозина, в присутствии разных изоформ тропо модулина Tmod1 и Tmod4. Значения жёсткости показаны, как медиана и межквартильный диапазон. Символом * обозначены статистически значимые отличия жёсткости. Оценка значимости отличий проведена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Уровни значимости отличий приведены в таблице 1

Таблица 1. Изгибная жёсткость актиновой и реконструированной тонкой нити в присутствии изоформ тропо модулина

Исследуемый объект	Изгибная жёсткость, $K \times 10^{26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$, медиана (межквартильный диапазон) (N – число экспериментов)
F-актин	2,57 (1,42) (N = 25)
Тонкая нить	4,59 (2,77) # p <0,0001 (N = 20)
Тонкая нить + Tmod1	4,05 (1,65) (N = 22)
Тонкая нить + Tmod4	3,65 (1,28) * p <0,0001 (N = 24)

Символами # и * обозначено статистически значимое отличие жёсткости тонкой нити от жёсткости F-актина и жёсткость тонкой нити в присутствии Tmod от жёсткости тонкой нити без Tmod, соответственно. Оценка значимости отличий проведена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Уровни значимости отличий приведены в таблице

Таким образом, изоформы тропо модулина специфически взаимодействуют с актином и тропомиозином тонкой нити, что может иметь значение для реализации сократительной функции разных типов поперечно-полосатых мышц.

Работа поддержана РФФ (грант №22-24-00729) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References:

- Weber A., Pennise C.R., Babcock G.G., Fowler V.M. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *The Journal of cell biology*, 1994, vol. 127, pp. 1627-1635, doi: 10.1083/jcb.127.6.1627.
- Littlefield R., Almenar-Queralt A., Fowler V.M. Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nature cell biology*, 2001, vol. 3, pp. 544-551, doi: 10.1038/35078517.
- Gokhin D.S., Fowler V.M. Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, e103069, doi: 10.1155/2011/103069.
- Yamashiro S., Gokhin D.S., Kimura S., Nowak R.B., Fowler V.M. Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton*, 2012, vol. 69, pp. 337-370, doi: 10.1002/cm.21031.
- Tsukada T., Kotlyanskaya L., Huynh R., Desai B., Novak S.M., Kajava A.V., Gregorio C.C., Kostyukova A.S. Identification of residues within tropomodulin-1 responsible for its localization at the pointed ends of the actin filaments in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no. 3, pp. 2194-2204, doi: 10.1074/jbc.M110.186924.
- Tolkatchev D., Smith G.E. Jr., Schultz L.E., Colpan M., Helms G.L., Cort J.R., Gregorio C.C., Kostyukova A.S. Leiomodulin creates a leaky cap at the pointed end of actin-thin filaments. *PLoS Biology*, 2020, vol. 18, no. 9, e3000848, doi: 10.1371/journal.pbio.3000848.
- Kostyukova A.S., Choy A., Rapp B.A. Tropomodulin binds two tropomyosins: a novel model for actin filament capping. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, pp. 12068-12075, doi: 10.1021/bi060899i.
- Colpan M., Moroz N.A., Kostyukova A.S. Tropomodulins and tropomyosins: working as a team. *Journal of muscle research and cell motility*, 2013, vol. 34, pp. 247-260, doi: 10.1007/s10974-013-9349-6.

9. Pardee J.D., Spudich J.A. Purification of muscle actin. *Methods Enzymology*, 1982, vol. 85, pp. 164–179, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
10. Potter J.D. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymology*, 1982, vol. 85, pp. 241–263, doi: 10.1016/0076-6879(82)85024-6.
11. Kopylova G.V., Berg V.Y., Kochurova A.M., Matyushenko A.M., Bershitsky S.Y., Shchepkin D.V. The effects of the tropomyosin cardiomyopathy mutations on the calcium regulation of actin-myosin interaction in the atrium and ventricle differ. *Biochemical and biophysical research communications*, 2022, vol. 588, pp. 29–33, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.051.
12. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Matyushenko A.M., Koubassova N.A., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K., Bershitsky S.Y. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament. *Biophysical Journal*, 2015, vol. 109, no. 2, pp. 373–379, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.006.
13. Yamashiro S., Gokhin D.S., Sui Z., Bergeron S.E., Rubenstein P.A., Fowler V.M. Differential actin-regulatory activities of Tropomodulin1 and Tropomodulin3 with diverse tropomyosin and actin isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 2014, vol. 289, pp. 11616–11629, doi: 10.1074/jbc.M114.555128.
14. Greenfield N.J., Kostyukova A.S., Hitchcock-DeGregori S.E. Structure and tropomyosin binding properties of the N-terminal capping domain of tropomodulin 1. *Biophysical Journal*, 2005, vol. 88, no. 1, pp. 372–383, doi: 10.1529/biophysj.104.051128.

STUDY OF THE EFFECT OF ACTIN-BINDING PROTEINS ON THE BENDING STIFFNESS OF ACTIN FILAMENT USING THE OPTICAL TRAP METHOD

Nabiev S.R.¹, Nikitina L.V.¹, Matyushenko A.M.², Shchepkin D.V.¹, Kopylova G.V.¹

¹Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS
Pervomayskaya str. 15, Yekaterinburg, 620041, Russia; e-mail: salavatik2003@gmail.com

²A.N. Bach Institute of Biochemistry of the RAS
Leninsky ave., 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia
Received 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0475

Abstract. To ensure the contractile function of muscles, the stability of a thin filament is important, which is maintained by the actin-binding proteins tropomyosin and tropomodulin (Tmod). It is known that the presence of the regulatory protein tropomyosin on the actin filament increases its stiffness. Tropomodulin is an actin-capping protein that binds to the minus end of the actin filament, prevents its disassembly, regulates its length, and determines its stability. Two isoforms of tropomodulin, Tmod1 and Tmod4, are expressed in the contractile apparatus of striated muscles. The Tmod1 isoform is expressed in the myocardium, and both isoforms are expressed in fast skeletal muscles. Using an optical trap method, the effect of actin-binding proteins, tropomyosin and tropomodulin (Tmod1 and Tmod4 isoforms), on the bending stiffness of the actin filament was analyzed. It was found that the presence of the regulatory proteins tropomyosin and troponin on the actin filament increases its flexural rigidity. Tropomodulin isoforms affected it differently. The Tmod4 isoform reduced the bending stiffness of a thin filament reconstructed from actin, troponin, and tropomyosin, while Tmod1 did not affect it. The results obtained indicate an isoform-specific interaction of tropomodulin with actin and tropomyosin.

Key words: actin, tropomyosin, tropomodulin, bending stiffness, optical trap.

ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ОДИНОЧНОГО АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИОКАРДЕ

Набиев С.Р., Копылова Г.В., Щепкин Д.В.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

ул. Первомайская, 91, г. Екатеринбург, 620041, РФ; e-mail: salavatik2003@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0476

Аннотация. Сокращение миокарда является результатом взаимодействия миозина, составляющего толстую нить, с актином, образующим основу тонкой нити, и регулируется кальцием через регуляторные белки тропонин и тропомиозин. Недавно было установлено, что в регуляции актин-миозинового взаимодействия, кроме регуляторных белков, принимает участие сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С). сМуВР-С является одним из интегральных белков саркомера кардиомиоцита, который имеет сайты связывания с основными белками саркомера, миозином, актином и тропомиозином. сМуВР-С контролирует количество миозиновых головок, взаимодействующих с тонкой нитью, и участвует в её активации. В работе исследовано влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия, размер шага миозина и продолжительность взаимодействия, используя метод оптической ловушки. Сердечный миозин экстрагировали из миокарда левого желудочка кролика, актин выделяли из быстрых скелетных мышц кролика, а сМуВР-С получали из миокарда левого желудочка курицы. сМуВР-С добавляли к сердечному миозину в физиологическом соотношении 1:5. В *in vitro* подвижной системе обнаружено, что добавление сМуВР-С замедляет скольжение актина по миозину на 30%. С помощью оптической ловушки показано, что сМуВР-С не влияет на величину рабочего шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актиновой нитью. Полученные результаты говорят о прямом влиянии сМуВР-С на одиночное актин-миозинное взаимодействие.

Ключевые слова: сердечный миозин-связывающий белок С, актин-миозинное взаимодействие, миокард, оптическая ловушка.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С) является одним из важнейших интегральных белков мышечного саркомера который, как недавно было установлено, участвует в регуляции взаимодействия миозина, составляющего толстую нить, с актином, образующим основу тонкой нити. сМуВР-С представляет собой белок массой 140-150 кДа, ассоциированный с толстыми филаментами. Молекула сМуВР-С представляет собой полипептидную цепь длиной 40 нм и состоит из 11 доменов (8 иммуноглобулиновых I-подобных и три фибронектиновых), обозначенных от С0 до С10 от N- до С-конца. С-конец (домены С7-С10) молекулы связывает стержневую часть молекулы миозина и титин [1,2], N-конец (домены С1-С2) взаимодействует с субфрагментом 2 миозина [3,4], кроме того, Pro-Ala область сМуВР-С между доменами С0 и С1 связывает актин [5,6].

сМуВР-С принимает участие в образовании актин-миозинового комплекса, контролируя количество миозиновых головок, взаимодействующих с тонкой нитью [7,8]. N-концевые домены сМуВР-С участвуют в активации тонкой нити, сдвигая тропомиозин из «блокированного» состояния в «закрытое», открывая тем самым миозин-связывающие сайты на актине [7,8], подобно тому, как это делает Ca²⁺-тропомиозинный комплекс.

В работе исследовано влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия, используя метод оптической ловушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Сердечный миозин (V) экстрагирован из миокарда левого желудочка кролика. Скелетно-мышечный актин выделен из *m. psoas* кролика и окрашен TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich Inc.). сМуВР-С получен из миокарда левого желудочка курицы согласно стандартной методике [3].

***In vitro* подвижная система.** С помощью *in vitro* подвижной системы оценено влияние сМуВР-С на скорость скольжения актиновых нитей по сердечному миозину в *in vitro* подвижной системе. Суть метода заключается в том, что в присутствии АТФ флуоресцентно-меченые актиновые нити двигаются по поверхности проточной ячейки, покрытой миозином. Движение нитей регистрируется с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Германия) с высокочувствительной iXon EMCCD (Andor, Ирландия) камерой и записывается на диск компьютера для измерения скорости нитей с помощью специализированной программы GMimPro [9]. Протокол эксперимента детально описан в нашей предыдущей работе [9].

Оптическая ловушка. Характеристики (размер шага миозина и продолжительность взаимодействия) одиночного взаимодействия молекул сократительных белков измеряли с помощью метода оптической ловушки.

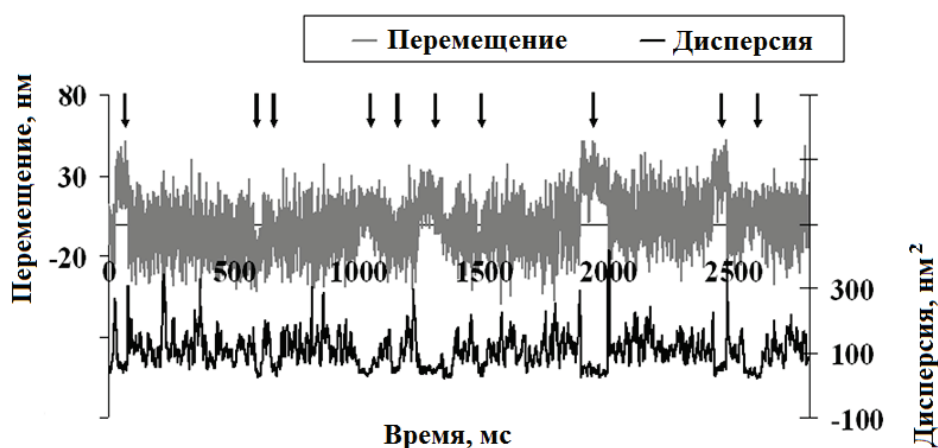


Рисунок 1. Пример экспериментальной записи измерения шага молекулы миозина при взаимодействии с актиновой нитью гантели. Серым показан сигнал смещений одного из шариков гантели, а черным – его дисперсия

Экспериментальная установка оптической ловушки и процедура проведения эксперимента подробно описаны в работе [10]. Экспериментальная установка двухлучевой оптической ловушки построена на базе инвертирующего флуоресцентного микроскопа (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). Коротко суть метода заключается в следующем. В проточной экспериментальной камере собирали гантелеподобный измерительный зонд [11], состоящий из двух полистироловых шариков диаметром 1,09 мкм (Sigma-Aldrich Co. LLC) и фрагментом флуоресцентно-меченой актиновой нити, приклеенной концами к этим шарикам с помощью NEM-модифицированного миозина, необратимо связывающего актин [12]. Шарики удерживаются в фокусах двух независимых лучей инфракрасного лазера (Ventus, Laser Quantum, США). В присутствии 10 мкм АТФ преднатянутая примерно на 2 пН «гантель» подводится к поверхности 2 мкм стеклянных шариков (Fluka), так называемых «пьедесталов», фиксированных на поверхности экспериментальной камеры и покрытой одиночными молекулами миозина.

Взаимодействия молекул миозина на поверхности пьедестала с актиновой нитью «гантели» наблюдали в виде одиночных событий (рис. 1). Каждое из таких событий сопровождается снижением уровня дисперсии колебаний шариков в оптических ловушках вследствие увеличения жёсткости гантели при присоединении молекулы миозина к актиновой нити. На рисунке 1 эти события показаны вертикальной стрелкой.

Размер шага миозиновой головки во время события и его продолжительность измеряли, как описано в работе [13]. Средний размер шага рассчитывался как отклонение шарика из ловушки, вызванное присоединением молекулы миозина к актиновой нити, усреднённое по всем событиям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализировано влияние сМуВР-С на скорость скольжения актиновых нитей в *in vitro* подвижной системе. Обнаружено, что добавление сМуВР-С к сердечному миозину в физиологическом соотношении 1:5 замедляет скольжение актина по миозину примерно на 30% с $0,7 \pm 0,1$ мкм/с до $0,5 \pm 0,1$ мкм/с. Эти эффект можно объяснить тем, что сМуВР-С, связывающий субфрагмент миозина 2 с актином, облегчает взаимодействие миозина с актином [3-6], но одновременно работает как тормоз. Этот результат хорошо согласуется с ранее полученными данными [14].

Измерена средняя величина рабочего шага молекулы сердечного миозина (V) при взаимодействии с актиновой нитью и его продолжительность в присутствии и отсутствии сМуВР-С. Распределения величины рабочего шага сердечного миозина без сМуВР-С и в его присутствии показаны на рисунке 2. Соотношение концентрации сМуВР-С, загружаемого в проточную экспериментальную камеру, по отношению к концентрации миозина составляло 1:5, что соответствует физиологически нормальному соотношению этих белков в мышце. Обнаружено, что сМуВР-С не влияет на величину шага миозина (табл. 1).

Распределение продолжительности взаимодействия одиночной молекулы сердечного миозина с актиновой нитью в присутствии и отсутствие сМуВР-С показано на рисунке 3. сМуВР-С увеличивает продолжительность одиночного актин-миозинового взаимодействия (табл. 1). Увеличение продолжительности актин-миозинового взаимодействия в присутствии сМуВР-С хорошо согласуется с уменьшением скорости скольжения актиновых нитей по поверхности, покрытой миозиновыми молекулами в *in vitro* подвижной системе. Скорость скольжения нитей по поверхности миозина в *in vitro* подвижной системе прямо пропорциональна величине шага миозина и обратно пропорциональна продолжительности взаимодействия [15,16].

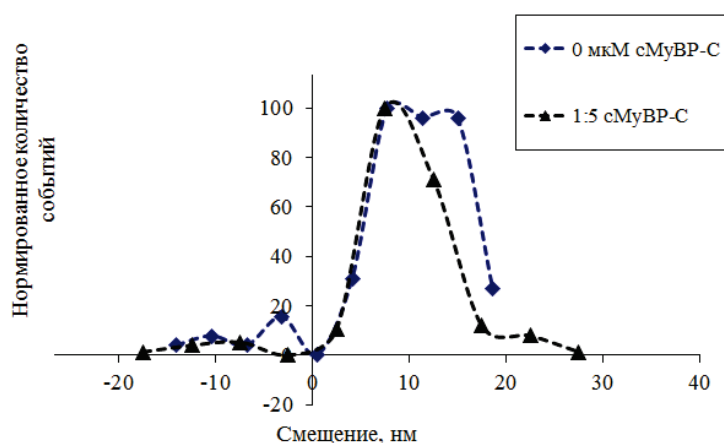


Рисунок 2. Распределение величины рабочего шага молекулы сердечного миозина (V) при взаимодействии с актином в присутствии и отсутствии сердечного миозин связывающего белка C (сMyBP-C)

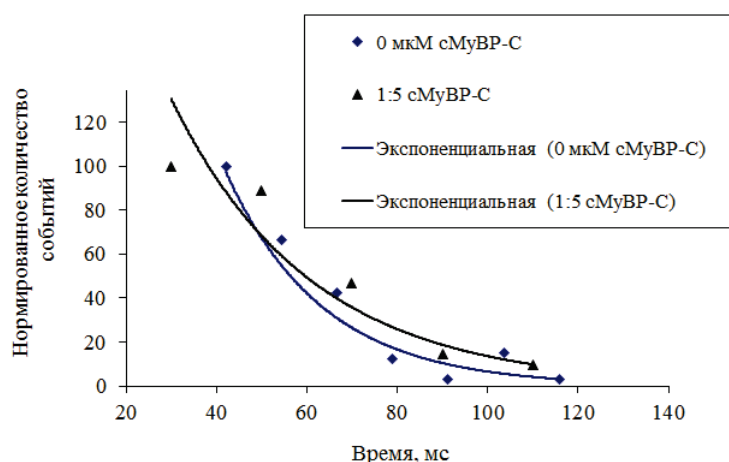


Рисунок 3. Распределение продолжительности событий взаимодействия молекулы сердечного миозина с актиновой нитью в присутствии и отсутствии сердечного миозин-связывающего белка C (сMyBP-C). Символы представляют собой экспериментальные точки, непрерывные линии – их экспоненциальные аппроксимации

Таблица 1. Характеристики одиночного взаимодействия сердечного миозина с актиновой нитью

Объект исследования	Размер шага, нм (среднее \pm стандартное отклонение) (N – число событий)	Продолжительность шага, мс (среднее \pm стандартная ошибка среднего)
V	9,5 \pm 4,0 (N = 623)	58,5 \pm 3,6
V + 1: 5 cMyBP-C	10,4 \pm 4,1 (N = 678)	68,8 \pm 4,4*

Символом * обозначена статистически значимое отличие величин, по сравнению с сердечным миозином V, оценённое с помощью критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Таким образом, сMyBP-C не влияет на величину рабочего шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актиновой нитью. Полученные результаты говорят о прямом влиянии сMyBP-C на одиночное актин-миозиновое взаимодействие.

Работа поддержана РФФ (грант №22-14-00174) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References:

1. Freiburg A., Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem.*, 1996, no. 235, pp. 317-323, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00317x.
2. Okagaki T., Weber F.E., Fischman D.A., Vaughan K.T., Mikawa T., Reinach. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J. Cell. Biol.*, 1993, no. 123, pp. 619-626, doi: 10.1083/jcb.123.3.619.

3. Starr R., Offer G. The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem. J.*, 1978, no. 171, pp. 813-816, doi: 10.1042/bj1710813.
4. Gruen M., Gautel M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *J. Mol. Biol.*, 1999, no. 286, pp. 933-949, doi: 10.1006/jmbi.1998.2522.
5. Squire J.M., Luther P.K., Knupp C. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J. Mol. Biol.*, 2003, no. 331, pp. 713-724, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00781-2.
6. Moos C., Mason C.M., Besterman J.M., Feng I.N., Dubin J.H. The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin, and its relation to the interaction of actin with myosin subfragment-11. *J. Mol. Biol.*, 1978, no. 124, pp. 571-586, doi: 10.1016/0022-2836(78)90172-9.
7. Mun J.Y., Previs M.J., Yu H.Y., Gulick J., Tobacman L.S., Previs S.B., Robbins J., Warshaw D.M., Craig R. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, no. 111, pp. 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.1316001111.
8. Wang L., Geist J., Grogan A., Hu L.R., Kontrogianni-Konstantopoulos A. Thick filament protein network, functions, and disease association. *Compr. Physiol.*, 2018, no. 8, pp. 631-709, doi: 10.1002/cphy.c170023.
9. Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Artemova N.V., Pivovarova A.V., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in the troponin T-binding region of cardiac tropomyosin. *Biochemistry*, 2017, no. 56, pp. 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
10. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Tsaturyan A.K., Bershitsky S.Y. The lifetime of the actomyosin complex in vitro under load corresponding to stretch of contractile muscle. *Eur. Biophys. J.*, 2015, no. 44, pp. 457-463, doi: 10.1007/s00249-015-1048-3.
11. Finer J.T., Simmons R.M., Spudich J.A. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps. *Nature*, 1994, no. 368, pp. 113-119, doi: 10.1038/368113a0.
12. Haerberle J.R. Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in an in vitro motility assay. *J. Biol. Chem.*, 1994, no. 269, pp. 12424-12431.
13. Knight A.E., Veigel C., Chambers C., Molloy J.E. Analysis of single-molecule mechanical recordings: application to acto-myosin interactions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2001, no. 77, pp. 45-72, doi: 10.1016/s0079-6107(01)00010-4.
14. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V., Katsnelson L.B., Bershitsky S.Y. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an in vitro motility assay. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, no. 401, pp. 159-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.040.
15. Alpert N.R., Brosseau C., Federico A., Krenz M., Robbins J., Warshaw D. M. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, no. 283, pp. 1446-1454, doi: 10.1152/ajpheart.00274.2002.
16. Palmiter K.A., Tyska M.J., Dupius D.E., Alpert N.R., Warshaw D.M. Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms. *J. Physiol.*, 1999, no. 519, pp. 669-678, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0669n.x.

EFFECTS OF CARDIAC MYOSIN-BINDING PROTEIN C ON THE CHARACTERISTICS OF A SINGLE ACTIN-MYOSIN INTERACTION IN THE MYOCARDIUM

Nabiev S.R., Kopylova G.V., Shchepkin D.V.

Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS

Pervomayskaya str., 15, Yekaterinburg, 620041, Russia; e-mail: salavatik2003@gmail.com

Received 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0476

Abstract. Myocardial contraction is the result of the interaction of myosin, which makes up the thick filament, with actin, which forms the basis of the thin filament, and is regulated by calcium through the regulatory proteins troponin and tropomyosin. Recently, it was found that, in addition to regulatory proteins, cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) is involved in the regulation of actin-myosin interaction. cMyBP-C is one of the integral proteins of the cardiomyocyte sarcomere, which has binding sites for the main sarcomere proteins, myosin, actin, and tropomyosin. cMyBP-C controls the number of myosin heads interacting with the thin filament and participates in its activation. In this work, the influence of cMyBP-C on the characteristics of a single actin-myosin interaction, myosin step size and interaction duration, was studied using an optical trap method. Cardiac myosin was extracted from rabbit left ventricular myocardium, actin was isolated from rabbit fast skeletal muscle, and cMyBP-C was obtained from chicken ventricles. cMyBP-C was added to cardiac myosin in a physiological ratio of 1:5. In an *in vitro* motility assay, the addition of cMyBP-C was found to slow actin sliding velocity over myosin by 30%. It was found that cMyBP-C does not affect step size of myosin but increases the duration of its interaction with the actin filament. The results obtained indicate a direct effect of cMyBP-C on a single actin-myosin interaction.

Key words: *cardiac myosin-binding protein C, actin-myosin interaction, myocardium, optical trap.*

ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА С ТИОСУЛЬФАТНЫМИ ЛИГАНДАМИ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Жигачева И.В.¹, Крикунова Н.И.¹, Генерозова И.П.², Буцанец П.А.², Васильева С.В.¹,
Расулов М.М.³

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

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, г. Москва, 127276, РФ; e-mail: igenozova@mail.ru

³ Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений
и. Энтузиастов, 38, г. Москва, 105118, РФ; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com
Поступила в редакцию 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0477

Аннотация. Исследовано влияние стрессовых воздействий (дефицита воды, высокотемпературного стресса) и донора оксида азота натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрата $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ-тио) на жирнокислотный состав и биоэнергетические характеристики митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха. Стрессовые воздействия вызывали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий. При этом значительные изменения происходили в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК). Снижение содержания линолевой и линоленовой кислот – одних из основных ЖК, входящих у высших растений в состав кардиолипина, по-видимому, вызывало снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. Обработка семян гороха 10^{-6} М ТНКЖ-тио предотвращала активацию ПОЛ, изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий и способствовала сохранению биоэнергетических характеристик этих органелл. Предупреждая снижение энергетического метаболизма ТНКЖ-тио, вероятно, обладает адаптогенными свойствами, которые отразились и на физиологических показателях, а именно на росте проростков. Обработка семян и проростков гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста корней и побегов в условиях дефицита воды. На основании полученных данных можно прийти к заключению, что протекторные свойства ТНКЖ-тио обусловлены его антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: доноры оксида азота, дефицит воды, тепловой стресс, митохондрии, жирные кислоты

Растения, ведущие прикрепленный образ жизни, подвергаются различным биотическим и абиотическим стрессовым воздействиям. Стрессовые факторы, такие как дефицит воды, патогены, высокие и низкие температуры, тяжелые металлы, вызывают в клетках растений изменение метаболизма липидов, результатом которого является адаптивная модификация липидных компонентов мембран и, в том числе, мембран митохондрий [1,2].

Эти органеллы занимают ключевые позиции в энергетических, окислительно-восстановительных и обменных процессах в клетке. Они играют одну из основных ролей в ответе растений на действие стрессовых факторов. При этом изменяется количество и степень насыщенности жирных кислот, входящих в состав липидного бислоя, возможно, это является сигналом действия стрессового фактора [3,4].

Изменения липидного компонента мембран, по-видимому, влияет на белок-липидные взаимодействия, что сказывается на активности белков-ферментов, входящих в состав дыхательной цепи митохондрий. Вероятно, это в некоторой степени обеспечивает защиту этих органелл и клетки от окислительного стресса. Действительно, при действии низких положительных температур на проростки озимой пшеницы функциональная активность митохондрий определяется составом жирных кислот их мембран. Среди этих кислот важную роль играет α -линоленовая кислота [5]. В условиях солевого и осмотического стресса в митохондриях этиолированных проростков твердой пшеницы, ячменя, томата, полбы, также зеленых проростков кукурузы наблюдается увеличение содержания свободных жирных кислот, обладающих разобщающим эффектом и активирующих АТФ-чувствительный калиевый (mitoK_{ATP}) канал, что приводит к снижению избыточной генерации АФК [6].

Однако, при длительном действии стрессового фактора или при сильном стрессовом воздействии защитные механизмы не справляются с чрезмерной генерацией АФК. В результате взаимодействия АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав мембран митохондрий, происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию токсических для клеток растений продуктов: альдегидов и 4-гидрокси-2,3-ноненалов. Эти токсиканты ингибируют ферменты, вовлеченные в основные метаболические пути: одни из них, ингибируя глицин-декарбоксилазу, угнетают фотодыхание, другие, производя ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы – фермента цикла трикарбоновых кислот, влияют на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий за счет источника пула НАДН в матриксе митохондрий [7-9]. Можно предположить, что препараты, снижающие генерацию АФК митохондриями, будут предотвращать нарушения биоэнергетических функций этих органелл и, следовательно, нарушения энергетического метаболизма клетки. В наших исследованиях мы обратили внимание на доноров оксида азота. Такой выбор

объекта исследования связан с тем, что оксид азота представляет собой сигнальную молекулу, участвующую в самых разнообразных физиологических процессах в растениях [10]. При этом различными исследованиями показано наличие положительной корреляции между увеличением содержания NO в различных органах и тканях растений при стрессовых воздействиях и адаптацией растений к изменяющимся условиям внешней среды [11,12]. Способность NO стимулировать адаптивные реакции, в условиях абиотического стресса, может быть связана с тем, что он может связывать свободные ионы железа в составе нитрозильных комплексов, что, возможно, будет приводить к ингибированию реакций свободно-радикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа [13]. Таким образом, NO может действовать как антиоксидант, хотя возможен и синергизм в действии NO и H₂O₂ [14].

Как показано в ряде работ, обработка растений экзогенными донорами NO регулирует устойчивость к абиотическому стрессу [15]. В нашей работе в качестве донора оксида азота мы использовали натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) – [Na₂[Fe₂(S₂O₃)₂(NO)₄]₂ × 4H₂O (кристаллический ТНКЖ-тио) [16].

В связи с этим исследовано влияние ТНКЖ-тио и стрессовых воздействий (дефицита воды и высокотемпературного стресса) на жирнокислотный состав липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха и их биоэнергетические характеристики.

Поскольку энергетический обмен играет важную роль в адаптивных процессах и митохондрии растений являются источниками и мишенью для оксида азота. Целью нашего исследования было изучение влияния стресса (дефицит воды и тепловой шок) на функциональное состояние митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха.

Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт – Флора 2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO₄. Контрольную группу семян в течение 1 часа замачивали в воде, а опытную группу – в 10⁻⁶М растворе ТНКЖ-тио.

Дефицит воды. Спустя 1 час все семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. После этого половину семян контрольной группы (ДВ) и семена, обработанные ТНКЖ-тио (ДВ+ТНКЖ), на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Спустя 2 суток все проростки переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они оставались в течение последующих 2 суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Тепловой стресс. Спустя 1 час семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где их проращивали в течение 5 суток в темноте при температуре 22°. Затем половину проростков контрольной группы (ТС) и проростки, обработанные ТНКЖ-тио (ТС+ТНКЖ) на 120 мин. помещали в термостат при температуре 45°. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток при температуре 22°. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатом. Кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом) [Na₂[Fe₂(S₂O₃)₂(NO)₄]₂ × 4H₂O (ТНКЖ-тио) синтезирован в ФГБУН Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка) [16].

Содержание NO в эпикотилиях 5-дневных этиолированных проростков гороха анализировали по методу, описанному в [17]. Определение его концентрации проводили по реакции Грисса. Навеску 60 г эпикотилей гомогенизировали на льду в 50 мМ ацетатном буфере (рН 3,6) с добавлением 4% ацетата цинка. Гомогенат центрифугировали при 8000g в течение 15 мин, затем к 10 мл супернатанта добавляли 150 мг древесного угля. Смесь фильтровали через бумажный фильтр, после чего смешивали 2 мл фильтрата с 1 мл 1% реактива Грисса в 12% уксусной кислоте и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 540$ нм. В качестве стандарта использовали растворы нитрита натрия.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков проводили методом дифференциального центрифугирования [18]. Первое центрифугирование – при 25000 g в течение 5 мин. Второе – при 3000 g в течение 3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KН₂РO₄ (рН 7,4), 0,1% БСА, (свободный от жирных кислот), и вновь осаждали митохондрии при 11000g в течение 10 мин.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала: 0,4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-Tris буфер (рН 7,2), 5 мМ KН₂РO₄, 4 мМ MgCl₂, и 0,1% БСА.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [19]. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветках на спектрофлуориметре “Fluoro-Max-HoribaYvon GmbH”, Германия. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). МЭЖК были получены путем кислотного метанолиза липидов мембран митохондрий [20,21]. МЭЖК экстрагировали гексаном, и полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава МЭЖК Количественное определение МЭЖК проводили с использованием хроматографа Kristall 2000M (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой

капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм, фирма J & W Scientific», США). Анализ МЭЖК проводили при программировании температуры от 120 до 270 °С со скоростью 4 °С / мин. Температура инжектора и детектора – 270 °С; скорость газа-носителя гелия составляла 2,0 мл / мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Каждый образец содержал 2 мкл гексанового экстракта. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали, как отношение площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков всех найденных МЭЖК [22]. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическая обработка результатов проводилась с использованием Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификацию МЭЖК проводили на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных газо-хроматографическому анализу с использованием прибора Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры были получены в режиме электронного удара при напряжении ионизации 70 эВ и скорости сканирования 1°С на декаду масс в области 40-400 а.е.м.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2-3 мг белка) помещали в 0,5 мл среды, содержащей: 0,1 М сахарозу, 10 мМ HEPES, 1 мМ K_2HPO_4 , pH 7,4. Митохондрии инкубировали 20-25 мин при комнатной температуре.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$. Обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ (Merck, Германия), сахараза, Трис, (Sigma- Aldrich, США), БСА (свободный от жирных кислот), FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон), ротенон, антимицин А, N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD), аскорбат (Sigma- Aldrich, США), дитиотреитол (AppliChem), карбонат калия, (Merck, Германия), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия), HEPES (4 (2-Гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота) (MB Biomedicals, Германия).

Исследование влияния дефицита воды, теплового стресса и комплекса железа с тиосульфатом на функциональное состояние митохондрий проростков гороха проводили, используя ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-6}M , т.е. в той концентрации, в которой препарат предотвращал активацию ПОЛ на модели «старения» митохондрий [23].

Тепловой стресс и дефицит воды увеличивали флуоресценцию продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий в 2-3 раза (рис. 1). Обработка семян гороха 10^{-6}M раствором ТНКЖ-тио предотвращала активацию ПОЛ, как в условиях дефицита воды, так и в условиях теплового стресса, что, вероятно, свидетельствовало о наличии у препарата протекторных свойств.

Активация ПОЛ, обусловленная стрессом, по-видимому, должна была влиять на жирнокислотный состав мембран митохондрий. Действительно, стрессовые воздействия изменяли пул жирных кислот (ЖК), содержащих 18 и 20 атомов углерода. Содержание линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий проростков, находящихся в условиях дефицита воды (ДВ) снизилось на 6% и 14% соответственно. При этом индекс ненасыщенности C_{18} ЖК почти не изменился, а $\sum \text{C}_{18}$ ненасыщенных ЖК / $\sum \text{C}_{18:0}$ ЖК в этих условиях сократилось с $16,26 \pm 1,25$ до $10,28 \pm 0,92$ (рис. 2).

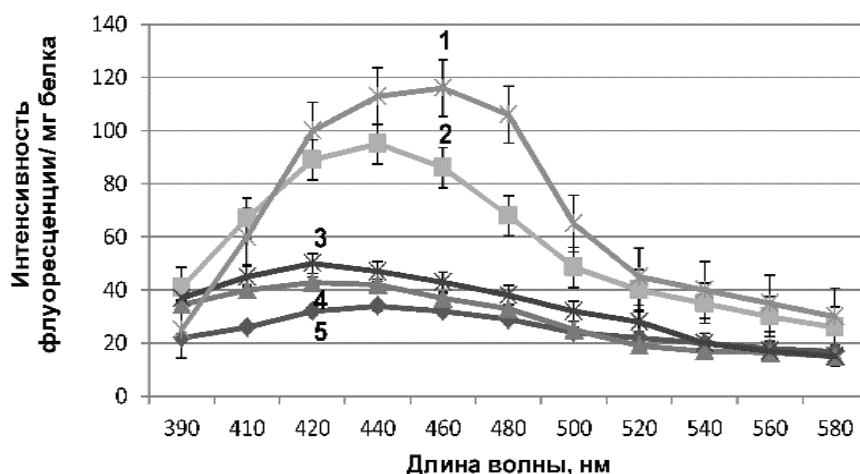


Рисунок 1. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды (ДВ), теплового стресса (ТС) и обработки семян гороха ТНКЖ-тио. По оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных ед./мг белка, по оси абсцисс – длина волны в нм. 1 – ТС; 2 – ДВ; 3 – ТС+ 10^{-6}M ТНКЖ-тио; 4 – ДВ+ 10^{-6}M ТНКЖ-тио; 5 – контрольная группа проростков

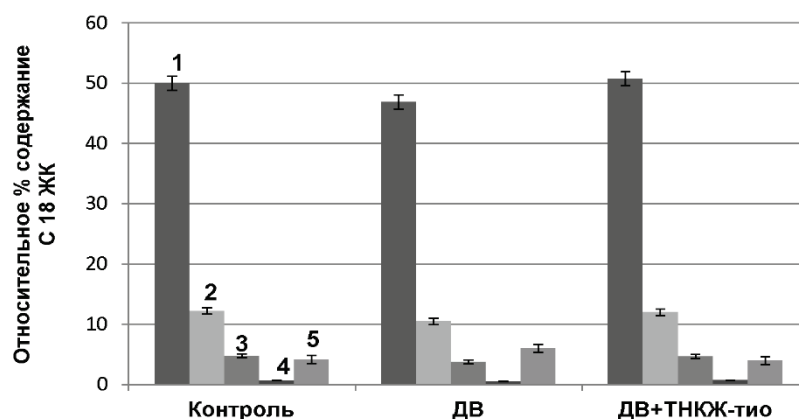


Рисунок 2. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное процентное содержание жирных кислот C_{18} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось Y: относительное % содержание жирных кислот C_{18} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось X: группы проростков; 1 – 18:2 ω_6 ; 2 – 18:3 ω_3 ; 3 – 18:1 ω_9 ; 4 – 18:1 ω_7 ; 5 – 18:0

Сопоставимые с этими данными изменения ЖК состава в условиях дефицита воды наблюдали в мембранах митохондрий кукурузы, липидов мембран суспензионной культуры картофеля и липидов из листьев *Arabidopsis thaliana* [24-26]. При этом авторы отмечали, что дефицит воды приводил и к увеличению содержания стеариновой кислоты в мембранах и снижению содержания линолевой и линоленовой кислот. Отметим, что наблюдаемое 10% снижение содержания олеиновой кислоты в мембранах митохондрий, возможно, объясняется не только активацией ПОЛ, но и снижением активности ацил-липидных ω_9 -десатураз. В условиях теплового стресса также наблюдалась модификация пула C_{18} жирных кислот. При этом происходило снижение содержания линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий проростков на 7,73% и 18% соответственно [27]. Также как и в условиях дефицита воды, индекс ненасыщенности C_{18} ЖК почти не изменился, а $\sum C_{18}$ ненасыщенных ЖК / $\sum C_{18:0}$ ЖК уменьшалось почти в 1,6 раза (с $16,37 \pm 1,20$ до $10,45 \pm 0,81$). Соизмеримое снижение содержания полиненасыщенных ЖК, в частности в содержании C_{18} ЖК при температурном стрессе наблюдали и у *Arabidopsis thaliana* [28,29]. Отметим, что более значительное снижение содержания полиненасыщенных C_{18} ЖК кислот в мембранах митохондрий проростков гороха происходило в условиях теплового стресса, а не в условиях дефицита воды и это снижение, вероятно, обусловлено активацией ПОЛ.

В результате стрессовых воздействий происходили значительные изменения и в содержании C_{20-22} ЖК. Индекс ненасыщенности C_{20} ЖК при дефиците воды понизился с $0,095 \pm 0,002$ до $0,057 \pm 0,001$, а содержание насыщенных $C_{20:0+C_{22:0}}$ ЖК уменьшилось в 1,6 раза (рис. 3).

В то же время тепловой стресс вызывал снижение индекса ненасыщенности C_{20} ЖК с $0,087 \pm 0,002$ до $0,067 \pm 0,001$ (уменьшение показателя в 1,3 раза, а содержание насыщенных $C_{20:0+C_{22:0}}$ ЖК даже увеличивалось с $1,21 \pm 0,12$ до $3,50 \pm 0,22$).

Изменения физико-химических характеристик мембран митохондрий, вероятно, должны были влиять на липид-белковые взаимодействия и, следовательно, на активность, ассоциированных с мембранами митохондрий ферментов. Действительно, стрессовые воздействия приводили к снижению скоростей окисления НАД-зависимых субстратов (табл. 1).

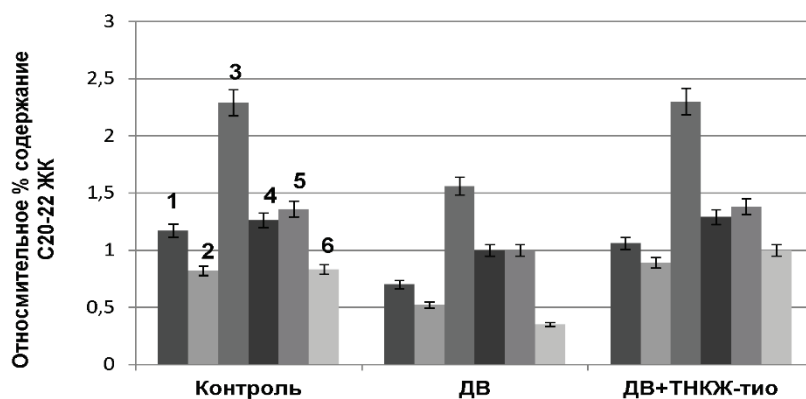


Рисунок 3. Влияние дефицита воды и ТНКЖ-тио на относительное % содержание C_{20-22} ЖК в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось Y: относительное % содержание жирных кислот C_{20-22} в мембранах митохондрий проростков гороха. Ось X: группы проростков; 1 – 20:3 ω_6 ; 2 – 20:2 ω_6 ; 3 – 20:1 ω_9 ; 4 – 20:1 ω_7 ; 5 – 20:0; 6 – 22:0

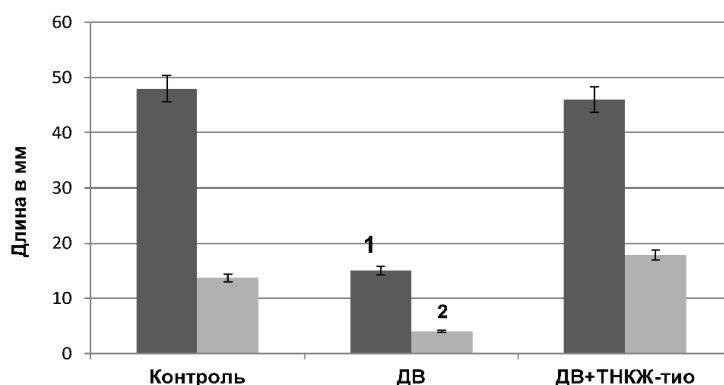


Рисунок 4. Влияние дефицита воды (ДВ) и обработки семян гороха ТНКЖ-тио на длину побегов и корней 5-дневных проростков. 1 – побег; 2 – корни

Действительно, максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов снижались на 36% в условиях дефицита воды и на 44% при тепловом стрессе. При этом эффективность окислительного фосфорилирования снижалась в 1,32 и 1,52 раза. Обработка семян гороха 10^{-6} М ТНКЖ-тио восстанавливала максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов как в присутствии АДФ, так и в присутствии разбавителя. Однако эти скорости были ниже контрольных значений, что, возможно, объясняется конкуренцией оксида азота и кислорода за места связывания с цитохромоксидазой [30].

Действительно, обработка семян гороха препаратом приводила к увеличению содержания NO в тканях растений. Так содержание оксида азота в тканях эпикотилей проростков, выращенных из семян обработанных ТНКЖ-тио в условиях дефицита воды было в 1,68 раз выше ($65,0 \pm 2,5$ нмоль/г. сырого веса), чем у не обработанных проростков, находящихся в тех же условиях ($38,7 \pm 1,9$ нмоль/г. сырого веса).

Изменения функционального состояния митохондрий отразились и на физиологических показателях – на росте проростков. Обработка семян гороха исследуемым препаратом предотвращала торможение роста побегов и корней проростков. При этом длина корней проростков в условиях дефицита воды была даже в 1,3 раза больше, чем у проростков, находящихся в стандартных условиях, что имеет важное значение для адаптации растений в условиях дефицита воды.

Таким образом способность натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрата повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов, вероятно, связана с его антиоксидантными свойствами. Эти свойства, по-видимому, обусловлены тем, что препарат донирует оксид азота. Действительно, экспериментальное сравнение антиоксидантных свойств ТНКЖ-тио с эффективностью NO, растворенного в воде, при тех же условиях показало, что антиоксидантная активность препарата определяется действием NO, выделяющегося при гидролизе ТНКЖ-тио [31]. Выделяющийся оксид азота способен модифицировать белки (в том числе антиоксидантные ферменты). Кроме того, благодаря нитрованию тирозина в белках NO может изменять активность супероксиддисмутазы (СОД) [32]. Более того, по мнению некоторых авторов, в результате S-нитрозилирования может происходить изменение состояния факторов, регулирующих транскрипцию антиоксидантных ферментов [16, 33]. При этом одним из механизмов антиоксидантного действия NO является, возможно, связывание свободных ионов железа в составе нитрозильных комплексов, аналогичное наблюдаемому в клетках животных и бактерий [13].

Таблица 1. Влияние ТНКЖ-тио, дефицита воды или теплового стресса (ТС) на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха. Скорости окисления представлены в виде нг.атом O_2 /мг белка \times мин. Число повторов – 8

Группа	V_2	V_3	V_4	V_3/V_4	ДНФ
Контр	$23,21 \pm 2,21$	$78,53 \pm 1,70$	$34,44 \pm 1,52$	$2,28 \pm 0,01$	$70,95 \pm 1,88$
ДВ	$36,05 \pm 1,24$	$50,20 \pm 2,80$	$29,88 \pm 1,23$	$1,68 \pm 0,01$	$46,00 \pm 1,32$
ДВ+ 10^{-6} М ТНКЖ-тио	$25,68 \pm 1,9$	$69,88 \pm 2,00$	$25,50 \pm 1,72$	$2,74 \pm 0,02$	$62,94 \pm 1,41$
ТС	$35,00 \pm 2,41$	$41,25 \pm 1,81$	$27,32 \pm 1,83$	$1,50 \pm 0,03$	$40,81 \pm 1,54$
ТС+ТНКЖ- тио	$22,41 \pm 1,35$	$65,41 \pm 2,00$	$32,86 \pm 1,42$	$1,99 \pm 0,05$	$60,43 \pm 1,68$

Среда инкубации: 0,4 М сахароза, 20 мМ HEPES-Tris буфер (pH 7,2), 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ $MgCl_2$, и 0,1% БСА, 10мМ малаг, 10мМ глутамат. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилицианид-*n*-трифлуорометоксифенилгидразон). Условные обозначения

V_2 - скорости окисления субстратов;

V_3 - скорости окисления субстратов в присутствии АДФ;

V_4 - скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ)

Предотвращая окисление ненасыщенных C₁₈ ЖК, главным образом линолевой и линоленовой – основных ЖК, входящих в состав кардиолипина – одного из основных фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий, препарат обеспечивает эффективную работу дыхательной цепи митохондрий [34].

При этом большое значение в сохранении функциональной активности этих органелл в стрессовых условиях, вероятно, имеет и сохранение пула ненасыщенных ЖК, содержащих 20 атомов углерода. Роль этих ЖК в устойчивости растений к стрессу еще мало изучена, но в некоторых случаях показано их участие в реакции растений на неблагоприятные воздействия. Так было обнаружено, что увеличение пула C₂₀ ЖК имело значение при адаптации растений к осмотическому стрессу, вызванному засолением [35]. Следует отметить, что изменения в составе и количестве ЖК с очень длинной цепью или (ЖКОДЦ) (C₂₀₋₂₄) в восках, фосфолипидах и сложных сфинголипидах в совокупности оказывают глубокое влияние на развитие эмбрионов, листьев, корней и цветков. Фосфолипиды и сфинголипиды ЖКОДЦ участвуют в структуре и динамике мембран, регулируя размер клеток, а также деление и дифференцировку [36,37], они также могут оказывать влияние на биогенез митохондрий.

Предотвращая окисление ненасыщенных жирных кислот, ТНКЖ-тио способствует сохранению функциональной активности митохондрий, а, следовательно, поддержанию энергетического метаболизма клетки, что особенно важно для прорастающих семян, нуждающихся в энергетических ресурсах.

Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику ФГБУН Института проблем химической физики РАН (Черноголовка) Саниной Н.А. за предоставление для исследований образцов натрия μ2-дитиосульфата – тетранитрозилдиферрат тетрагидрата.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 44.4-44.5 1201253310).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Список литературы / References:

1. Иванова Т.В., Воронков А.С., Кузнецова Э.И., Кумахова Т.Х., Жиров В.К., Цыдендамбаев В.Д. Жирные кислоты липидов перикарпия *Cydonia oblonga* Mill. и *Mespilus germanica* L. вовлекаются в адаптацию растений к условиям высотной поясности. *ДАН*, 2019, т. 486, № 5, с. 620-625. [Ivanova T.V., Voronkov A.S., Kuznetsova E.I., Kumakhova T.Kh., Zhirov V.K., Tsyendambaev V.D. Fatty acids of lipids of the pericarp of *Cydonia oblonga* Mill. and *Mespilus germanica* L. are involved in plant adaptation to altitudinal zonality. *Reports of the Russian Academy of Sciences*, 2019, vol. 486, no. 5, pp. 620-625, doi: 10.31857/S0869-56524865620-625. (In Russ.)]
2. Живетьев М.А., Граскова И.А., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Войников В.К. Изменение жирнокислотного состава растений при гипотермической адаптации. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2010, т. 6, № 4, с. 51-65. [Zhivetiev M.A., Graskova I.A., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Voinikov V.K. Changes in the fatty acid composition of plants during hypothermic adaptation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2010, vol. 6, no 4, pp. 51-65. (In Russ.)]
3. Hou Q., Ufer G., Bartels D. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, 2016, vol. 39, no. 5, pp. 1029-48, doi: 10.1111/pce.12666.
4. Okazaki Y, Saito K. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.*, 2014, vol. 79, no. 4, pp. 584-96, doi: 10.1111/tpj.12556.
5. Грабельных О.И., Кириченко К.А., Побежимова Т.П., Боровик О.А., Павловская Н.С., Любушкина И.В., Королева Н.А., Войников В.К. Устойчивость проростков озимой пшеницы к кратковременному действию отрицательной температуры может быть обусловлена активацией разобщающих белков и АТФ/АДФ антипортера. *Биол. мембраны*, 2014, т. 31, № 3. [Gabelnykh O.I., Kirichenko K.A., Pobezhimova T.P., Borovik O.A., Pavlovskaya N.S., Lyubushkina I.V., Koroleva N.A., Voinikov V.K. wheat to a short-term exposure to negative temperatures may be due to the activation of uncoupling proteins and the ATP/ADP antiporter. *Biol. Membranes*, 2014, vol. 31, no. 3. (In Russ.)]
6. Pastore D. The Enigmatic Metabolite Transport in Plant Mitochondria Lacking Proton Motive Force – news from Durum Wheat Mitochondria. *Bioenergetics*, 2014, vol. 3, no 3, pp. 121-122, doi: 10.4172/2167-7662.1000e121.
7. Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med. Longev.*, 2014, vol. 2014, pp. 2-67, doi: 10.1155/2014/360438.
8. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential Impact of Environmental Stresses on the Pea Mitochondrial Proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2005, vol. 4, no. 8, pp. 1122-1133, doi: 10.1074/mcp.M400210-MCP200.
9. Zhigacheva I.V., Burlakova E. B. Plant Growth and Development Regulators and Their Effect on the Functional State of Mitochondria. *Chemistry and Technology of Plant Substances. Chemical and Biochemical Aspects/* Ed. Ed Kutchin A.V., Shishkina L.N., Weisfeld L.I. Oakville: Apple Academic Press, 2017, chapter 12, pp. 243-278, doi: 10.1201/9781315207469-15.
10. Мамаева А.А., Фоменков А.В., Носов И.Е., Мошков Л.А., Мур Ж., Холл М.А., Новикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота в растениях. *Физиол. Растений*. 2015, т. 62, № 4, с. 459-474. [Mamaeva A.A., Fomenkov A.V., Nosov I.E., Moshkov L.A., Moore Zh., Hall M.A., Novikova G.W. Regulatory role of nitric oxide in plants. *Physiol. Plants*, 2015, vol. 62, no. 4, pp. 459-474, doi: 10.7868/S0015330315040132. (In Russ.)]

11. Shi H., Ye T., Zhu J.K., Chan Z. Constitutive production of nitric oxide leads to enhanced drought stress resistance and extensive transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 2014, vol. 65, pp. 4119-4131, doi: 10.1093/jxb/eru184.
12. Nabi R.B.S., Tayade R., Hussain A., Kulkarni K.P., Imran Q.M., Bong-Gyu Mun. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, vol. 161, pp. 120-133, doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
13. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015, 220 с. [Vanin A.F. *Dinitrosyl complexes of iron with thiol-containing ligands: physical chemistry, biology, medicine*. Moscow-Izhevsk: Institute for Computer Research, 2015, 220 p. (In Russ.)].
14. Hasanuzzaman M.K., Nahar K., Alam Md.M., M. Fujita M. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase. *Australian J. Crop Science*, 2012, vol. 6, no. 8, pp. 1314-1323.
15. Seabra A.B., Oliveira H.C. How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: what we know so far and perspectives. *AIMS Molecular Science*, 2016, vol. 3, no. 4, pp. 692-718, doi: 10.3934/molsci.2016.4.692.
16. Санина Н.А., Алдошин С.М. Структура и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами. *Изв. РАН, Сер., Хим*, 2011, т. 7, с. 1199-1205. [Sanina N.A., Aldoshin S.M. Structure and properties of iron nitrosyl complexes with functional sulfur-containing ligands. *Russian Chemical Bulletin*, 2011, vol. 7, pp. 1199-1205, doi: 10.1007/s11172-011-0192-x. (In Russ.)]
17. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, pp. 3223-3228, doi: 10.1093/jxb/eri319.
18. Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*, 2003, т. 68, № 7, с. 910-916. [Popov V.N., Ruge E.K., Starkov A.A. Influence of inhibitors of electron transport on the formation of reactive oxygen species during the oxidation of succinate by pea mitochondria. *Biochemistry*, 2003, vol. 68, no. 7, pp. 910-916. (In Russ.)]
19. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, 1973, vol. 52, pp. 1-9.
20. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., Sim I.S. Fatty acid determination in chicken egg yolk. A comparison of different methods. *Poultry science*, 2000, vol. 79, pp. 1168-1171, doi: 10.1093/ps/79.8.1168.
21. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, 1979, vol. 151, pp. 384-390.
22. Golovina R.V., Kuzmenko T.E. Thermodynamic Evaluation Interaction of Fatty Acid Methyl Esters with Polar and Nonpolar Stationary Phases, Based on Their Retention Indices. *Chromatogr.*, 1977, vol. 10, no. 9, pp. 545-546, doi: 10.1007/BF02262915.
23. Жигачева И.В., Васильева С.В., Генерозова И.П., М.М. Расулов М.М. Тетранитрозильный биядерный комплекс железа повышает устойчивость проростков гороха и клеток *E. coli* к стрессовым воздействиям. *Биологические мембраны*, 2020, т. 37, № 2, с. 149-153. [Zhigacheva I.V., Vasilyeva, S.V., Generozova I.P., Rasulov M.M. Tetranitrosyl binuclear iron complex increases the resistance of pea seedlings and *E. coli* cells to stress. *Biochemistry (Moscow), supplement series A: Membrane and cell biology*, 2020, vol. 37, no. 2, pp. 149-153 (In Russ.)].
24. Макаренко С.П., Константинов Ю.М., Хотимченко С.В., Коненкина Т.А., Арзиев А.Ш. Жирнокислотный состав липидов митохондриальных мембран у представителей культурных (*Zea Mays*) и дикорастущих (*Elymus Sibiricus*) злаков. *Физиол. растений*, 2013, т. 60, № 2, с. 205-213. [Makarenko S.P., Konstantinov Y.M., Khotimchenko S.V., Konenkina T.A., Arziev A.Sh. Fatty acid composition of mitochondrial membrane lipids in cultivated (*Zea mays*) and wild (*Elymus sibiricus*). *Grasses. Russ J Plant Physiol* 2003, vol. 50, pp. 548-553, doi: 10.1023/A:1024716606132. (In Russ.)]
25. Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A.T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann Bot* 2004, vol. 94, no 3, pp. 345-351, doi: 10.1093/aob/mch150.
26. Leone A., Costa A., Grillo S., Tucci M., Horvarth I., Vigh L. Acclimation to Low Water Potential Determines Changes in Membrane Fatty Acid Composition and Fluidity in Potato Cells. *Plant Cell Environ.*, 1996, vol. 19, pp. 1103-1109, doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00218.x.
27. Жигачева И.В., Бинюков В.И., Миль Е.М., Крикунова Н.И., Расулов М.М., Албантова А.А., Генерозова И.П. Натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат повышает устойчивость проростков гороха к тепловому стрессу. *Физиол. Растений*, 2022, т. 69, № 2. с. 198-207. [Zhigacheva I.V., Binyukov V.I., Mil E.M., Krikunova N.I., Rasulov M.M., Albantova A.A., Generozova I.P. Sodium μ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate Prevents Heat Shock-Induced Mitochondria Dysfunction., *Russian Journal of Plant Physiology*, 2022, vol. 69, pp. 38-46 (In Russ.)].
28. Saidi Y., Peter M., Finka A., Cicekli C., Vigh L., Goloubinoff P. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca^{2+} -dependent heat shock response. *Plant Signal Behav*, 2010, vol. 5, no. 12, pp. 1530-1533, doi: 10.4161/psb.5.12.13163.

29. Falcone D.L., Ogas J.P., Somerville Ch.R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol.*, 2004, vol. 4, pp. 17-24, doi: 10.1186/1471-2229-4-17.
30. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Физиологическая роль оксида азота при инфекционном процессе. *Успехи физиологических наук*, 2012, т. 43, № 3, с. 62-81. [Plekhnova N.G., Somova L.M. The physiological role of nitric oxide in the infectious process. *Advances in the physiological sciences*, 2012, vol. 43, no. 3, pp. 62-68. (In Russ.)].
31. Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Смолина А.В., Полетаева Д.А., Солдатова Ю.В., Покидова О.В., Садков А.П., Санина Н.А., Алдошин С.М. Антиоксидантная активность тетранитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами и его влияние на каталитическую активность митохондриальных ферментов в опытах in vitro. *ДАН*, 2019, т. 488, № 5, с. 571-575. [Faingold I.I., Kotelnikova R.A., Smolina A.V., Poletaeva D.A., Soldatova Yu.V., Pokidova O.V., Sadkov A.P., Sanina N.A., Aldoshin S.M. Antioxidant activity of tetranitrosyl iron complex with thiosulfate ligands and its effect on the catalytic activity of mitochondrial enzymes in experiments in vitro. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 488, no. 1, pp. 342-345, doi: 10.1134/S1607672919050120. (In Russ.)]
32. Hancock J.T., Neill S.J. Nitric oxide: Its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* (Basel), 2019, vol. 8, no. 2, pp. 41, doi: 10.3390/plants8020041307598233641.
33. Groß F., Durner J., Gaupels F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci*, 2013, vol. 4, pp. 419, doi: 10.3389/fpls.2013.00419.
34. Oemer G., Lackner K., Muigg K., Krumschnabel G., Watschinger K., Sailer S., Lindner H., Gnaiger E., Wortmann S.B., Werner E.R., Zschocke J., Kelle M.A. Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *PNAS*, 2018, vol. 115, no. 16, pp. 4158-4163, doi: 10.1073/pnas.1719407115.
35. Цыдендабаев В.Д., Иванова Т.В., Халилова Л.А., Куркова Е.Б., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Жирнокислотный состав липидов вегетативных органов галофита *Suaeda Altissima* при разном уровне засоления. *Физиология растений*, 2013, т. 60, с. 700-711. [Tsydenbabaev V.D., Ivanova T.V., Khalilova L.A., Kurkova E.B., Myasoedov N.A., Balnokin Yu.V. Fatty acid composition of lipids in the vegetative organs of the halophyte *Suaeda Altissima* at different levels of salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2013, vol. 60, no. 5, pp. 661-671, doi: 10.1134/S1021443713050142. (In Russ.)]
36. Bach L., Faure J.D. Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C R Biol.*, 2010, vol. 333, no. 4, pp. 361-370, doi: 10.1016/j.crv.2010.01.014.
37. Bach L., Gissot L., Marion J. et al. Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell. Sci.*, 2011, vol. 124, no. 19, pp. 3223-3234, doi: 10.1242/jcs.074575.

ETRANITROSYL IRON COMPLEX WITH THIOSULFATE LIGANDS PREVENTS MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION UNDER STRESS

Zhigacheva I.V.¹, Krikunova N.I.¹, Generozova I.P.², Butsanets P.A.², Vasilyeva S.V.¹, Rasulov M.M.³

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics. of RAS,

Kosygina str. 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology named of RAS,

Botanicheskaya str. 35, Moscow, 127276, Russia; e-mail: igenerozova@mail.ru

³ State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Connections

Entuziastov w. 38, Moscow, 105118, Russia; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Received 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0477

Abstract. The effect of stress (water deficiency, high-temperature stress) and nitric oxide donor sodium μ 2-dithiosulphate-tetranitrosyldiferrate tetrahydrate $\text{Na}_2 [\text{Fe}_2 (\text{S}_2\text{O}_3)_2 (\text{NO})_4]_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (TNIC-thio) on the fatty acid composition and bioenergetic characteristics of 5-day etiolated pea seedling mitochondria was studied. Stressful effects caused the activation of LPO in the mitochondrial membranes. At the same time, significant changes occurred in the content of C_{18} and C_{20} fatty acids (FA). A decrease in the content of linoleic and linolenic acids, one of the main FA components of cardiolipin in higher plants, apparently caused a decrease in the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates. The treatment of pea seeds with 10^{-6}M TNIC-thio prevented the activation of LPO, changes in the fatty acid composition of mitochondrial membranes, and contributed to the preservation of the bioenergetic characteristics of these organelles. By preventing the decline in energy metabolism, TNIC-thio probably has adaptogenic properties, that were also reflected in physiological parameters, namely, the growth of seedlings. Treatment of pea seeds and seedlings with the studied preparation prevented inhibition of root and shoot growth in conditions of water deficiency. Based on the data obtained, it can be concluded that the protective properties of TNIC-thio are due to its antioxidant activity.

Key words: nitric oxide donors, water deficiency, heat stress, mitochondria, fatty acids.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДИСПЕРСНОЙ ФАЗЫ ДИСТИЛЛИРОВАННОЙ ВОДЫ

Яхно Т.А., Богданов С.А., Санин А.Г., Яхно В.Г.

ФИЦ Институт прикладной физики РАН

ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: yakhta13@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0478

Аннотация. Данная статья продолжает цикл работ авторов по исследованию дисперсной фазы воды с помощью оптического микроскопа. Ранее было обнаружено, что каждая единица дисперсной фазы представляет собой микрокристалл NaCl, окруженный толстым слоем гидратной воды, предохраняющей его от растворения. При испарении свободной воды со стеклянной поверхности осмотическое давление в остатках воды повышается, что ведет к диссоциации гидратных оболочек и контакту соли с водой. После полного испарения на стеклянной подложке остаются крупные кристаллы NaCl и гелеобразная неиспаряющаяся вода. Использование сканирующего электронного микроскопа позволило выявить ряд деталей, неизвестных ранее: образование мелких кристаллов хлорида натрия на поверхности дисперсной фазы воды и рост кристаллов на тяжках гелеобразной воды. По мнению авторов, значительная часть NaCl в высокоомной воде находится в виде кристаллов внутри дисперсной фазы, что проявляется после испарения свободной воды. Обсуждаются версии других авторов, наблюдавших «стабильные водные кластеры» в серийно разведенных растворах.

Ключевые слова: *микроструктуры воды, дисперсная фаза, осадок после испарения, кристаллизация NaCl.*

Присутствие микрочастиц неизвестного происхождения в объеме воды, в том числе, высокой степени очистки (бидистиллированной, деионизированной), было продемонстрировано неоднократно с помощью разных методов физического анализа, упомянутых, в частности, в обзоре [1]. Визуализация «стабильных водных кластеров» размером от десятков нанометров до миллиметра в высохшем осадке сверхчистой воды при сверхвысоком разведении NaCl (10^{-7} М) была впервые осуществлена с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) и атомно-силового микроскопа (АСМ) в 1996 году [2]. Впоследствии с помощью этой же техники в осадке воды сверхвысокого разведения был выявлен целый набор гелеобразных водных кластеров: стержни, двойные спирали, шары, петли [3], составленные из шаровых структур диаметром в десятки нанометров. Авторы полагают, что «стабильные водные кластеры» являются формой мягкой материи, близкой по структуре к EZ [4]. Критический анализ данных [2,3] представлен в обзоре [5]. Было показано также [6], что сильно серийно разведенные растворы, независимо от того, включают ли они органические соли, амфифильные или липофильные вещества, спонтанно образуют кластеры от 100 до 300 нм с поверхностным потенциалом от -2 до -20 мВ. При защите растворов от внешних электромагнитных полей пермаллоевым экраном кластеры не образуются [7]. Группа авторов [8-11] разработала способ получения стабильных водных структур путем длительного повторного возмущения определенного объема высокоочищенной воды гидрофильными объектами (пластины нафтона, целлофан, производные целлюлозы, и т.д.). После этого физико-химические свойства используемой воды изменялись качественно сходным образом и приближались к физико-химическим свойствам EZ. Лиофилизация такой воды приводила к образованию твердотельного осадка. Наше мнение относительно данного способа и оценки его результатов изложено в обзоре [1]. Существует также представление о водных структурах как о конструкциях из нанопузырьков газа [12]. Необходимо отметить, что участие внешних электромагнитных полей в организации водных структур – когерентных доменов – очень популярно среди современных исследователей [13].

Рассмотрим некоторые результаты нашей работы и сравним их с перечисленными выше. Исследование тонкого слоя дистиллированной воды (~ 8 мкм) через оптический микроскоп позволило обнаружить в ней присутствие микрочастиц дисперсной фазы (ДФ) – прозрачных сферических элементов диаметром ~ 10 мкм с темной частицей в центре [14]. Микрочастицы объединялись в агрегаты размером до нескольких сотен микрометров. Как показали наши исследования, центральная структурообразующая частица представляет собой микрокристалл хлорида натрия, а окружающая его сфера – жидкокристаллическую оболочку гидратной воды. Состав, физические свойства и вероятное происхождение ДФ воды обсуждается в работах [14,15]. Там же предложена динамика фазовых переходов в высыхающих тонких пленках воды с образованием крупных кристаллов хлорида натрия. Крупные скопления кристаллического NaCl можно было наблюдать при высыхании и растрескивании толстого слоя (~1 мм) дисперсной фазы дистиллированной воды, заключенной в препарате между предметным и покровным стеклами [16].

Присутствие крупных кристаллов хлорида натрия в осадках высокоомной дистиллированной воды могло говорить только о том, что эта соль присутствовала в растворе не в виде ионов, а в виде молекул. Неужели этот феномен наблюдали только мы? Возвращаясь к работе [2], мы обратили внимание на фотографию высохшей капли солевого раствора при сверхвысоком разведении сверхчистой водой: 10^{-7} М NaCl (рис. 1, верхний ряд).

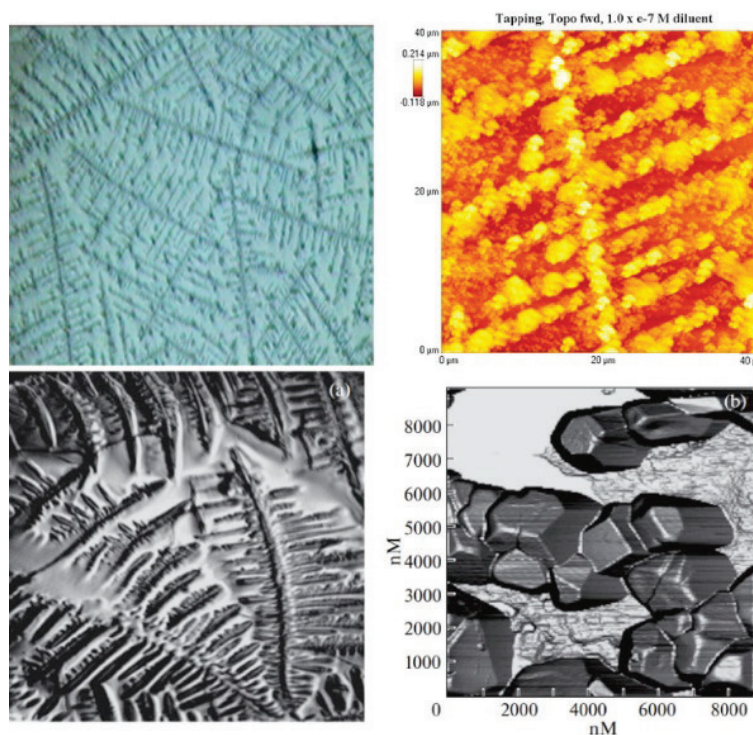


Рисунок 1. Верхний ряд – иллюстрации из статьи [2]: рельеф, видимый под обычным световым микроскопом (слева) и атомно-силовым микроскопом (справа). Нижний ряд – иллюстрации из статьи [17]: слева – картина, видимая под обычным световым микроскопом (кристаллизация NaCl при высыхании капли белково-солевого раствора); справа – кристаллы NaCl из фрактальных кластеров левого рисунка, видимые под атомно-силовым микроскопом

Авторы работы полагают, что фрактальные кластеры, образовавшиеся при этом, представлены кластерами воды. Приводим цитату [2, с. 2]: «Все горизонтальные линии пересекаются с вертикальной линией под углом 102° . Это тот же самый угол, который образуют два атома водорода, взаимодействующие с атомом кислорода в молекуле воды. Можно было бы заключить, что это могло быть случайным, но авторы предполагают, что это проявление закона масштабирования». Мы не можем согласиться с этим утверждением, поскольку при большем увеличении изображения видно, что фрактальные кластеры, растущие в высыхающих каплях, представлены кристаллами NaCl (рис. 1, нижний ряд). Значит, опять этот загадочный хлорид натрия где-то прятался, а проявился только при испарении свободной воды. Вот и в предыдущей нашей работе [18] после испарения дистиллированной воды со стеклянной поверхности при комнатных условиях остаются крупные кристаллы соли

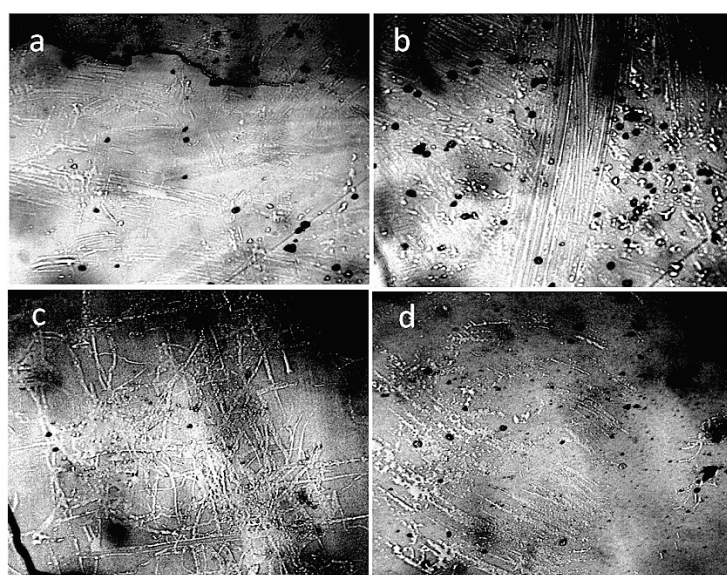


Рисунок 2. Осадок на стекле после испарения свободной воды со стеклянной поверхности под оптическим микроскопом (разные поля зрения). Видны тяжи неиспаряющейся гелеобразной воды и кристаллы NaCl (темные точки). На рисунке (b) виден след от деревянной зубочистки, деформировавший гелеобразные отложения [18]. Ширина каждого кадра – 3 мм

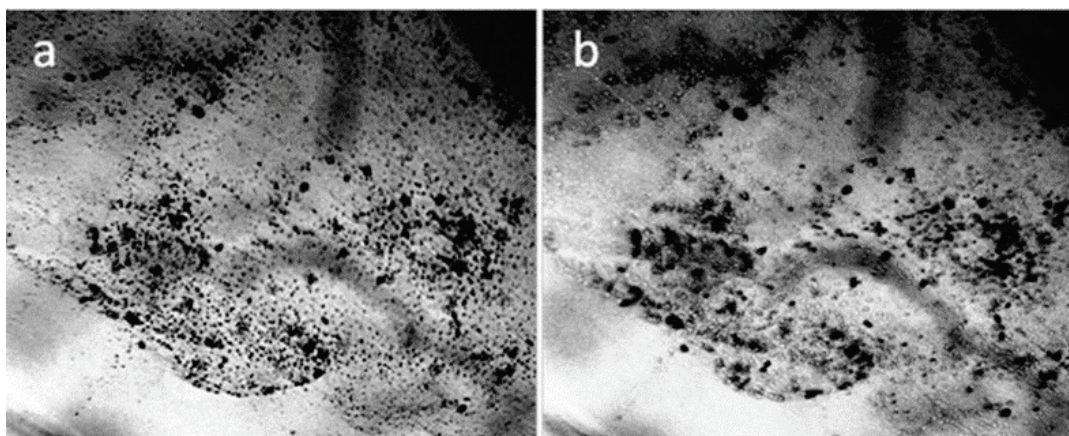


Рисунок 3. Фрагмент осадка ДФ дистиллированной воды на дне чашки Петри под оптическим микроскопом: а – в обычном режиме просмотра; б – при изменении фокусного расстояния объектива. Видны крупные монокристаллы (темные образования) и растущие микрокристаллы соли (б, белые точки), высота которых превышает среднюю высоту препарата (см. [15]). Микрофото. Ширина каждого кадра 3 мм [18]

и тяжи неиспаряющейся гелеобразной воды (рис. 2). В редких островках ДФ при изменении фокусного расстояния можно видеть возвышающиеся над структурами белые точки: кристаллы NaCl? (рис. 3).

Подтвердить или опровергнуть наши предположения о том, где скрывается молекулярный NaCl, находясь в высокоомной дистиллированной воде, можно было только проведя дополнительные исследования с помощью электронной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данной темы мы работали с дистиллированной водой ГОСТ 6709-72 (рН 6,6 удельная электропроводность 5 мкСм/см). Небольшой объем воды (~20 мкл) помещали на поверхность нового предметного стекла ApexLab, предварительно промытого в дистиллированной воде, и оставляли для испарения при комнатных условиях в защищенном от пыли пластмассовом коробе. На следующий день препараты извлекали и просматривали через оптический микроскоп Levenhuk с видеокамерой, сопряженной с компьютером, при помощи программы TourView, отмечая участки, предназначенные для исследования под сканирующим электронным микроскопом JEOL JSM – 6390 LA (СЭМ). Предметом наших интересов были скопления ДФ и кристаллы NaCl. На рисунке 4 показано скопление ДФ в виде небольших шариков с более темной центральной частью и мелкие кристаллы соли.

При большем увеличении микроскопа можно убедиться, что кристаллы соли формируются на поверхности ДФ (рис. 5).

В настоящее время классическая теория кристаллизации минералов из растворов активно пересматривается [19-23]. Согласно результатам моделирования [22,23], поведение растворенного NaCl в воде зависит от концентрации ионов. С увеличением концентрации NaCl поведение растворенных ионов Na^+ и Cl^- трансформируется из диспергированного в агрегированное состояние в воде. Агрегатам присущи гидрофобные свойства, что значительно снижает порог кристаллизации [23]. Происходит образование докритических жидкоподобных (аморфных) кластеров – предзародышей. На втором этапе происходит трансформация

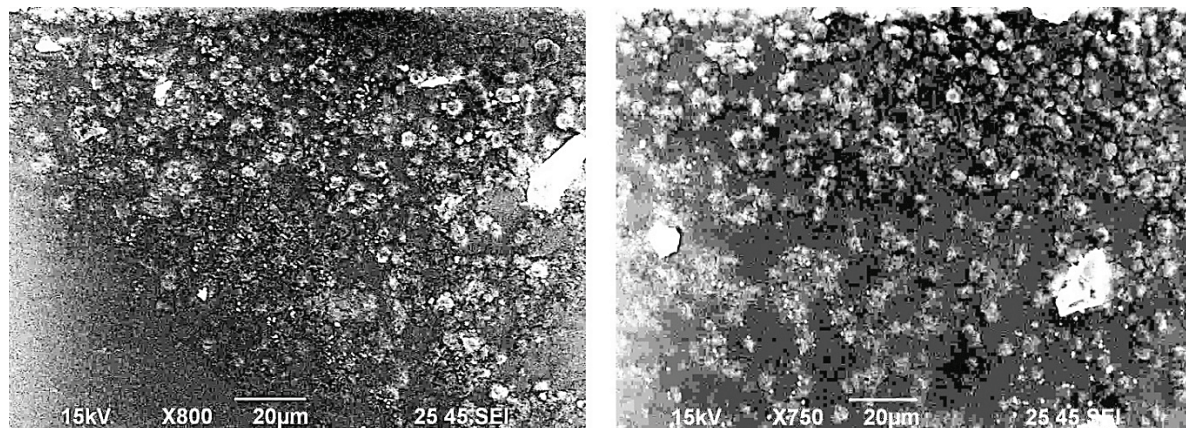


Рисунок 4. Дисперсная фаза воды под СЭМ. Слева – ДФ в «облаке» крошечных кристаллов соли; справа – компактное расположение кристаллов соли (левый участок кадра) над расплавляющимися участками ДФ (см. [15])

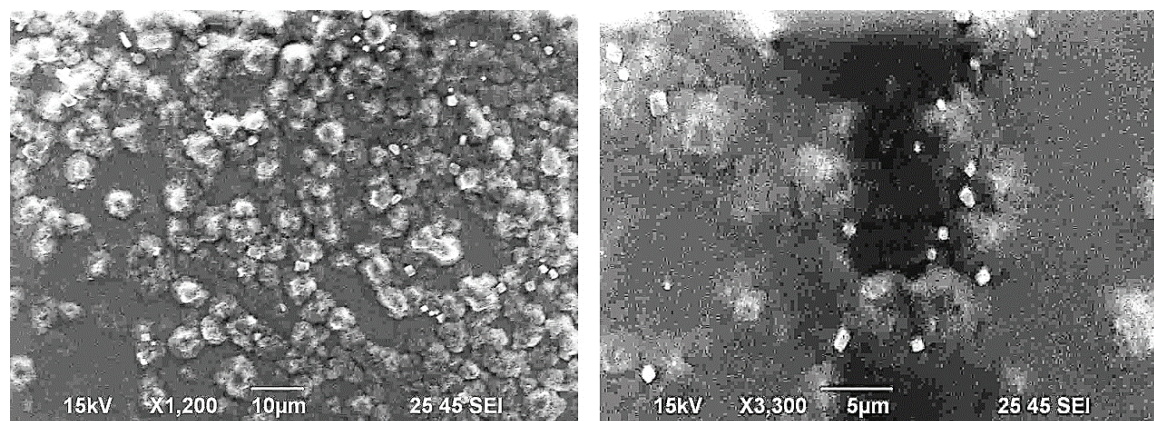


Рисунок 5. ДФ воды и кристаллы NaCl при большем увеличении: скопления мелких кристаллов расположены на поверхности ДФ

предзародыша в зародыш [19]. Наши данные говорят о том, что ДФ также может являться активным участником фазовых переходов NaCl, наблюдаемых в растворе.

Во-первых, испарение свободной воды сопровождается повышением осмотического давления в оставшемся объеме жидкости, что приводит к началу расплавления гидратных оболочек [14,15] и частичному обнажению содержащихся внутри них микрокристаллов соли. На представленных здесь фотографиях видно, что верхняя часть элементов ДФ покрыта мелкими кристаллами NaCl. Кроме того, можно наблюдать более крупные кристаллы поверх слоя ДФ. Структура и свойства гидратных оболочек соответствуют структуре и свойствам EZ [4,8-11]. По свидетельству авторов [24], EZ имеет губчатое строение, где стенки губки представлены плотной высокоструктурированной водной фазой, а ячейки заполнены обычной водой. Подобно гидрогелю [25], такая структура обладает большой впитывающей способностью. По мере испарения свободной воды, вода, заключенная в гидратных оболочках, испаряется медленнее. Этот факт следует учитывать при рассмотрении динамики фазовых переходов в рассматриваемой системе.

Что касается тяжелой неиспаряющейся гелеобразной воды, то при рассмотрении под СЭМ становится заметным включение в них мелких кристаллических образований, которые способны к росту и разрушению данных структур (рис. 6). Если тяжи состоят из EZ, то растущие на них солевые структуры «вытягивают» содержащуюся в них свободную воду, что приводит к нарушению целостности данных тяжей.

Наряду с классическими кубическими кристаллами NaCl в препаратах встречались кристаллы, образованные по неклассическому типу: микро-наноблочным способом [19]. Пример такого типа кристалла представлен на рисунке 7.

Проведенное электронномикроскопическое исследование и анализ литературы дают основание полагать, что многие данные о «стабильных водных структурах», накопленные к настоящему времени, требуют пересмотра. Так, фрактальные кластеры в высыхающих каплях образованы не водой [2], а хлоридом натрия, которого теоретически не могло быть при таком высоком разведении. Получение таких структур не требует никаких предварительных манипуляций с водой [2,3,6-11], поскольку эти структуры присутствуют в ней изначально. Изоляция растворов от внешних электромагнитных полей пермаллоевым экраном, по нашим данным [26], никак не сказывается на их структуре и динамике. Наиболее важным направлением дальнейших исследований считаем выяснение механизма взаимодействия хлорида натрия (в ионном и кристаллическом виде) с обычной и структурированной (EZ) водой.

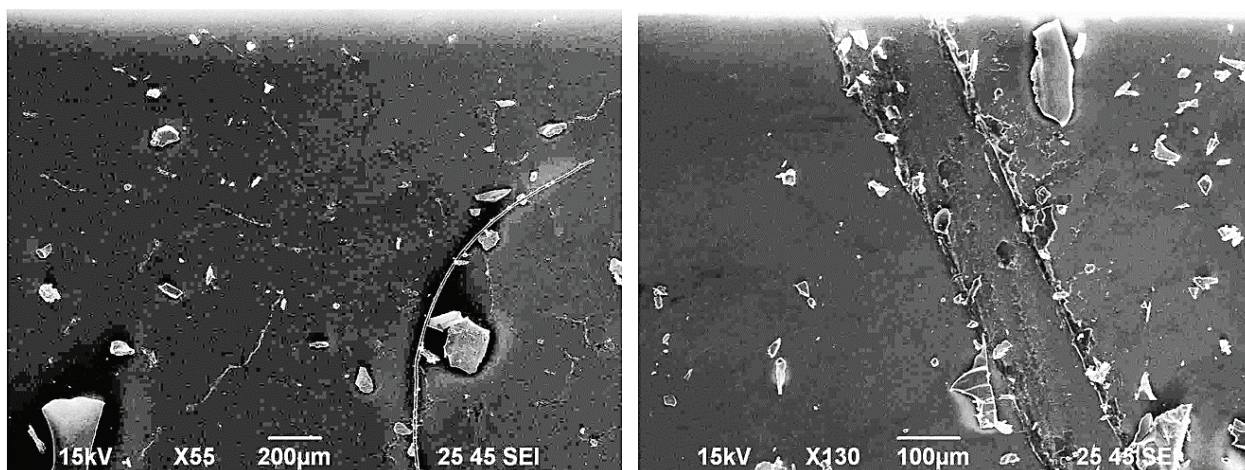


Рисунок 6. Гелеобразные тяжи неиспаряющейся воды с прорастающими из них кристаллами NaCl

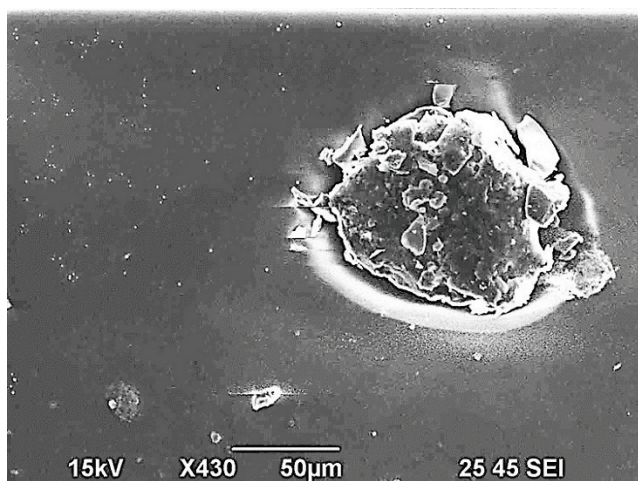


Рисунок 7. Пример неклассической кристаллизации NaCl при испарении свободной воды со стеклянной поверхности

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ИПФ РАН, проект № 0030-2021-0014.

Список литературы / References:

1. Yakhno T.A., Yakhno V.G. Water as a Microdispersed System. Water “Activation” Mechanism. Water Phases at Room Conditions. *WATER SPECIAL EDITION: Evidence of Water Structure*, 2022, doi: 10.14294/WATER.2021.S2.
2. Lo S.Y., Geng X., Gann D. Evidence for the existence of stable-water-clusters at room temperature and normal pressure. *Phys. Lett.*, 2009, vol. 373, pp. 3872-3876, doi: 10.1016/j.physleta.2009.08.061.
3. Lo A., Cardarella J., Turner J., Lo S.Y. A soft matter state of water and the structures it forms. *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 2012, vol. 3, no. 3-4, pp. 237-252, doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2013007847.
4. Pollack G. *The fourth phase of water: beyond solid, liquid, and vapor*. Seattle, WA: Ebner and Sons Publishers, 2013, 320 p.
5. Ho M.W. Large supramolecular water clusters caught on camera – A Review. *Water*, 2014, doi: 10.14294/WATER.2013.12.
6. Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V., Konovalov A.I. Properties of supramolecular nanoassociates formed in aqueous solutions of biologically active compounds in low or ultra-low concentrations. *Doklady Physical Chemistry*, 2009, vol. 428, pp. 196-200.
7. Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Konovalov A.I. Action of the external electromagnetic field is the condition of nanoassociate formation in highly diluted aqueous solutions. *Doklady Physical Chemistry*, 2011, vol. 440, pp. 201-204.
8. Elia V., Ausanio G., De Ninno A., Gentile F., Germano R., Napoli E., Niccoli M. Experimental evidence of stable aggregates of water at room temperature and normal pressure after iterative contact with a Nafion® polymer membrane. *WATER*, 2013, vol. 5, pp. 16-26, doi: 10.14294/WATER.2013.4.
9. Elia V., Germano R., Napoli E. Permanent dissipative structures in water: the matrix of life? Experimental evidences and their quantum origin. *Curr. Top Med. Chem.*, 2015, vol. 15, pp. 559-71.
10. Elia V., Napoli E., Germano R., Oliva R., Roviello V., Niccoli M., Amoresano A., Naviglio D., Ciaravolo M., Trifuoggi M., Yinnon T.A. New chemical-physical properties of water after iterative procedure using hydrophilic polymers: The case of paper filter. *J. Mol. Liq.*, 2019, vol. 296, e111808.
11. Elia V., Napoli E., Germano R., Roviello V., Oliva R., Niccoli V., Amoresano A., Toscanesi M., Trifuoggi M., Fabozzi A., Yinnon T.A. Water perturbed by cellophane: comparison of its physicochemical properties with those of water perturbed with cotton wool or Nafion. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2021, vol. 146, pp. 2073-2088, doi: 10.1007/s10973-020-10185-0.
12. James R.T., Seddon and Detlef Lohse. Nanobubbles and micropancakes: gaseous domains on immersed substrates. *J. Phys. Condens. Matter*, 2011, vol. 23, pp. 22.
13. Del Giudice E., Vitiello G. Role of the electromagnetic field in the formation of domains in the process of symmetry-breaking phase transitions. *Phys. Rev. A.*, 2006, vol. 74, e022105, pp. 1-9.
14. Yakhno T., Yakhno V.A. study of structural organization of water and aqueous solutions by means of optical microscopy. *Crystals*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 52, doi: 10.3390/cryst9010052.
15. Yakhno T., Drozdov M., Yakhno V. Giant Water Clusters: Where Are They From? *Int. J. Mol. Sci.* 2019, vol. 20, pp. 158, doi: 10.3390/ijms20071582.
16. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Физико-химическая эволюция дисперсной фазы воды при ее высыхании. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 1, с. 9-16. [Yakhno T.A., Yakhno V.G. Physico-chemical evolution of the dispersed phase of water during its drying. *Topical issues of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 9-16. (In Russ.)]

17. Yakhno T.A. Sodium chloride crystallization from drying drops of albumin-salt solutions with different albumin concentrations. *Technical Physics*, 2015, vol. 60, no. 11, pp. 1601-1608.
18. Yakhno T., Sanin A., Yakhno V. Microstructure of water sediments on hydrophilic surfaces. *World Journal of Condensed Matter Physics*, 2022, preprint: <https://arxiv.org/abs/2205.10542>.
19. Асхабов А.М. Предзародышевые кластеры и неклассическое кристаллообразование. *Записки российского минералогического общества*, 2019, ч. CXLVII, № 6. [Askhabov A.M. Pre-germinal clusters and non-classical crystal formation. *Notes of the Russian Mineralogical Society*, 2019, Part CXLVII, no. 6, doi: 10.30695/zrmo/2019.1486.00. (In Russ.)]
20. Линников О.Д. Механизм формирования осадка при спонтанной кристаллизации солей из пересыщенных водных растворов. *Усп. хим.*, 2014, т. 83, № 4, с. 343-364. [Linnikov O.D. The mechanism of sediment formation during spontaneous crystallization of salts from supersaturated aqueous solutions. *Russian Chem. Reviews*, 2014, vol. 83, no. 4, pp. 343-364, doi: 10.1070/RC2014v083n04ABEH004399. (In Russ.)]
21. Cölfen H. Nonclassical Nucleation and Crystallization. *Crystals*, 2020, vol. 10, no. 61, doi: 10.3390/cryst10020061.
22. Jiang H., Debenedetti P.G., Panagiotopoulos A.Z. Nucleation in aqueous NaCl solutions shifts from 1-step to 2-step mechanism on crossing the spinodal. *J. Chem. Phys.*, 2019, vol. 150, pp. 124502, doi: 10.1063/1.5084248.
23. Sun Q., Cui S., Zhang M. Homogeneous Nucleation Mechanism of NaCl in Aqueous Solutions. *Crystals*, 2020, vol. 10, no. 107, doi: 10.3390/cryst10020107.
24. Hwang S.G., Hong J.K., Sharma A., Pollack G.H., Bahng G. Exclusion zone and heterogeneous water structure at ambient temperature. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 4, e0195057, doi: 10.1371/journal.pone.0195057.
25. Chang S., Jensen K.H., Kim W. Dynamics of water imbibition through hydrogel-coated capillary tubes. *Phys. Rev. Fluids*, 2022, vol. 7, e064301, doi: 10.1103/PhysRevFluids.7.064301.
26. Яхно Т.А., Яхно В.Г. «Феномен капли кофе» и его временные флуктуации. Автономные колебательные процессы в коллоидных жидкостях. *ЖТФ*, 2017, т. 87, № 3, с. 323-330. [Yakhno T.A., Yakhno V.G. "The phenomenon of a drop of coffee" and its temporal fluctuations. Autonomous oscillatory processes in colloidal liquids. *ZhTF*, 2017, vol. 87, no. 3, pp. 323-330. (In Russ.)]

ELECTRON MICROSCOPY OF THE DISPERSED PHASE OF DISTILLED WATER

Yakhno T.A., Bogdanov S.A., Sanin A.G., Yakhno V.G.

FRC Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences

Ulyanov str. 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: yakhta13@gmail.com

Received 08.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0478

Abstract. This article continues a series of works by the authors on the study of the dispersed phase of water using an optical microscope. Previously, it was found that each unit of the dispersed phase is a NaCl microcrystal surrounded by a thick layer of water of hydration, which prevents its dissolution. When free water evaporates from the glass surface, the osmotic pressure in the remaining water increases, which leads to the dissociation of hydration shells and contact of the salt with water. After complete evaporation, large NaCl crystals and gel-like non-evaporating water remain on the glass substrate. The use of a scanning electron microscope made it possible to reveal a number of previously unknown details: the formation of small crystals of sodium chloride on the surface of the dispersed phase of water and the growth of crystals on filaments of gel-like water. According to the authors, a significant part of NaCl in high-resistivity water is in the form of crystals inside the dispersed phase, which manifests itself after the evaporation of free water. The versions of other authors who observed "stable water clusters" in serially diluted solutions are discussed.

Key words: water microstructures, dispersed phase, sediment after evaporation, crystallization of NaCl.

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОТМЫВАНИЯ КЛЕТОК *CHARA FRAGILIS* ОТ РАСТВОРОВ ФИТОКОМПОЗИЦИИ ОДУВАНЧИК-ЗВЕРОБОЙ-КАЛЕНДУЛЫ**Гасанова А.Э.^{1,2}, Мусаев Н.А.¹, Оджажвердиева С.Я.¹**¹ Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: ahasanova89@gmail.com

² Институт ботаники НАН Азербайджана

Бадамдарское ш., 40, г. Баку, AZ1004, Азербайджан

Поступила в редакцию 09.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0479

Аннотация. С помощью микроэлектродной техники изучали закономерности изменения потенциала (ϕ_m) и сопротивления (R_m) плазматической мембраны (ПМ) клеток *Chara fragilis* в присутствии растворов фитокомпозиции Одуванчик – Зверобой – Календулы (ОЗК). Значения ϕ_m и R_m в стандартных условиях среды разбросаны в широких пределах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом·м² соответственно. Среднее значение ϕ_m составило $-183 \pm 4,9$ мВ, $R_m = 9,2 \pm 1,2$ Ом·м². Используя зависимости ϕ_m , R_m от концентрации K^+ в наружной среде, определяли диапазоны активации K^+ -каналов наружного (ККНВ) и внутреннего (ККВВ) выпрямления. При действии фитокомпозиции ОЗК, пока клетка находилась в среде с концентрацией композита 10^{-1} или 1 мг/мл, в течение 25 мин изменения ϕ_m и R_m нами не были выявлены. Стимуляция или подавление транспортных процессов под влиянием композитов происходили только при исключении ОЗК из состава питательной среды и при ступенчатом увеличении концентрации композиции в среде. Электрофизиологические эффекты действия композиции ОЗК обсуждаются с точки зрения его действия на липидную фазу плазматической мембраны опытной клетки.

Ключевые слова: *Chara fragilis*, мембранный потенциал, мембранное сопротивление, фитопротекторы, H^+ -помпа, K^+ -каналы.

Поиск эффективных способов повышения радиорезистентности биообъектов, в большинстве случаев основан на тестировании натуральных продуктов растительного происхождения, благодаря их способности длительно действовать без каких-либо токсических и побочных эффектов. С другой стороны, они широко распространены в природе. К таким растениям можно отнести *Taraxacum officinale* (одуванчик обыкновенный), *Hypericum* (зверобой) и *Caléndula* (календула). Все три отмеченных растения обладают радиопротекторным свойством и удачно применяются на практике фитотерапии [1,3,7-9,13-16]. Целью настоящей работы было выявление возможных механизмов модификации компонентов транспортной системы плазматической мембраны клеток *Chara fragilis* при экзогенном воздействии композиции экстрактов ОЗК.

Первичной мишенью любого экзогенного фактора при воздействии на клетки растений является их плазматическая мембрана. Компонентами системы первичного активного транспорта ПМ, являются H^+ -помпа с высокой электрогенной активностью и два типа K^+ -каналов: K^+ -каналы внутреннего выпрямления (ККВВ), K^+ -каналы наружного выпрямления (ККНВ). Выявленные закономерности действия ОЗК на эти компоненты мембранного транспорта могут быть использованы для осуществления детализации клеточных механизмов действия радиопротекторной способности названных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились с использованием междоузловых клеток водоросли *Chara fragilis*. Водоросли отбирались из пруда «Катиб Булагы», образованного из сточных вод нескольких горных родников в Товузском районе. *Chara fragilis* принадлежит к семейству *Characeae* Ag. *Emand Hollerb* из класса *Charaphyceae*. Междоузловые клетки *Chara fragilis* в качестве объекта электрофизиологических исследований впервые были использованы нами [10]. Длина зрелых междоузловых клеток *Chara fragilis* достигала 5-8 см, диаметр 0,4-1 мм. Большие размеры междоузловых клеток *Chara fragilis* позволяют использовать их в длительных (многочасовых, многосуточных) экспериментах с применением стеклянных микроэлектродов. Минеральный состав воды «Катиб Булагы» определялся методом атомно-абсорбционной спектроскопии с применением спектрофотометра ААС-1, фирмы Bruker (Германия), что соответствовал минеральному составу искусственной прудовой воды (ИПВ), содержащей катионов (в М/л) $0,1 K^+$, $1 Na^+$, $0,4 Ca^{2+}$, $0,3 Mg^{2+}$ и анионов $1,0 Cl^-$, $0,1 HCO_3^-$, $0,1 NO_3^-$, $0,1 PO_4^{3-}$, $0,2 SO_4^{2-}$ при рН - $6,9 \div 7,2$ [10].

Для обеспечения высокой точности измерения сопротивления мембран использовали клетки длиной не более 20 мм [10]. Эта величина соответствовала длине второй мутовки от верхушки растений *Chara fragilis*. Измерения основных электрофизиологических параметров проводились с помощью двухэлектродной методики Хогга, разработанной для клеток цилиндрической формы [11,12]. Метод Хогга позволял одновременно и непрерывно регистрировать мембранный потенциал ϕ_m и сопротивление R_m экспериментальных клеток.

Для получения фитокомпозиции в качестве исходного препарата брали сухой порошок экстракта корня одуванчика, зверобоя и лепестков календулы. Порошковый экстракт был изготовлен из трав фармацевтической компании «Herba-Flora», Азербайджан. Композиционная смесь этих растений экстрагировалась из порошков в

равной пропорции 70%-ным этанолом. Сырье и экстрагент в соотношении 1:15 перемешивали 10 минут на магнитной мешалке при комнатной температуре, затем фильтровали. Экстракцию с последующей фильтрацией повторяли трижды. Затем фильтраты упаривали на роторном испарителе в вакууме досуха [5]. Рабочие растворы сухого экстракта готовили на ИПВ. Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась по законам вариационной статистики [2]. Графики кинетических зависимостей построены с использованием компьютерной программы SigmaPlot12.0, на основе данных 7-8 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку клетки *Chara fragilis* впервые были внедрены нами в практику электрофизиологических исследований, на начальном этапе экспериментальной работы проведён статистический анализ распределения электрофизиологических показателей по числам клеток в стандартных условиях. Оказалось, что стационарные значения φ_m и R_m разбросаны в довольно широких пределах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом \cdot м² соответственно. Среднее значение φ_m составило $-183 \pm 4,9$ мВ. Объем выборки экспериментального материала n составил 106. Распределение φ_m по числам клеток подчинялось закону нормального распределения Гаусса–Муавра–Лапласа. Значение сопротивления мембраны, рассчитанное от уровня сопротивления клеточной оболочки, составило $9 \pm 1,2$ Ом \cdot м² ($n = 45$). Распределение значений R_m не подчинялось закону нормального распределения.

Ярко выраженные биоэлектрические эффекты фитокомпозиции ОЗК обнаружили в присутствии 10^{-1} или 1 мг /мл концентраций фитопротектора. Однако пока клетки находились в среде с 10^{-1} или 1 мг/мл концентрации композита, изменения φ_m и R_m в течение 25 мин нами не выявлены (рис. 1, 2). Стимуляция или подавление транспортных процессов, индуцированные под влиянием композита происходили только на фоне постепенного исключения ОЗК из состава питательной среды (рис. 1, 2). Такой «аномальный» эффект фитокомпозиции нами был назван «эффектом отмывания». Здесь употребление прилагательного «аномальный» совершенно логично по той причине, что обычно эффект модификатора проявляется накануне его воздействия. Однако в анализируемом случае биоэлектрический эффект фитопротектора проявился при его исключении из состава питательной среды.

Изменения φ_m и R_m накануне «эффекта отмывания» качественно и количественно определялись исходным уровнем φ_m и концентрацией фитопротектора. Причем, если φ_m находился в диапазоне активации ККНВ, то обнаружили стимуляцию транспортных процессов через плазматическую мембрану (рис. 1, а). Абсолютное значение φ_m при этом возрастало на 16-20 мВ. Гиперполяризация ПМ сопровождалась уменьшением R_m . Однако, если φ_m находился в диапазоне активации ККВВ, то обнаружили подавление транспортных процессов через ПМ. При этом ПМ деполяризовалась на 30-35 мВ, а R_m оставалось на постоянном уровне (рис.1, б).

Увеличение R_m на фоне гиперполяризации ПМ мы обнаружили у клеток, φ_m которых находились в диапазоне активации ККНВ, при введении в среду увеличенной концентрации фитокомпозита 1 мг / мл (рис. 2а). Однако у клеток, φ_m которых находились в диапазоне активации ККВВ, увеличение R_m сопровождалось деполяризацией ПМ в пределах 10 мВ (рис. 2б).

Совершенно иное качество приобрела биоэлектрическая реакция клетки *Chara fragilis* при ступенчатом увеличении концентрации фитопротектора в составе ИПВ (рис. 3). Появление 10^{-1} мг / мл ОЗК в среде, как и прежде не вызвало ответную биоэлектрическую реакцию ПМ исследуемых клеток. Однако при последующем 10-ти кратном увеличении концентрации фитокомпозита в среде выявили существенные изменения φ_m и R_m . Причём, характер изменения параметров зависел от типа K^+ - каналов ПМ, которые находились в активном состоянии (рис. 3).

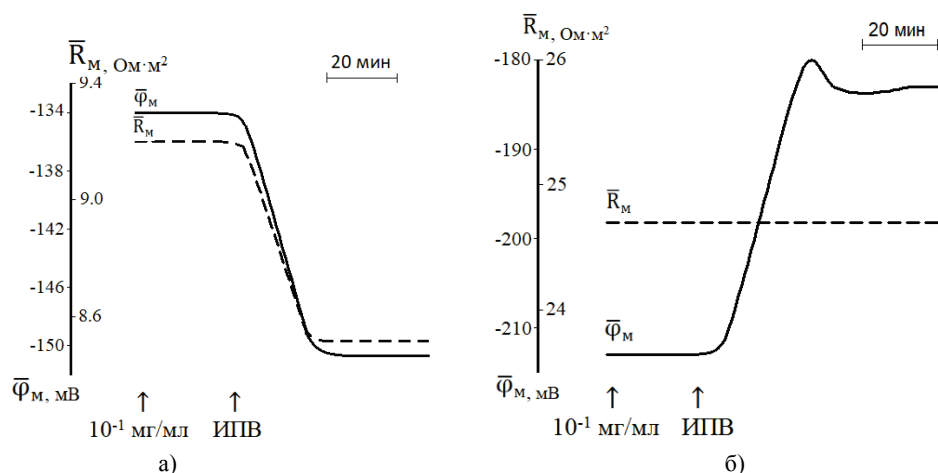


Рисунок 1. Кинетика изменения электрических параметров ПМ клеток *Chara fragilis*, φ_m которых находились в диапазоне активации ККНВ (а) и ККВВ (б) под влиянием 10^{-1} мг / мл концентрации композита ОЗК. Стрелками на рисунке указаны моменты введения в среду соответствующих концентраций композиции и ИПВ. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 20,2 мм, 0,45 мм; при б) 19,0 мм, 0,48 мм

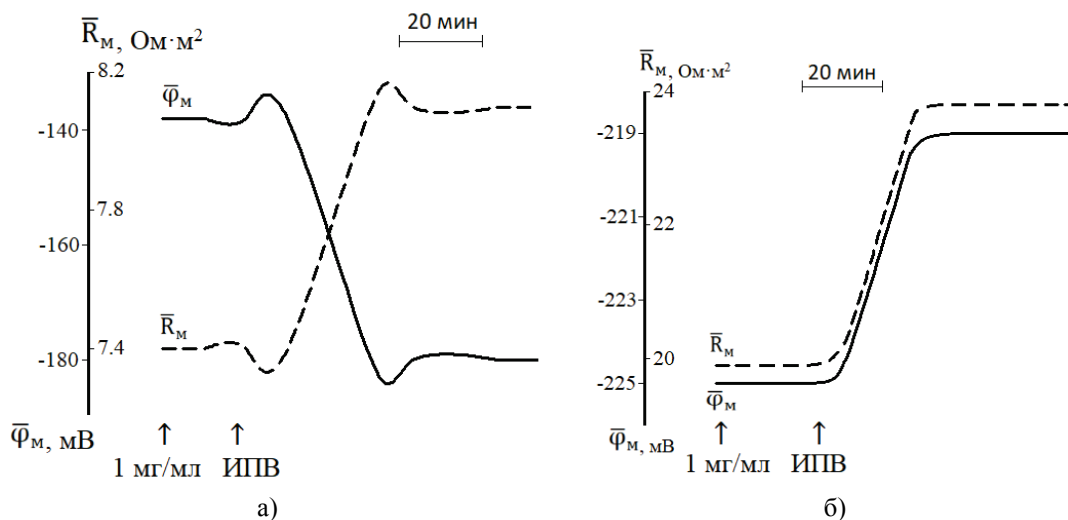


Рисунок 2. Протокол изменения средних значений потенциала $\bar{\varphi}_m$ и сопротивления \bar{R}_m ПМ клеток *Chara fragilis* в диапазоне активации ККНВ (а) и ККВВ (б) под действием 1 мг/мл композита ОЗК. На рисунке стрелками указаны моменты включения в состав среды 1 мг/мл композита и момент подачи чистой ИПВ. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 20 мм, и 0,45 мм; при б) 19,2 мм и 0,44 мм

Если мембранный потенциал клеток находился в диапазоне активации ККВВ, то заметное уменьшение R под действием 1 мг/мл композиции ОЗК выявлено на фоне постоянного φ_m (рис. 3, а). Отмывание клетки от фитокомпозиции ОЗК приводило к деполяризации ПМ на 55 мВ, после чего φ_m установился на стационарном уровне. Мембранное сопротивление R_m при этом переходя через минимум (на четверть меньше исходной величины) также установился на стационарном уровне. Таким образом, конечные стационарные уровни φ_m и R_m в ИПВ не совпадали с их уровнями в стандартных условиях среды (рис. 3). Если мембранный потенциал клеток находился в диапазоне активации ККНВ, то введение в среду 10^{-1} мг/мл ОЗК в среде не вызвало достоверного изменения параметров φ_m и R_m . Однако увеличение концентрации композиции до 1 мг/мл вызывало существенное изменение средних величин параметров φ_m и R_m (рис. 3, б). Таким образом средняя величина мембранного сопротивления установилась на 2,4 Ом m^2 меньше исходного уровня, а абсолютное значение средней величины мембранного потенциала уменьшилось на 30 мВ. Исключение из состава питательной среды не приводило к восстановлению параметров ПМ на своих исходных уровнях (рис. 3, б). Среднее значение φ_m установилось на уровне, превышающем его исходный уровень на 30 мВ, а R_m установился на уровне ниже, чем 10% от исходного уровня. Это свидетельствует о стимуляции электрогенной системы ПМ. А совокупность установленных данных свидетельствует о том, что действие фитокомпозиции ОЗК на компоненты первичного ионного транспорта происходит необратимо. Вероятно, протекторное действие этого класса веществ осуществляется через модификацию транспортных свойств ПМ клеток объекта, который подвергается облучению. На фоне такого предположения необходимо задуматься о факте усиления электрогенной активности ПМ клеток, φ_m которых

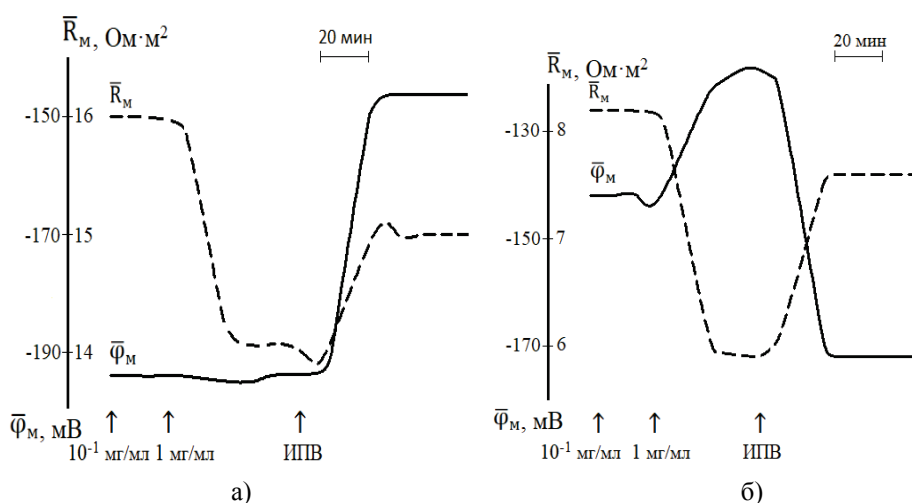


Рисунок 3. Кинетика изменения $\bar{\varphi}_m$ и \bar{R}_m клеток *Chara fragilis* мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации ККВВ (а) и ККНВ (б) при последовательном введении в среду 10^{-1} и 1 мг/мл композиции ОЗК. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 18,6 мм и 0,45 мм; при б) 18,2 мм и 0,42 мм

находились в диапазоне активации ККНВ (рис. 1 а; 2 а) после обработки композитом протекторов. А когда речь идёт о модификации транспортной системы, следует учесть, что её основными компонентами являются 2 типа K^+ -каналов и H^+ -помпа. Оба компонента проявляют функциональную активность только при наличии специального липидного окружения. Многочисленными данными [2,4,6] подтверждены, что липидная фаза биомембран является стерическим регулятором активности мембранных белков. Исходя из такой логики можно предположить, что воздействие фитокомпозиита возможно на оба компонента ионтранспортной системы: на функционально активную конформацию двух типов K^+ -каналов и H^+ -помпы, а также на физическое состояние липидной фазы ПМ. Однако установленные факты показывают, что компоненты системы первичного активного транспорта при действии композиита не только сохраняют функциональную активность, но даже при определённых условиях усиливают её. Поэтому мы предполагаем, что регуляция функциональной активности компонентов системы первичного транспорта ионов ПМ осуществляется её липидной фазой. Такое предположение оправдано тем, что фитокомпозиит ОЗК обладает органической природой [1,7,8] и удачно может адсорбироваться поверхностью липидной фазы ПМ. Вероятно, по этой причине все эффекты фитокомпозиита проявляются накануне его отмывания из клеток на ИПВ.

Список литературы / References:

1. Горьков В.А. и др. Фитотерапия умеренных депрессий препаратами зверобоя (аналитический обзор). *Психиатрия и психофармакотерапия*, 2000, т. 2, № 6. [Gorkov V.A. et al. Herbal medicine for moderate depression with St. John's wort (analytical review). *Psychiatry and psychopharmacotherapy*, 2000, vol. 2, no. 6. (In Russ.)]
2. Демидчик В.В. Мембранные механизмы регуляции активности ионов кальция в цитоплазме клеток высших растений. *Труды БГУ*, 2012, т. 7, № 1, с. 99-105. [Demidchik V.V. Membrane mechanisms of regulation of the activity of calcium ions in the cytoplasm of cells of higher plants. *Proceedings of BSU*, 2012, vol. 7, no. 1, pp. 99-105. (In Russ.)]
3. Дробижев М.Ю. и др. Гелариум гиперикум при лечении депрессий в общесоматической сети. *Consilium Medicum., Медиа Медика*, 2002, т. 4, № 5. [Drobizhev M.Yu. et al. Gelarium Hypericum in the treatment of depression in the general somatic network. *Consilium Medicum., Media Medica*, 2002, vol. 4, no. 5. (In Russ.)]
4. Мусаев Н.А. *Биофизические механизмы модификации транспортных свойств плазматической мембраны растительных клеток*. Докторская диссертация, Баку, 2012, 336 с. [Musaev N.A. *Biophysical mechanisms of modification of the transport properties of the plasma membrane of plant cells*. Doctoral dissertation, Baku, 2012, 336 p. (In Russ.)]
5. Перельман Я.М. *Анализ лекарственных форм. Практическое руководство*. Л. Медгиз, 1961, 616 с. [Perelman Ya.M. *Analysis of dosage forms. Practical Guide*. L. Medgiz, 1961, 616 p. (In Russ.)]
6. Hasanova A.E., Musayev N.A. Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (Characeae) cells. *Ukrainian Botanical Journal, M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine*, 2020, vol. 77, no. 5, pp. 398-404.
7. Ahmad V., Yasmeen S., Ali Z., Khan M., Choudhary M., Akhtar F., Miana G., Zahid M. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii*. *J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, pp. 1010–1011.
8. Shivasharan B., Nagakannan P., Thippeswamy B., Veerapur V. Protective Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats. *Indian J. ClinBiochem.*, 2013, pp.292-298.
9. Choi J.H., Shin K.M., Kim N.Y., Lee Y.S., Kim H.J., Park H.J., Lee K.T. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum Nakai*, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, vol. 25, pp. 1446-1450.
10. Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P., Musayev N. *Chara Fragilis* cells – a new object for electrophysiology research. *Journ. of Baku Engineering University, – Chemistry and Biology*, 2017, vol. 1, no. 2, pp. 176-182.
11. Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. A simplified method for measuring membrane resistances *Nitellatranslucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1968, vol. 150, p. 518.
12. Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. Light intensity and the membrane parameters of *Nitellatranslucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1969, vol. 173, pp. 564-566.
13. Fonseca Y., Catini C., Vicentini F., Nomizo A. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, no. 127, pp.596-601.
14. Yang D., Whang W., Kim I. The constituents of *Taraxacum hallaisanensis* roots. *Arch. Pharmacol. Res.*, 1996, vol. 19, pp. 507-513.
15. Yun S., Cho H., Choi H. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, vol. 66, pp. 1859-1864.
16. Prylutsky Y.I., Vereshchaka I.V., Maznychenko A.V., Bulgakova N.V., Gonchar O.O., Kyzyma O.A., Ritter U., Scharff P., Tomiak T., Nozdrenko D.M., Mishchenko I.V., Kostyukov A.I. C⁶⁰ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, vol. 15, no. 8, doi: 10.1186/s12951-016-0246-1.

BIOELECTRIC EFFECTS OF WASHING OF THE *CHARA FRAGILIS* CELLS FROM SOLUTIONS OF PHYTOCOMPOSITION OF DANDELION- HYPERICUM-CALENDULA**Hasanova A.E.^{1,2}, Musaev N.A.¹, Ojagverdiyeva S.Y.¹**¹Baku State University*Z. Khalilov Str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: ahasanova89@gmail.com*²Institute of Botany ANAS*Badamdar highway 40, AZ1004, Baku, Azerbaijan*

Received 09.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0479

Abstract. By using of microelectrode techniques, patterns of change in the potential (φ_m) and resistance (R_m) of the plasma membrane (PM) of *Chara fragilis* cells under the influence of Dandelion–Hypericum–Calendula (DHC) phytocomposition solutions were studied. The values of φ_m and R_m are widely scattered: $-90 \div -300$ mV and $1 \div 32.6$ Ohm·m², respectively under the standard conditions. The average value of φ_m was -183 ± 4.9 mV, $R_m = 9.2 \pm 1.2$ Ohm·m². Using the dependences of φ_m , R_m on the concentration of K⁺ in the external environment, the ranges of activation of the K⁺ - channels to the inward (KCIR) and outward rectification (KCOR) were determined. Under the action of the DHC phytocomposition, while the cell was in the medium with the concentration of the composite 10⁻¹ or 1 mg/ml, we did not detect changes in φ_m and R_m for 25 min. Stimulation or suppression of transport processes under the influence of composites occurred only with the exclusion of DHC from the composition of the nutrient medium and with a stepwise increase in the concentration of the composition in the medium. The electrophysiological effects of the action of the DHC composition are discussed from the point of view of its action on the lipid phase of the plasma membrane of the experimental cells.

Key words: *Chara fragilis*, membrane potential, membrane resistance, phytoprotectors, H⁺ - pumps, K⁺ - channels.

АЗУЛЕНА ЛИСТОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ КАК ЗАЩИТНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ ФИЛЬТР

Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

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

Поступила в редакцию 11.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0480

Аннотация. Исследованы реакции на озон поверхностных клеток листьев с голубой или серебристой окраской у растительных видов: василисника малого *Thalictrum minus* L., лоха колючего *Elaeagnus pungens* Thunb., ивы белой *Salix alba* L., облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., красного клевера *Trifolium pratense* L., клевера ползучего *Trifolium repens* L., райграса пастбищного *Lolium perenne* Engels. У них не отмечено заметных спектральных изменений. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки этих растений содержали азулены. В спектрах поглощения листьев отмечены характерные для этих синих пигментов максимумы соответственно 580-585 нм и 608-610 нм, а в спектрах флуоресценции – 410 или 430-450 нм. Предполагается, что именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у видов с синей или серебристой окраской листьев, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность к озону. В этом случае синие пигменты служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием.

Ключевые слова: автофлуоресценция, адсорбция, азулены, спектральный анализ

ВВЕДЕНИЕ

Поверхность растений чувствительна к ультрафиолетовой радиации и озону, и эти внешние сигналы воспринимают в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы. У некоторых древесных растений поверхность имеет голубой цвет, который обусловлен присутствием синих пигментов азуленов [1,2]. Это, вероятно, определяет их устойчивость к повреждающим факторам, особенно в весенний период, когда велика интенсивность ультрафиолетовой радиации и растет количество тропосферного озона. Ранее эти пигменты находили только в продуктах дистилляции эфирных масел [3], а не на поверхности листьев или хвои. Исследование присутствия и роли синих пигментов на поверхности клеток находится только в самом начале, и до сих пор внимание уделялось преимущественно древесным видам растений субтропической зоны [1,2]. Целью нашего исследования является исследование поверхности клеток у древесных и травянистых видов Средней полосы России, обладающих синей или серебристой окраской. Предполагается, что и у них могут быть азулены.

МЕТОДЫ

Объекты. В качестве объектов исследований с синей или серебристой окраской выбраны листья древесных видов и травянистых видов Подмосковья в районе Пущино на Оке: василисника малого *Thalictrum minus* L., лоха колючего *Elaeagnus pungens* Thunb., ивы белой *Salix alba* L., облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., красного клевера *Trifolium pratense* L., клевера ползучего *Trifolium repens* L., райграса пастбищного *Lolium perenne* Engels. Использовали свежие листья растений без всякой обработки и подвергнутые воздействию озоном в хронической экспозиции в общей дозе (в мкл/л) 0,05 (по 5 часов в день в течение трех дней). Озон производился генератором КПМЗ (Россия).

Спектральные методы. Поглощение и собственную флуоресценцию клеток измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США) и спектрофлуориметра *Perkin Elmer 350 MPF-44B* (UK). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 96% этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 0,5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью вышеупомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра.

Хроматография. Для выявления азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля Silufol, как описано ранее для пыльцы [1]. Затем регистрировали их спектры поглощения и флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными на интактных клетках. Среднюю ошибку опыта из трех-четырёх повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля, соответственно. Концентрацию азуленов (А) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

$$A = D_{580} / \epsilon \times l,$$

где D_{580} – оптическая плотность при 580 нм,

ϵ – коэффициент молярной экстинкции азулена $328 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$,

l – толщина слоя жидкости в кювете, см.

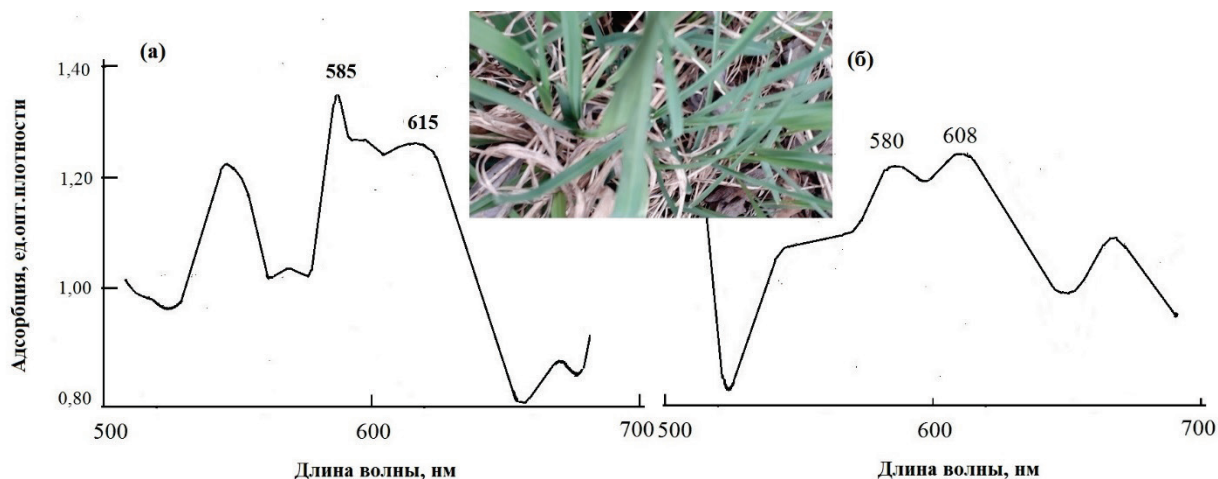


Рисунок 1. Спектры поглощения верхней поверхности листа райграса пастбищного *Lolium perenne* L. (а) спектр до экстракции в течение 10 мин 96 % этанолом; (б) дифференциальный спектр листа до экстракции минус спектр листа после экстракции. Фото листьев – видна голубая окраска

Эксперименты проводили в трех повторностях и вычисляли среднюю ошибку опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Листья с голубой или серебристой окраской выбранных объектов были подвергнуты обработке озоном в общей дозе 0,05 мкл/л. Чувствительность к озону оценивали по спектральным изменениям поверхности листьев. При всех экспозициях заметных изменений в спектрах поглощения и флуоресценции листьев не было выявлено. По аналогии с такими же результатами с древесными видами Сочинского дендрария [1] предполагали, что это связано с присутствием синих пигментов азуленов в кутикуле и клеточной стенке. Для проверки предположения проведены специальные опыты по спектральному анализу поверхности листьев включая прямые измерения листьев и 10- или 60-минутных экстрактов из них этанолом или ацетоном.

На рисунке 1 приведены спектры поглощения листьев райграса пастбищного *Lolium perenne*, травянистого растения с голубой окраской. В контрольном варианте (а) видны заметные максимумы 585 и 615 нм, характерные для азуленов [3]. Экстракция 100% ацетоном или 96 % этанолом целых неповрежденных листьев (1:10 вес/объем) в течение 5-10 минут, как показано ранее [1], дает возможность увидеть присутствие синих пигментов в экстракте. Десятиминутная экстракция с растворителем выявила слабую голубую окраску экстрактов у всех исследованных объектов. Как показано в дифференциальном спектре поглощения листа “контроль поверхности

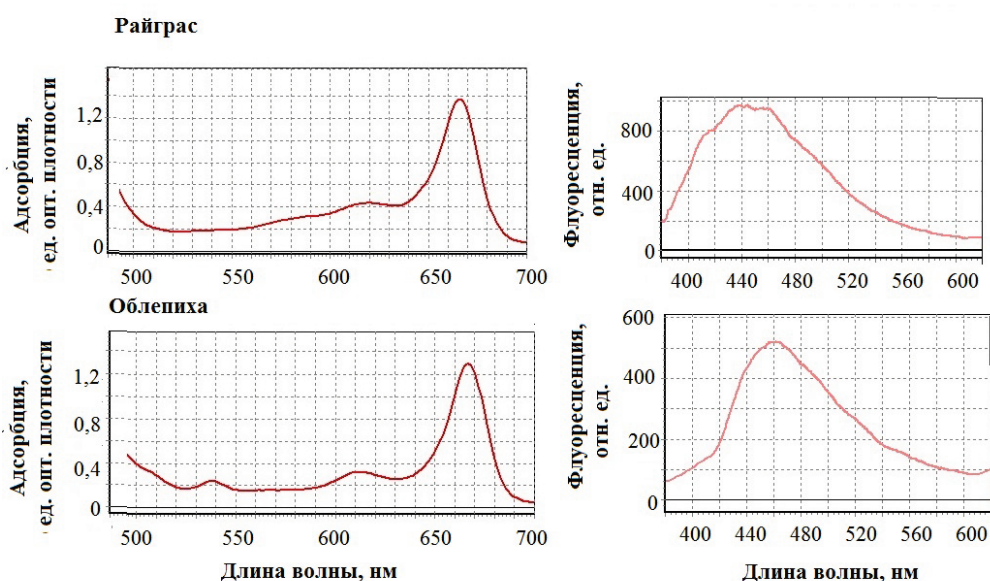


Рисунок 2. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) экстрактов с листовой поверхности в течение 10 мин 96 % этанолом у райграса пастбищного *Lolium perenne* и облепихи крушевидной *Hippophae rhamnoides*

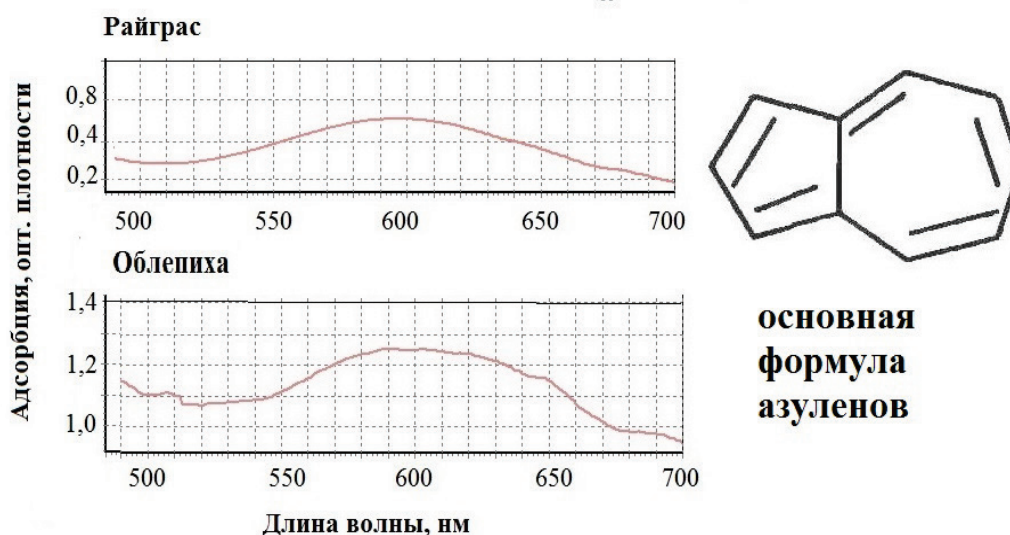


Рисунок 3. Спектр поглощения 10 минутных экстрактов этанолом из листьев райграса пастбищного и облепихи крушевидной после обработки 50 % серной кислотой

без экстракции минус поверхность после экстракции “(б) видны максимумы 580 и 608 нм. Время появления в экстракте хлорофилла, показывало в нашей предыдущей работе [1], насколько глубоко проникает растворитель с клеточной поверхности внутрь клетки. Оказалось, что практически у всех исследованных в данной работе видов слой с голубым пигментом очень тонкий, поскольку в экстракте уже обнаруживается хлорофилл. На рисунке 2 показано, что в спектрах поглощения у таких экстрактов с поверхности листьев райграса и облепихи азулены видны в виде максимумов 580 и 615 нм у первого вида и максимума 610 нм у второго вида.

Ранее было установлено присутствие азуленов с максимумами поглощения 608 нм у эвкалипта пепельного, сосны мелкоцветковой и ели голубой [1], как у фенилазуленов [3]. В нашем случае могут быть другие азулены, природа которых пока не идентифицирована. Эти пигменты не являются антоцианами, поскольку не меняют окраску в кислоте и щелочи.

Мы определили примерное содержание азуленов в 10 минутных этанольных экстрактах исследуемых нами видов в расчете на единицу массы листьев (табл. 1). Оказалось, что жесткие, опушенные или имеющие железистые листья древесных видов имели близкую концентрацию азуленов около 1 мг на г сухой массы, тогда как у травянистых растений с мягкой листовой пластикой их было значительно меньше. Однако жесткие пластинки листьев райграса отличались столь же высоким содержанием азуленов, как и древесные виды. Если сравнить количество азуленов в листовых поверхностях растений Средней России и субтропиков Сочинского дендрария [1], то они сопоставимы. У эвкалипта пепельного и сосны мелкоцветковой эти значения близки к полученным для лоха колючего, облепихи крушиновидной и белой ивы, а также райграса пастбищного и красного клевера. Более низкие концентрации в поверхностных слоях, как и у кедра атласского, отмечены у василисника малого и белого клевера.

Таким образом, растения с голубой или серебристой окраской листьев содержат азулены в поверхностном слое. Эти синие пигменты имеют свойства антиоксидантов, предохраняя клетки от реактивных форм кислорода, появляющихся под действием ультрафиолетовой радиации и озона или загрязнения окружающей среды. При этом роль азуленов может рассматриваться как сенсора реактивных форм кислорода [4]. Антиоксидантные свойства азуленов, благодаря их многочисленным двойным связям (основная формула на рис. 3), известны давно

Таблица 1. Содержание азуленов на поверхности листьев исследованных растений по данным 10-минутных экстрактов этанолом

Вид травянистого растения	Азулены, мг/г сухой массы	Вид древесного растения	Азулены, мг/г сухой массы
<i>Lolium perenne</i> L (Graminae) Райграс пастбищный	1,63±0,07	<i>Elaeagnus pungens</i> L. (Elaeagnaceae) Лох колючий	1,00±0,05
<i>Thalictrum minus</i> L. (Ranunculaceae) Василисник малый	0,17±0,01	<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Elaeagnaceae) Облепиха крушиновидная	1,04±0,06
<i>Trifolium pratense</i> L. (Fabaceae) Клевер луговой	0,96±0,03	<i>Salix alba</i> L. ива белая (Salicaceae)	0,92±0,04
<i>Trifolium repens</i> L. (Fabaceae) Клевер белый	0,41±0,03		

и применяются в медицине и оптической технике. Теперь такое же их приложение может быть и в природе растений в качестве защитного фильтра для их поверхности. Показательно, что наряду с поверхностью листьев, азулены содержатся и в одиночных клеточных структурах, таких как пыльца семенных растений и вегетативные споры споровых видов, где также могут выполнять протекторную функцию [2]. При выделении из растений наблюдается тесная связь азуленов с хлорофиллом. Так азулены могут находиться не только на поверхности клеток, но и внутри, в частности, в хлоропластах, где играют роль доноров электронов при повреждении электрон-транспортных путей [2]. Дальнейшие исследования в этой области могут быть весьма полезны для понимания механизмов защитных свойств азуленов.

Список литературы / References:

1. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62. [Roshchina V.V., Kuchin A.V., Okunev A.R., Soltani G.A., Khaibulaeva L.M., Prizova N.K. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biological Membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62, doi: 10.1134/S1990747822010081. (In Russ.)]
2. Roshchina V.V. Possible Role of Azulene in Plant Life: Experiments with Models. *SMP Environ. Sci. Technol.*, 2022, vol. 1, no. 1, pp.1-10.
3. Heilbronner E. Azulenes. In: Non-benzenoid aromatic compounds. Ed. D.Ginsburg. New York, London: Intersci. Publ., pp. 171–276.
4. Murfin L.C., Lewis S.E. Azulene – a bright core for sensing and imaging. *Molecules*, 2021, vol. 26, pp. 353-362.

AZULENES OF LEAF SURFACE AS A PROTECTIVE OPTICAL FILTER

Roshchina V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M.

Institute of Cell Biophysics, FSC PNCBI RAS

Institutskaya str. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru

Received 11.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0480

Abstract. Reactions to ozone of surface cells of leaves with blue or silver color in plant species: meadow-rue *Thalictrum minus* L., oleaster *Elaeagnus* L., white willow *Salix alba* L., buckthorn *Hippophae rhamnoides* L., creeping clover *Trifolium repens* L., red clover *Trifolium pratense* L., ryegrass pasture *Lolium perenne* Engels were studied. They had no noticeable spectral changes. It has shown that the surface layers of the cuticle and the cell wall of these plants contained azulenes. In the leaf absorption spectra, the maxima characteristic of these blue pigments of 580-585 nm and 608-610 nm, respectively, were noted, and in the fluorescence spectra – 410 or 430 nm. It has assumed that these pigments may be the primary targets for ozone in species with blue or silvery leaf color, and their antioxidant properties determine low sensitivity to ozone. In this case, the blue pigments serve as a protective optical filter against ultraviolet radiation and ozone formed with its participation.

Key words: adsorbance, autofluorescence, azulenes, spectral analysis.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ММ ЭМВ НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ НОЕCHST 33258 С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ

Вардеванян П.О., Шагинян М.А., Микаелян М.С., Григорян С.В.

Ереванский государственный университет

ул. А. Манукяна, 1, г. Ереван, 0025, Республика Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0481

Аннотация. В работе исследовано влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на особенности комплексообразования Ноеchst 33258 (Н33258) с биомакромолекулами – ДНК и сывороточным альбумином человека (САЧ) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий. Показано, что спектроскопические характеристики комплексов ДНК-Н33258 и САЧ-Н33258 зависят от частоты облучения ММ ЭМВ. Показано также, что при облучении частотой 41,8 ГГц воздействие ММ ЭМВ выражено гораздо слабее, чем при облучении частотой 50,3 ГГц, что подтверждает роль воды во влиянии ММ ЭМВ, поскольку частота 50,3 ГГц является резонансной частотой для воды. С другой стороны, показано, что облучение ММ ЭМВ приводит к понижению сродства Н33258 к биомакромолекулам, поскольку облучение ММ ЭМВ приводит к уменьшению параметров связывания Н33258 с ДНК и САЧ. Кроме того, облучение ММ ЭМВ приводит к тому, что тушение флуоресценции Н33258 с помощью ДНК и САЧ ослабевает. Важным заключением является и то, что облучение ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц вызывает слабое изменение вышеотмеченных параметров комплексов ДНК-Н33258, в то время как на комплексы САЧ-Н33258 оставляет значительное влияние.

Ключевые слова: Ноеchst 33258, ДНК, сывороточный альбумин человека, комплексообразование, константа связывания, тушение флуоресцентной интенсивности.

В настоящее время актуальными и важными являются исследования, посвященные изучению влияния электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические системы, находящихся на различных уровнях организации [1-5]. ММ ЭМВ являются радиоволнами с частотным диапазоном 30-300 ГГц и длинами волн от 1 мм до 10 мм. Естественный фон ММ ЭМВ на Земле низкий, поэтому биологические системы в ходе эволюции не очень хорошо приспособлены к данному физическому фактору. С другой стороны, в течение последних десятилетий интенсивность ММ ЭМВ стремительно растет в окружающей среде, что связано с научно-техническим прогрессом. Поэтому очень важно иметь представление о том, как эти волны воздействуют на биологические объекты и какими механизмами происходит это влияние. Стоит также отметить, что диапазон миллиметровых волн представляет интерес еще потому что, в этом интервале находятся резонансные частоты воды [6]. В наши дни считается, что ММ ЭМВ воздействуют на биологические системы двумя группами механизмов: непосредственно влияя на биологический объект и второе – воздействуя на биологическую систему опосредовано через воду при облучении частотами, резонансными для воды. Следует также отметить, что иногда ММ ЭМВ могут иметь биологический эффект, влияя одновременно двумя механизмами. В большинстве случаев это зависит от частоты облучения. В данном случае исследовано влияние ММ ЭМВ на биологические системы, находящихся на молекулярном уровне – ДНК и сывороточный альбумин человека (САЧ) и их комплексы с Ноеchst 33258 (Н33258). ДНК в клетке все время находится в окружении различных низкомолекулярных веществ – лигандов, которые так или иначе взаимодействуют с молекулой ДНК, изменяя ее физикохимические характеристики, поэтому имеет смысл изучить ДНК в комплексе с лигандом, тем более, что многие лиганды имеют лекарственное значение и рассматриваются как потенциальное лечебное средство против многих генетических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. С другой стороны, сывороточные альбумины, в том числе и САЧ, являются главными транспортными протеинами в кровотоке млекопитающих. Эти белки имеют большое значение как факторы, обеспечивающие осмотическое давление. Альбумины известны как главные белки в плазме крови, переносящие различные эндогенные и экзогенные вещества [7,8]. С другой стороны, Н33258 является ДНК-специфическим лигандом [9], поэтому интересно, как он будет взаимодействовать с САЧ при транспортировке кровотоком. В данной работе исследовано влияние ММ ЭМВ на некоторые характеристики комплексов Н33258 с ДНК и САЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использованы ДНК тимуса теленка (ГЦ-содержание почти 42%), сывороточный альбумин человека (1%-ный раствор), Ноеchst 33258 (“Sigma”, США), физиологический раствор. Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и Н33258 определены спектрофотометрически, по следующим коэффициентам экстинкции: $\varepsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК и $\varepsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Н33258.

Облучение растворов ДНК и САЧ проведено с помощью генератора Г4-141 (“Исток”, Фриазино, РФ) с рабочим интервалом частот 37,5–53,5 ГГц и плотностью потока мощности $\approx 0,1 \text{ мВт/см}^2$ при мощности 8 мВт на выходе. Значение плотности потока мощности было зафиксировано на месте образца. Выходная мощность генератора измерялась с помощью головки термистра М5-49 и ваттметром М3-10А (“Исток”, Фриазино, РФ).

Частота выходного сигнала контролировалась волнометром СН2-25 (“Исток”, Фрязино, РФ). Стабильность частоты генератора в постоянном режиме работы считалась ± 15 МГц. Облучение растворов ДНК и САЧ проведено в дальней зоне конусообразной антенны с апертурой 32×32 мм на расстоянии 250 мм от излучающей плоскости антенны. Растворы ДНК и САЧ облучались сверху стеклянной чашки с диаметром 6 см, где толщина раствора составляла 1 мм, что, в свою очередь, позволило лучам проникать в объем раствора. Образцы облучались в течение 1 часа, частотами 41,8 ГГц и 50,3 ГГц. Специфическая скорость абсорбции (ССА) составляла ~ 20 мкВт/кг, что меньше для того, чтобы индуцировать термический эффект. Значение ССА рассчитано согласно описанному методу [10]. Электромагнитное поле было однородным. Контрольные образцы были выбраны следующим образом. Растворы ДНК и САЧ в течение 1 часа были расположены в экспозиционной зоне, при том, что выходная мощность генератора была приравнена к нулю. Затем этими растворами титрировали растворы Н33258.

Изучение комплексов ДНК и САЧ с Н33258 проведено спектроскопическими методами абсорбции и флуоресценции. Спектры поглощения получены на спектрофотометре PerkinElmer UV-VIS Lambda 365 (США) в интервале длин волн $300 \leq \lambda \leq 700$ нм. После получения спектра поглощения чистого лиганда, раствор лиганда титрировали необлученным и облученным растворами САЧ и ДНК. Концентрационное соотношение лиганд/биомакромолекула менялось от 1/2 до 1/10. Из полученных спектров поглощения были рассчитаны значения констант связывания по методу описанному в [11].

Спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с необлученными и облученными ДНК и САЧ были получены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Австралия). Возбуждение образцов было осуществлено при длине волны 343 нм, а спектры флуоресценции были сняты в интервале $400 \leq \lambda \leq 600$ нм. После получения спектра флуоресценции чистого лиганда, лиганд раствора титрировали необлученными и облученными растворами ДНК и САЧ. Концентрационное соотношение лиганд/биомакромолекула менялось от 1/2 до 1/10. Из спектров флуоресценции получили кривые Штерна-Вольмера.

Ошибка измерений не превышала 4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После получения спектров поглощения были рассчитаны значения констант связывания Н33258 с ДНК и САЧ. Значения констант связывания приводятся в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, облучение растворов ДНК и САЧ ММ ЭМВ частотой 50,3 ГГц приводит к уменьшению констант связывания во всех случаях. Почти в два раза уменьшение константы связывания свидетельствует о том, что облучение ММ ЭМВ с частотой 50,3 ГГц влияет на конформацию ДНК и САЧ таким образом, что понижается сродство лиганда к этим макромолекулам. Скорее всего, вокруг макромолекулы вода структурируется, повышается упорядоченность молекул воды, вследствие чего связывание Н33258 с макромолекулой затрудняется. При сильном способе взаимодействия Н33258 с ДНК в ее малом желобке, затрудняется доступ молекул лиганда к АТ-последовательностям ДНК, поэтому константа связывания сильно уменьшается. При слабом – электростатическом связывании Н33258 с фосфатными группами ДНК, имеет место повышение степени упорядоченности воды вокруг ДНК, из-за чего опять сила связывания уменьшается. В случае связывания Н33258 с САЧ, взаимодействие происходит водородными связями и ван-дер-Ваальсовыми силами [12]. В данном случае мы заключаем, что степень гидрофильности вокруг молекулы САЧ растет, из-за чего гидрофобные взаимодействия не вступают в силу и связывание затрудняется. С другой стороны, водородные связи могут возникать между Н33258 и упорядоченной водой, что также понижает эффективность связывания Н33258 с САЧ. Приведенные заключения подтверждаются еще и тем, что иная картина наблюдается при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц. В таблице 2 приведены значения констант связывания Н33258 с ДНК и САЧ при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц. Как видно из таблицы 2 при сильном связывании Н33258 с ДНК, при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц константа связывания почти не меняется, не меняется также и константа связывания слабым способом. Это свидетельствует о том, что вода вокруг ДНК не меняет своей упорядоченности и, следовательно, сродство Н33258 к ДНК не меняется. При взаимодействии Н33258 с САЧ, облучение ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц также не понижает константу связывания, более того, константа связывания увеличивается. Это увеличение может быть обусловлено тем, что облучение частотой 41,8 ГГц

Таблица 1. Значения констант связывания Н33258 с необлученными и облученными ДНК и САЧ с частотой 50,3 ГГц

		Необлученные образцы ($K \cdot 10^{-5}$)	Облученные образцы частотой 50,3 ГГц ($K \cdot 10^{-5}$)
ДНК-Н33258	Сильный способ	105 \pm 0,5	58 \pm 0,2
	Слабый способ	1,1 \pm 0,05	0,52 \pm 0,05
САЧ-Н33258		0,33 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02

Таблица 2. Значения констант связывания Н33258 с необлученными и облученными ДНК и САЧ с частотой 41,8 ГГц

		Необлученные образцы ($K \cdot 10^{-5}$)	Облученные образцы частотой 41,8 ГГц ($K \cdot 10^{-5}$)
ДНК-Н33258	Сильный способ	105±0,5	101±0,3
	Слабый способ	1,1±0,05	1,3±0,08
САЧ-Н33258		0,33±0,02	0,41±0,01

воздействует непосредственно на белок, изменяет конформацию САЧ, в результате чего связывание с Н33258 происходит сильнее.

Для дальнейшего подтверждения вышеотмеченных заключений, проведены флуоресцентно-спектроскопические исследования. Получены спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с ДНК и САЧ (спектры не приводятся) при облучении ММ ЭМВ частотами 41,8 ГГц и 50,3 ГГц и без облучения. На основании спектров флуоресценции построены кривые Штерна-Вольмера (рис. 1).

Из кривых Штерна-Вольмера видно, что облучение приводит к уменьшению коэффициента тушения, при этом в зависимости от частоты облучения степень уменьшения K_{SV} разная. В таблице 3 представлены значения коэффициента Штерна-Вольмера. Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что при облучении САЧ, коэффициент тушения уменьшается, однако, при частоте 41,8 ГГц уменьшается в 1,2 раза, в то время как при частоте 50,3 ГГц уменьшается в 2,2 раза. Этот результат находится в согласии с данными, полученными абсорбционно-спектроскопическим методом и утверждает вышесделанное заключение о том, что при облучении ММ ЭМВ с частотой, резонансной для воды – 50,3 ГГц, упорядоченность воды растет в том числе и в окружении макромолекулы, вследствие чего сродство Н33258 к САЧ уменьшается. При связывании Н33258 с ДНК также наблюдается уменьшение коэффициента Штерна-Вольмера, при этом при облучении ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц K_{SV} меняется слабо. При облучении ММ ЭМВ с частотой 50,3 ГГц значение K_{SV} уменьшается значительным образом, почти в 3,1 раза.

Таким образом, исходя из полученных данных абсорбционно- и флуоресцентно-спектроскопическими методами, можно заключить, что облучение макромолекул ММ ЭМВ приводит к понижению сродства Н33258 к САЧ и ДНК. При этом, уменьшение выражено при облучении частотой, резонансной для воды – 50,3 ГГц, а при не резонансной частоте уменьшением можно пренебречь в случае ДНК. Это свидетельствует о том, что при

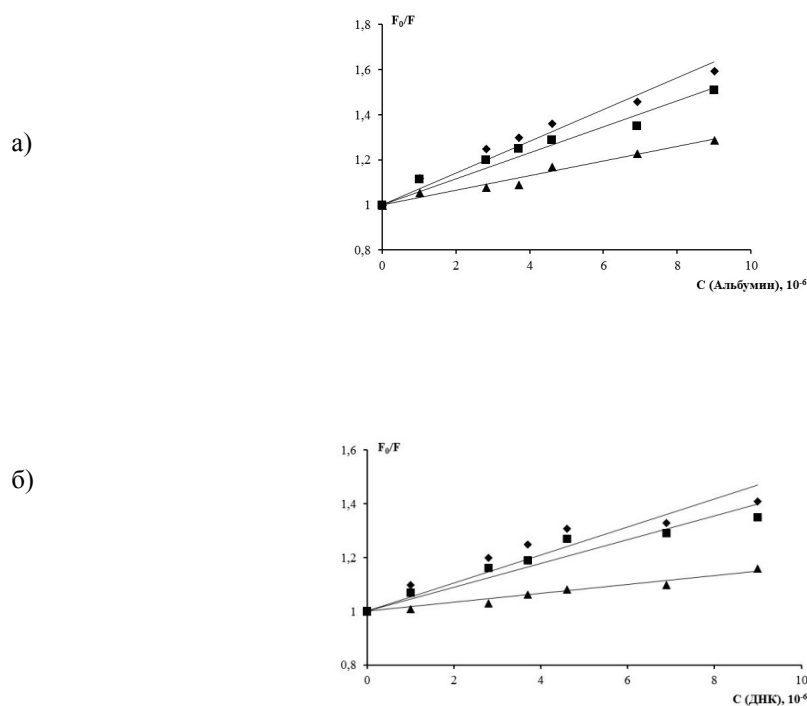


Рисунок 1. Характеристические кривые Штерна-Вольмера при взаимодействии САЧ (а) и ДНК (б) с Н33258. Сверху вниз кривые соответствуют случаям без облучения, с облучением ММ ЭМВ частотой 41,8 ГГц и 50,3 ГГц соответственно

Таблица 3. Значения констант Штерна-Вольмера для H33258 при связывании с САЧ и ДНК

	Значения констант тушения ($K_{SV} \cdot 10^{-4}$) (л/моль)	
	САЧ-H33258	ДНК-H33258
Необлученный образец	7,04±0,08	5,2±0,06
Облученный образец ММ ЭМВ с частотой 41.8 ГГц	5,8±0,06	4,4±0,06
Облученный образец ММ ЭМВ с частотой 50.3 ГГц	3,2±0,03	1,65±0,04

облучении частотой 50,3 ГГц, упорядоченность воды растет, из-за чего макромолекула экранируется водными молекулами и становится труднодоступной для лигандов, связывающихся с ними. При облучении САЧ частотой 41,8 ГГц наблюдается увеличение константы связывания H33258 с САЧ, что является результатом непосредственного воздействия облучения на белок и изменения его конформации. В конечном итоге сродство H33258 к САЧ, облученного частотой 41,8 ГГц, растет.

Список литературы / References:

1. Zhao R., Zhang S., Xu Z., Ju L., Lu D., Yao G. Studying gene expression profile of rat neuron exposed to 1800 MHz radio-frequency electromagnetic fields with cDNA microassay. *Bioelectromagnetics*, 2007, vol. 235, doi: 10.1016/j.tox.2007.03.015.
2. Zhang M., Li X., Bai L., Uchida K., Bai W., Wu B., Xu W., Zhu H., Huang H. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An in vitro study. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, doi: 10.1002/bem.21747.
3. Romanenko S., Siegel P.H., Wagenaar D.A., Pikov V. Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. *Journal of Neurophysiology*, 2014, vol. 112, doi: 10.1152/jn.00357.2014.
4. Trosic I., Busljeta I., Modlic B. Investigation of the genotoxic effect of microwave irradiation in rat bone marrow cells: in vivo exposure. *Mutagenesis*, 2004, vol. 19, no. 5, doi: 10.1093/mutage/geh042.
5. Abdolmaleki A., Sanginbadi F., Rajabi A., Saberi R. The effect of electromagnetic waves exposure on blood parameters. *International Journal of Hematology, Oncology and Stem Cell Research*, 2012, vol. 6, no. 2.
6. Петросян В.И., Синицын Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Роль молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2001, № 5-6. [Petrosyan V.I., Sinityn N.I., Elkin V.A., Devyatkov N.D., Gulyaev Yu.V. The role of molecular wave processes in nature and their use for monitoring and correcting the state of ecological systems. *Biomedical Radioelectronics*, 2001, no. 5-6. (In Russ.)]
7. Yang G.-D., Li C., Zeng A.-G., Zhao Y., Yang R., Bian X.-L. Fluorescence spectroscopy of osthole binding to human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, vol. 3, no. 3, doi: 10.1016/j.jpha.2012.10.002.
8. He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, no. 186, doi: 10.1038/358209a0.
9. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding to DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2008, vol. 25, no. 6, doi: 10.1080/07391102.2008.10507210.
10. Gapeyev A.B., Mikhailik E.N., Chemeris N.K. Anti-inflammatory effects of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation: Frequency and power dependence. *Bioelectromagnetics*, 2008, vol. 29, doi: 10.1002/bem.20381.
11. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 2004, vol. 35, no. 6, doi: 10.1038/emm.2003.68.
12. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Mamasakhlisov Y.S. Spectroscopic study of protein complexes with low-molecular compounds. *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2021, vol. 56, no. 1, doi: 10.3103/S1068337221010126.

STUDY OF THE EFFECT OF MM EMW ON COMPLEX-FORMATION OF HOECHST 33258 WITH BIOMACROMOLECULES**Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Mikaelyan M.S., Grigoryan S.V.**

Yerevan State University

A. Manoogian str., 1, Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0481

Abstract. In this work the effect of millimeter range electromagnetic waves (MM EMW) on complex-formation peculiarities of Hoechst 33258 (H33258) with biomacromolecules – DNA and human serum albumin (HSA) has been studied by the methods of absorption and fluorescence spectroscopies. Spectroscopic characteristics of the complexes DNA-H33258 and HSA-H33258 were shown to depend on the irradiation frequency of MM EMW. It was also shown that at the irradiation by the frequency 41.8 GHz the effect of MM EMW is pronounced weaker, than at the irradiation by 50.3 GHz, which maintains the water role in the influence of MM EMW, since the frequency 50.3 GHz is resonant one for water. On the other hand, it was revealed that the irradiation of MM EMW leads to decreasing of H33258 affinity to biomacromolecules, since the MM EMW irradiation results in decreasing of the binding parameters of H33258 to DNA and HSA. Besides, the MM EMW irradiation results in the weakening of H33258 fluorescence by DNA and HSA. The important conclusion also is the fact that the irradiation of MM EMW by the frequency 41.8 GHz invokes a weak change of the aforementioned parameters of the complexes DNA-H33258, while it leaves a significant influence on the complexes HSA-H33258.

Key words: *Hoechst 33258, DNA, human serum albumin, complex-formation, binding constant, fluorescence intensity quenching.*

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ Fe_3O_4 (СІТ) НА ОНТОГЕНЕЗ И МОРФОМЕТРИЮ КУКУРУЗЫ САХАРНОЙ

Котюк П.Ф., Корниенко В.О.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, ДНР; e-mail: pkyuk01@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0482

Аннотация. В работе представлены исследования по влиянию сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (СІТ) на ростовые процессы и онтогенез кукурузы сахарной (*Zea mays* L.). Цель исследований, описанных в работе – исследование влияния сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (СІТ) на онтогенетическое развитие и морфометрию на ранних стадиях развития кукурузы сахарной (*Zea mays* L.). В ходе исследований было изучено: влияние переменного магнитного поля с частотой магнитных колебаний 50 Гц и амплитудой 1 мТл, на морфометрические показатели и онтогенез кукурузы сахарной; влияние наночастиц наночастиц Fe_3O_4 с цитратным покрытием и концентрацией 0,1 мг/мл на морфометрические показатели и онтогенез кукурузы сахарной; влияние сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (СІТ), в различном порядке обработки на морфометрические показатели и онтогенез кукурузы сахарной. Так же оценивалась и сравнивалась относительно контрольной группы, сила роста семян при обработке: в переменном магнитном поле, наночастицами Fe_3O_4 (СІТ), а также в переменном магнитном поле с наночастицами Fe_3O_4 (СІТ) в различном порядке обработки.

Ключевые слова: растения, онтогенез, морфология, биотестирование, переменное магнитное поле, наночастицы.

В настоящее время вопросами предпосевной обработки сельскохозяйственных культур занимаются ученые-биологи (ботаники, физиологи, биофизики), физики, химики, инженеры, специалисты в области сельского хозяйства и технических наук, что говорит об особой актуальности данной проблемы. Ранее нами было изучено влияние исключительно наночастиц (НЧ) Fe_3O_4 [1,2], а также влияние переменного магнитного поля (ПеМП) [3,4], на рост и развитие кукурузы сахарной. В связи с тем, что прогрессивная технология получения сельскохозяйственной продукции должна предусматривать экономию материальных и трудовых затрат при высокой стабильности получаемых результатов и сохранении единого согласованного во всех звеньях производственного цикла, нами было предпринято изучение сочетанного действия двух факторов – ПеМП и НЧ на предпосевные свойства семян растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Установка для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных растений. В отделе физики магнитных явлений и высокотемпературной сверхпроводимости научно-исследовательской части Донецкого национального университета была спроектирована магнитная установка для обработки биологических объектов. Блок-схема установки для обработки семян растений переменным магнитным полем промышленной частоты (50 Гц) представлена на рисунке 1. Установка состоит из катушки (1), в центре которой создается переменное магнитное поле, автотрансформатора (2), с помощью которого производится регулировка величины переменного тока, и вольтметра переменного напряжения (3).

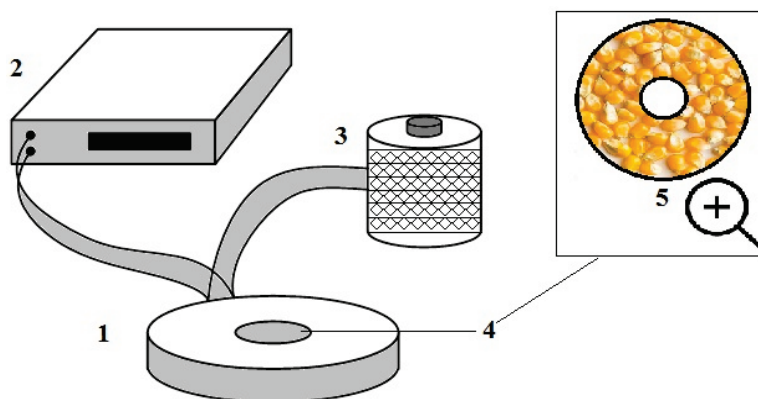


Рисунок 1. Блок-схема установки для обработки семян растений переменным магнитным полем промышленной частоты. Обозначения: 1 – катушка; 2 – вольтметр; 3 – автотрансформатор; 4 – место для расположения контейнера для семян; 5 – схема расположения семян в контейнере

Таблица 1. Экспериментальные группы

НАЗВАНИЕ ГРУППЫ	ОПИСАНИЕ
К	контрольная группа растений
I	ПеМП с магнитной индукцией 1 мТл (время облучения 1 час)
II	обработка наночастицами Fe ₃ O ₄ с цитратным покрытием при C= 0,1 мг/мл (время инкубации 1 час)
III	сочетанное действие ПеМП (B=1 мТл) и НЧ Fe ₃ O ₄ (C= 0,1 мг/мл)
IV	сочетанное действие НЧ Fe ₃ O ₄ (C= 0,1 мг/мл) и ПеМП (B=1 мТл)

Таблица 2. Зависимость силы роста выборки семян от процентного соотношения нормально развитых проростков (по [6])

Сила роста выборки	Доля нормально развитых проростков, %
Высокая	80–100
Средняя	48–79
Низкая	<48

В центр катушки помещается стеклянный контейнер с сухими семенами. Расположение семян показано на рисунке 1 (позиция 5), и это связано с особенностями распределения магнитного поля.

Облучение семян. Предпосевная обработка семян кукурузы сахарной происходила в течение 1 часа при значении магнитной индукции ПеМП 1 мТл. Выборка состояла из 50 семян в 3-кратной повторности. Семена обрабатывали на установке (рис. 1) в сухом состоянии, затем семена помещались в чашки Петри, при этом подложкой для семян служила влажная фильтровальная бумага. Полив осуществляли только дистиллированной водой. Семена проращивали при температуре +20 °С. Энергию прорастания и всхожесть семян определяли в сроки, указанные в ГОСТ 12038-84 [5]: на 3-е сутки (энергия прорастания) и 8-е сутки (всхожесть). Все полученные результаты обрабатывались методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistica».

Обработка семян. Семена замачивали на 1 час в раствор наночастиц Fe₃O₄ с цитратным покрытием и концентрацией 0,1 мг/мл. В результате проведения исследований были сформированы 5 групп:

Оценка силы роста группы семян. После обработки семян кукурузы сахарной и дальнейшего проращивания, оценивали проростки, согласно критериям стандартного теста на всхожесть (нормально проросшие, аномально проросшие, непроросшие). Затем измеряли длину нормально проросших проростков в каждой повторности, определяли среднюю длину пяти самых длинных проростков (L) и умножали ее на коэффициент 0,25 [6]. Нормально проросшие проростки подразделяли на 2 категории:

- высокая сила: нормально проросшие проростки, длиной более $0,25 \times L$;
- средняя сила: нормально проросшие проростки, длиной менее $0,25 \times L$.

Например, для выборки, облученной 6 мТл, длина пяти самых длинных проростков составляет 6,5, 6,7, 6,9, 6,2, 7,2 см. Затем вычислили среднюю длину этих пяти проростков (L) = 6,7 см. Среднюю длину умножили на коэффициент 0,25. $L \approx 1,7$ см. Следовательно, все проростки длиной более 1,7 см имеют высокую силу; все проростки длиной менее 1,7 см имеют среднюю силу. Выборка семян может быть оценена по шкале (табл. 2), представленной в работе Г.Н. Алексейчук, Н.А. Ламана [6].

Проростки, которые развиваются быстро в описанных условиях, имеют высокую силу. Проростки со средней силой могут выживать при интенсивном действии фактора, но их рост и развитие будут заторможены по сравнению с первой группой.

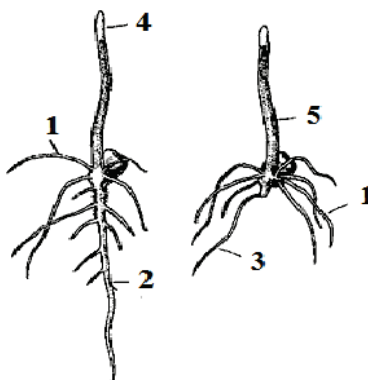


Рисунок 2. Нормальные проростки семян кукурузы сахарной при учете энергии прорастания и всхожести (по ГОСТ 12038-84 [5]). Обозначения: 1 – придаточные корешки; 2 – главный зародышевый корешок; 3 – боковые корешки; 4 – coleoptиль; 5 – первичный лист.

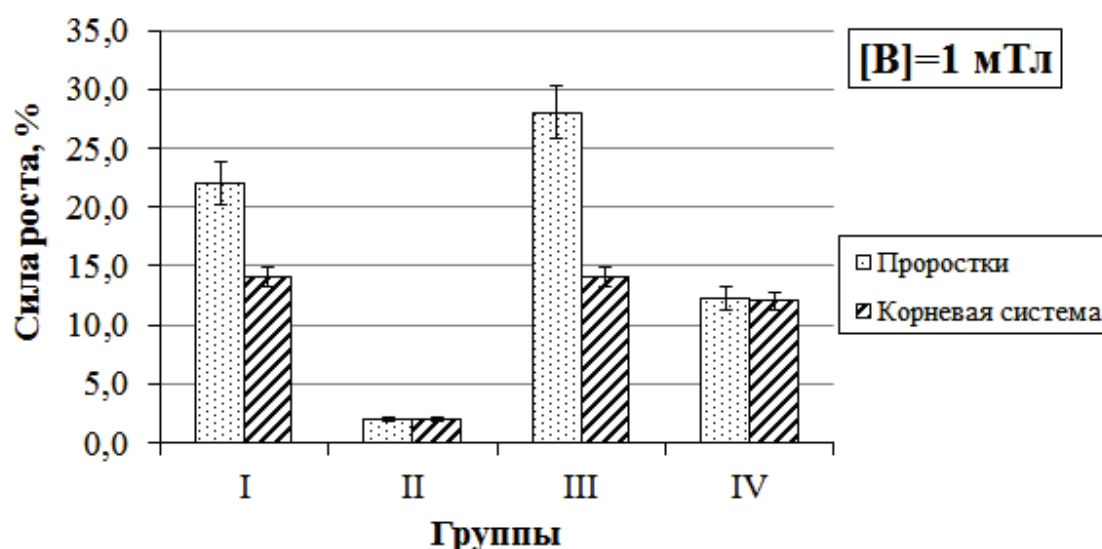


Рисунок 3. Влияние облучения переменным магнитным полем и обработки наночастицами с цитратным покрытием на силу роста (%) кукурузы сахарной

Оценку нормального развития проростков семян кукурузы сахарной (рис. 2), при учете энергии прорастания и всхожести, проводили по ГОСТ 12038-84 [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения сочетанной обработки семян кукурузы сахарной местной селекции, мы установили, что наибольшую силу роста, по сравнению с контролем, имели семена в группе III (сочетанное действие ПеМП ($B=1$ мТл) и НЧ ($C=0.1$ мг/мл)) – 28%. Также высокие значения силы роста как надземной части растения, так и корневой системы наблюдали в группе I (ПеМП 1 мТл) – 22%. Достоверно определено ($p<0.05$), что в экспериментальной группе (III) с сочетанным действием ПеМП и наночастиц Fe_3O_4 с цитратным покрытием сила роста выше, по сравнению с обратной схемой обработки (группа IV – НЧ + ПеМП). Возможно при начальной обработке магнитным полем (имеется ввиду порядок применения фактора), в семени запускаются механизмы (происходит изменение проницаемости клеточных мембран, в результате чего ускоряется диффузия через мембрану определенных молекул и ионов [7,8] и увеличивается водопоглощение семян [9]), которые в дальнейшем ведут к высокой сорбции наночастиц внутрь семени. Однако этот вопрос ещё необходимо более детально изучать.

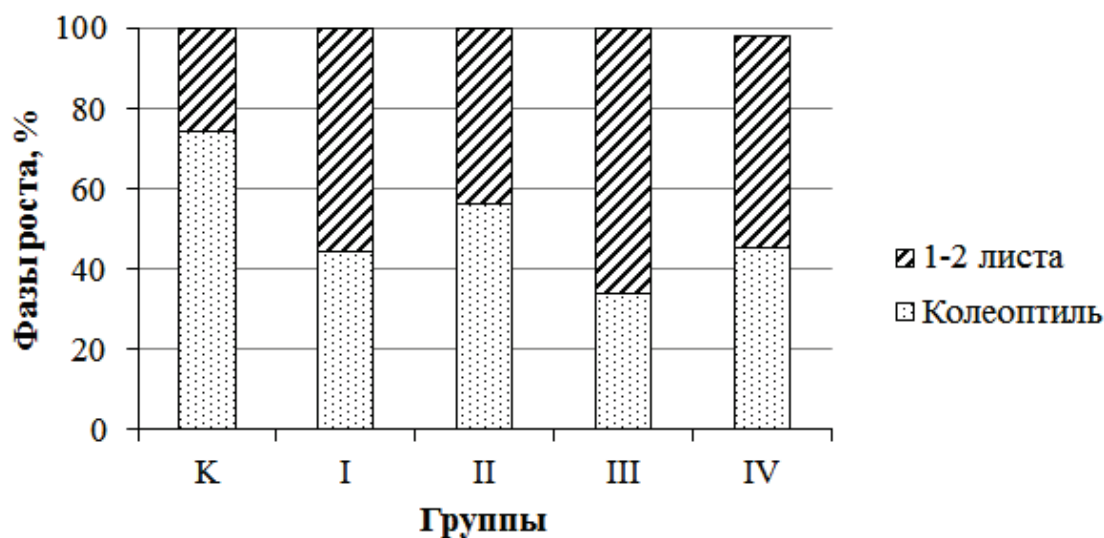


Рисунок 4. Онтогенетические изменения семенного материала кукурузы сахарной в различных экспериментальных схемах обработки

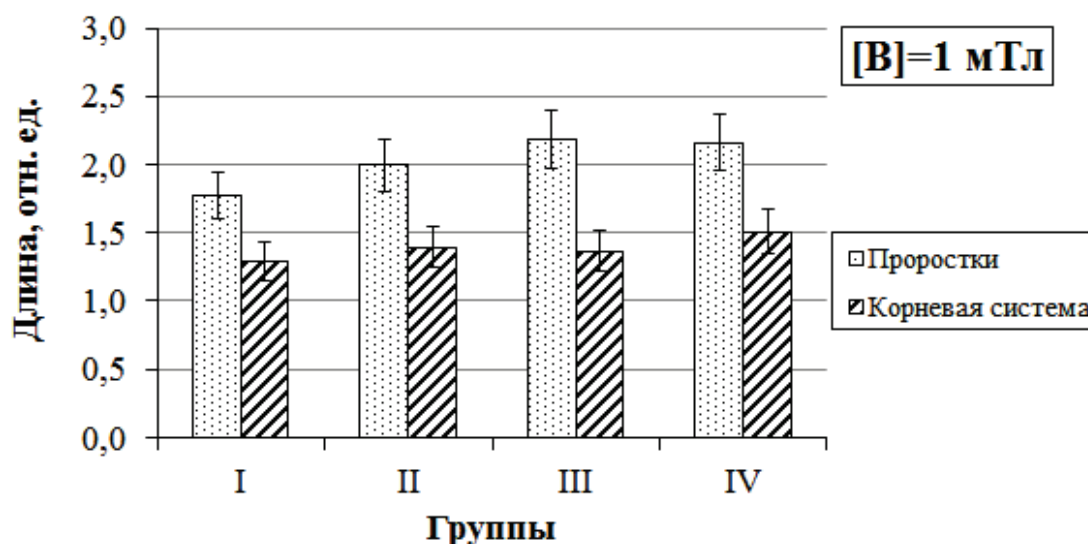


Рисунок 5. Зависимость длины надземной части и корневой системы кукурузы сахарной от схемы обработки семян

При оценке онтогенетических изменений в ростовых процессах кукурузы сахарной (рис. 4), достоверно установили, что в группах с применением экспериментальных схем обработки процент растений в стадии развития 1-2 листа выше, чем в контрольной группе.

Так максимальное значение выявлено в группе III – 66%, затем группы I и IV – 56% и 53% соответственно. Для группы II – процент семян в стадии 1-2 листа составлял 44%, что тем не менее выше, чем у контрольной группы. Однако сравнивая данные по силе роста, можем достоверно утверждать, что сочетанное действие магнитного поля, а затем только наночастиц приводит к лучшему включению Fe_3O_4 с цитратным покрытием в схему обработки семян. Некоторые авторы предполагают некую «встряску» или «активацию» семени из состояния покоя в результате действия ПеМП. Возможно, именно в результате действия переменного магнитного поля и происходит более качественное применение Fe_3O_4 с цитратным покрытием в схеме обработки семян.

В результате обработки семян кукурузы сахарной различными схемами сочетания физического (ПеМП) и химического (НЧ) факторов, мы установили, что при всех вариантах наблюдается стимулирующий эффект надземной части растений и её корневой системы (рис. 5).

Более эффективными (для надземной части – в 2,2 раза, для корневой системы – в 1,4-1,5 раза) оказались схемы III и IV, при сочетанном действии переменного магнитного поля и наночастиц Fe_3O_4 с цитратным покрытием и концентрацией 0,1 мг/мл.

Схемы I и II также имели высокие морфометрические показатели растений: стимулирующий эффект для надземной части составлял 1,8-2,0 раза, для корневой системы 30-40%.

ВЫВОДЫ

При общей оценке влияния сочетанного действия переменного магнитного поля и наночастиц Fe_3O_4 , достоверно получены однозначные данные о стимулирующем действии схемы №3 – сочетанное действие ПеМП (с параметрами поля: $f=50$ Гц, $B=1$ мТл, тип сигнала синусоида, $t_{\text{облучения}} = 1$ час) и НЧ Fe_3O_4 ($C= 0,1$ мг/мл, $t_{\text{инкубации}} = 1$ час). По сравнению с контролем а) сила роста составляла 28%; б) опережение фазы онтогенеза всходы «1-2 листа» в 2,5 раза; в) морфометрические параметры надземной части и корневой системы выше в 2,2 и 1,4 раза соответственно.

Список литературы / References:

1. Корниенко В.О., Кольченко О.Р., Яицкий А.С. Влияние наночастиц Fe_3O_4 на онтогенез и морфометрические показатели кукурузы сахарной (*Zea mays* L.). *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*, 2020, № 08/2, с. 30-36. [Kornienko V.O., Kolchenko O.R., Yaitskiy A.S. Influence of Fe_3O_4 nanoparticles on ontogeny and morphometric parameters of sweet corn (*Zea mays* L.). *Modern sciences: actual problems of theory and practice. Series: Natural and technical sciences*, 2020, no. 08/2, pp. 30-36. (In Russ.)]
2. Корниенко В.О. Влияние наночастиц Fe_3O_4 с различными типами покрытия на ранние стадии развития кукурузы сахарной (*Zea mays* L.). *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*, 2020, № 3-4, с. 88-98. [Kornienko V.O. Influence of Fe_3O_4 nanoparticles with different types of coating on the early stages of

development of sweet corn (*Zea mays* L.). *Problems of ecology and nature conservation of the technogenic region*, 2020, no. 3-4, pp. 88-98. (In Russ.)]

3. Корниенко В.О., Котюк П.Ф., Яицкий А.С. Влияние переменного магнитного поля (1-14 мТл) на рост и развитие кукурузы сахарной. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*, 2021, № 11, с. 17-23. [Kornienko V.O., Kotyuk P.F., Yaitskiy A.S. Influence of an alternating magnetic field (1-14 mT) on the growth and development of sweet corn. *Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sciences*, 2021, no. 11, pp. 17-23. (In Russ.)]

4. Корниенко В.О., Котюк П.Ф., Яицкий А.С. Влияние переменного магнитного поля с различным временем экспозиции на рост и развитие кукурузы сахарной (*Zea mays* L.). *Естественные и технические науки*, 2021, № 11, вып. 162, с. 57-61. [Kornienko V.O., Kotyuk P.F., Yaitskiy A.S. Influence of an alternating magnetic field with different exposure times on the growth and development of sweet corn (*Zea mays* L.). *Natural and technical sciences*, 2021, no.11, iss. 162, pp. 57-61. (In Russ.)]

5. ГОСТ 12038-84. *Семена сельскохозяйственных культур*. Методы анализа: сб. ГОСТов. М.: ИПК Издательство стандартов, 2004, 47 с. [GOST 12038-84. *Seeds of agricultural crops*. Methods of analysis: Sat. GOSTs. M.: IPK Standards Publishing House, 2004, 47 p. (In Russ.)]

6. Алексейчук Г.Н., Ламан Н.А. *Физиологическое качество семян сельскохозяйственных культур и методы его оценки*. Мн.: Право и экономика, 2005, 48 с. [Alekseychuk G.N., Laman N.A. *Physiological quality of seeds of agricultural crops and methods for its evaluation*. Minsk: Law and Economics, 2005, 48 p. (In Russ.)]

7. Козырский В.В., Савченко В.В., Синявский А.Ю. Влияние магнитного поля на диффузию молекул через клеточную мембрану семян сельскохозяйственных культур. *Вестник ВИЭСХ*, 2014, № 2, вып. 15, с. 16-19. [Kozyrsky V.V., Savchenko V.V., Sinyavsky A.Yu. Influence of a magnetic field on the diffusion of molecules through the cell membrane of seeds of agricultural crops. *Vestnik VIESKh*, 2014, no. 2, iss. 15, pp. 16-19. (In Russ.)]

8. Козырский В.В., Савченко В.В., Синявский А.Ю. Влияние магнитного поля на транспорт ионов в клетке растений. *Вестник ВИЭСХ*, 2014, № 3, вып. 16, с. 18-22. [Kozyrsky V.V., Savchenko V.V., Sinyavsky A.Yu. Effect of magnetic field on ion transport in plant cells. *Vestnik VIESKh*, 2014, no. 3, iss. 16, pp. 18-22. (In Russ.)]

9. Козирський В.В., Савченко В.В., Синявський О.Ю. Вплив магнітного поля на водопоглинання насіння. *Науковий вісник НУБіП України*, 2014, вип. 194, ч. 1, с. 16-20. [Kozirsky V.V., Savchenko V.V., Sinyavsky O.Yu. Influx of the magnetic field on the water sump. *Scientific Bulletin of Ukraine*, 2014, iss. 194, art. 1, pp. 16-20. (In Ukr.)]

INFLUENCE OF THE COMBINED ACTION OF AN AC MAGNETIC FIELD WITH Fe₃O₄ NANOPARTICLES (CIT) ON ONTOGENESIS AND MORPHOMETRY OF SUGAR CORN

Kotyuk P.F., Kornienko V.O.

Donetsk National University

st. Universitetskaya, 24, Donetsk, DPR; e-mail: pkotyuk01@mail.ru

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0482

Abstract. The paper presents studies on the effect of the combined action of an alternating magnetic field with Fe₃O₄ (CIT) nanoparticles on the growth processes and ontogeny of sweet corn (*Zea mays* L). The purpose of the studies described in the work is to study the effect of the combined action of an alternating magnetic field with Fe₃O₄ nanoparticles (CIT) on ontogenetic development and morphometry in the early stages of development of sweet corn (*Zea mays* L). In the course of the research, the following was studied: the influence of an alternating magnetic field with a frequency of magnetic oscillations of 50 Hz and an amplitude of 1 mT on morphometric parameters and ontogeny of sweet corn; the effect of nanoparticles of Fe₃O₄ nanoparticles with a citrate coating and a concentration of 0.1 mg/ml on morphometric parameters and ontogeny of sweet corn; the influence of the combined action of an alternating magnetic field with Fe₃O₄ nanoparticles (CIT), in a different order of processing, on morphometric parameters and ontogeny of sweet corn. The seed growth force was also evaluated and compared with respect to the control group during treatment: in an alternating magnetic field, with Fe₃O₄ nanoparticles (CIT), as well as in an alternating magnetic field with Fe₃O₄ nanoparticles (CIT) in a different order of treatment.

Key words: plants, ontogeny, morphology, biotesting, alternating magnetic field, nanoparticles.

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АСПИРИНА С КИСЛОТО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ *TRICHOPLAX ADHAERENS*

Кузнецов А.В.^{1,2}, Курченко В.М.¹, Воронин Д.П.¹, Завьялова О.С.¹

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 10.05.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0483

Аннотация. Кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs) представляют семейство мембранных трёх-субъединичных белков DEG/ENaC, проводящих ионы Na⁺, которые встречаются у представителей многих таксономических групп [1]. DEG/ENaC-каналы включают такие структурные домены, как ладонь, β-шар, костяшка, указательный палец, большой палец и запястье [2]. Будучи каналами с протонной регуляцией, они участвуют во многих физиологических процессах, когда изменяется pH внеклеточной среды [3]. Каналы DEG/ENaC связаны с широким спектром клеточных функций, как ощущение боли и эпителиальный транспорт Na⁺ [4]. Эти каналы обладают различными свойствами стробирования, от почти постоянного открытия до быстрой инактивации, поэтому с нарушением работы этих каналов связано большое число патологий [5]. Традиционно изучение функций этих каналов осуществляли с применением токсинов [6]. Мы обнаружили 9 генов кислото-чувствительных ионных каналов и 12 гомологов с неизвестной функцией в геноме трихоплакса *Trichoplax adhaerens*, две аминокислотные последовательности, из которых (QEP99390.1 и XP_002115321.1) были свёрнуты в пространственные модели и использованы для докинга амилорида, аспирина и салициловой кислоты. Салицилаты имеют множественные сайты связывания на кислото-чувствительных рецепторах трихоплакса, в том числе в кислотном кармане – сенсоре протонов, что предполагает их возможное использование для модуляции активности ASIC-каналов трихоплакса.

Ключевые слова: Placozoa, геном, ASIC-каналы, гомологии, фолдинг, докинг.

ВВЕДЕНИЕ

Кислото-чувствительные ионные каналы (ASICs - Acid-sensing ion channels) широко экспрессируются в организме человека и принадлежат к суперсемейству эпителиальных натриевых каналов, которые чувствительны к внеклеточным протонам и могут ощущать как кратковременное, так и продолжительное закисление [7]. На сегодня известно пять типов субъединиц (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b и ASIC3), кодируемые тремя генами человека (*ACCN2*, *ACCN1* и *ACCN3*), которые могут объединяться в кислотно-активируемые каналы [8]. Поскольку катионные ASIC-каналы присутствуют почти во всех типах нейронов, а в некоторых синаптических пузырьках содержится кислота, участие протонов в синаптической передаче может быть общим явлением для всей центральной нервной системы [3]. ASIC-каналы играют важную роль в различных патологиях, затрагивающих как периферическую нервную систему (например, периферическая боль, диабетическая нейропатия), так и центральную нервную систему (например, инсульт, эпилепсия, мигрень, тревога, страх, депрессия, нейродегенеративные заболевания и т.д.) [5].

Катионные ASIC-каналы являются возможными целями для широкого спектра препаратов [9]. Развитие фармакологии ASIC-каналов основано на изучении их структуры, молекулярных и клеточных функций и физиопатологической роли. Соединения, взаимодействующие с этими каналами, оказывают ингибирующее или стимулирующее действие, а также обладают высокой селективностью или низкой специфичностью. К ним относятся лекарственные препараты и эндогенные регуляторы, природные соединения растительного происхождения и пептиды, выделенные из ядов животных. Так, например, псалмотоксин 1 (PcTx1) может ингибировать или активировать ASIC-каналы в зависимости от подтипа канала и вида животных, а амилорид имеет различные сайты адсорбции, связанные с его ингибирующим и стимулирующим эффектами. Следует отметить, что лиганды не обязательно нацелены на одни и те же подтипы ASIC-каналов, иногда возможны множественные мишени [10].

Структура кислото-чувствительного канала впервые изучена на примере куриного ASIC1a-канала в комплексе с MitTx токсином тегасской коралловой змеи [11]. Оказалось, что три субъединицы объединяются для формирования ионпроводящей поры. Каждая субъединица имеет два трансмембранных домена, один внеклеточный домен с 14 характеристическими остатками цистеина и несколько консервативных аминокислотных мотивов. Остатки Gly443 в селективном фильтре образуют кольцо из трёх карбонильных атомов кислорода с радиусом 3,6 Å, представляя собой энергетический барьер для гидратированных ионов натрия. Внутренняя динамика кислото-чувствительного ионного канала ASIC1 коррелирует с механизмом стробирования. Поворот внеклеточного домена и коллективные движения между большим и указательным пальцами, вызванные связыванием протонов, приводят к изменению конформации рецептора в направлении от

внеклеточной части к трансмембранной части белка, вызывая так называемое "поворот-открытие" поры канала. Особенности деформаций в трансмембранном домене указывают на то, что вероятное положение ворот канала находится в районе Leu440 [12].

Показано, что Placozoa очень чувствительны к кислотному стрессу [13]. В *Trichoplax adhaerens* был описан кислото-зависимый канал утечки ионов Na^+ , семейства DEG/EpaC, называемый TadNaC6, который также блокируется ионами Ca^{2+} . Протонный блок усиливался при низкой внешней концентрации ионов Ca^{2+} , тогда как кальциевый блок интенсифицировался при малой внешней концентрации протонов, что указывает на конкурентное связывание этих двух лигандов с внеклеточными участками канального белка. TadNaC6 активируется общим блокатором DEG/EpaC-каналов амилоридом, что является редкой особенностью, о которой сообщалось только для кислотно-активируемого канала ASIC3 [14]. Известно, что устойчивый ток в ASIC3-канале блокируется также салициловой кислотой, аспирином и диклофенаком [15]. Амилорид и его дериваты имеют различные сайты связывания на ASIC-каналах, как например, в кислотном кармане – сенсоре протонов, в затворе катионного канала и в непротонном сайте связывания лигандов, называемом – ладонь [10].

В этой связи, значительный теоретический интерес представляет изучение связывания низкомолекулярных лигандов с потенциальными ASIC-мишенями для модуляции чувствительности трихоплаксов к низким значениям pH [16] с помощью компаундов, заменяющих амилорид, как например, салициловая кислота и аспирин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислотные последовательности кислото-чувствительных ионных каналов (ASICs) *T. adhaerens* были выбраны из базы данных *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* [17].

Множественные выравнивания и построение деревьев гомологий аминокислотных последовательностей ASIC-каналов проводили на EMBL-EBI-сервере – European Bioinformatics Institute с использованием программы Clustal Omega (1.2.4) [18].

Построение 3D-моделей ASIC-каналов осуществляли на Phyte2-сервере методом сравнения гомологичных последовательностей с известными пространственными структурами белков. Оценивали достоверность и полноту покрытия исследуемых аминокислотных последовательностей [19].

Докинг лигандов с белками. Полученные 3D-модели ASIC-каналов и координаты атомов салициловой кислоты, аспирина или амилорида загружали на SwissDock-сервер. Изучали все возвращённые конформации связанных с белками лигандов и оценивали величину ΔG (ккал/моль) как разность свободной энергии Гиббса конечного состояния (в составе комплекса) и начального состояния (в свободном виде) [20].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амилорид представляет собой синтетическое производное пиразина (рис. 1в). Амилорид является модулятором кислото-чувствительных ASIC-каналов [10]. В частности, амилорид ингибирует натриевые каналы, расположенные в дистальных канальцах почек, тем самым предотвращая всасывание натрия. Салициловая кислота и аспирин, наряду с амилоридом также являются синтетическими модуляторами ASIC-каналов. Сообщалось, что в отличие от амилорида небольшие молекулы, не всегда являются ингибиторами ASIC-токов [10].

Салициловая кислота — это моногидроксibenзойная кислота, которая представляет собой бензойную кислоту с гидроксигруппой в орто-положении (рис. 1а). Салициловая кислота встречается в растениях в качестве естественного соединения. Она обладает противовоспалительными свойствами, действует как местное антибактериальное средство и играет роль ингибитора L-аскорбат пероксидазы (EC 1.11.1.11).

Аспирин или ацетилсалициловая кислота является нестероидным противовоспалительным средством (рис. 1б). Ацетилсалициловая кислота относится к неселективным ингибиторам циклооксигеназы, т.к. связывается и ацетилирует остатки серина в циклооксигеназах. Это вещество обладает анальгетическими, жаропонижающими и антикоагулянтными свойствами.

В основе докинга, т.е. исследования взаимодействия лигандов с макромолекулами-мишенями *in silico*, в качестве стандарта были выбраны известные кристаллические структуры 4fz0 и 4fz1 [22] кислото-чувствительного ионного канала курицы *Gallus gallus* в комплексе с псалмотоксином 1 при низком значении pH (рис. 2). Координаты атомов макромолекул использовали в расчётах по связыванию низкомолекулярных лигандов (рис. 3, табл. 1). Из файла 4fz1.pdb удалили координаты атомов псалмотоксина, получив свободный мономер кислото-чувствительного ионного канала 4fz1 delta (рис. 2в, 2е).

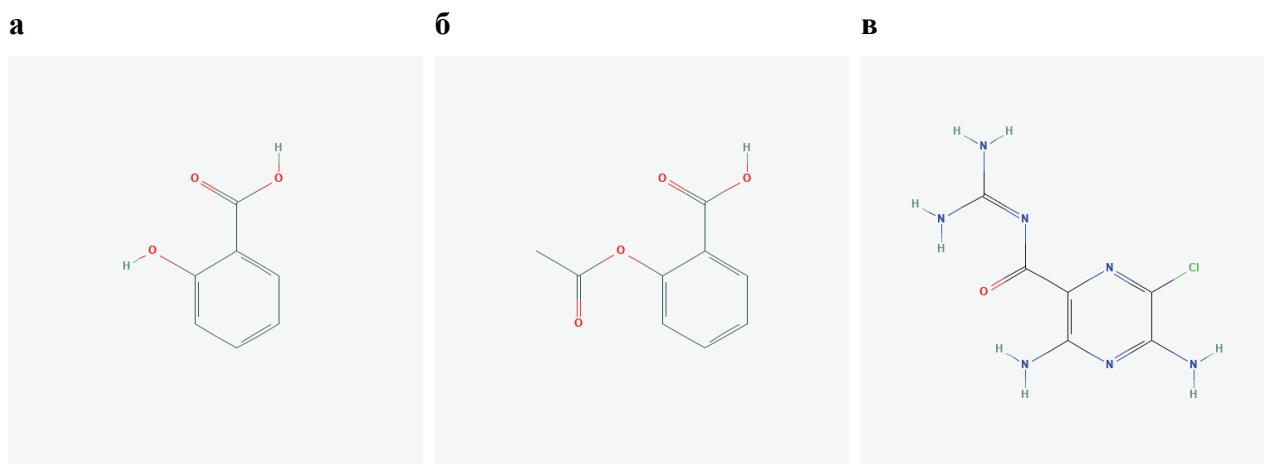


Рисунок 1. Структурные формулы салициловой кислоты (а), аспирина (б) и амилорида (в) в порядке их возрастающей сложности

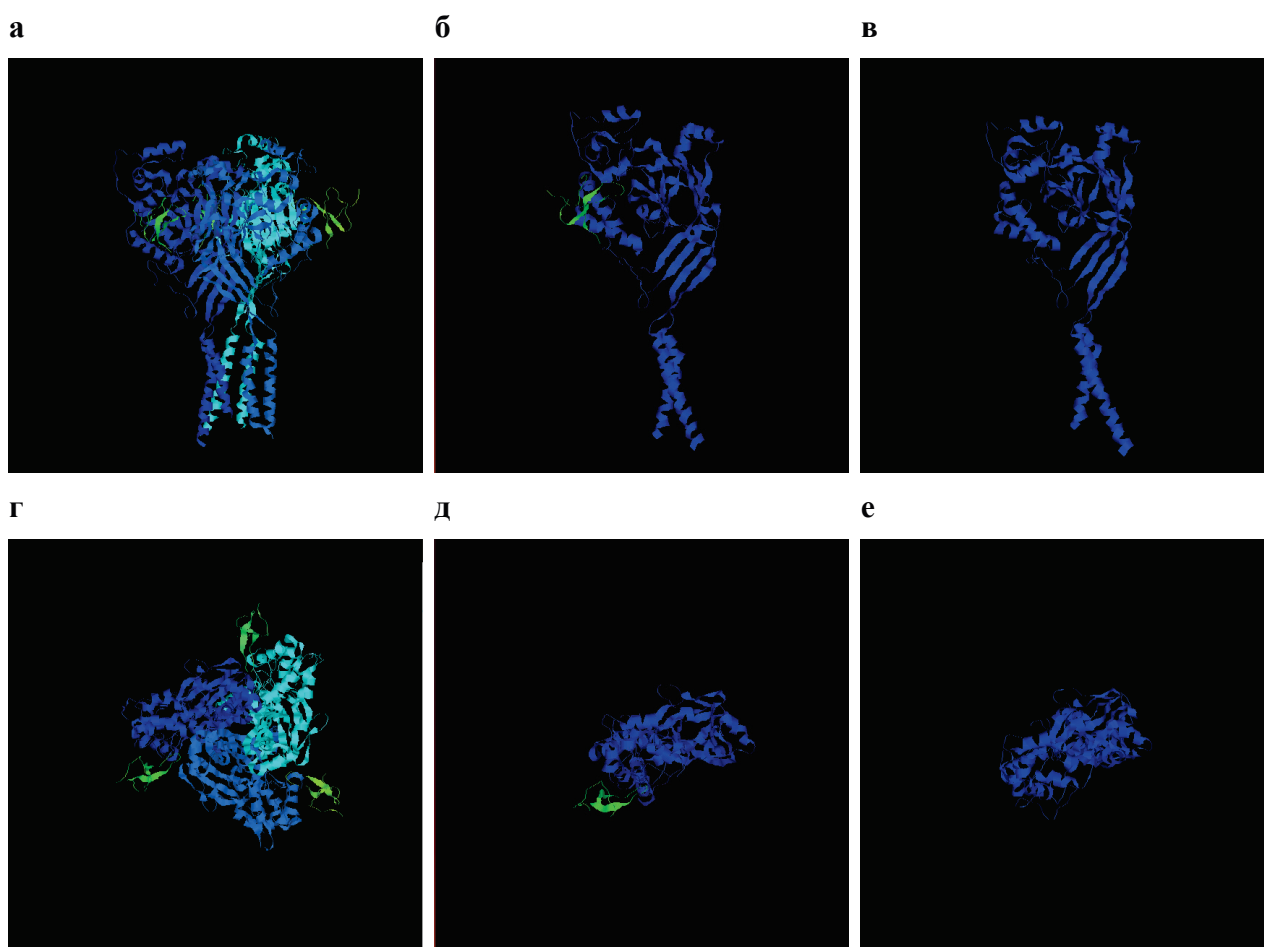


Рисунок 2. Трёхмерные структуры кислото-чувствительного ионного канала курицы *G. gallus* в двух проекциях, тример (4fz0) в комплексе с тремя молекулами плазматоксина (вид сбоку - а, вид сверху - г), мономер (4fz1) в комплексе с плазматоксином (б, д) и мономер без плазматоксина (в, е), ионный канал обозначен голубым цветом, плазматоксин – зелёным

Результаты докинга салициловой кислоты и аспирина с одной субъединицей кислото-чувствительного ионного канала курицы в присутствии плазматоксина (4fz1) и без него (4fz1delta) выявили множественные места связывания для всех вариантов экспериментов (рис. 3). Интересно отметить, что в присутствии плазматоксина, в области кислотного кармана связывалось больше молекул салициловой кислоты или аспирина (рис. 3а, 3в), чем в отсутствие плазматоксина (рис. 3б, 3г), что согласуется с данными по активации этого канала плазматоксином [22].

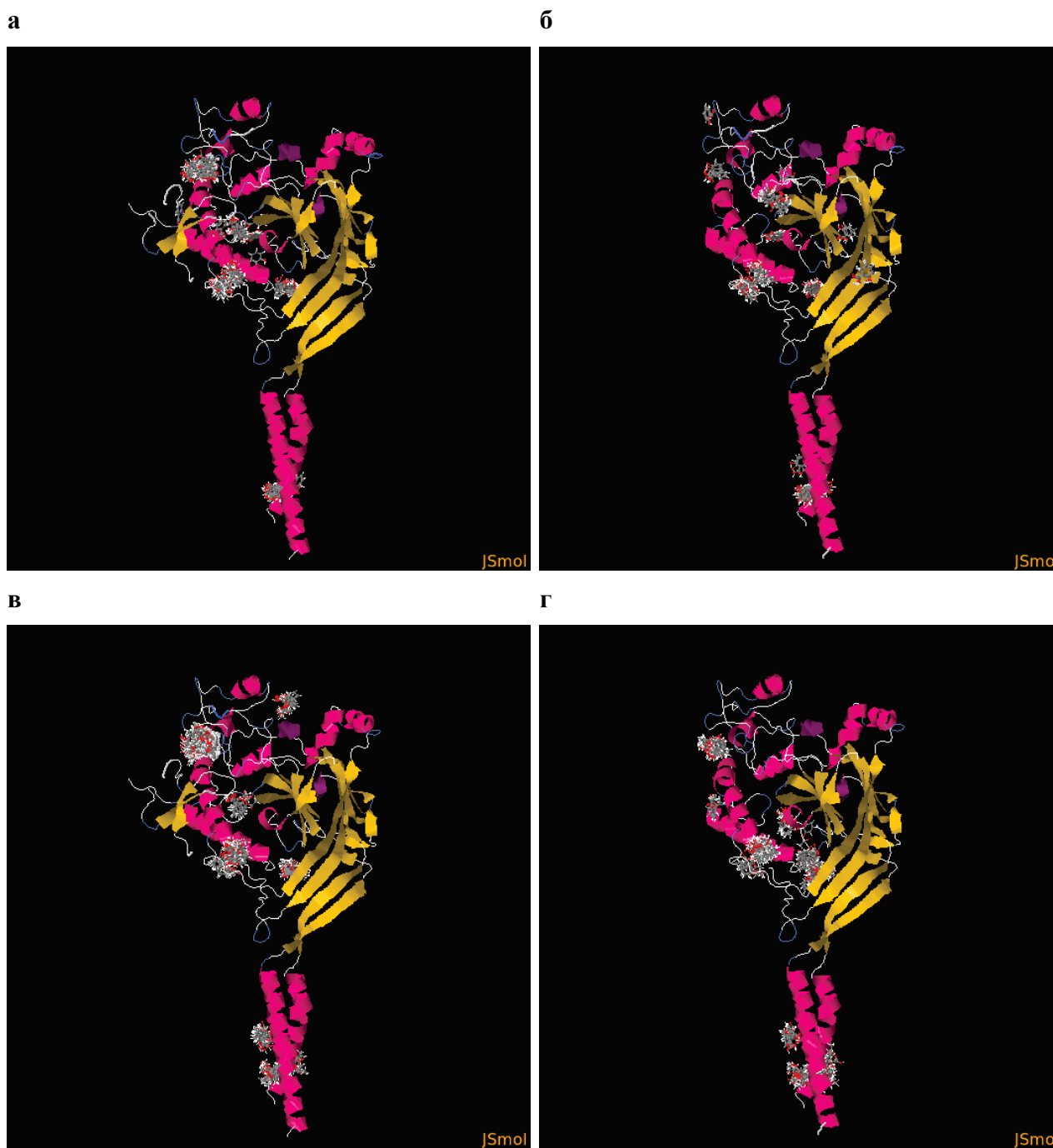


Рисунок 3. Связывание салициловой кислоты (а, б) и аспирина (в, г) с одной субъединицей кислото-чувствительного ионного канала курицы 4fz1 в присутствии плазматоксина, что не показано (а, в) и без него (б, г), α -спирали отмечены пурпурным цветом, β -слои – жёлтым, суперпозиции связывания лигандов – белыми облаками

Расчёт энергетических характеристик связывания низкомолекулярных лигандов с макромолекулами показывает наибольшую специфичность для простейшего из используемых низкомолекулярных компаундов, салициловой кислоты (рис. 1а), при взаимодействии с ASIC1a-каналом курицы без плазматоксина (рис. 3в, 3г), где положение, как кластер 0 и элемент 0, величина полного соответствия $-2633,93$ ккал/моль и расчётное значение ΔG $-6,56$ ккал/моль (табл. 1) согласуются с [10].

Биоинформационный поиск в геноме трихоплакса *T. adhaerens* по запросу, основанному на аминокислотной последовательности ASIC1a-канала курицы без плазматоксина 4fz1delta, выявил 9 кислото-чувствительных ионных каналов и 12 гомологов с неопределённой функцией, направляющие деревья гомологий которых приведены на рисунке 4, где видно, что аннотированные белковые последовательности перемежаются с неаннотированными последовательностями протеинов (рис. 4в). Данное обстоятельство позволяет присвоить последним гипотетические функции ASIC-каналов, как было сделано ранее для опсинов трихоплаксов и мнемипсиса [23].

Таблица 1. Анализ взаимодействия одной субъединицы кислото-чувствительного ионного канала курицы (4fz1) в присутствии плазматоксина и без него (4fz1delta) с салициловой кислотой и аспирином

рН-зависимый ионный канал	Лиганд	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
в присутствии плазматоксина	салициловая кислота	0	0	-2785,85	-6,59
		1	0	-2785,57	-6,79
в присутствии плазматоксина	аспирин	1	0	-2777,05	-6,52
		14	0	-2773,69	-6,91
без плазматоксина	салициловая кислота	0	0	-2633,93	-6,56
		0	0	-2633,93	-6,56
без плазматоксина	аспирин	1	0	-2625,11	-6,52
		1	3	-2622,01	-6,77

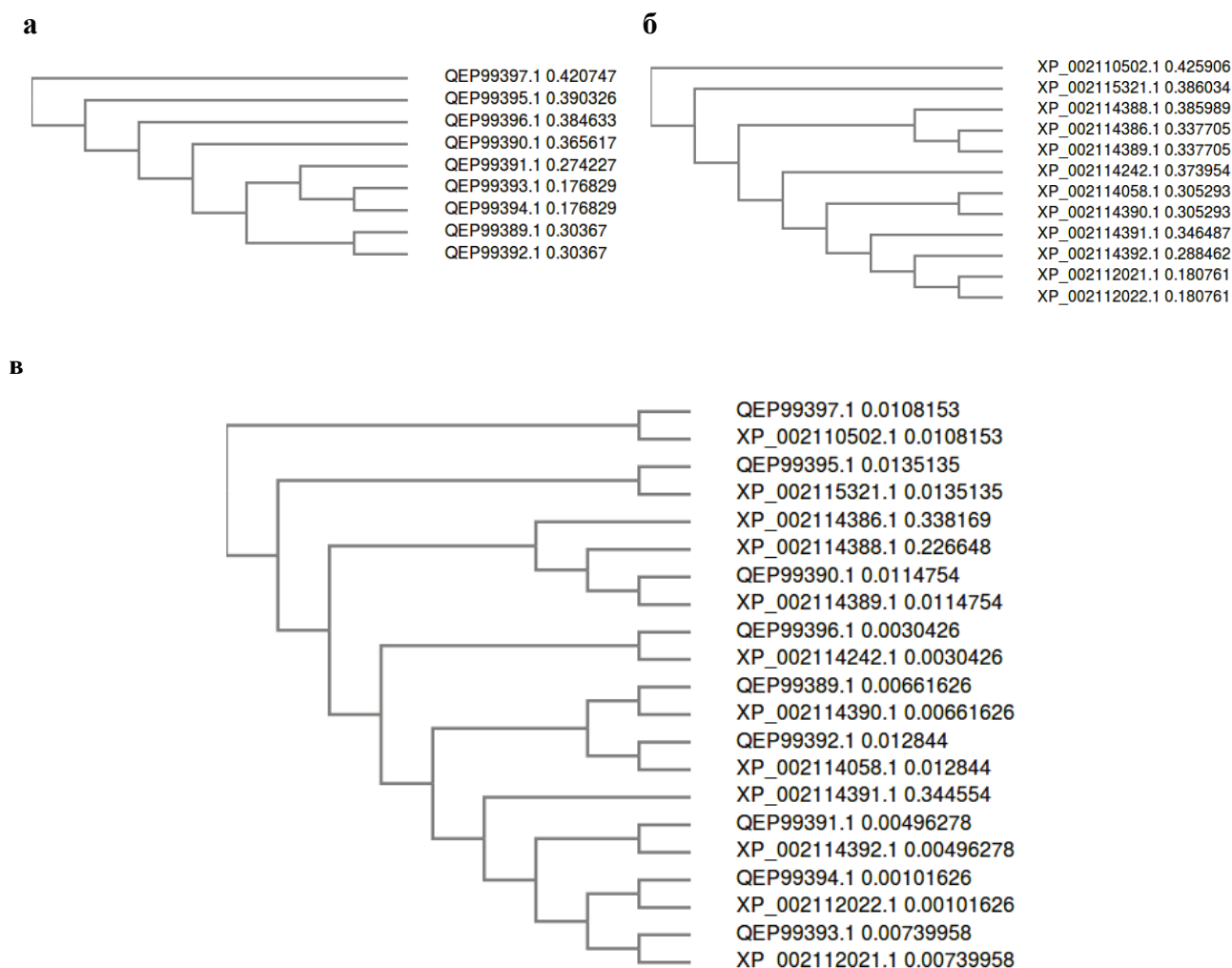


Рисунок 4. Направляющие деревья аминокислотных последовательностей кислото-чувствительных ионных каналов *T. adhaerens* (а), их гипотетических гомологов (б) и общего множества этих протеинов (в), цифры справа – дистанции между листьями

Результаты гомологичного выравнивания с наибольшим покрытием 98% ($E_v=2e^{-70}$, длина 523 aa) для субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и покрытием 97% ($E_v=1e^{-81}$, длина 555 aa) для гипотетического белка XP_002115321.1, соответственно, были использованы для фолдинга протеинов с целью получения их 3D-моделей (рис. 5).

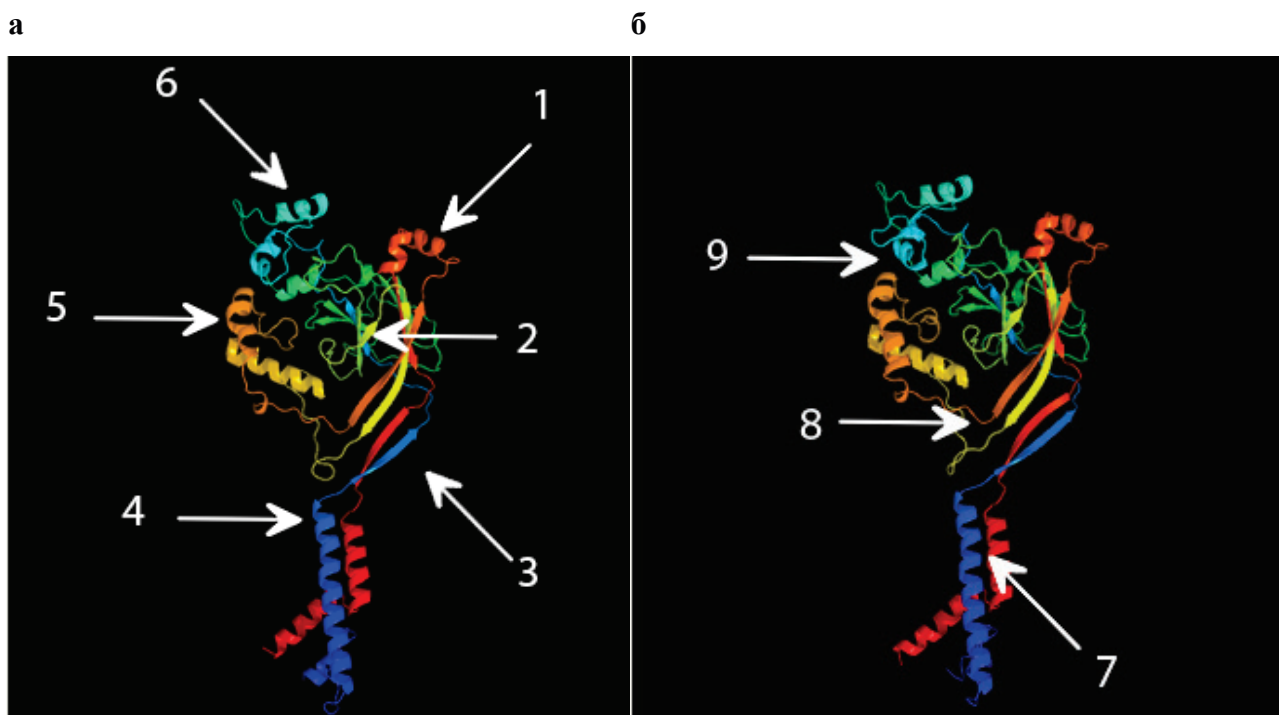


Рисунок 5. Пространственные модели одной из трёх субъединиц кислотно-чувствительного ионного канала QER99390.1 (а) и гипотетического белка XP_002115321.1 (б) из *T. adhaerens*, включающие типичные структурные домены, как костяшка (1), β -шар (2), ладонь (3), запястье (4), большой палец (5) и указательный палец (6) в соответствии с моделью левой руки, держащей мяч [2], ворота канала (7), непротонный сайт (8), протонный карман (9) [10], N-конец – голубой, С-конец – красный

Пространственная модель канального протеина QER99390.1 длиной 425 аминокислотных остатков построена с высоким счётом, достоверностью 100% и охватом 81%. Модель гипотетического белка XP_002115321.1 длиной 438 аминокислотных остатка рассчитана на основе того же высококачественного шаблона sbv1C. Стоит отметить, что для клонированного кислото-чувствительного ионного канала TadNaC6 (TadASIC6, QER99393.1, MK547547) длиной 492 aa из работы [14] полнота покрытия составила 96%, а $E_v=3e^{-45}$.

Докинг салициловой кислоты и аспирина с 3D-моделями макромолекул кислото-чувствительного ионного канала QER99390.1 и гипотетического белка XP_002115321.1 из *T. adhaerens* выявил множественные места связывания низкомолекулярных лигандов на непротонном сайте связывания лигандов в домене ладонь, в протонном кармане и в области ворот канала, как было определено в [10]. Так, например, аспирин связывался преимущественно в районе канального затвора и в основании ладони, но в меньшей степени в районе большого пальца, указательного пальца и костяшек для QER99390.1, тогда как он в меньшей степени адсорбировался в районе указательного пальца и не взаимодействовал с большим пальцем и костяшками XP_002115321.1. Напротив, салициловая кислота почти не связывалась со шлюзом канала QER99390.1 и не взаимодействовала с большим пальцем XP_002115321.1, но связывалась со всеми другими доменами, включая β -шар (рис. 6).

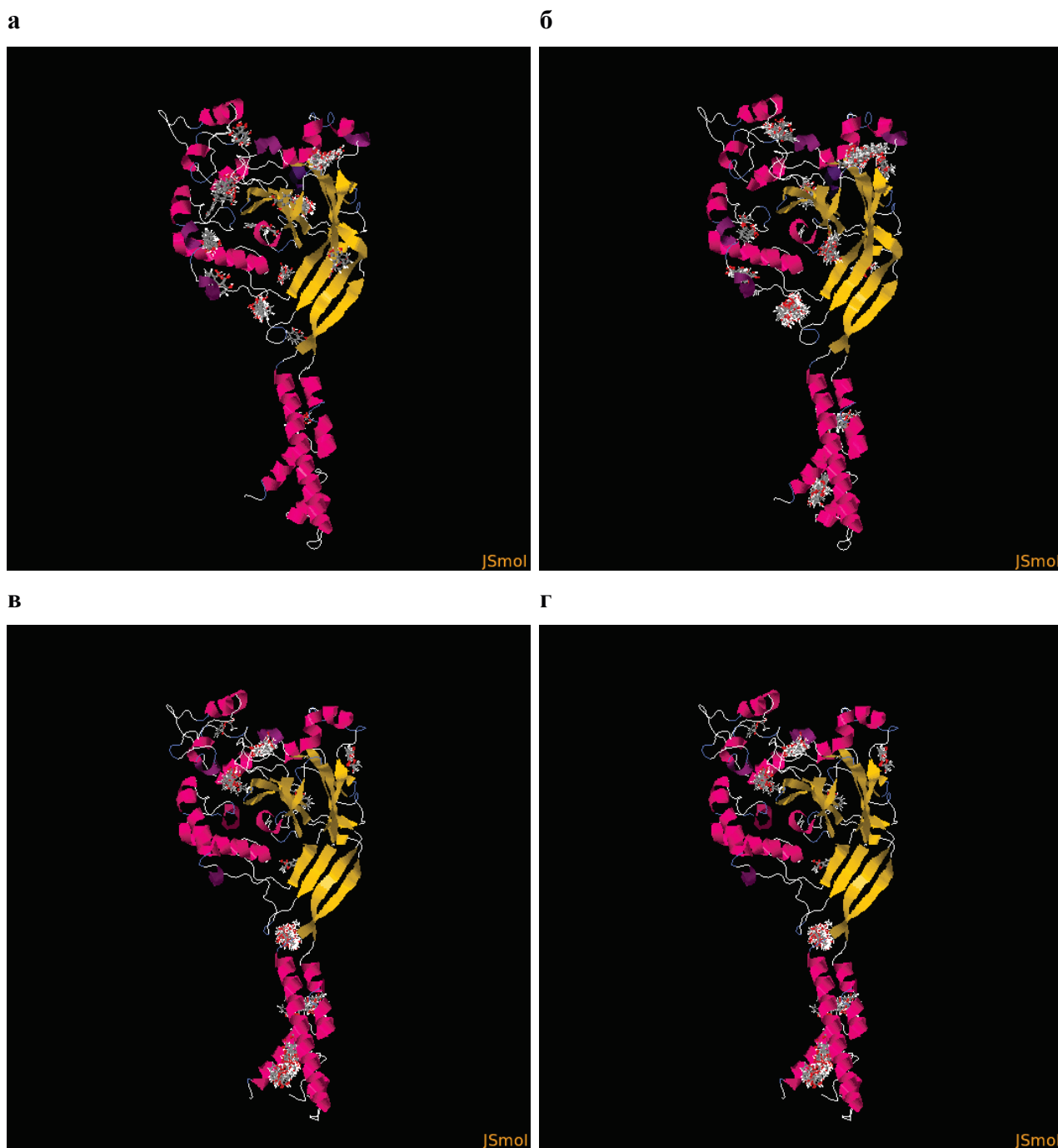


Рисунок 6. Связывание салициловой кислоты (а, б) и аспирина (в, г) с одной субъединицей пространственной модели кислотно-чувствительного ионного канала QER99390.1 (а, в) и гипотетического белка XP_002115321.1 (б, г) из *T. Adhaerens*

Наибольшее абсолютное значение свободной энергии Гиббса (ΔG) равное 6,51 и 6,73 ккал/моль, зафиксировано для связывания аспирина с белком QER99390.1 в районе основания ладони. Салициловая кислота менее интенсивно связывалась в области β -шара со значениями ΔG равными -6,39 и -6,45 ккал/моль. Специфическое связывание отмечено для пары аспирин-XP_002115321.1 со значением $\Delta G=-6,37$ ккал/моль и пары салициловая кислота-QER99390.1 с показателем $\Delta G=-6,29$ ккал/моль (рис. 6, табл. 2).

Таблица 2. Анализ взаимодействия 3D-модели субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и гипотетического белка XR_002115321.1 из *T. adhaerens* с салициловой кислотой и аспирином

рН-зависимый ионный канал	Лиганд	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
QEP99390.1	салициловая кислота	2	0	-2589,92	-6,29
		2	0	-2589,92	-6,29
QEP99390.1	аспирин	1	0	-2581,81	-6,51
		3	0	-2580,11	-6,73
XR_002115321.1	салициловая кислота	0	0	-2668,00	-6,39
		1	1	-2667,73	-6,45
XR_002115321.1	аспирин	0	0	-2658,40	-6,37
		0	0	-2658,40	-6,37

Контрольное взаимодействие амилорида с субъединицей 4fz1delta курицы *G. gallus* оказалось более специфично, чем с 3D-моделями кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и гипотетического белка XR_002115321.1 из *T. adhaerens* (Пр. 1). Так амилорид преимущественно связывался в области ворот канала, непротонного сайта связывания лиганда и в районе протонного кармана между большим и указательным пальцами субъединицы 4fz1delta ASIC1a-канала курицы (Пр. 1a), что согласуется с [2,10]. Максимальные абсолютные значения энергии Гиббса ΔG в районе непротонного сайта связывания лиганда составляли 7,33 и 7,39 ккал/моль (Пр. 2).

В свою очередь, при взаимодействии с пространственной моделью QEP99390.1, амилорид наиболее эффективно связывался в районе указательного пальца и костяшек со значениями ΔG равными -7,65 и -7,07 ккал/моль, соответственно (Пр. 1, 2), а также в протонном кармане, непротонном сайте связывания лигандов и в области ионных ворот (Пр. 1).

При взаимодействии с 3D-моделью XR_002115321.1, амилорид интенсивно связывался в месте расположения β -шара со значениями ΔG равными -7,57 и -6,98 ккал/моль. Кроме того, связывание отмечено в протонном кармане, непротонном сайте связывания лигандов и, особенно, в области ворот канала. Помимо этого, выявлены участки связывания в запястье, между указательным пальцем и костяшками, а также в районе костяшек и β -шара.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, компьютерное моделирование показало, что салицилаты имеют множественные сайты связывания на кислото-чувствительных рецепторах трихоплакса в том числе в кислотном кармане – сенсоре протонов [24], что позволяет надеяться на модуляцию состояния животных в лабораторных экспериментах и обнаружение ярких физиологических эффектов, как например, активация или ингибирование образования розеток при закислении среды [16].

Авторы считают своим долгом выразить благодарность Булкову В.А. и Хавронюку И.С. за содействие, а также Ратникову В.Д., Рыбаковой К.А., Втюриной Д.Н., Халаимовой А.В. и Капранову С.В. за обсуждение рукописи. Работа выполнена в рамках проекта Сириус «Трихоплакс для бионики II».

Список литературы / References:

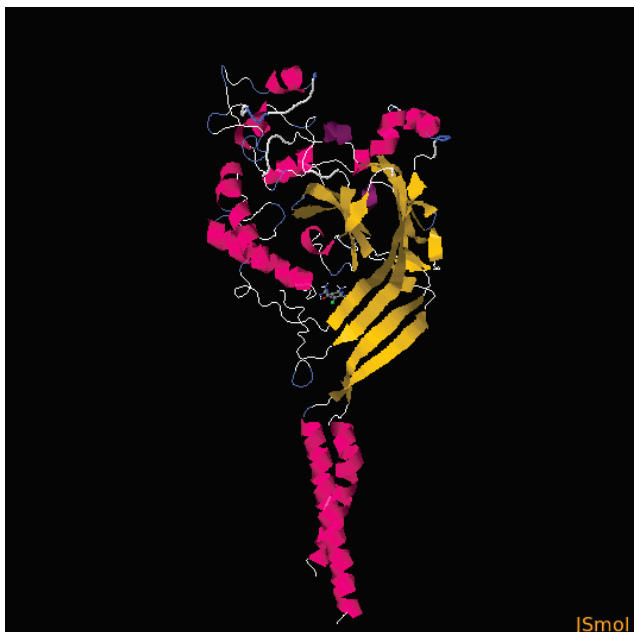
1. Wichmann L., Althaus M. Evolution of epithelial sodium channels: current concepts and hypotheses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2020, vol. 319, no. 4, pp. 387-400, doi: 10.1152/ajpregu.00144.2020.
2. Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7160, pp. 316-323, doi: 10.1038/nature06163.
3. González-Inchauste C., Gobetto M.N., Uchitel O.D. Modulation of acid sensing ion channel dependent protonergic neurotransmission at the mouse calyx of Held. *Neuroscience*, 2020, vol. 439, pp. 195-210, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.023.
4. Hanukoglu I., Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 2016, vol. 579, no. 2, pp. 95-132, doi: 10.1016/j.gene.2015.12.061.
5. Radu B.M., Banciu A., Banciu D.D., Radu M. Acid-Sensing Ion Channels as Potential Pharmacological Targets in Peripheral and Central Nervous System Diseases. *Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.*, 2016, vol. 103, pp. 137-167, doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.10.002.

6. Cristofori-Armstrong B., Rash L.D. Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms. *Neuropharmacology*, 2017, pp. 173-184, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.042.
7. Gründer S., Pusch M. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology*, 2015, vol. 94, pp. 9-18, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.016.
8. Gründer S., Geissler H.S., Bässler E.L., Ruppersberg J.P. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport*, 2000, vol. 11, no. 8, pp. 1607-11, doi: 10.1097/00001756-200006050-00003.
9. Sluka K.A., Winter O.C., Wemmie J.A. Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2009, vol. 12, no. 5, pp. 693-704.
10. Baron A., Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels – Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*, 2015, vol. 94, pp. 19-35, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.005.
11. Bacongus I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. *Cell*, 2014, vol. 13, no. 156, pp. 717-729, doi: 10.1016/j.cell.2014.01.011.
12. Yang H., Yu Y., Li W.G., Yu F., Cao H., Xu T.L., Jiang H. Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, no. 7, e1000151, doi: 10.1371/journal.pbio.1000151.
13. Schleicherová D., Dulias K., Osigus H.J., Paknia O., Hadrys H., Schierwater B. The most primitive metazoan animals, the placozoans, show high sensitivity to increasing ocean temperatures and acidities. *Ecol. Evol.*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 895-904, doi: 10.1002/ece3.2678.
14. Elkhatib W., Smith C.L., Senatore A. A Na(+)-leak channel cloned from *Trichoplax adhaerens* extends extracellular pH and Ca(2+) sensing for the DEG/ENaC family close to the base of Metazoa. *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 44, pp. 16320-16336, doi: 10.1074/jbc.RA119.010542.
15. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A., Bolshakov K.V., Magazanik L.G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J. Neurochem.*, 2008, vol. 106, no. 1, pp. 429-441, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05412.x.
16. Булков В.А., Савченко Е.В., Кузнецов А.В. Placozoa как лакмусовая бумажка закисления океанов. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021», материалы XVI Междунар. науч. конф., г. Севастополь, 13-17 сентября 2021 г., с. 206-207. [Bulkov V.A., Savchenko E.V., Kuznetsov A.V. Placozoa as a litmus test for ocean acidification. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 206-207. (In Russ.)]
17. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955-960, doi: 10.1038/nature07191.
18. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, no. 1, pp. 636-641, doi: 10.1093/nar/gkz268.
19. 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.
20. 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.
21. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, pp. 374, doi: 10.1016/s0968-0004(00)89080-5.
22. Bacongus I., Gouaux E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature*, 2012, vol. 20, no. 489, pp. 400-405, doi: 10.1038/nature11375.
23. Хавронюк И.С., Мамонтов А.А., Булков В.А., Воронин Д.П., Кузнецов А.В. Присваивание функций опсином трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2. Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2021, т. 6, № 4, с. 686-694. [Khavronyuk I.S., Mamontov A.A., Burkov V.A., Voronin D.P., Kuznetsov A.V. Assignment of functions to opsins of *Trichoplax adhaerens* and *Trichoplax* sp. H2. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 686-694. (In Russ.)]
24. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. Gating mechanisms of acid-sensing ion channels. *Nature*, 2018, vol. 15, no. 555, pp. 397-401, doi: 10.1038/nature25782.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Связывание амилорида с одной субъединицей ASIC1a-канала 4fz1delta курицы *Gallus gallus* (а) и с 3D-моделями субъединиц кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 (в) и гипотетического белка XP_002115321.1 (д) из *Trichoplax adhaerens*, соответственно суперпозиции связывания (б, г, е)

а



б



в



г



д

е



Приложение 2. Анализ взаимодействия амилорида с субъединицей ASIC1a-канала 4fz1delta курицы *Gallus gallus*, а также с 3D-моделями одной субъединицы кислото-чувствительного ионного канала QEP99390.1 и субъединицы гипотетического белка XP_002115321.1 из *Trichoplax adhaerens*

рН-зависимый ионный канал	Кластер	Элемент	Полное соответствие, ккал/моль	Расчётное значение ΔG , ккал/моль
4fz1delta	0	0	-2683,97	-7,33
QEP99390.1	0	2	-2683,83	-7,39
	0	0	-2641,16	-7,07
	6	0	-2637,51	-7,65
XP_002115321.1	0	0	-2714,18	-6,98
	1	3	-2707,04	-7,57

PECULIARITIES OF SALICYLIC ACID AND ASPIRIN BINDING TO ACID-SENSITIVE ION CHANNELS OF *TRICHOPLAX ADHAERENS*

Kuznetsov A.V.^{1,2}, Kurchenko V.M.¹, Voronin D.P.¹, Zavyalova O.S.¹

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences

Nakhimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: kuznet61@gmail.com

Received 10.05.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0483

Abstract. Acid-sensitive ion channels (ASICs) represent a family of membrane three subunits' DEG/ENaC proteins that transport Na⁺ ions and are found in representatives of many taxonomic groups [1]. DEG/ENaC channels include such structural domains as the palm, β -ball, knuckle, finger, thumb and wrist [2]. They are involved in many physiological processes as proton-regulated channels, when the pH of the extracellular environment changes [3]. DEG/ENaC channels are associated with a wide range of cellular functions, such as pain sensation and epithelial Na⁺ transport [4]. These channels have different gating properties, from almost constant opening to rapid inactivation, so numerous pathologies are associated with damage to these channels [5]. Traditionally, the functions of these channels have been studied using toxins [6]. We found 9 acid-sensitive ion channel genes and 12 homologs with unknown function in the *Trichoplax adhaerens* genome, of which two amino acid sequences (QEP99390.1 and XP_002115321.1) were folded into 3D-models and used to dock amiloride, aspirin and salicylic acid. Salicylates have multiple binding sites on the acid-sensitive trichoplax receptors, including the acid pocket that is a proton sensor, which suggests their possible application in modulating the activity of the ASIC-channels of *T. adhaerens*.

Key words: Placozoa, genome, ASIC channels, homology, folding, docking.

COUMARIN 337 IN AQUEOUS SOLUTION: INTERPLAY BETWEEN EXCITATION AND HYDRATION

Kostjukov V.V., Leontieva S.V., Savenko E.S., 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 01.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0484

Abstract. Excitation of the C337, highly fluorescent dye in an aqueous solution was studied by the TD-DFT. Through the B3PW91/6-311++G(d, p)/IEFPCM theory level, we obtained the C337 vibronic absorption spectrum which exactly reproduces the experimental maximum. Significant differences are shown between the results of calculating the transition energies using the models of vertical and vibronic transitions. Upon excitation, the main shift of the electron density occurs from C10 to C4 neighboring atom. Thus, large-scale ICT not occur. The effect of excitation on the vibrational spectra of C337 was analyzed. A single C337 molecule and its five different hydration complexes with strongly bound water molecules have been analyzed. Various hydrate complexes of the dye have been studied, and the effect of hydration on its excitation vibrational properties has been elucidated. It was taken into account that a water molecule can attach to the nitrogen atom N1 ("A" type) and the C=O carbonyl ("B" type), and cyano C≡N ("C" type) groups of the dye.

Key words: TD-DFT/DFT, coumarin 337 (523), excitation, hydration, vibronic spectrum, aqueous solution.

INTRODUCTION

Coumarin 337 (C337, also occasionally referred to as C523, Fig. 1) is a highly fluorescent dye used in lasers [1-3] and solar cells [3].

C337 is a member of the 7-aminocoumarins family with a nitrogen atom in position 7 which is rigidly fixed (Fig. 1). This structural feature excludes rotational relaxation and non-radiative TICT [1] which caused a high quantum yield of fluorescence Φ . So, in ethanol, $\Phi=0.65$ [1,4]. In water, the fluorescence quantum yield of C337 is even higher and amounts to $\Phi=0.67$ [4].

The chromophore of C337 is formed by julolidyl ABC moiety (electron donor), and a lactone D ring with oxo and cyano groups (electron acceptors, see Fig. 1). Therefore, due to dye excitation, ICT is possible [1]. The spatial structure of C337 was investigated in Ref. [4] by X-ray diffraction. Aliphatic A and B rings are flexible, so they can have different conformations.

In addition to the C337 structural characteristics, its fluorescence [1,4], hyperpolarizability [5], and dipole moments of ground and excited states [6-8] have been investigated in sufficient detail. The non-covalent binding of the dye with other molecules [9-11], including electron transfer in these heterocomplexes [9,10] was also studied. In solutions, C337 exhibits positive solvatochromism [4-8], which corresponds to the electronic transition of the $\pi \rightarrow \pi^*$ type [12]. This is also consistent with the increase in the dipole moment of the dye in the excited state as compared to the ground state experimentally established [6-8].

Theoretical studies of the C337 photoexcitation in solutions were carried out in three early works semi-empirically [4,5,13] and the most recent one by TD-DFT [14]. In Ref. [4], using the CNDO model, dipole moments, π -electron densities on atoms, and bond lengths in the ground (S_0) and first excited (S_1) singlet states were calculated. Also, the authors of Ref. [4] suggested the enhancement of hydrogen bonds between the solvent and the lactone ring of the dye upon excitation. In Ref. [5], the hyperpolarizability of the C337 molecule and the dipole moment of its ground state were obtained using the PM3 method. The authors of Ref. [13] also calculated the dipole moments and the energies of vertical transitions by the AM1 approach. In Ref. [14], the energies of the six vertical electronic transitions were calculated at the B3LYP/TZVP/vacuum theory level.

Thus, the performed review of the literature shows that, despite the abundance of experimental data on the C337 optical properties, their theoretical study remains poor, especially for the aqueous environment. At the same time, the

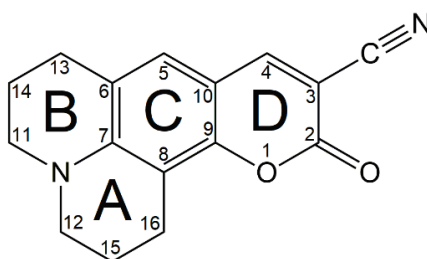


Figure 1. Chemical structure of C337

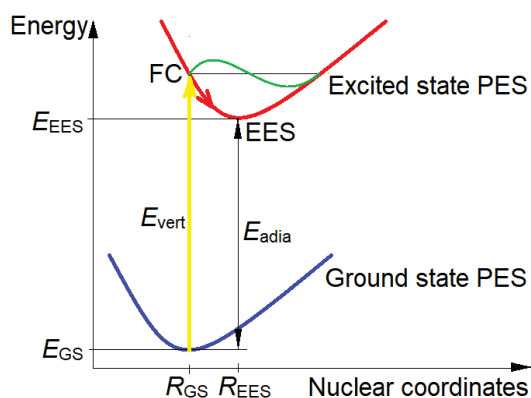


Figure 2. Energetic diagram of vibronic transition

unique property of C337 to intensively fluoresce in a water medium, which causes its biomedical applications, requires a detailed theoretical explanation. In addition to the implicit specification of the solvent, theoretical studies of photoexcitation of a dye in a solution also require analyzes of site-specific interactions (hydrogen bonds), as well as vibronic (rather than purely electronic) transitions. These two important aspects were considered separately by other authors for two other famous 7-aminocoumarins with a structurally rigidized 7-amino group in an aqueous medium – C102 (C480) [15-17] and C343 (C519) [18,19]. In the present work, we have applied these two approaches together in the analysis of the C337 excitation in an aqueous solution.

METHODS

For all calculations, the Gaussian 16 software [20] was applied. The aqueous media was described implicitly by the IEFPCM approach [21]. Water molecules forming strong H-bonds with the C337 molecule were specified explicitly (see below). Under the Franck-Condon principle [22], the electronic transition occurs at fixed nuclear coordinates R_{GS} of the ground state. In other words, this transition is vertical in the “nuclear coordinates-energy” diagram (Fig. 2).

Corresponding excited Franck-Condon (FC) state is non-equilibrium. This state activates the vibrations of the nuclear core (see Fig. 2, green wave). The solvent reaction for the FC state was modeled by a state-specific description [23]. Then, the dye relaxes into an equilibrium excited state (EES) by adjusting the nuclei following to an electron shell ($R_{GS} \rightarrow R_{EES}$, red arrow in Fig. 2). The aqueous environment relaxes also; the solvent reaction field of EES is given by the equilibrium solvation model [24]. The adiabatic energy term $E_{adia} = E_{EES} - E_{GS}$ is used (see Fig. 2). In this case, the adiabatic Hessian model was used: both PESs were calculated and the force constants are evaluated at the respective equilibrium structures (R_{GS} and R_{EES} , see Fig. 2) by harmonic approximation.

The vibronic absorption spectra of C337 were calculated by the time-independent DFT approach of Baiardi et al. [25] built into Gaussian 16. The 6-311++G (d, p) basis set recommended for excited states [26] was used. Unfortunately, the experimental absorption spectrum of an aqueous solution of C337 is absent in the literature; only its maximum ($\lambda_{max} = 452$ nm [4]) is known. However, our unpublished studies of other 7-amino-substituted coumarins (C314, C343, and C334) show that for them the best coincidence of the shape of the calculated absorption spectrum with the experimental one is achieved at a value of $HWHM = 900$ cm^{-1} . Therefore, for the broadening of the bands of vibronic transitions in C337, the same value is adopted in this work. To broaden the calculated IR spectra, we used the $HWHM = 4$ cm^{-1} value. The temperature $T = 298$ K was used for simulations. The visualizations of the spectra and surfaces were performed by the Gaussview 6 software package [27].

RESULTS AND DISCUSSION

The investigation starts from the choice of a functional, which repeats most accurately the experimental absorption spectrum of C337 aqueous solution ($\lambda_{max} = 452$ nm which is equivalent to $E_{max} = 2.74$ eV [4]). It is known that E_{vert} , E_{adia} , and E_{vibron} (maxima of vibronic absorption spectra) depend on the X fraction of the Hartree-Fock exchange: with X rising, these three energies grow also [28,29]. The comparison with the experimental energy E_{max} should not be E_{vert} (as was for the C337 case in Ref. [14]), but E_{vibron} [18,30]. It is known from the theoretical works [4,5,13,14] that the C337 absorption spectrum in the visible range has one band of the singlet (HOMO \rightarrow LUMO, $S_0 \rightarrow S_1$) transition of $\pi \rightarrow \pi^*$ type. As an initial probe, we used the most popular B3LYP functional (X=20%) [31]. However, it gave the $E_{vibron} = 2.71$ eV value slightly underestimated compared with the experimental $E_{max} = 2.74$ eV energy (Table 1). Therefore, after that, to achieve the best match, two other functionals with the same X value were applied, of which B3PW91 gave fine coincidence with the experiment (see Table 1). B3PW91 is a historically first hybrid density functional, which combines Becke exchange [32] with Perdew and Wang correlation [33]. Both components involve local densities and density gradients. The Becke part includes a single parameter that fits the exchange functional to accurate computed atomic data.

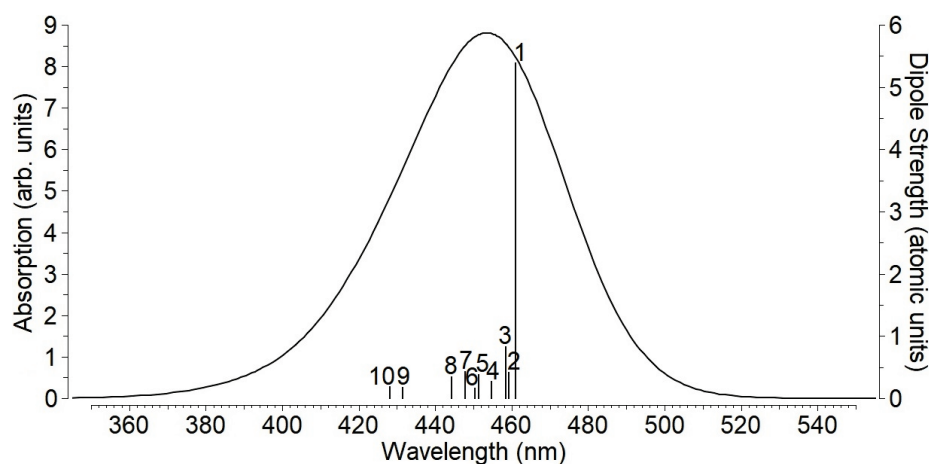


Figure 3. The vibronic absorption spectrum of C337 in an aqueous solution. Vertical sticks with corresponding numbers present vibronic transitions

The C337 spectrum calculated at the B3PW91/(6-311++G(d,p)/IEFPCM theory level, is shown in Fig. 3. On it, vibronic transitions show themselves superfluous in that they give the short-wave slope, on which they are located, a greater flatness in comparison with the long-wave one. Water, being a highly polar solvent, smoothes vibronic bands.

However, in the experimental absorption spectrum of C337 in cyclohexane, they can be observed as individual peaks [11].

Thus, further analysis will be performed at the B3PW91/(6-311++G(d,p)/IEFPCM theory level. The coordinates of the C337 atoms in the GS and EES are presented in Table S2. The model of C337 vertical transitions in Ref. [14] gave underestimated ($\lambda_{\max}=373$ nm at the B3LYP/TZVP/vacuum theory level) wavelength value calculated.

The calculations with an implicit specification of the water environment will be references to trace the influence of hydration on dye excitation. Five patterns of C337 H-bonds with waters were used in the present work following Ref. [15-17,34,35] for C102. Namely, bindings with the nitrogen atom of chromophore (“A” type), the carbonyl oxygen atom (“B” type), and the nitrogen atom of cyano group (“C” type) were considered. The “B” and “C” bonding types are possible with single or double waters. In the case of binding to each of these groups of two water molecules, we will designate them, respectively, “B1”, “B2”, “C1”, and “C2” (Fig. 4).

The briefly structural description of C337 hydration complexes is the following. The endocyclic O1 atom of the lactone D ring is a hydrogen-bond acceptor but obstacles from the neighboring aliphatic hydrogens of the C16 atom (see atom numbering in Fig. 1) do not allow waters to bind with this oxygen. The H11 and H12 hydrogens block the water access to the N1 atom from the chromophore plane. However, the water bounds with an N1 atom situating over it (“A”-type H-bond). The water molecule bounded with the C337 carbonyl group (H-bond of “B” type) is located in the chromophore plane on the side of the C=O line. These features agree with Ref. [15] for C102. The water bound to the cyano group of the dye (“C” type) is in line with the C≡N bond (see Fig. 4). In the “B+C” complex, waters are situated in the chromophore plane. For the “2B+2C” complex, the angles between H-bonds connecting waters and dye carbonyl and cyano groups are 95° and 87° , respectively. In this case, all four water molecules, due to mutual steric obstacles, lie outside the plane of the dye chromophore, and a hydrogen bond is formed between two of them (“B2” and “C1”, see Fig. 4).

The “A”-type H-bonds are cleaved when optimizing the excited state. This is explained by the electron density redistribution (see below) and agrees with Ref. [15] for C102. Therefore, their parameters for “A”, “A+B”, and “A+2B” hydrate complexes were calculated for the GS and FC only. However, “B”- and “C”-types H-bonds are strengthened due to excitation, which corresponds to their shortening (Table 2). This regularity is consistent with the assumption of other authors [4] about C337 hydration (see Introduction) as well as with Refs. [15-17] for C102. For the “2B” hydrated complex of C102 studied by the Monte Carlo simulation [35], one H-bond between the water molecule and the carbonyl group was much more stable than the other. Following our results, the strengths of “B1” and “B2”, “C1” and “C2” bonds are close to each other (see Table 2). It is consistent with Ref. [16] for C102. The introduction of additional water molecules weakens the original hydration H-bonds (B1 vs. B, and C1 vs. C). Remember that B2 and C1 water molecules are also linked by H-bond (see Fig. 4). The hydrogen bond of the water molecule with the carbonyl group (B, B1, and B2) turns out to be somewhat stronger than with the cyano group (C, C1, and C2). The “A”-type H-bond is significantly weaker than the “B” and “C” types. It is also interesting to note that the addition of a bound “A”-type water molecule slightly weakens the H-bonds of “B” and “C” types (“A+B+C” vs. “B+C”, and “A+2B+2C” vs. “2B+2C”, see Table 2).

Table 1. Calculated energies for C337 excitation in aqueous solution

Hybrid functional	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{adia} (nm)	E_{adia} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)
B3LYP	406	3.05	446	2.78	457	2.71
B3P86	402	3.08	441	2.81	450	2.76
B3PW91	403	3.08	443	2.80	453	2.74

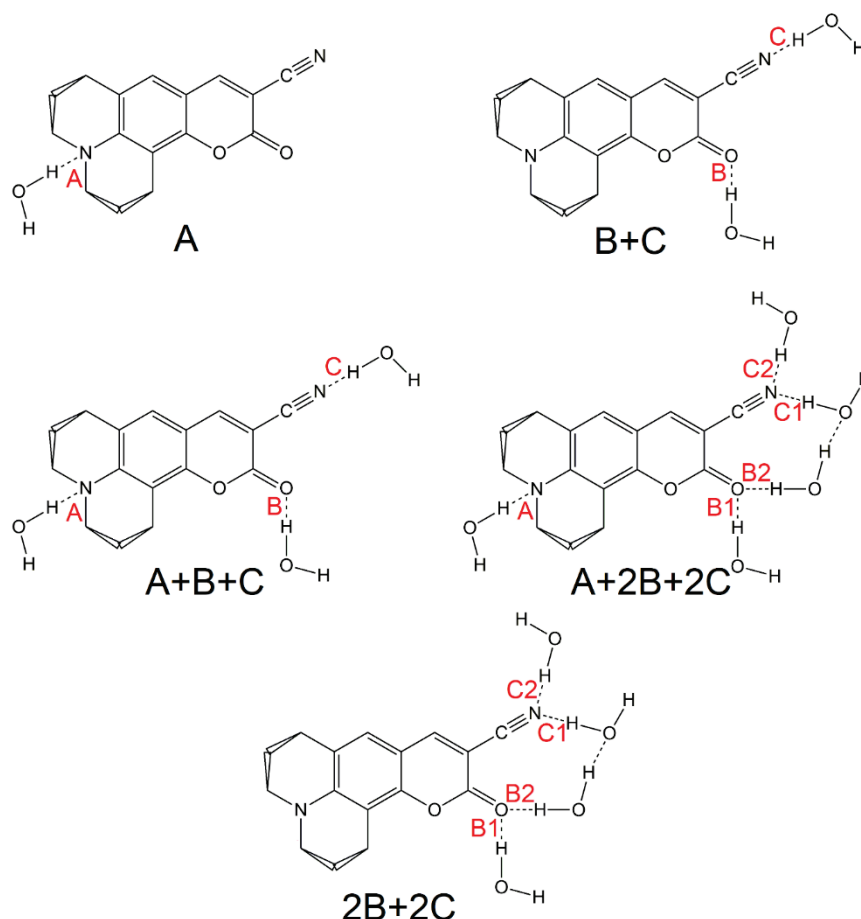


Figure 4. C337 hydrated complexes

Let us describe the influence of hydration on frontier Mos shown in Figs. 5 and 6. As seen in Fig. 6, the LUMOs are identical for a single C337 molecule and its hydration complexes. Wherein, LUMOs do not cover hydration water molecules. At the same time, HOMOs capture waters bound to the dye by the “A”-type. However, waters bound to the C337 by “B” and “C” types are not covered by HOMOs (see Fig. 5). The water molecule binding by “A” type leads to a short-wavelength shift, and by “B” and “C” types – long-wavelength one (Table 3). This agrees with cleavage of “A”-type H-bond which is energetically unfavorable, and, respectively, energetically favorable strengthening of “B”- and “C”-type H-bonds due to excitation. A hypsochromic shift for the “A+B+C” complex in comparison with a single dye molecule occurs which agrees with Refs. [30,31] for C102.

Table 2. Lengths (distances between acceptor and donor atoms in Å) of H-bonds in hydrated C337 complexes

System	H-bond	Ground state	Excited equilibrium state
A		3.150	-
B+C	B	2.836	2.816
	C	2.942	2.935
A+B+C	A	3.186	-
	B	2.845	-
	C	2.951	-
A+2B+2C	A	3.263	-
	B1	2.871	-
	B2	2.959	-
	C1	2.988	-
2B+2C	B1	2.863	2.844
	B2	2.950	2.928
	C1	2.978	2.971
	C2	2.992	2.981

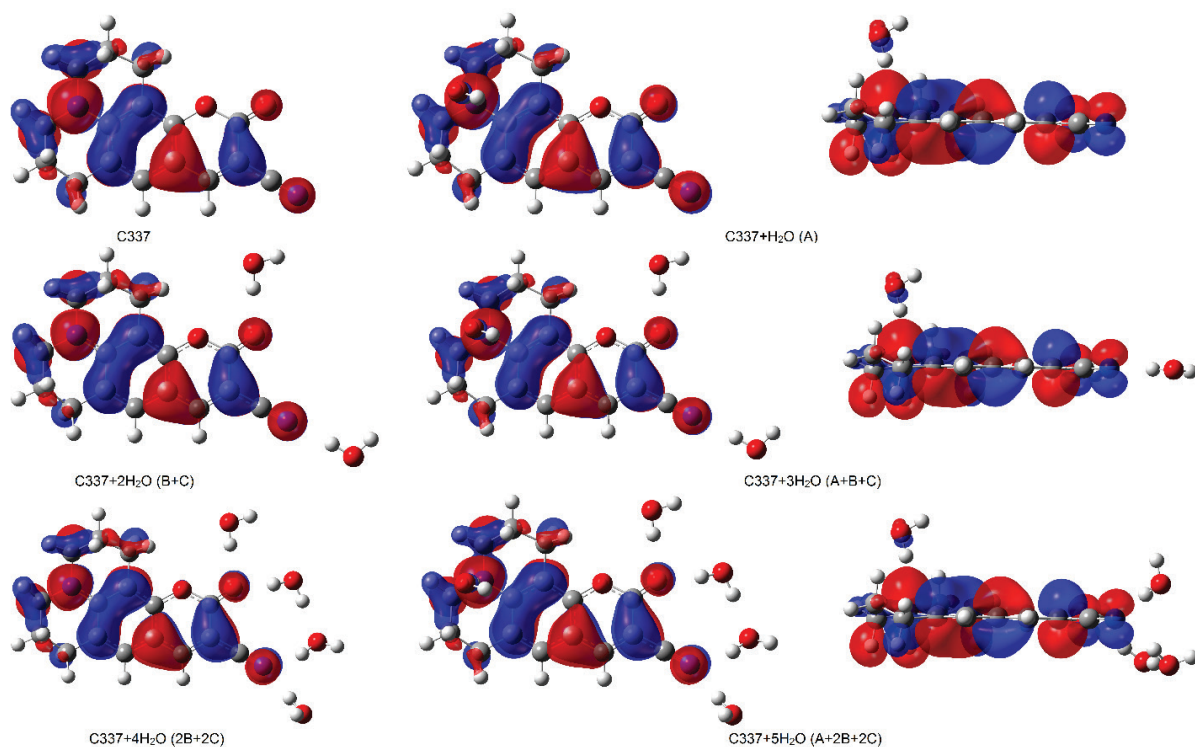


Figure 5. HOMOs of a C337 and its hydrated complexes

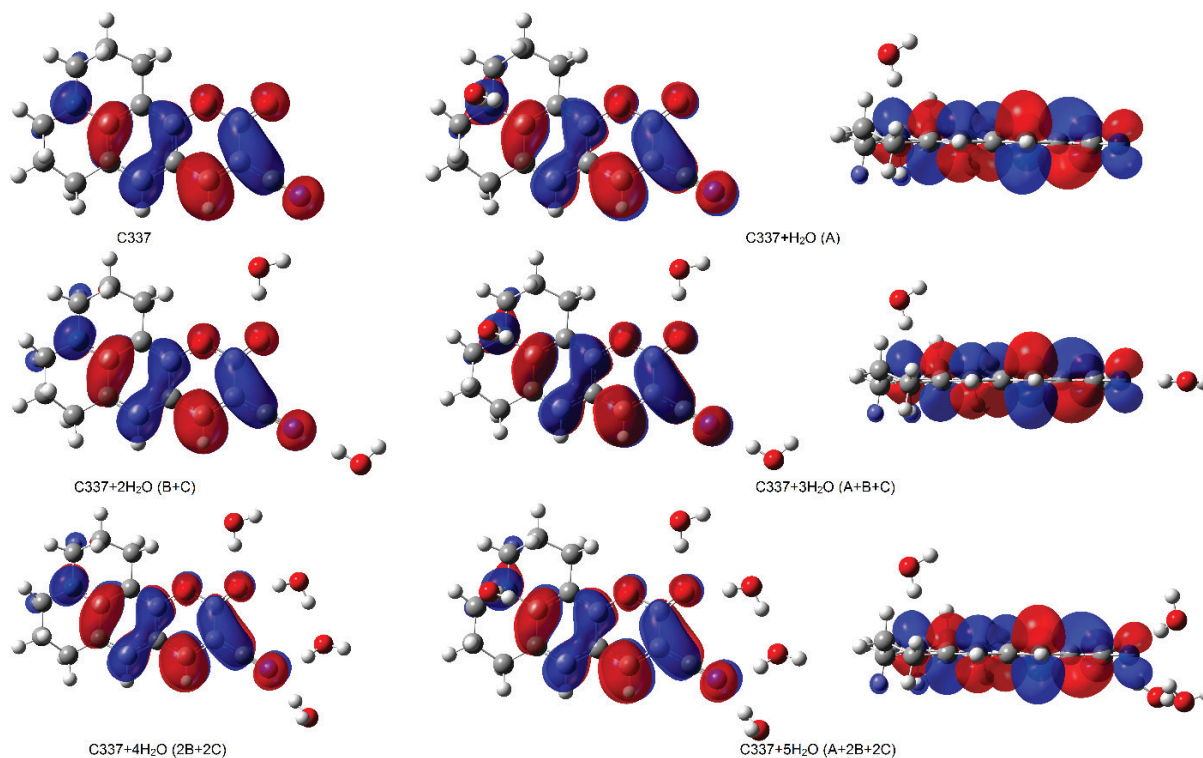


Figure 6. LUMOs of a C337 and its hydrated complexes

Table 3. Calculated energies and wavelengths for excitations of single C337 dye and its hydrated complexes (B3PW91/(6–311++G(d,p)/IEFPCM theory level)

System	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{adia} (nm)	E_{adia} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)
C337	403	3.08	443	2.80	453	2.74
A (C337+H ₂ O)	395	3.14	-	-	-	-
B+C (C337+2H ₂ O)	405	3.06	446	2.78	457	2.71
2B+2C (C337+4H ₂ O)	408	3.04	449	2.76	459	2.70
A+B+C (C337+3H ₂ O)	400	3.10	-	-	-	-
A+2B+2C (C337+5H ₂ O)	404	3.07	-	-	-	-

The hydration does not influence the shape of the C337 absorption spectrum. Also noteworthy is the smaller number of vibronic transitions for the "2B+2C" complex compared to "B+C" (7 vs. 10). In addition, vibrations #2 and #3 involved in them are associated with the water molecules.

Analysis of calculated IR spectra of C337 and its hydration complexes allows the following conclusions to be drawn. In the ground state of a single C337 molecule, the most intense are the shear vibrations of the chromophore rings in its plane (#60, #77, #79, and #80). Upon excitation, they essentially weaken, as well as the carbonyl group's vibrations become the strongest. Due to excitation, the intensity of vibrations of the latter remains almost unchanged, and the intensity of compression-extension of the cyano group increases significantly. This pattern is also observed for the "B+C"-type complex. Water molecules bound to C337 introduce to the IR spectra their vibrations but they have almost no effect on the intensity of vibrations of the carbonyl and cyano groups with which they are bounded, reducing their frequency by $\Delta\nu \approx -50 \text{ cm}^{-1}$. It is interesting to note that excitation has the same effect on these vibrations mentioned above: the vibrations of the water hydrogens involved in the H-bonds with the C337 carbonyl and cyano groups are much stronger compared to uninvolved ones. The "B2" and "C2" water molecules add in the IR spectra weaker corresponding vibrations compared with "B1" and "C1". Note that the "B2" and "C2" H-bonds themselves are weaker than "B1" and "C1" (see Table 2). The connection of two water molecules to the carbonyl group increases the intensity of their vibrations in the excited state as compared to the ground state. At the same time, the intensity of vibrations of the cyano group increases with the addition of the second water molecule bound to it. In this case, excitation has little effect on the intensity of vibrations of hydrogens of water molecules. The vibration of the "A"-type water hydrogen is essentially less intensive than by the "B" and "C" types. This regularity is shown also in Figs. S7 and S8, in which the hydrogen vibration of water molecule bound to the endocyclic nitrogen atom of the dye has significantly less intensity than in water hydrating its carbonyl or cyano groups. Note that in Ref. [10], when measuring the IR spectrum of the ground state of C337 in acetonitrile, the absorption band of the carbonyl group is in the range of $1690\text{-}1740 \text{ cm}^{-1}$, and that of the cyano group is $2220\text{-}2250 \text{ cm}^{-1}$, which is in good agreement with our calculated IR spectra.

The electron density distribution was described by Mertz-Kollman charges [36] of non-hydrogen atoms. Let's analyze the atomic charges of a single dye molecule. Fig. S12 shows that in the ground state C2, C9, and C31 are positively charged, while O1, O2, N3, and C3 atoms have negative charges. These atoms belong to the lactone D ring and carbonyl and cyano groups attached to it. During GS \rightarrow FC excitation, the electron density shifts mainly from the C10 atom to the C4 nearest neighbor. Also, a weak shift from N1 to C5, C11, and C12 took place (Fig. 7). Therefore, the large-scale ICT [1], following our calculations, does not occur. Atomic charges change due to FC \rightarrow EES relaxation in comparison with GS \rightarrow FC excitation are slight ($q_{\text{EES}} - q_{\text{FC}} < 0.08 \text{ e}$).

The addition of explicit water molecules bound to C337 by "B+C" or "2B+2C" types, respectively, lead to noticeable changes in the dye atomic charges (ring D, carbonyl, and cyano groups) of the ground state compared to a single C337 molecule. Respectively, the photoinduced electron density redistributions for a single C337 molecule and its hydrate "B+C" and "2B+2C" complexes differ insignificantly from each other. Also, there is no noticeable photoinduced polarization of water oxygens and hydrogens involved in "B"-type H-bonds with the dye (Fig. 8). From Fig. 8 it can also be seen that the photoinduced redistribution of the electron density is local.

On the contrary, the binding of "A"-type water molecule significantly affects the charge of the endocyclic nitrogen atom and its C6 and C7 neighbors in the ground and excited FC states. Nevertheless, a slight decrease in the positive charge of the N1 atom upon excitation is sufficient to break the "A"-type H-bond of the water molecule with it (see above). The photoinduced changes in the atomic charges for other dye atoms in the "C337+H₂O (A)" system are almost the same as for a single dye molecule. The "A" water molecule is highly polarized upon GS \rightarrow FC excitation (see Fig. 8). The "A+B+C" and "A+2B+2C" complexes combine parameters of "A", "B+C", and "2B+2C" systems described above.

The analysis of electron density distribution performed helps to explain the C337 dipole moments (Table 4). The dipole moment increases essentially upon excitation: $\mu_{\text{GS}} > \mu_{\text{FC}} \approx \mu_{\text{EES}}$. This feature is qualitatively consistent with the experimental result $\mu_{\text{EES}} = 2.3 \times \mu_{\text{GS}}$ of other authors [4], and with the C337 positive solvatochromism [4-8]. Ref. [5] gives the experimental $\mu_{\text{GS}} = 10.2 \text{ D}$ and theoretical (PM3) $\mu_{\text{GS}} = 9.20 \text{ D}$ values. Theoretical (AM1) calculations from Ref. [13] give $\mu_{\text{GS}} = 9.68 \text{ D}$ and $\mu_{\text{EES}} = 15.1 \text{ D}$. Ref. [6] reports the experimental $\mu_{\text{GS}} = 1.95 \text{ D}$ and $\mu_{\text{EES}} = 5.97 \text{ D}$ values with the angle between them being $\varphi \approx 2^\circ$. In Ref. [7], $\mu_{\text{GS}} = 1.8 \text{ D}$ and $\mu_{\text{EES}} = 4.9 \text{ D}$ experimental values were obtained. According to our calculations, $\mu_{\text{FC}} \approx \mu_{\text{EES}} \approx 1.5 \times \mu_{\text{GS}}$. As can be seen, these values differ significantly from each other and are much less than

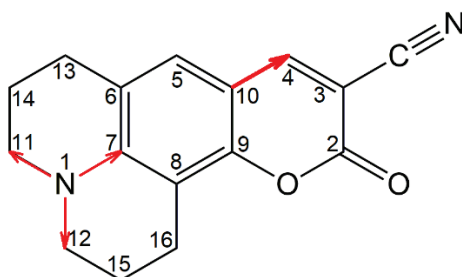


Figure 7. Electron density displacements upon GS \rightarrow FC transition

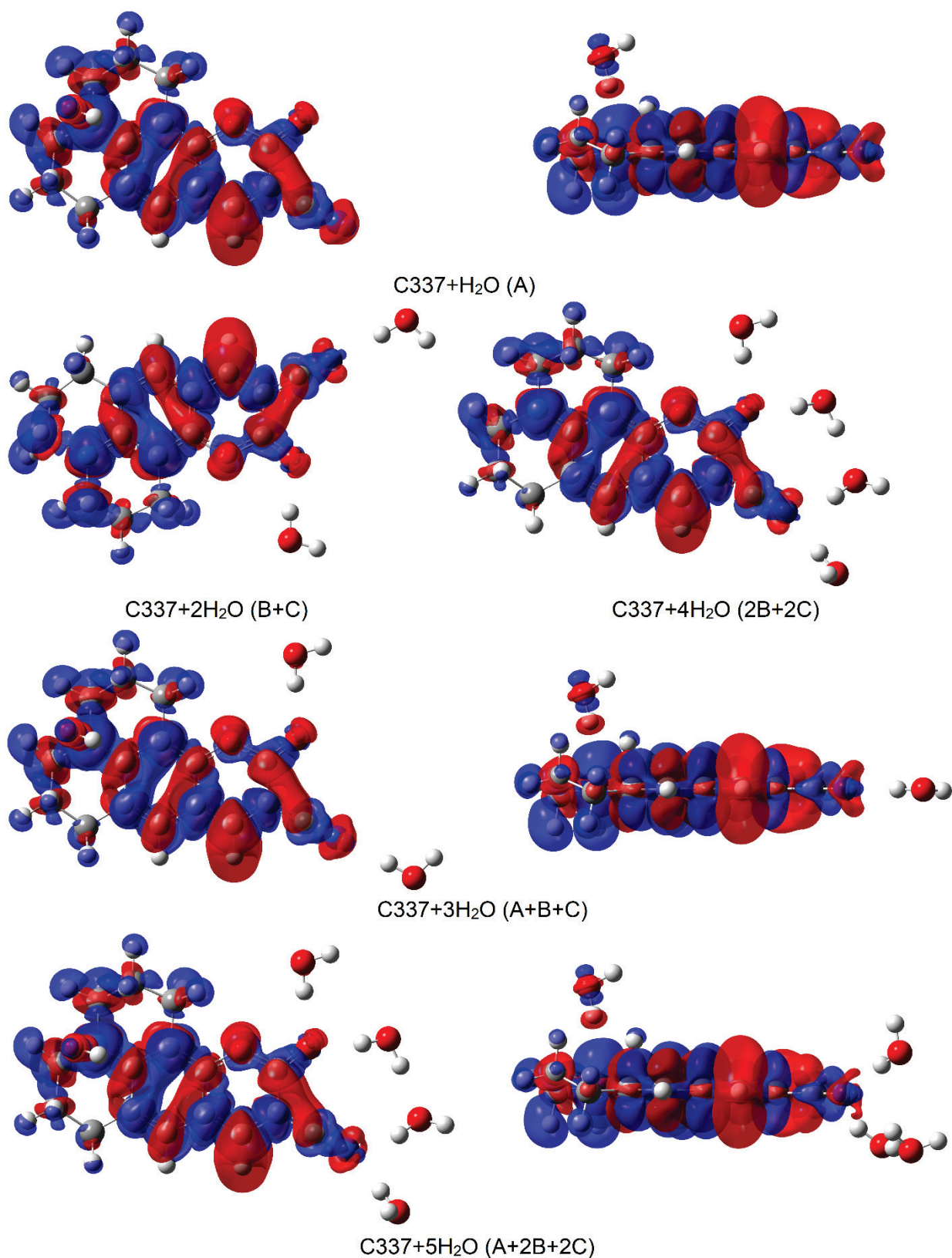


Figure 8. Electron density differences between Franck-Condon and ground states for hydrated complexes of C337

those obtained in this work (see Table 4). The μ is directed along with the BCD line in the GS, and in FC and EES ($\mu_{FC} \approx \mu_{EES}$) – at a $\varphi \approx 11^\circ$ angle to it (see scheme inside Table 4). These μ changes are explained by the electron density displacement from the C10 atom to the C4 atom (see above). The transition dipole moment M is oriented along the C337 x-axis (see Table 4). Unfortunately, the M values for the C337 excitation from other authors lack.

Table 4. Calculated moments (D) of C337 in an aqueous media. Cartesian coordinate axes coincide with the main inertia axes of the molecule

Dipole moment	GS	FC	EES	Transition moment	
μ_x	-16.3	-24.7	-23.7	M_x	-8.75
μ_y	3.24	1.98	2.12	M_y	-0.346
μ_z	-0.540	-0.694	-0.548	M_z	-0.247
μ	16.6	24.8	23.8	M	8.76

CONCLUSIONS

Vibronic transitions and hydration were considered for theoretical investigation of the coumarin 337 excitation in aqueous media. The B3PW91/6-311++G(d,p)/IEFPCM theory level gives the vibronic absorption spectrum, which good consistent with the experiment. A single C337 molecule and its hydration complexes were considered. Waters attach to the endocyclic nitrogen atom ("A" type), the carbonyl ("B" type), and cyano ("C" type) groups. The hydrogen bond of the "B" type is somewhat stronger than the "C" type. The "A"-type H-bond in the dye ground state is essentially weaker than the "B"- and "C"-types ones. The addition of the water molecules ("2B" and "2C" complexes) weakens the initial intermolecular H-bonds ("B" and "C" complexes). HOMOs cover waters bound by the "A" type. However, waters bound by the "B" and "C" types are not captured by HOMOs. Water molecules bounded with dye do not influence the shape of the C337 absorption spectrum. The binding of an "A"-type water molecule provides a blue shift, while "B"- and "C" types water – a redshift. Main electron density shift upon excitation took place from C10 to C4 neighboring atom. Therefore, ICT from one side of the molecule to the other does not take place. There are no noticeable photoinduced polarization of water oxygens and hydrogens involved in "B"- and "C"-types H-bonds with the dye. The "A" water molecule is highly polarized upon excitation. The absolute value of the dipole moment upon excitation increases approximately 1.5 times. At the same time, its direction along the line passing through the centers of the B, C, and D rings changes insignificantly.

References:

1. Reynolds G.A., Drexhage K.H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Optics Commun.*, 1975, vol. 13, pp. 225.
2. Choi D.W., Lim C.W., Sohn S.H. Optical properties of Rh6G:C337 dye mixture in the sol-gel silica matrix. *J. Mater. Sci.*, 2004, vol. 39, pp. 4017-4019.
3. Liu X., Cole J.M., Waddell P.G., Lin T.C., Radia J., Zeidler A. Molecular Origins of Optoelectronic Properties in Coumarin Dyes: Toward Designer Solar Cell and Laser Applications. *J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 116, pp. 727-737.
4. Abdel-Mottaleb M.S.A., Antonious M.S., Abo-Aly M.M., Ismaiel L.F.M., El-Sayed B.A., Sherief A.M.K. Photophysics and dynamics of rigidized coumarin laser dyes. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1989, vol. 50, pp. 259-273.
5. Moylan C.R. Molecular Hyperpolarizabilities of Coumarin Dyes. *J. Phys. Chem.*, 1994, vol. 98, pp. 13513-13516.
6. Raikar U.S., Tangod V.B., Mannopantar S.R., Mastiholi B.M. Ground and excited state dipole moments of coumarin 337 laser dye. *Optics Communications*, 2010, vol. 283, pp. 4289-4292.
7. Kumar S. Comparative Study of Excited State Dipole Moment of Coumarin Laser Dyes: Solvent and Substituent Effect. *J. Mater. Sci. Eng. B*, 2014, vol. 4, no. 12, pp. 358-365.
8. Liu X., Cole J.M., Low K.S. Solvent Effects on the UV-vis Absorption and Emission of Optoelectronic Coumarins: Comparison of Three Empirical Solvatochromic Models. *J. Phys. Chem. C*, 2013, vol. 117, pp. 14731-14741.
9. Wang C., Akhremitchev B., Walker G.C. Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy of Photoinduced Intermolecular Electron Transfer Dynamics and Solvent-Solute Reaction Geometries: Coumarin 337 in Dimethylaniline. *J. Phys. Chem. A*, 1997, vol. 101, pp. 2735-2738.
10. Ghosh H.N., Verma S., Nibbering E.T.J. Ultrafast Forward and Backward Electron Transfer Dynamics of Coumarin 337 in Hydrogen-Bonded Anilines as Studied with Femtosecond UV-Pump/IR-Probe Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 2011, vol. 115, pp. 664-670.
11. Liu X., Cole J.M., Chow P.C.Y., Zhang L., Tan Y., Zhao T. Dye Aggregation and Complex Formation Effects in 7-(Diethylamino)-coumarin-3-carboxylic Acid. *J. Phys. Chem. C*, 2014, vol. 118, pp. 13042-13051.
12. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.

13. McCarthy P.K., Blanchard G.J. AM1 Study of the Electronic Structure of Coumarins. *J. Phys. Chem.*, 1993, vol. 97, pp. 12205-12209.
14. Yang D., Liu Y., Shi D., Sun J. Theoretical study on the excited-state photoinduced electron transfer facilitated by hydrogen bonding strengthening in the C337-AN/MAN complexes. *Comput. Theor. Chem.*, 2012, vol. 984, pp. 76-84.
15. Hessz D., Hégely B., Kállay M., Vidóczy T., Kubinyi M. Solvation and Protonation of Coumarin 102 in Aqueous Media: A Fluorescence Spectroscopic and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A*, 2014, vol. 118, pp. 5238-5247.
16. Zhao W., Ding Y., Xia Q. Time-Dependent Density Functional Theory Study on the Absorption Spectrum of Coumarin 102 and Its Hydrogen-Bonded Complexes. *J. Comput. Chem.*, 2011, vol. 32, pp. 545-553.
17. Miao C., Shi Y. Reconsideration on Hydrogen Bond Strengthening or Cleavage of Photoexcited Coumarin 102 in Aqueous Solvent: A DFT/TDDFT Study. *J. Comput. Chem.*, 2011, vol. 32 pp. 3058-3061.
18. Wu W., Cao Z., Zhao Y. Theoretical studies on absorption, emission, and resonance Raman spectra of Coumarin 343 isomers. *J. Chem. Phys.*, 2012, vol. 136, e114305.
19. Jiang L.L., Liu W.L., Song Y.F., He X., Wang Y., Wu H.L., Yang Y.Q. Solvent Effects on Spectral Property and Dipole Moment of the Lowest Excited State of Coumarin 343 Dye. *Chin. J. Chem. Phys.*, 2012, vol. 25, pp. 577-584.
20. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E. et al. *Gaussian 16, Revision C.01*. Wallingford: Inc., 2016.
21. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105, pp. 2999-3093.
22. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
23. Impropa R., Barone V., Scalmani G., Frisch M.J. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 125, e054103.
24. Scalmani G., Frisch M.J., Mennucci B., Tomasi J., Cammi R., Barone V. Geometries and properties of excited states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 124, e094107.
25. Baiardi A., Bloino J., Barone V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 4097-4115.
26. Jacquemin D., Adamo C. Basis set and functional effects on excited-state properties: Three bicyclic chromogens as working examples. *Int. J. Quantum Chem.*, 2012, vol. 112, pp. 2135-2141.
27. Dennington R., Keith T.A., Millam J.M. *GaussView, Version 6.1*. Shawnee Mission, KS: Semichem Inc., 2016.
28. 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.
29. Kantchev E.A.B., Norsten T.B., Sullivan M.B. Time-dependent density functional theory (TDDFT) modelling of Pechmann dyes: from accurate absorption maximum prediction to virtual dye screening. *Org. Biomol. Chem.*, 2012, vol. 10, pp. 6682-6692.
30. Jacquemin D., Brémond 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.
31. Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 1993, vol. 98, pp. 5648-5652.
32. Becke A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 1998, vol. 38, pp. 3098-3100.
33. Perdew J.P., Wang Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys. Rev B*, 1992, vol. 45, pp. 13244-13249.
34. Liu X., Cole J.M., Low K.S. Solvent Effects on the UV-vis Absorption and Emission of Optoelectronic Coumarins: Comparison of Three Empirical Solvatochromic Models. *J. Phys. Chem. C*, 2013, vol. 117, pp. 14731-14741.
35. Wells N.P., McGrath M.J., Siepmann J.I., Underwood D.F., Blank D.A. Excited State Hydrogen Bond Dynamics: Coumarin 102 in Acetonitrile - Water Binary Mixtures. *J. Phys. Chem. A*, 2008, vol. 112, pp. 2511-2514.
36. Singh U.C., Kollman P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.*, 1984, vol. 5, pp. 129-145.

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ПЕНТАПЕПТИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ ARG-GLU-ARG-GLY-PRO

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

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru
Поступила в редакцию 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0485

Аннотация. Актуальным представляется проведение структурно-функциональных исследований глипролинов и их синтетических аналогов на модельных системах с помощью теоретических методов исследования. Глипролины – семейство коротких пептидов, аминокислотные последовательности которых содержат остатки глицина и пролина. Механизмы их действия мало изучены. Большой интерес к их структуре вызван необходимостью создания новых лекарственных препаратов, которые являются собственным резервом человеческого организма. Такие пептидные молекулы отличаются высокой стабильностью и эффективностью. С помощью метода молекулярной механики было определено пространственное строение и конформационные свойства глипролиновой пентапептидной молекулы Arg- Glu-Arg-Gly-Pro. Потенциальная энергия молекулы оценивалась как сумма невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены 9 низкоэнергетических конформаций для этого пентапептида, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для пентапептида являются полусвернутые формы основной цепи. Боковые цепи аминокислот Arg и Glu в низкоэнергетических конформациях осуществляют эффективные взаимодействия и являются конформационно лабильными аминокислотами, они сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в пентапептид.

Ключевые слова: молекула, пространственная структура, пентапептид, конформация

Основным звеном механизма осуществления всех функций живого организма являются регуляторные пептиды. Они не имеют негативных последствий, высоко эффективны и быстро действуют. Регуляторные пептиды относятся к группе нейромодуляторов. Выяснение структурно-функциональных свойств этих пептидов имеет большое прикладное значение в фармакологии и медицине. Чтобы определить природу регуляторных пептидов и выполняемые ими функции, необходимо изучить пространственное строение и структурно-функциональную организацию этих молекул. Используя регуляторные пептиды, которые являются собственным резервом человеческого организма, можно создавать новые и эффективные лекарственные препараты.

Глипролины относятся к регуляторным пептидам. Аминокислотные последовательности этих молекул содержат остатки глицина (Gly) и пролина (Pro). Глипролины модулируют работу иммунной и нервной систем, влияют на систему свертывания крови и обладают противовоспалительным действием [1-3]. В настоящее время механизмы действия глипролинов и их мишени мало изучены. Актуальным представляется проведение структурно-функциональных исследований глипролинов и их синтетических аналогов на модельных системах с помощью теоретических методов исследования.

Недавно была установлена противосвертывающее действие 12 коротких пептидов глипролинового ряда [4-6]. Целью данной работы является определение пространственного строения пентапептидной глипролиновой молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro. Для нахождения трехмерной структуры пептидов использовался теоретический подход, позволяющий проводить ее расчет исходя из известной аминокислотной последовательности. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Такие расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определить геометрические и энергетические параметры пептидов, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Пентапептидная молекула Arg-Glu-Arg-Gly-Pro принадлежит к классу глипролиновых молекул, обладающих противосвертывающим действием [4]. Расчет пространственной структуры этой молекулы проводился фрагментарно: сначала на основе стабильных конформаций монопептидов была найдена структурная организация трипептидной молекулы Arg-Glu-Arg и дипептида Gly-Pro. Найденные низкоэнергетические конформации трипептида и дипептида позволили оценить пространственную структуру всей пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro.

В расчетах использовалась разработанная специальная классификация (конформация, форма основной цепи, шейп). Формы остатков определялись областями В, R, L и P двугранных углов основной цепи ϕ - ψ . При расчете рассматривались развернутые формы дипептидной молекулы (BB, BR, LB, LR, RL шейп e) и свернутые формы основной цепи (RB, RR, BL, PR, PB- шейп f). Для глицина начальные приближения формировались из низкоэнергетических конформаций: (R форма – ϕ ; $\psi = -90^\circ$; B форма – $\phi = -90^\circ$; $\psi = 100^\circ$; L форма – ϕ , $\psi = 90^\circ$ и P форма основной цепи – $\phi = 90^\circ$; $\psi = -90^\circ$). Для аминокислоты пролин учитывались два положения (B форма – $\phi = -60^\circ$, $\psi = 130^\circ$ и R форма – $\phi = -60^\circ$, $\psi = -50^\circ$), а для Arg и Glu так же B и R формы основной цепи. Положения

боковой цепи аминокислоты Arg определялись четырьмя двугранными углами χ^1 , χ^2 , χ^3 и χ^4 , а положения боковой цепи Glu определялись тремя двугранными углами χ^1 , χ^2 и χ^3 , так как эти аминокислоты имеют длинные, лабильные и заряженные боковые радикалы.

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учётом невалентных ($E_{\text{нв}}$), электростатических ($E_{\text{эл}}$), торсионных взаимодействий ($E_{\text{тор}}$) и энергии водородных связей ($E_{\text{вс}}$). Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности каждой молекулы изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Конформационное состояние каждого аминокислотного остатка обозначалось через X_{ij} , где X характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L или P), а символы $ij = 11, \dots, 12, \dots, 13, \dots, 21, \dots$, и т.д. отвечают положениям боковой цепи (χ^1, χ^2, \dots); индекс 1 соответствует значениям углов области $0-120^\circ$, индекс 2 – области $120^\circ - (-120^\circ)$, а индекс 3 – области $(-120^\circ)-0^\circ$. Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют принятой международной номенклатуре [7]. Для нахождения пространственного строения данных пептидных молекул использовалась специально разработанная программа [8]. Расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определить геометрические и энергетические параметры пептидов, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий. Данная работа является продолжением исследований пространственного строения пептидных молекул [9-14].

Определение пространственной структуры пентапептида мы начали с выяснения конформационных возможностей трипептида Arg-Glu-Arg. Боковые цепи этих аминокислот являются объемными, лабильными и заряженными (Arg имеет положительно заряженную боковую цепь, а Glu- отрицательную). Трипептидная молекула Arg-Glu-Arg представляет собой N-концевой участок пентапептидной молекулы. Ее расчет выполнялся на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-аргинина и N-ацетил-L-глутаминовой кислоты. Трипептид включал в себя 69 томов и 21 переменный двугранный угол основной и боковых цепей. Было составлено свыше 1500 начальных приближений, которые принадлежали 4 шейпам ee, ef, fe и ff. Расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации конформаций, форм основной цепи и шейпов. В энергетический интервал $0 - 4$ ккал/моль попадают 26 конформаций, а в интервал $0 - 3$ ккал/моль попадают 16 конформаций шейпов ef, fe и ff. Низкоэнергетическими из них являются конформации BRB, BRR, RBB, RRB и RRR. В низкую энергию конформаций вносят основной вклад ди- и трипептидные взаимодействия. Расчет выявил, что для трипептидной молекулы самыми низкоэнергетическими являются конформации BRB и RRB с полусвернутой формой основной цепи. В глобальной конформации трипептидной молекулы $B_{21222}R_{221}B_{33222}$ ход основной цепи приводит к сближенности участков основной цепи и боковых цепей аминокислотных остатков.

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

Учитывая специфику боковых цепей аминокислотных остатков глицина и пролина, важно подчеркнуть, что остаток Gly лишен боковой цепи (в боковой цепи находится один атом водорода), а боковая цепь остатка Pro представляет жестко фиксированное кольцо. Конформационные возможности дипептидной молекулы определяются углами только основной цепи этих остатков: ϕ , ψ , ω . Расчет показал, что основной вклад в энергию молекулы вносят дипептидные взаимодействия, их энергия варьируется от $(-1,0)$ до $(-3,0)$ ккал/моль. Формы основной цепи шейпа e имеют одинаковый развернутый ход основной цепи, при этом боковые цепи Gly и Pro находятся по разные стороны от основной цепи, а формы шейпа f имеют одинаковый свернутый ход основной цепи, где боковые цепи аминокислот оказываются сближенными. Низкой энергией для дипептидной молекулы обладают конформации PR, RR, RB, которые имеют свернутую форму основной цепи.

Найденные низкоэнергетические конформации трипептидной и дипептидной молекул послужили основой для начальных приближений при изучении структуры всей пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro. Молекула содержала 90 атомов и 26 переменных двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот, входящих в эту молекулу. Специфика боковых цепей всех аминокислот пентапептидной молекулы определила количество начальных приближений. Было составлено свыше 250 начальных приближений. Все они были проминимизированы по энергии, оценены их геометрические и энергетические параметры. Низкоэнергетические конформации молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro представлены в таблице 1. Геометрические параметры (в градусах) трех низкоэнергетических конформаций пентапептида Arg-Glu-Arg-Gly-Pro представлены в таблице 2.

Самой низкоэнергетической конформацией оказалась форма основной цепи BRBLR (шейп effe), которая имеет полусвернутый ход основной цепи. В глобальной конформации $B_{3222}R_{221}B_{3322}LR$ (effe) ($\Delta E_{\text{отн}}=0$ ккал/моль) энергия невалентных взаимодействий составляет $(-18,2)$ ккал/моль, электростатических $(-5,6)$ ккал/моль и торсионных $2,4$ ккал/моль. При этом основной стабилизирующий вклад вносят ди-, три-, тетра- и пентапептидные взаимодействия аминокислотных остатков.

Таблица 1. Энергетические параметры низкоэнергетических конформаций пентапептидной глипролиновой молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro.

№	Конформация (шейп)	Е _{нв}	Е _{эл}	Е _{торс}	Е _{общ}	Е _{отн}
Молекула Arg-Glu-Arg-Gly-Pro						
1	B ₃₂₂₂ R ₂₂₁ B ₃₃₂₂ LR(effe)	-18,2	-5,6	2,4	-21,5	0,0
2	B ₂₁₂₂ R ₂₂₁ B ₃₃₂₂ LB(effe)	-18,2	-5,6	2,5	-21,4	0,1
3	B ₃₂₂₂ R ₂₂₁ B ₃₃₂₂ LR(effe)	-16,7	-5,4	2,0	-20,2	1,3
4	B ₂₂₂₂ R ₂₂₁ R ₃₂₂₂ PB(efef)	-15,9	-4,2	2,0	-18,1	3,4
5	B ₃₃₂₂ R ₂₂₁ B ₃₃₂₂ PB(efff)	-12,2	-4,4	2,3	-14,3	7,2
6	B ₂₃₂₂ R ₂₂₁ R ₃₃₂₂ LR(efee)	-14,1	-5,2	3,3	-16,1	5,4
7	R ₃₂₂₂ B ₂₂₁ R ₃₂₂₂ BR(fefē)	-18,1	-4,7	4,6	-18,2	3,3
8	R ₁₂₂₂ B ₃₂₁ R ₃₂₂₂ RR(fe ff)	-14,8	-2,9	2,8	-15,0	6,5
9	R ₂₂₂₂ R ₂₂₁ R ₃₃₂₂ PR(ffef)	-14,3	-3,7	1,9	-16,1	5,4

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) низкоэнергетических конформаций пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro.

	Углы	B ₃₂₂₂ R ₂₂₁ B ₃₃₂₂ LR	B ₂₂₂₂ R ₂₂₁ R ₃₂₂₂ PB	R ₂₂₂₂ R ₂₂₁ R ₃₃₂₂ PR
Arg 1	φ ₁	-120	-120	-101
	χ ¹ ₁	180	175	178
	χ ¹ ₂	63	176	-172
	χ ¹ ₃	174	174	171
	χ ¹ ₄	-179	176	-175
	ψ ₁	200	120	-63
	ω ₁	-173	173	-172
Glu 2	φ ₂	-95	-91	-103
	χ ² ₁	-179	-179	-157
	χ ² ₂	180	-175	174
	χ ² ₃	91	94	97
	ψ ₂	-49	-56	-54
	ω ₂	-172	-177	-178
Arg 3	φ ₃	-111	-116	-98
	χ ³ ₁	-53	-48	-49
	χ ³ ₂	-63	-178	-56
	χ ³ ₃	179	-172	-177
	χ ³ ₄	180	180	180
	ψ ₃	93	-57	-51
	ω ₃	177	-176	-178
Gly4	φ ₄	88	117	137
	ψ ₄	89	-97	-70
	ω ₄	179	176	175
Pro5	φ ₅	-60	-60	-60
	ψ ₅	-55	134	-52
	ω ₅	180	179	180
Энергия Е _{отн} (ккал/моль)		0,0	3,4	5,4

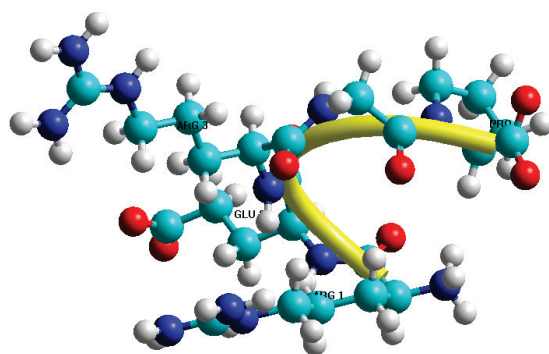


Рисунок 1. Низкоэнергетическая пространственная структура B₂₂₂R₂₂₁B₃₃₂₂LR пентапептида Arg-Glu-Arg-Gly-Pro

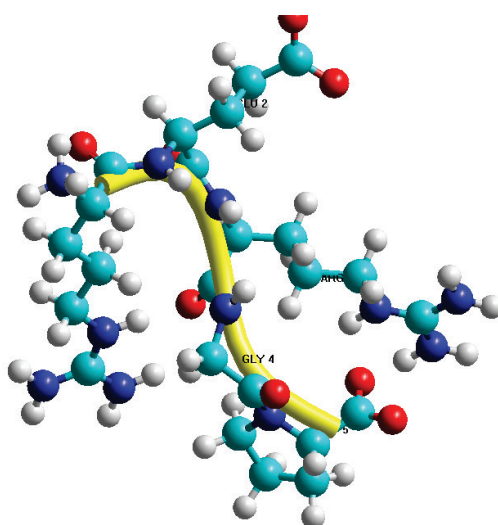


Рисунок 2. Низкоэнергетическая пространственная структура B₂₂₂₂R₂₂₁R₃₃₂₂PB пентапептида Arg-Glu-Arg-Gly-Pro

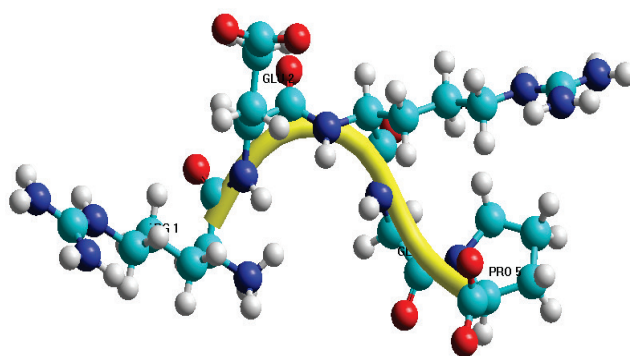


Рисунок 3. Низкоэнергетическая пространственная структура R₂₂₂₂R₂₂₁R₃₃₂₂PR пентапептида Arg-Glu-Arg-Gly-Pro

Всего 3,4 ккал/моль проигрывает другая конформация с полусвернутой формой основной цепи B₂₂₂₂R₂₂₁R₃₃₂₂PB (efef) и 3,3 ккал/моль R₃₃₂₂B₂₂₁R₃₃₂₂BR (feff). Конформация R₁₂₂B₃₂₁R₃₃₂₂RR (feff) со свернутой формой основной цепи проигрывает глобальной конформации 6,5 ккал/моль. Формы с полностью развернутой основной цепью уступают по энергии от 5 до 9 ккал/моль. Таким образом, расчет обнаружил резкую энергетическую дифференциацию конформаций по шейкам и формам основной цепи. В энергетический интервал 0-5 ккал/моль попадают 26 конформаций, принадлежащих 8 возможным шейкам. Расположение аминокислот в трех низкоэнергетических конформациях B₃₂₂₂R₂₂₁B₃₃₂₂LR, B₂₂₂₂R₂₂₁R₃₃₂₂PB и R₂₂₂₂R₂₂₁R₃₃₂₂PR пентапептида представлено на рисунках 1-3.

Таким образом, пространственную структуру молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro можно представить девятью низкоэнергетическими конформациями, в которых пентапептидная молекула выполняет свои функции.

Теоретический конформационный анализ пентапептида привел к таким структурным организациям молекулы, которые не исключают реализацию ими функций, требующих специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Список литературы / References:

1. Falaliyeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V. et al. Effects of glyprolines PGP, PG and GP on homeostasis of gastric mucosa in rats with experimental ethanol-induced gastric ulcers. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2010, vol. 149, no. 6, pp. 699-701.
2. Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А. и др. Структурно-функциональные исследования глицин и пролин содержащих пептидов, являющихся нейропротекторами. *Биоорг. хим.*, 2009, т. 35. № 2, с. 165-171. [Martynova K.V., Andreeva L.A., Klimova P.A. et al. Structure-functional investigation of the glysin and prolin containing peptides, which are neuroprotectors. *Bioorg. chim.*, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 165-171. (In Russ.)]
3. Umarova B.A., Kopylova G.N., Smirnova E.L. et al. Secretory Activity of Mast Cell during Stress: Effect of Prolyl-Glycyl-Proline and Simax. *Bullet. of Exper. Biology and Medicine*, 2003, vol. 136, no. 4, pp. 325-327.
4. Рогозинская Э.Я., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Андреева Л.А. Тромбоэластографическое исследование аргининсодержащих, лейцинсодержащих и лизинсодержащих пептидов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2020, т. 169, с. 716-719. [Rogozinskaya E.Ya., Lyapina L.A., Shubina T.A., Myasoedov N.F. et al. Trombotlastografic research of arginin-containing, leusine-containing and lysine-containing peptides. *Bullet. of Exper. Biology and Medicine*, 2020, vol. 169, pp. 716-719. (In Russ.)]
5. Жуйкова С.Е. Глипролины – регуляторные пептиды с интегративным действием. *Интегративная физиология*, 2020, т. 1, № 6, с. 303-316. [Juykova S.E. Glyprolines – regulatory peptides with integrative action. *Integrative physiology*, 2020, vol. 1, no. 6, pp. 303-316. (In Russ.)].
6. Grigoryeva M., Shubina T., Obergan T., Lyapina L. Hema Sphere Peptides PGP and RERPGP increase NO metabolites and tissue plasminogen activator activity in vitro in rat model. *Biofarmaceutical Journal*, 2020, vol. 12, pp. 38-42.
7. *IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988, vol. 39.
8. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaye N.M. Program of the semi-empirical calculation of the conformations of the molecular complexes on the IBM. *Journal of structural chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148. (In Russ.)]
9. Akhmedov N.A., Gadjieva Sh.N., Abbasli R.M. Structural organization of Asp-Pro- Lys-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ molecule. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2009, vol. 10, pp. 57-62.
10. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
11. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Akhmedova S.R. Spatial structure of Octarphin Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
12. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, pp. 62-67.
13. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA*, 2020, vol. 1, pp. 218-221.
14. Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А. Структурная организация молекулы Gly-Pro-Arg-Pro. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 53-56. [Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. *Russian Journal biological physics and chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 53-56. (In Russ.)]

THREEDIMENSIONAL STRUCTURE OF THE PENTAPEPTIDE MOLECULE ARG-GLU-ARG-GLY-PRO

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

Baku State University, Institute for Physical Problems

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

Received 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0485

Abstract. It seems relevant to carry out structural and functional studies of glyprolines and their synthetic analogues on model systems using theoretical research methods. Glyprolines are a family of short peptides whose amino acid sequences contain residues of proline and glycine. Currently their mechanisms of action are poorly understood. Great interest in their structure is caused by the possibility of creating new drugs that are the human body's own reserve. Glyproline molecules are stable and eddicient. Using the method of molecular mechanics, the spatial structure and conformational properties of the glyproline pentapeptide molecule Arg-Glu-Arg-Gly-Pro were determined. The potential energy of the molecule was estimated as the sum of non-valent, electrostatic, torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. 9 low-energy conformations were found for glyproline pentapeptide, the values of structure the dihedral angles of the main and side chains, and the energy of intra-and inter-residue interactions was estimated. It is revealed that low energy conformations of this molecule have the half-folded type of backbone. The side chains of the Arg and Glu amino acids in low-energy conformations carry out effective interactions and are conformationally labile amino acids, they bring together the regions of the main chain and the side chains of the amino acids included in the pentapeptide.

Key words: *molecule, spatial structure, pentapeptide, conformation.*

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ БЕТА-ЛАКТОРФИНА

Агаева Л.Н.¹, Абдинова А.А.², Ахмедова С.Р.³, Ахмедов Н.Ф.¹, Ахмедов Н.А.¹¹ Бакинский государственный университет

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

² Азербайджанский государственный педагогический университет

ул. Рашида Бейбутова, 6, г. Баку, Азербайджан

³ Азербайджанский технический университет

просп. Гусейна Джавида, 25, г. Баку, Азербайджан

Поступила в редакцию 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0486

Аннотация. Опиоидные пептиды вызывают обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Обнаружен ряд молочных экзорфинов, имеющих свойства антагонистов опиоидных рецепторов. К ним относятся казоксины А, В, С, человеческий казоксин D, а также лактоферроксины А, В и С, а также альфа и бета лакторфины. Возможность образования этих пептидов при гидролизе соответствующих белков пептидазами желудочно-кишечного тракта доказана *in vitro*. Представителями экзорфинов являются также цитохрофины и геморфины. Предполагается, что эти пептиды могут образовываться *in vivo* при протеолитическом расщеплении цитохрома b и гемоглобина. Молекула бета-лакторфина является представителем этого класса. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы бета-лакторфина Tug-Leu-Leu-Phe. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы альфа-лакторфина, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекул, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы бета-лакторфина может быть представлена восемью формами основной цепи. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул экзорфинов.

Ключевые слова: экзорфин, лакторфин, опиоид, структура, конформация.

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

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динорфинов, неэндорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [4-12].

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса.

Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополюльном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы альфа-лакторфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции [4,5].

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij} , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты $f-\psi : R(f, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$, $B(\phi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$, $L(\phi, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$ и $P(\phi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$; $ij \dots = 11 \dots, 12 \dots, 13 \dots, 21 \dots$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2 \dots$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , 2 – от 120° до -120° , и 3 - от -120° до 0° . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [13].

Трехмерная структура молекулы бета-лакторфина Tug1- Leu2- Leu3- Phe4 была исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. Расчет пространственной структуры альфа-лакторфина показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация, между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0–7,0 ккал/моль попадают конформации восьми шейпов и они представлены восьми формами основной цепи. Таким образом, в энергетический интервал 0-7,0 ккал/моль попадают конформации всех возможных шейпов. Из каждой формы выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в таблице 1. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий и относительная ($U_{отн.}$) энергия оптимальных конформаций молекулы бета-лакторфина. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры четырех конформаций, относительная энергия которых меньше 3,0 ккал/моль представлены в таблицах 2, 3. На рисунке 1 показано пространственное расположение аминокислотных остатков в этих низкоэнергетических конформациях молекулы бета-лакторфина.

В представленных низкоэнергетических конформациях энергия невалентных взаимодействий изменяется в энергетическом интервале (-21,2)–(-13,8) ккал/моль, электростатических взаимодействий 1,3–3,6 ккал/моль, торсионных взаимодействий (2,1)–(4,1) ккал/моль (табл. 1). Глобальной конформацией молекулы бета-лакторфина является конформация $B_2B_{21}R_{22}R_3$ полусвернутого шейпа eef (рис. 1). Конформация является выгодной по невалентным взаимодействиям (табл. 1, рис. 1). В этой конформации возникают эффективные ди-, три и тетрапептидные взаимодействия, Tug1 эффективно взаимодействует с трипептидным фрагментом Leu2-Leu3-Phe4, вклад которых составляют (-9,3L) ккал/моль, также Leu2 с Leu3 и Leu3 с Phe4. Общий вклад их межостаточных взаимодействий составляет (-11,5) ккал/моль (табл. 2).

Конформация $R_2R_{21}R_{31}R_3$ полностью свернутого шейпа fff имеет относительную энергию 1,4 ккал/моль. Эта конформация выгодна по электростатическим взаимодействиям, вклад электростатического отталкивания составляет всего 1,3 ккал/моль (табл. 1). В этой конформации N- и C-концы молекулы бета лакторфина сближены в пространстве, Tug1 эффективно взаимодействует с Phe4, энергетический вклад которых составляет (-8,2) ккал/моль. Также образуется водородная связь между атомами N-H Tug1 и атомами C=O Phe4. Возникают эффективные дипептидные взаимодействия между аминокислотными остатками Leu2-Leu3 и Leu3-Phe4 (табл. 2).

Таблица 1. Относительная энергия и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы бета-лакторфина

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{общ.}$	$U_{отн.}$
			$U_{нев.}$	$U_{эл.}$	$U_{торс.}$		
1.	e e f	$B_2B_{21}R_{22}R_3$	-21,2	3,3	2,9	-15,0	0
2.	f f f	$R_2R_{21}R_{31}R_3$	-17,7	1,3	2,8	-13,6	1,4
3.	e f f	$B_1R_{21}R_{31}R_3$	-19,2	2,3	4,1	-12,9	2,1
4.	f e f	$R_2B_{21}R_{31}R_3$	-18,2	3,6	2,1	-12,5	2,5
5.	f e e	$R_2B_{21}B_{12}B_3$	-17,0	3,6	3,0	-10,4	4,6
6.	e e e	$B_3B_{21}B_{21}B_3$	-16,3	3,1	3,1	-10,1	4,9
7.	f f e	$R_2R_{21}B_{31}B_1$	-15,4	3,0	2,7	-9,7	5,3
8.	e f e	$B_3R_{21}B_{21}B_1$	-13,8	2,9	2,2	-8,7	6,3

Таблица 2. Энергия внутри-и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы бета-лакторфина: B₂B₂₁R₂₂R₃ (U_{отн}=0 ккал/моль, 1-я строка), R₂R₂₁R₃₁R₃ (U_{отн}=1,4 ккал/моль, 2-я строка), B₁R₂₁R₃₁R₃ (U_{отн}=2,1 ккал/моль, 3-я строка), R₂B₂₁R₃₁R₃ (U_{отн}=2,5 ккал/моль, 4-я строка)

Tyr1	Leu2	Leu3	Phe4	
2,6	-3,8	-3,3	-2,2	Tyr1
2,9	-2,1	-0,7	-8,2	
2,6	-2,4	-1,4	-6,2	
2,7	-3,3	-1,7	-2,3	
	-1,1	-2,0	-2,9	Leu2
	-0,9	-3,4	-0,8	
	-0,9	-3,7	-0,6	
	-1,2	-2,5	-2,6	
		-0,3	-5,5	Leu3
		-0,6	-3,3	
		-0,6	-4,4	
		-0,6	-3,4	
			0,6	Phe4
			0,7	
			0,5	
			0,4	

Таблица 3. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы бета-лакторфина

Остаток	Конформации			
	B ₂ B ₂₁ R ₂₂ R ₃	R ₂ R ₂₁ R ₃₁ R ₃	B ₁ R ₂₁ R ₃₁ R ₃	R ₂ B ₂₁ R ₃₁ R ₃
Tyr1	-81 146 175 171 80 0	-38 -48 178 -171 91 0	-45 148 -176 66 83 0	-66 -70 180 170 72 0
Leu2	-122 134 179 179 66 179 174	-82 -56 178 -177 64 180 178	-97 -58 -175 -170 68 179 175	-110 113 180 173 59 179 175
Leu3	-89 -66 -177 -159 178 -169 -179	-82 -56 -175 -78 63 180 171	-83 -73 -166 -79 64 180 173	-94 -54 180 -72 64 179 168
Phe4	-94 -61 - -57 102	-96 -42 - -56 95	-103 -48 - -55 94	-122 -59 - -56 86
ΔU	0,0 ккал/моль	1,4 ккал/моль	2,1 ккал/моль	2,5 ккал/моль

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности φ, ψ, ω, χ₁, χ₂

Конформация B₁R₂₁R₃₁R₃ шейпа eff с относительной энергией 2,1 ккал/моль, от полностью свернутой конформацией, отличается формой основной цепи Tyr1, поэтому характер межостаточных взаимодействий почти такой же, как в полностью свернутой конформации (табл. 2, рис. 1с). Конформация R₂B₂₁R₃₁R₃ шейпа fef от полностью свернутой формы отличается формой основной цепи Leu2. В форма Leu2 отделяет друг от друга N- и C-концы молекулы, поэтому уменьшаются взаимодействия между остатками Tyr1 и Phe4 (табл. 2, рис. 1d). Относительные энергии конформаций шейпов fee, eee, ffe, и efe выше 4,6 ккал/моль (табл. 1).

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

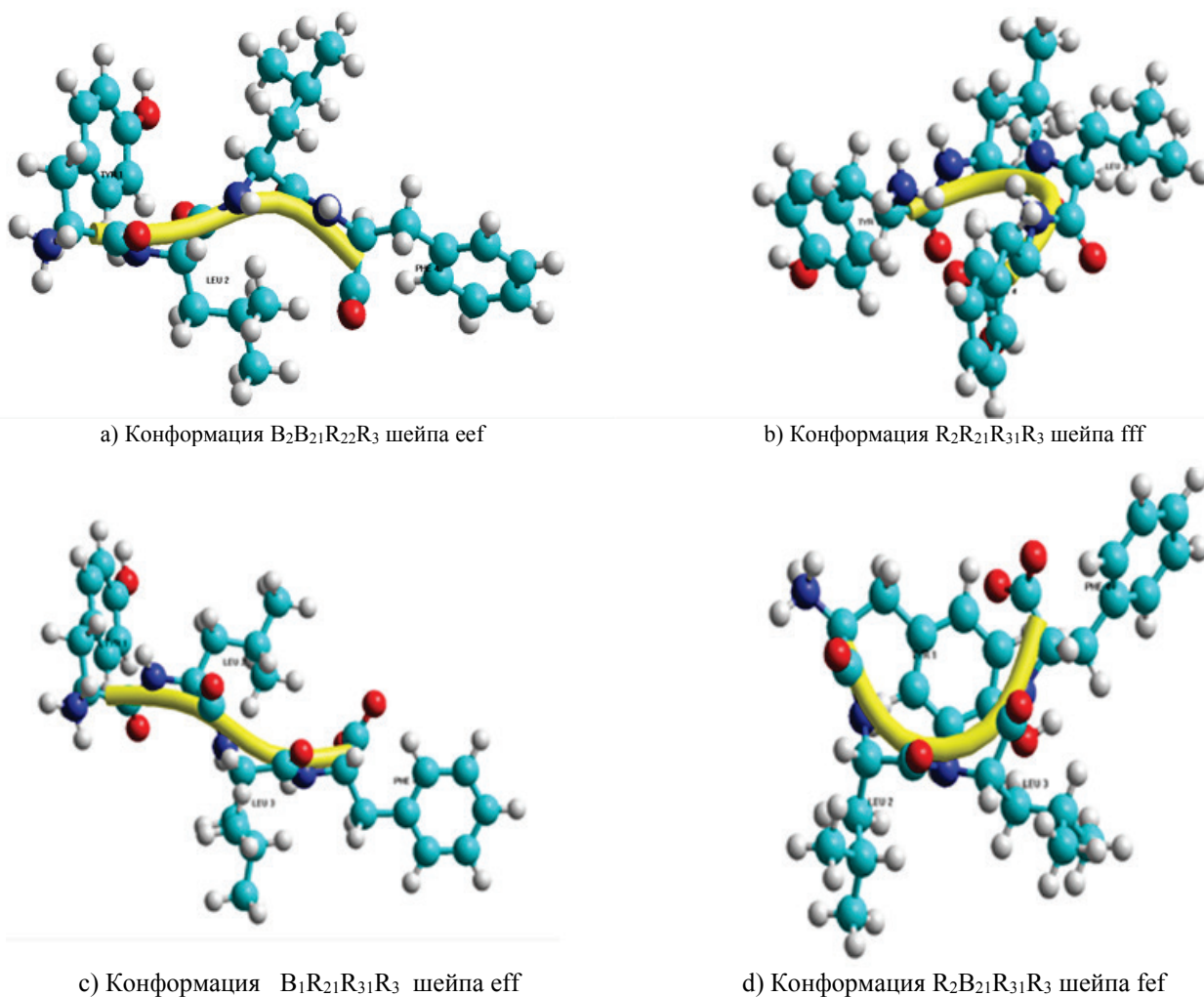


Рисунок 1. Пространственное расположение аминокислотных остатков в низкоэнергетических конформациях молекулы бета-лакторфина

Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46. (In Russ.)]
2. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с. 29-35. [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K., Tarakanova Yu.N., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. Possible role of casomorphins in the pathogenesis of autism. *Psychiatry*, 2010, vol. 45, no. 3, pp. 29-35. (In Russ.)]
3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.*, 2009, vol. 19, no. 4, pp. 258-263.
4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул β -казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная биология*, 1989, т. 23, с. 240-248. [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of β -casomorphin, valmuceptin and morphiceptin molecules. *Molecular Biol.*, 1989, vol. 23, pp. 240-248. (In Russ.)]
5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667. [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667. (In Russ.)]
6. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 587-590. (In Russ.)]

7. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
8. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA*, 2020, vol. 1, pp. 218-221.
9. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akverdieva G.A., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J.Chem.Soc.Pak.*, 2021, vol. 43, no. 5, pp.500-504.
10. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *IOSR Journal of Applied. Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, pp. 62-67. doi: 10.9790/4861-1305026267.
11. Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.A. Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 531-534.
12. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. *Conference proceedings Modern Trends In Physics*, 2019, pp. 201-104.
13. *IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Oxford: Blackwell Scientific, 1993.

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF THE BETA-LACTORFIN MOLECULE

Agayeva L.N.¹, Abdinova A.A.², Akhmedova S.R.³, Akhmedov N.F.¹, Akhmedov N.A.¹

¹Baku State University

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

²Azerbaijan State Pedagogical University,

Rashid Beybutov str., 6, Baku, Azerbaijan

³Azerbaijan Technical University

Huseyn Javid Avenue, 25, Baku, Azerbaijan

Received 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjpc.2022.0486

Abstract. Opioid peptides cause pain relief, sedation and sleep, as well as a euphoric state and a number of autonomic reactions. These peptides are of animal and plant origin. A number of exogenous peptides obtained from food have opiate-like properties. These peptides were named exorphins. The discovery of the opioid activity of the peptide components of food has led to the assumption that certain types of food can act on the central nervous system like opiate drugs. A number of milk exorphins have been found that have opioid receptor antagonist properties. These include casoxins A, B, C, human casoxin D, as well as lactoferroxins A, B and C, as well as alpha and beta lactorphins. The possibility of the formation of these peptides during the hydrolysis of the corresponding proteins by peptidases of the gastrointestinal tract has been proven in vitro. Representatives of exorphins are also cytochromophins and hemorphins. It is assumed that these peptides can be formed in vivo during the proteolytic cleavage of cytochrome b and hemoglobin. The beta-lactorphine molecule is a representative of this class. The conformational possibilities of the beta-lactorphine Tyr-Leu-Leu-Phe molecule were studied by the method of theoretical conformational analysis. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of the alpha-lactorphine molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of the amino acid residues that make up the molecules were found, and the energy of intra- and interresidual interactions was estimated. It has been shown that the spatial structure of the beta-lactorphine molecule can be represented by eight forms of the main chain. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of exorphin molecules.

Key words: exorphin, lactorphine, opioid, structure, conformation.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ АЛЬФА-ЛАКТОРФИНА**Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.**Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. 3. Халилова 23, Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: Namiq.49@bk.ru

Поступила в редакцию 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0487

Аннотация. Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоидоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами, имеются десятки представителей. Молекула альфа-лакторфина является представителем этого класса. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы альфа-лакторфина Tyr-Gly-Leu-Phe. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы альфа-лакторфина, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекул, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы альфа-лакторфина может быть представлена одиннадцатью формами основной цепи. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул экзорфинов.

Ключевые слова: экзорфин, лакторфин, опиоид, структура, конформация.

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

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динорфинов, неоэндорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [4-12].

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы альфа-лакторфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции [4,5].

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи,

а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij} , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты $\phi - \psi : R(\phi, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$, $B(\phi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$, $L(\phi, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$ и $P(\phi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$; $ij \dots = 11 \dots, 12 \dots, 13 \dots, 21 \dots$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2 \dots$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , 2 – от 120° до -120° , и 3 – от -120° до 0° . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [13]. Трехмерная структура молекулы альфа-лакторфина Tug1-Gly2-Leu3-Phe4 была исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. В тетрапептидную молекулу альфа-лакторфина Tug-Gly-Leu-Phe входит аминокислотный остаток глицин. Известно, что для глицина четыре формы осной цепи R, B, L, P являются низкоэнергетическими. Поэтому для данной молекулы в восьми шейпах пептидного скелета возможны шестнадцать форм основной цепи. Расчет пространственной структуры альфа-лакторфина показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация, возникающая между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0–6 ккал/моль попадают конформации восьми шейпов и они представлены одиннадцатью формами основной цепи. Таким образом, в энергетический интервал 0–6 ккал/моль попадают конформации всех возможных шейпов. Из каждой формы выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в таблице 1. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий и относительная ($U_{отн.}$) энергия оптимальных конформаций молекулы альфа-лакторфина. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры пяти конформаций, относительная энергия которых меньше 2,0 ккал/моль представлены в таблицах 2, 3. На рисунке 1 показано пространственное расположение аминокислотных остатков в этих низкоэнергетических конформациях молекулы альфа-лакторфина.

В представленных низкоэнергетических конформациях энергия невалентных взаимодействий изменяется в энергетическом интервале (-15,1)–(-10,4) ккал/моль, электростатических взаимодействий (-0,2)–(3,8) ккал/моль, торсионных взаимодействий (1,8)–(4,4) ккал/моль (табл. 1). Глобальной конформацией молекулы альфа-лакторфина является конформация $B_2 P R_{22} R_3$ свернутого шейпа fff (рис. 1). Конформация является выгодной по невалентным и электростатическим взаимодействиям (табл. 1, рис. 1). В этой конформации возникают эффективные ди-, три и тетрапептидные взаимодействия, Tug1 эффективно взаимодействует с трипептидным фрагментом Gly2-Leu3-Phe4, вклад которых составляют (-11,8) ккал/моль, также Gly2 с Leu3 и Leu3 с Phe4. Общий вклад их межостаточных взаимодействий составляет (-7,1) ккал/моль (табл. 2). В этой конформации N-конец и C-концы молекулы сближены друг с другом, между ними возникают эффективные электростатические взаимодействия, образуется водородная связь между атомами H – N основной цепи Tug1 и атомами основной цепи C = O остатка Phe4. Шейп fff представлен еще одной конформацией с относительной энергией 1,8 ккал/моль (табл. 1).

Самая низкоэнергетическая конформация $B_1 P B_{31} B_2$ шейпа ffe имеет относительную энергию 1,1 ккал/моль. Она от глобальной отличается формой основной цепи Leu3-Phe4. В этой конформации возникают эффективные взаимодействия между Tug1 с последующим трипептидным фрагментом Gly2-Leu3-Phe4, вклад которых составляет (-8,4) ккал/моль. Gly2 эффективно взаимодействует с остатками Leu3 и Phe4, вклад которых составляет (-4,4) ккал/моль (табл. 2). В этой конформации образуется водородная связь между атомами C=O основной цепи Tug1 и N-H атомом основной цепи Leu3 (рис. 1b).

Полностью развернутый шейп ее представлен только одной конформацией $B_3 B B_{33} B_1$ с относительной энергией 1,4 ккал/моль. В этой конформации возникают эффективные ди-, три- и тетрапептидные взаимодействия. Энергетический вклад взаимодействия Tug1 с участком Gly2-Leu3-Phe4 составляют (-8,1) ккал/моль, энергетический вклад Gly2 с участком Leu3-Phe4 (-4,1) ккал/моль, Leu3 с остатком Phe4 составляет (-2,6) ккал/моль. Здесь так же образуется водородная связь между атомами H – N основной цепи Tug1 и атомами основной цепи C = O остатка Phe4.

В низкоэнергетических конформациях молекулы альфа-лакторфина шейп fef представлен двумя низкоэнергетическими формами основной цепи. Конформация $B_2 L R_{32} R_1$ имеет относительную энергию 1,5 ккал/моль, а конформация $R_2 B R_{32} R_1$ относительную энергию 3,1 ккал/моль. Как видно, эти конформации отличаются формами основной цепи Tug1 и Gly2.

Шейп пептидного скелета fee тоже представлен двумя низкоэнергетическими формами основной цепи. Относительная энергия конформации $B_2 L B_{32} B_1$ равна 0,9 ккал/моль. В этой конформации вклад невалентных взаимодействий наибольший (-15,1) ккал/мол. Tug1 одновременно эффективно взаимодействует с аминокислотными остатками Gly2, Leu3 и Phe4. Конформация $R_2 B B_{32} B_1$ имеет относительную энергию 2,4 ккал/моль. В этих конформациях формы основной цепи Leu3 и Phe4 одинаковые.

Относительная энергия низкоэнергетических конформаций шейпов eef, efe и eff больше 3 ккал/мол, и все они представлены одной формой основной цепи (табл. 1).

Таблица 1. Относительная энергия и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы альфа-лактофрина

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад			$U_{общ.}$	$U_{отн.}$
			$U_{нев.}$	$U_{эл.}$	$U_{торс.}$		
1.	fff	$B_2PR_{22}R_3$	-12,5	-0,2	2,7	-10,0	0
	fff	$R_1RR_{22}R_3$	-12,4	1,0	3,3	-8,2	1,8
2.	ffe	$B_1PB_{31}B_3$	-13,7	2,2	2,6	-8,9	1,1
3.	eee	$B_3BB_{33}B_1$	-14,4	3,3	2,5	-8,6	1,4
4.	fef	$B_2LR_{32}R_1$	-13,9	3,1	2,2	-8,5	1,5
	fef	$R_2BR_{32}R_1$	-12,5	3,7	1,9	-6,9	3,1
5.	fee	$B_2LB_{32}B_1$	-15,1	3,5	2,6	-9,1	0,9
	fee	$R_2BB_{32}B_1$	-13,7	3,8	2,4	-7,6	2,4
6.	ee f	$B_2BR_{32}R_3$	-12,0	3,3	1,8	-6,9	3,1
7.	e fe	$R_3PB_{31}B_1$	-10,8	3,5	2,3	-4,9	5,1
8.	e ff	$B_1RR_{22}R_2$	-10,4	1,6	4,4	-4,5	5,5

Таблица 2. Энергия внутри-и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы альфа-лактофрина: $B_2PR_{22}R_3$ ($U_{отн}=0$ ккал/моль, 1-я строка), $B_1PB_{31}B_3$ ($U_{отн}=1,1$ ккал/моль, 2-я строка), $B_3BB_{33}B_1$ ($U_{отн}=1,4$ ккал/моль, 3-я строка), $B_2LR_{32}R_1$ ($U_{отн}=1,5$ ккал/моль, 4-я строка), $B_2LB_{32}B_1$ ($U_{отн}=0,9$ ккал/моль, 5-я строка)

Tyr1	Gly2	Leu3	Phe4	
4,2	-1,5	-1,3	-9,0	Tyr1
2,0	-1,3	-2,3	-4,8	
2,1	-0,8	-4,2	-2,1	
1,9	-1,7	-3,4	-2,5	
1,9	-1,7	-3,4	-2,2	
	1,3	-1,0	-0,6	Gly 2
	1,3	-1,7	-2,7	
	1,3	-1,7	-2,4	
	1,3	-1,8	-0,7	
	1,3	-1,8	-2,4	
		0,1	-5,5	Leu3
		-0,6	-1,9	
		-0,7	-2,6	
		-0,8	-3,1	
		-0,7	-2,6	
			0,7	Phe4
			0,4	
			0,1	
			0	
			0,1	

Таблица 3. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы альфа-лактофрина

Остаток	Конформации				
	$B_2PR_{22}R_3$	$B_1PB_{31}B_3$	$B_3BB_{33}B_1$	$B_2LR_{32}R_1$	$B_2LB_{32}B_1$
Tyr1	-103 146 179 179 87 0	-72 154 -177 66 80 0	-61 156 179 -68 106 0	-67 146 -178 177 86 0	-65 147 -179 178 85 0
Gly2	-87 -59 170 -96 -70 -175	76 -73 175 -94 111 -179	-78 77 -178 -101 96 -179	62 53 -184 -104 -63 180	63 53 -175 -103 96 -179
Leu3	-164 174 -169 180	-72 64 179 170	-50 177 -175 180	-49 177 -176 180	-50 177 -175 180
Phe4	-83 -49 - -58 101	-105 142 - -60 95	-154 91 - 52 91	-139 -36 - 53 91	-155 151 - 53 90
ΔU	0 ккал/моль	1,1 ккал/моль	1,4 ккал/моль	1,5 ккал/моль	0,9

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

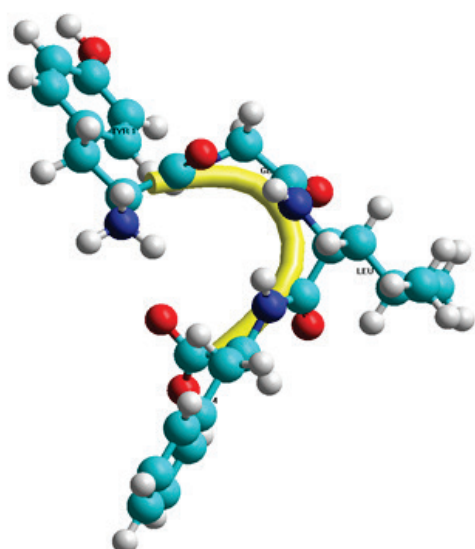
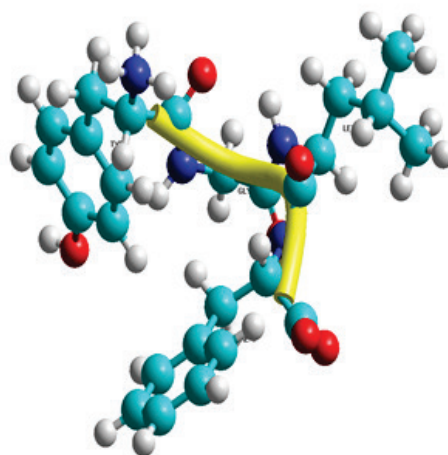
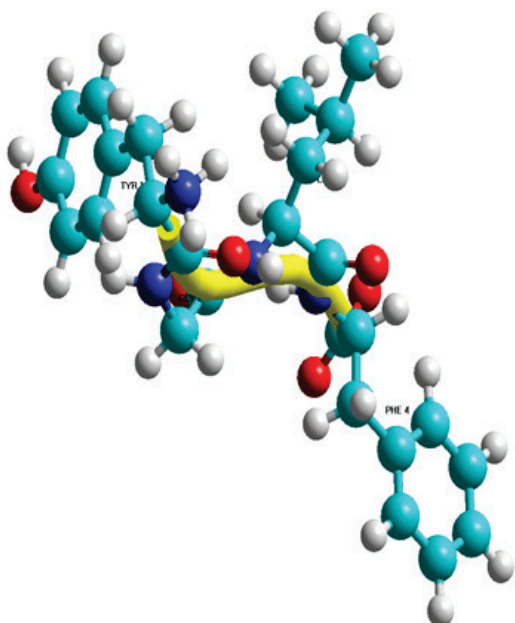
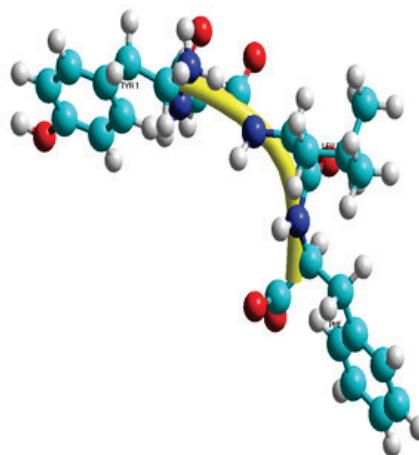
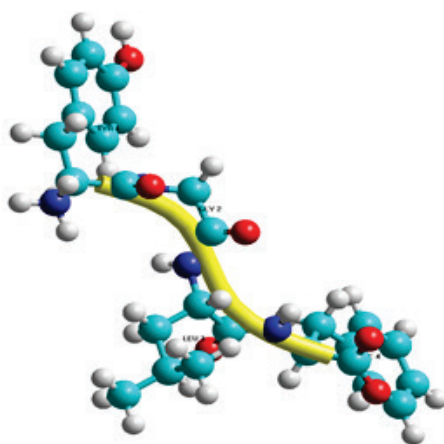
а) Конформация $V_2PR_{22}R_3$ свернутого шейпа fffб) Конформация $V_1PV_{31}V_2$ шейпа ffeв) Конформация $V_3VV_{33}V_1$ шейпа eeeг) Конформация $V_2LR_{32}R_1$ шейпа fefе) Конформация $V_2LB_{32}V_1$ шейпа fee

Рисунок 1. Пространственное расположение аминокислотных остатков в низкоэнергетических конформациях молекулы альфа-лактоферрина

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

Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46. (In Russ.)]
2. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с. 29-35. [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K., Tarakanova Yu.N., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. Possible role of casomorphins in the pathogenesis of autism. *Psychiatry*, 2010, vol. 45, no. 3, pp. 29-35. (In Russ.)]
3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.*, 2009, vol. 19, no. 4, pp. 258-263.
4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул β -казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная Биология*, 1989, т. 23, с. 240-248. [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of β -casomorphin, valmuceptin and morphiceptin molecules. *Molecular Biol.*, 1989, vol. 23, pp. 240-248. (In Russ.)]
5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667. [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667. (In Russ.)]
6. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 587-590. (In Russ.)]
7. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
8. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA*, 2020, vol. 1, pp. 218-221.
9. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akverdieva G.A., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J.Chem.Soc.Pak.*, 2021, vol. 43, no. 5, pp. 500-504.
10. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, pp. 62-67. doi: 10.9790/4861-1305026267.
11. Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.A. Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 531-534.
12. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. Conference proceedings. *Modern Trends in Physics*, 2019, pp. 201-104.
13. IUPAC-IUB. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Oxford: Blackwell Scientific, 1993.

SPATIAL STRUCTURE OF ALFA-LAKTORFINE MOLECULE

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

Baku State University, Institute for Physical Problems

Khalilova str. 3, 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: Namiq.49@bk.ru

Received 22.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0487

Abstract. Opioid peptides are currently considered the most studied group of peptide signaling substances. Opium causes pain relief, sedation and falling asleep, as well as a euphoric state and a number of vegetative reactions. Opioid peptides are of animal and plant origin. A number of exogenous peptides obtained from food have opioid-like properties. Such peptides were called exorphins, there are dozens of representatives. The alpha-laktorphine molecule is a representative of this class. The conformational possibilities of the Tyr-Gly-Leu-Phe alpha-laktorphine molecule were studied by the method of theoretical conformational analysis. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of the alpha-laktorphine molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of the amino acid residues that make up the molecule were found, and the energy of intra- and interresidual interactions was estimated. It was shown that the spatial structure of the alpha-laktorphine molecule can be represented by eleven forms of the main chain. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of exorphin molecules.

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

ВЛИЯНИЕ АЛЬБУМИНА ЯИЧНОГО БЕЛКА НА БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЮ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Захаров Н.А.¹, Коваль Е.М.¹, Гоева Л.В.¹, Шелехов Е.В.², Алиев А.Д.³, Киселев М.Р.³,
Матвеев В.В.³, Захарова Т.В.⁴

¹ Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова

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

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

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

³ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина

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

⁴ Российский университет транспорта «МИИТ»

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

Поступила в редакцию 28.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0488

Аннотация. Актуальным является направление исследований, связанных с синтезом перспективных для применения в медицинской практике материалов на основе карбоната кальция (CaCO_3 , КК). Среди ряда известных полиморфных модификаций карбоната кальция (кристаллических безводных – кальцит, арагонит, ватерит; гидратированных – моно- ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и гексагидрат- ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); аморфной фазы КК) наибольший интерес для использования в качестве материалов таргетированной доставки лекарственных препаратов представляет ватерит. Приведены результаты моделирования биоминерализации карбоната кальция с участием альбумина яичного белка (АЛБ) в условиях осаждения из водных растворов в водной системе $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-АЛБ-H}_2\text{O}$ и проведена оценка влияния содержания АЛБ в растворе на образование в составе продуктов синтеза фаз кальцита (К), арагонита (А) и ватерита (В). Продукты синтеза идентифицированы методами физико-химического анализа (химического, рентгенофазового, колебательной спектроскопии, электронной сканирующей и просвечивающей микроскопии) и установлены фундаментальные взаимосвязи состав – условия синтеза – структура – дисперсность – свойства для полученных продуктов синтеза. Обсуждены разработанные и реализованные подходы для направленного синтеза материалов с регулируемыми в ходе синтеза и последующей обработки свойствами на основе карбоната кальция медицинского назначения и варианты использования в медицинской практике синтезированных материалов.

Ключевые слова: карбонат кальция, синтез, альбумин, биоминерализация, моделирование

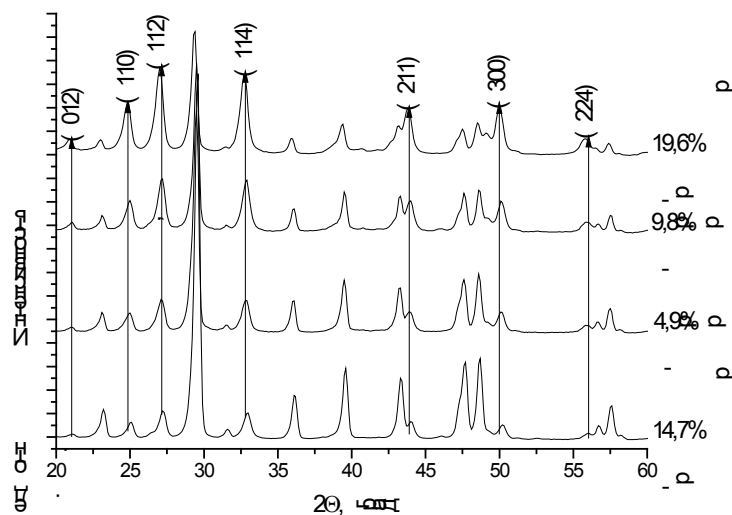
В природе КК имеет шесть известных кристаллических полиморфных модификаций, три из которых являются безводными кристаллами (кальцит, арагонит и ватерит) (табл. 1), две – гидратированными фазами КК (моно- и гексагидрат КК: $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и одна является гидратированной аморфной (аморфный КК (АКК)) [1].

КК известен как дешевый доступный коммерческий материал [2]. Он широко используется для различных промышленных применений [3]. Внимание к изучению особенностей кристаллизации КК вызвано широко распространенными природными процессами кальцификации и биоминерализации: от бактерий до млекопитающих [4]. Биоминералы типа органика/неорганика, являющиеся биокомпозитами различного типа, включают большую группу биологических объектов [5]. Среди биологических минералов КК занимает особое место, поскольку он входит в состав костей и панцирей животных. При этом, неорганический материал (КК) оказывается связанным с биополимерами [6].

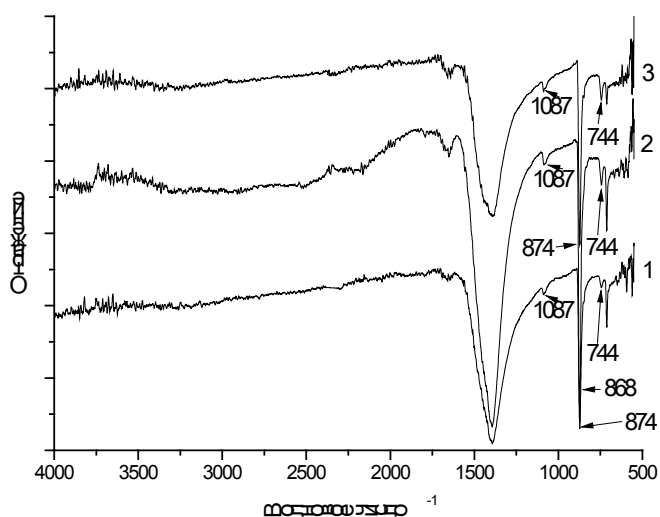
На образование определенной полиморфной модификации КК, происходящее в ходе осаждения из водных растворов кристаллов КК, способны оказывать влияние такие условия синтеза, как тип прекурсоров, характер их взаимодействия в ходе синтеза, а также внешние воздействия – температура, давление, скорости перемешивания и потока газа (CO_2) в растворе. Оценка влияния органических добавок на образование КК из водных растворов

Таблица 1. Кристаллографические характеристики безводных полиморфных модификаций

	Кальцит	Арагонит	Ватерит
Кристаллическая структура	Тригональная	Орторомбическая	Гексагональная
Пространственная группа	$R\bar{3}2/c$	$Pm\bar{c}n$	$P6_3/mmc$
Параметры решетки	$a = b = 4,990 \text{ \AA}$ $c = 17,061 \text{ \AA}$	$a = 4,9598 \text{ \AA}$ $b = 7,9641 \text{ \AA}$ $c = 5,7379 \text{ \AA}$	$a = b = 7,16 \text{ \AA}$ $c = 2,547 \text{ \AA}$



а



б

Рисунок 1. Дифрактограммы (а) и ИК спектры (б) образцов, синтезированных при 20 °С мгновенным сливанием растворов хлорида кальция и карбоната натрия и последующим прикапыванием растворов альбумина яичного белка различных концентраций

перспективно в том отношении, что оно, как известно [6], эффективно для управления фазовым составом продуктов синтеза.

Синтез КК проводили при 20 °С путем сливания растворов Na_2CO_3 и CaCl_2 с последующим перемешиванием смеси. Добавление АЛБ осуществляли по каплям его водного раствора в количестве, соответствующем получению продуктов синтеза, содержащих 4,9%, 9,8% и 19,6% масс. % АЛБ. Полученную смесь отстаивали и отфильтровывали образовавшийся в осадке продукт синтеза.

Идентификацию образцов проводили с использованием методов химического и рентгенофазового анализов (РФА), инфракрасной спектроскопии (ИК), сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии (СЭМ, ПЭМ).

Об образовании мелкокристаллического КК свидетельствуют результаты химического и РФА анализов, ИКС (рис. 1а, 1б).

Количество вводимого в ходе синтеза АЛБ оказывает существенное влияние на фазовый состав продуктов синтеза (рис. 2а). Как видно, содержание наиболее растворимой и наименее устойчивой фазы ватерита имеет место при наибольшем содержании АЛБ в ходе синтеза.

При этом размеры кристаллов ватерита (рис. 2б) в меньшей степени подвержены влиянию содержания АЛБ при синтезе.

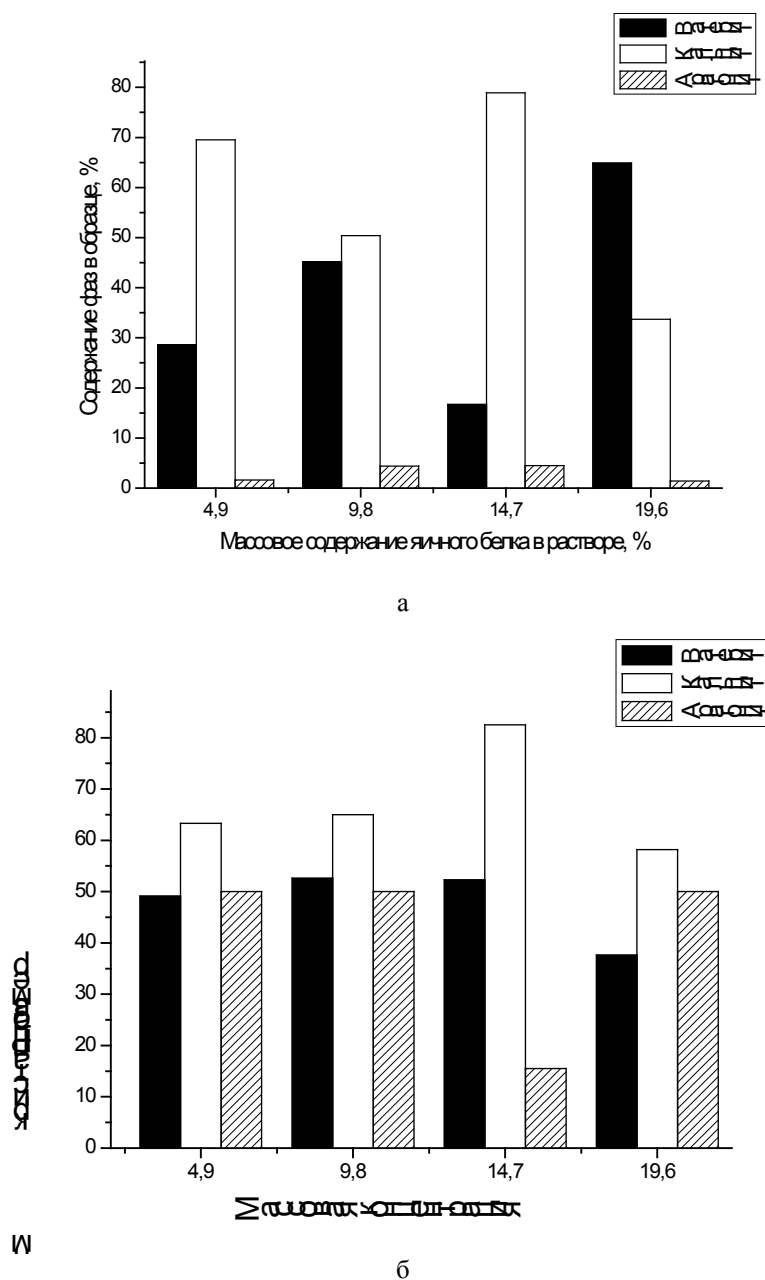
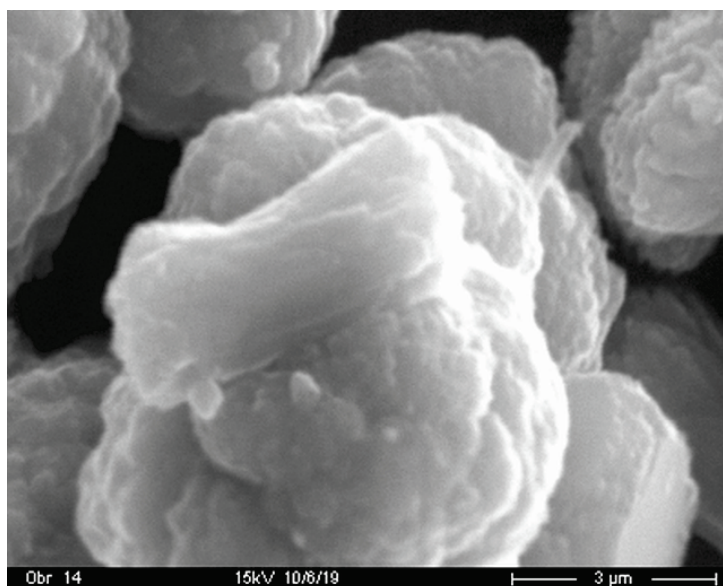


Рисунок 2. Содержание различных фаз (а) и размеры кристаллов (б) образцов, синтезированных при 20 °С мгновенным сливанием растворов хлорида кальция и карбоната натрия и прикапыванием растворов яичного альбумина различных концентраций

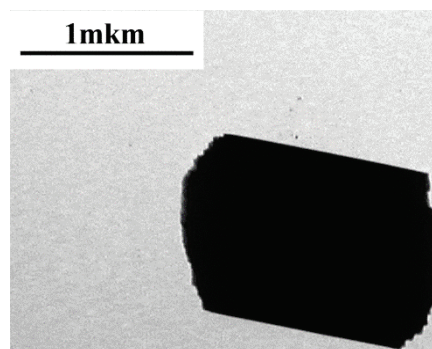
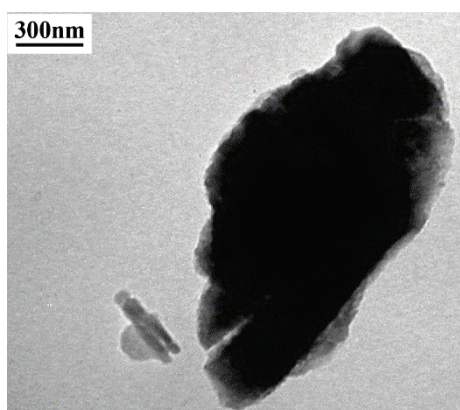
Результаты электронной (СЭМ, ПЭМ) микроскопии (рис. 3а, 3б) подтверждают данные рентгеновской дифрактометрии и ИК спектроскопии и свидетельствуют о том, что микрокристаллы КК (рис. 3а) образованы сростками нанокристаллов КК меньших размеров (рис. 3б).

Представленные результаты будут способствовать разработке методов направленного синтеза КК в ходе осаждения из водных растворов в системе $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-АЛБ-H}_2\text{O}$ с регулируемыми параметрами содержания различных фаз (кальцит, арагонит, ватерит), частиц различных размеров и определенной морфологии в продуктах синтеза; представляют несомненный интерес для создания биосовместимых препаратов на основе КК с различными физико-химическими и медико-биологическими характеристиками.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена в рамках государственного задания ИОНХ РАН в области фундаментальных научных исследований.



a



б

Рисунок 3. Результаты СЭМ и ПЭМ образцов, синтезированных с содержанием 4.9 масс. % АЛБ

Список литературы / References:

1. Kawano J., Shimobayashi N., Kitamura M. et al. Formation process of calcium carbonate from highly supersaturated solution. *Journal of Crystal Growth*, 2002, vol. 237, pp. 419-423.
2. Wang Y., Moo Y.X., Chen C. et al. Fast precipitation of uniform CaCO₃ nanospheres and their transformation to hollow hydroxyapatite nanospheres. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2010, vol. 352, pp. 393-400.
3. Xiang L., Xiang Y., Wen Y. et al. Formation of CaCO₃ nanoparticles in the presence of terpineol. *Materials Letters*, 2004, vol. 58, pp. 959-965.
4. Mann S. *Biomaterialization principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, 2001, 401 p.
5. Dujardin E., Mann S. Bio-inspired materials chemistry. *Advanced Materials*, 2002, vol. 14, no. 11, pp. 1-14.
6. Hunter K.G. Interface aspects of biomaterialization. *Current Opinion Solid State & Materials Sci.*, 1996, vol. 1, pp. 430-435.

**THE EFFECT OF EGG ALBUMIN ON CALCIUM CARBONATE BIOMINERALIZATION
IN WATER SOLUTION****Zakharov N.A.¹, Koval E.M.¹, Goeva L.V.¹, Shelichov E.V.², Aliev A.D.³, Kiselev M.R.³, Matveev V.V.³,
Zakharova T.V.⁴**¹Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry
*Lininsky ave., 31, Moscow, 119991, Russia; e-mail: zakharov@jgic.ras.ru*²NITU «MISiS»
*Lininsky ave., 4, Moscow, 119991, Russia*³Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry
*Lininsky ave., 31, Moscow, 119071, Russia*⁴Russian University of Transport «MIIT»
Moscow, 127994, Russia

Received 28.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0488

Abstract. Topical is the trend of investigation, that connected with synthesis of perspective for medical practice materials on the base of calcium carbonate (CaCO_3 , CC). Among a number of polymorphous modifications of calcium carbonates (crystalline anhydrous calcite, aragonite, vaterite; hydrated – mono- ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) hexahydrate- ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); amorphous phase CC) the greatest interest for application as materials for targeted delivery of medical preparations presents vaterite. The results of biomineralization simulation of calcium carbonate with participation of egg white albumine (ALB) in conditions precipitation from water solutions in water system $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-ALB-H}_2\text{O}$ are considered and carried out assessment effect of ALB content in solution on formation in composition of synthesis products of phases calcite (C), aragonite (A) and vaterite (V) were realized. The synthesis products identified by methods of physical and chemical analysis (chemical, X-Ray, infrared spectral analysis, scanning- and translucent electron microscopy) and fundamental interactions composition – synthesis conditions – structure – properties for prepared synthesis products were estimated. Developed and realized approaches for directed synthesis materials with regulated in course of synthesis and following processing properties on the base of calcium carbonate for medical purposes and variants of applications in medical practice synthesized materials were considered.

Key words: calcium carbonate, synthesis, albumin, bimineralization, simulation.

ИЗМЕРЕНИЕ И РАСЧЕТ ХАРАКТЕРИСТИК УПРУГОСТИ СТЕНКИ ОБЩЕГО ЖЕЛЧНОГО ПРОТОКА ЧЕЛОВЕКА

Муслов С.А., Зайцева Н.В., Корнеев А.А., Сеницын А.А.

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

ул. Дедегатская, 20/1, г. Москва, 127473, РФ

Поступила в редакцию 28.06.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0489

Аннотация. В работе опытным путём получены кривые зависимостей напряжение-деформация в продольном и кольцевом направлении и определены дифференциальные упругие модули стенки сегмента общего желчного протока человека на трупном материале. Знание физико-механических свойств желчных протоков может быть использовано для понимания функционирования всей желчевыводящей системы человека, выяснения аспектов её старения в связи с качественными структурно-функциональными изменениями тканей, для диагностики заболеваний и в терапевтических целях. Одним из ранних проявлений изменений свойств протоковой стенки, обусловленных развитием в ней патологического процесса, является нарушение её эластичности, что находит свое отражение в увеличении показателей жесткости. Установлено в продольном направлении: $\sigma_z(\varepsilon_z) = 0,19(e^{19,89\varepsilon_z} - 1)$ кПа и $E_z(\varepsilon_z) = 3,79e^{19,89\varepsilon_z}$ кПа (коэффициент достоверности регрессии 0,99), в кольцевом – $\sigma_\theta(\varepsilon_\theta) = 11,24(e^{10,61\varepsilon_\theta} - 1)$ кПа и $E_\theta(\varepsilon_\theta) = 119,24e^{10,61\varepsilon_\theta}$ КПа (коэффициент достоверности регрессии 0,98), соответственно.

Ключевые слова: желчевыводящая система, упругие свойства, модуль Юнга

ВВЕДЕНИЕ

Систематических исследований упругих свойств желчных протоков человека до сих пор не проводили. В работах [1-3] были выполнены только определённые доступные авторам испытания физико-механических свойств желчного пузыря и желчных протоков собак и поросят. Но данные, полученные в испытаниях на органах животных, можно принимать во внимание только для приблизительной оценки их поведения таковых у человека, несмотря, например, на то, что пищеварительная система, например, свиньи во многом подобна аналогичной у человека. Кроме того, численные значения некоторых важных параметров упругих свойств приведены не были. В данной работе впервые определены дифференциальные упругие свойства непосредственно стенки холедоха человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поскольку органы живого человека изучать механическими методами практически невозможно, материалами для исследования служил аутопсийный материал, т.е. эксперименты были проведены на трупных органах человека, это позволило избежать вынужденной экстраполяции данных опытных исследований на животных. Исследования проводились не позже, чем через 24 часа после смерти пациентов. Летальность не была связана с патологией печени или желчных путей, а образцы, отобранные для испытаний, визуально не имели признаков патологических процессов. Механические испытания проводились преимущественно на проксимальном отделе холедоха, но по данным экспериментальных исследований они могут быть распространены на дистальный отдел и даже печёночный проток желчевыводящей системы. Был применен инфузионный метод. Такой тип испытаний даёт больше достоверной информации, чем одноосное растяжение изотропных материалов [4]. Исследование желчных протоков при внутреннем давлении было выполнено в условиях, близких к физиологическим, это позволило получить достоверную информацию о деформационном поведении органов.

Морфологические исследования аутопсийного материала, взятого для механических испытаний, осуществлялось на срезах стенки желчного пузыря и прилегающих магистральных протоков. Данные этих исследований также могут быть использованы при обсуждении вопросов моторной активности желчевыводящей системы и организации тока желчи в двенадцатиперстную кишку и пищеварительный тракт.

Желчный пузырь. Слизистая оболочка выстлана цилиндрическим эпителием, образует многочисленные складки. Складки, выделяются в просвет желчного пузыря, складки часто имеют сложную форму, более широкие у основания и узкие к концу. Эпителий – однослойный высокий цилиндрический, располагается на собственной пластинке слизистой, состоящей из рыхлой соединительной ткани. Мышечная пластинка слизистой отсутствует, есть слой слабо развитой гладкомышечной ткани, представленный пучками разнонаправленных гладкомышечных клеток. Гладкомышечные волокна идут циркулярно и продольно, часть мышечных волокон идет косо. В промежутках между гладкомышечными пучками имеются многочисленные эластические волокна. Нередко мышечные пучки очень близко подходят к просвету желчного пузыря. Ширина мышечного слоя имеет большой размах колебаний – от 100,0 до 500,0 мкм. Это обусловлено, по нашему мнению, тем, что мышечные пучки проходят в различных направлениях, заходят в слизистую оболочку и проникают в адвентициальный слой.

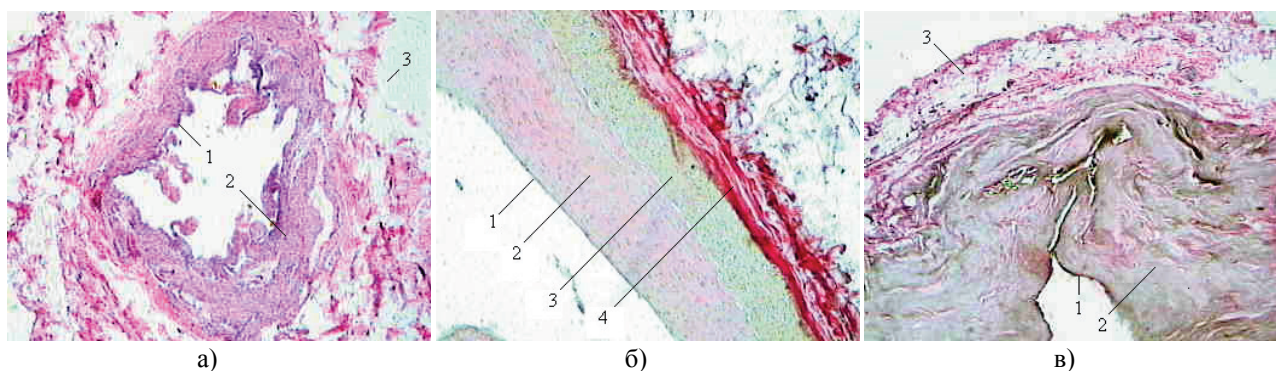


Рисунок 1. Фрагменты стенки: а) желчного пузыря, окраска гематоксилином и эозином, х50: 1 – эпителий, 2 – мышечная оболочка, 3 – субсерозная оболочка; б) пузырного протока, окраска по Ван-Гизон, х120: 1 – эпителий, 2 – слизистая с эластичными волокнами, 3 – слой гладких мышц, 4 – субсероза с коллагеновыми волокнами; в) общего желчного протока, окраска гематоксилином и эозином, х120: 1 – эпителий, 2 – слизистая, 3 – сероза

Адвентициальный слой рыхлый, содержит большое количество жировых клеток. Субсерозная оболочка образована рыхлой соединительной тканью. Внешний край адвентициальной оболочки покрыт серозным слоем (рис. 1а).

Пузырный проток. Слизистая образует несколько поперечных складок, мышечная оболочка достаточно хорошо выражена (рис. 1б).

Общий желчный проток. Слизистая оболочка представлена слоем цилиндрического эпителия, гладкая и практически не образует складок. Подслизистая с хорошо выраженными железами. Определяются отдельные мышечные волокна. Стенки образованы сетью коллагеновых и эластических волокон и единичными гладкомышечными волокнами или их пучками. Адвентициальный слой покрыт серозой (рис. 1в).

Патологических изменений в сегментах холедоха обнаружено не было. Это указывало на интактность и правомерность применения взятых отделов протоков для исследования упругих свойств.

Измерения проводились в пластиковом контейнере (рис. 2) в среде буферного раствора Кребса-Рингера с рН=7, моделирующем физиологические жидкости организма при температуре 37⁰С. В этом же растворе образцы хранились до испытаний. Исследования выполнены на трупных органах. Взятие и подготовку органов проводили по стандартной методике. Резецированный участок холедоха отмывали струёй проточной воды и освобождали от слоя жировой клетчатки. Вырезка органов осуществлялась как можно ближе к моменту смерти. Напряжённое состояние желчных протоков в организме [5] обуславливает их сокращение после перерезки. Для минимизации мышечных сокращений в 1 л раствора добавлялось 0,1 г Ca²⁺-связывающего агента EGTA. В качестве инфузионной системы использовались комплектующие от стандартного устройства для вливаний лекарственных растворов SFM Hospital Products GmbH. Проксимальный конец фрагмента протока соединялся с канюлей – полый трубкой системы. Нагнетание давления осуществлялось с помощью колонны гидростатического давления.

Другой конец, ближайший к сфинктеру Одди, как можно дистальнее перевязывался специальной лигирующей нитью с покрытием, снижающим прорезывание тканей и прочно удерживающей узлы. Величина

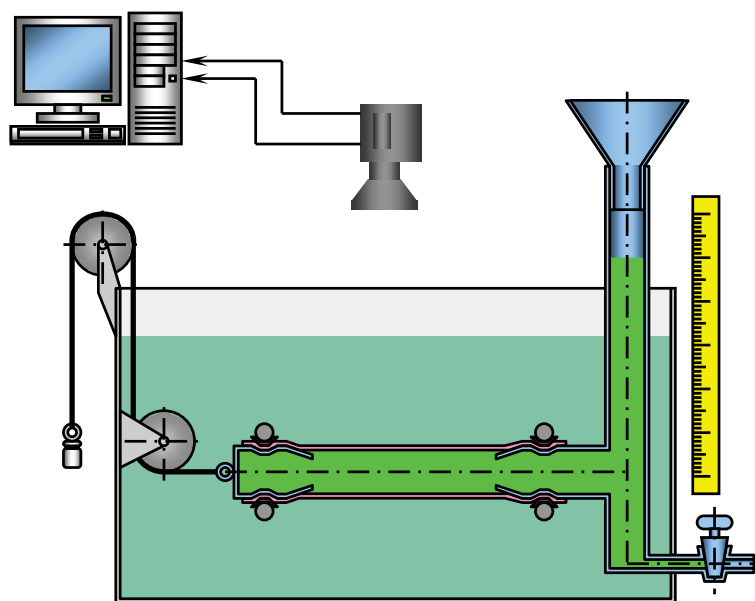


Рисунок 2. Схематическое изображение экспериментальной установки для испытаний механических свойств стенки общего желчного протока

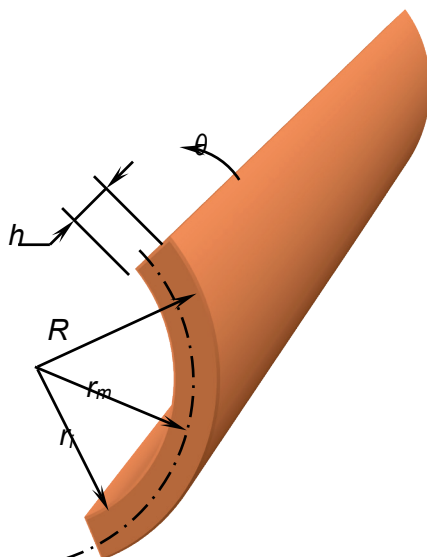


Рисунок 3. Сегмент стенки общего желчного протока

трансмурального давления определялась по высоте столба жидкости и изменялась ступенчато от 0 до 10 кПа (1 кПа = 10 см H₂O) с шагом 1 кПа. Изображение протока под избыточным давлением записывалось на видеокамеру Nikon CoolPix 5600, и подавалось на персональный компьютер. Далее захваченное изображение преобразовывалось в оттенки серого и обрабатывалось графическими пакетами SigmaScan Pro 5.0 и XnView. Эти программы позволяют работать практически с любыми типами изображений, получаемых с внешних устройств. Кроме того, они имеют удобный интерфейс, созданный специально для учёных и специалистов, не являющихся экспертами в области обработки изображений, позволяет быстро получить необходимую информацию об изображении и сократить время проведения исследований. Замер относительных деформаций в продольном направлении производился при помощи калиброванной координатной сетки. Чтобы исключить краевые эффекты, длина и площадь сегмента протока при канюлировании измерялись между двумя специальными метками, нанесёнными на образец на определённом расстоянии от его концов. Для определения величины деформаций в кольцевом направлении внешний диаметр протоков вычислялся по измеренным длине l и площади S . Начальная толщина исследуемых препаратов определялась на бинокулярном микроскопе с помощью нескольких измерений, по которым вычислялось среднее значение. В описанной методике испытаний внутренний диаметр протока и толщина стенки не могли быть измерены экспериментально и поэтому вычислялись, основываясь на следующих “классических” условных предположениях: форма общего желчного протока цилиндрическая, т.е., поперечное сечение – круглое; отношение толщины стенки протока к его радиусу мало; толщину стенки протока в ненагруженном состоянии можно измерить; материал стенки протока несжимаем из-за большого содержания воды, т.е. её объём при деформации не изменяется [6].

Так как биологические ткани практически в пределах физиологического диапазона деформаций не изменяют свой объём, с точки зрения механики они могут рассматриваться как несжимаемые материалы. Неизменный объём стенки при деформации и ортотропность механических свойств позволили упростить расчёт деформаций. Объём стенки протока (рис. 3) считался постоянной величиной, равной объёму при давлении 0 кПа:

$$V = V_0 = (R_0^2 - (R - h_0)^2)\pi l_0, \quad (1)$$

где R_0 , h_0 и l_0 – внешний радиус, толщина и длина, измеренные при давлении 0 кПа.

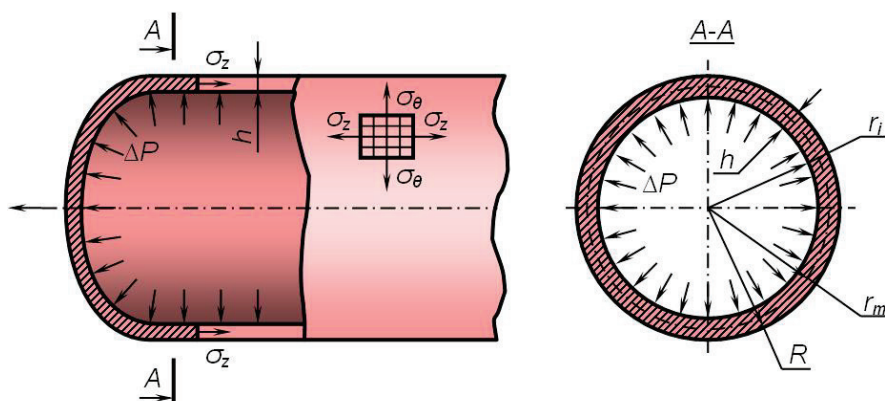


Рисунок 4. Сечения стенки общего желчного протока и схема действующих в них напряжений

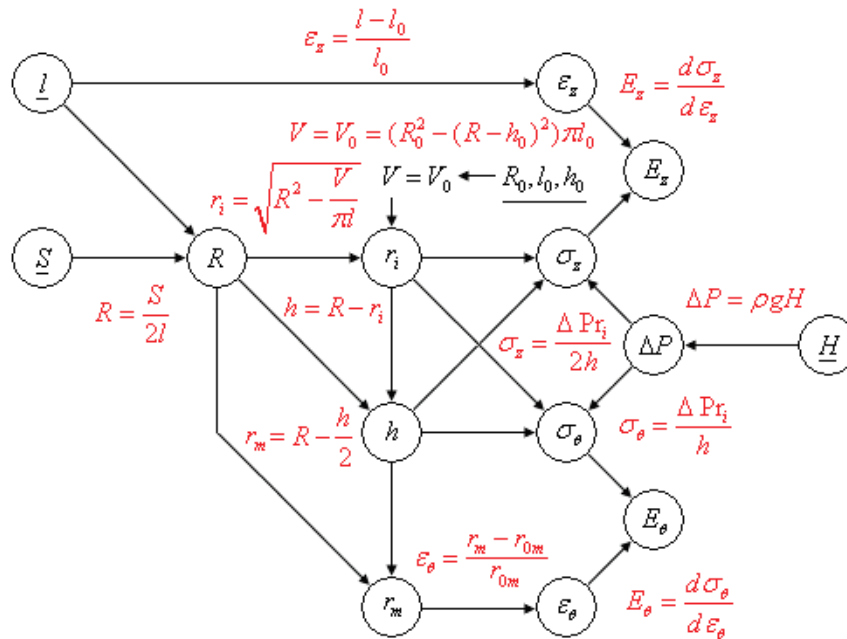


Рисунок 5. Последовательность расчётов при вычислении деформаций, напряжений и упругих модулей общего желчного протока. Условные обозначения: $V=V_0$ – постоянный объём стенки сегмента органа, измеренный между специальными метками; R – внешний радиус; l – длина; S – площадь; r_i – внутренний радиус; r_m – среднecольцевой радиус (радиус срединной поверхности); h – толщина стенки; σ_z, ϵ_z – напряжение и относительная деформация в продольном направлении; $\sigma_\theta, \epsilon_\theta$ – напряжение и относительная деформация в кольцевом (окружном) направлении; ρ – плотность, H – высота столба жидкости. Величины, определённые путём прямых измерений подчёркнуты

Толщина стенки h при произвольном давлении тогда вычислялась как

$$h = R - \sqrt{R^2 - \frac{V}{\pi l}}, \tag{2}$$

где R и l – внешний радиус и длина, соответственно при нагружении.

Величина измеренных и рассчитанных деформаций далее использовалась для вычисления кольцевых и продольных напряжений (рис. 4). Последовательность измерений и вычислений деформаций протока, напряжений и упругих модулей была как на схеме (рис. 5).

В условиях равновесия связь напряжений и деформаций в кольцевом и продольном направлении определяли по формулам Лапласа. Согласно [7] кольцевое (оно же окружное) напряжение σ_θ , уравновешивающее избыточное внутреннее трансмуральное давление равно:

$$\sigma_\theta = \frac{\Delta P \cdot r_i}{h}, \tag{3}$$

где ΔP – трансмуральное давление, а $r_i = R - h$ – внутренний радиус.

Избыточное давление рассчитывали по известному гидростатическому. Поскольку ось протока в ванне с физиологическим раствором проходила через основание колонны давления (рис. 2), то по закону Паскаля трансмуральное давление совпадало с гидростатическим, приложенным к сегменту:

$$\Delta P = \rho g H, \tag{4}$$

здесь ρ – плотность жидкости; $g = 9,81 \text{ м} \cdot \text{сек}^{-2}$ – ускорение свободного падения; H – высота столба жидкости.

Продольное напряжение σ_z вычислялось как:

$$\sigma_z = \frac{\Delta P \cdot r_i}{2h}. \tag{5}$$

Несмотря на то, что деформации были достаточно большие, для простоты они вычислялись как деформации Коши [8]. Величина деформации в кольцевом направлении определялась как

$$\epsilon_\theta = \frac{r_m - r_{0m}}{r_{0m}} = \frac{\Delta r_m}{r_{0m}}, \tag{6}$$

где $r_m = \frac{R + r_i}{2} = R - \frac{h}{2}$ – среднecольцевой радиус (внешний радиус за вычетом половины толщины протока) при различных приложенных напряжениях; r_{0m} – среднecольцевой радиус при 0 кПа.

Относительная деформация в продольном направлении рассчитывалась как:

$$\varepsilon_z = \frac{\Delta l}{l_0} = \frac{l - l_0}{l_0}, \quad (7)$$

здесь l – длина сегмента протока, измеренная под давлением; l_0 – соответствующая длина, измеренная при 0 кПа.

В результате использовались следующие формулы для расчёта кольцевых и продольных деформаций ε_θ , ε_l и напряжений σ_θ , σ_l :

$$\varepsilon_\theta = \frac{\sqrt{\frac{S^2}{4l^2} - \frac{V}{\pi l}} + \frac{S}{2l}}{\sqrt{\frac{S_0^2}{4l_0^2} - \frac{V_0}{\pi l_0}} + \frac{S_0}{2l_0}} - 1; \quad \varepsilon_z = \frac{l - l_0}{l_0};$$

$$\sigma_\theta = \frac{P}{\frac{1}{\sqrt{1 - \frac{4Vl}{\pi S^2}}} - 1}; \quad \sigma_z = \frac{0,5P}{\frac{1}{\sqrt{1 - \frac{4Vl}{\pi S^2}}} - 1}.$$
(8)

Коэффициенты α и β зависимостей $\sigma = \alpha(e^{\beta\varepsilon} - 1)$ были найдены с помощью функции *genfit* пакета компьютерной алгебры MATHCAD 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате получены кривые зависимостей напряжение-деформация протоков в продольном $\sigma_z = \sigma_z(\varepsilon_z)$ и кольцевом $\sigma_\theta = \sigma_\theta(\varepsilon_\theta)$ направлениях *in vitro*, где ε_z и ε_θ – компоненты деформации (рис. 1, 3), σ_z и σ_θ – соответствующие им напряжения (рис. 6).

Кривые $E_z = E_z(\varepsilon_z)$ и $E_\theta = E_\theta(\varepsilon_\theta)$ были подвержены значительным индивидуальным колебаниям и существенно нелинейны. Их сдвиг по отношению друг к другу по оси деформаций является признаком того, что пассивные механические свойства холедоха анизотропны по типу “ортотропия”. Из относительного положения кривых следует, что гепатикохоледох легче деформируется и более податлив в продольном направлении, чем в кольцевом. Аналитически диаграммы были описаны экспоненциальными зависимостями вида $\sigma = \alpha(e^{\beta\varepsilon} - 1)$. Данный способ аппроксимации оказался эффективен и показал высокую точность. Упругие модули холедоха $E_z(\varepsilon_z)$ и $E_\theta(\varepsilon_\theta)$ определялись дифференцированием соответствующих регрессионных зависимостей. В результате в продольном направлении установлено: $\sigma_z(\varepsilon_z) = 0,19(e^{19,89\varepsilon_z} - 1)$ кПа и $E_z(\varepsilon_z) = 3,79e^{19,89\varepsilon_z}$ кПа (коэффициент достоверности регрессии 0,99), в кольцевом – $\sigma_\theta(\varepsilon_\theta) = 11,24(e^{10,61\varepsilon_\theta} - 1)$ кПа и

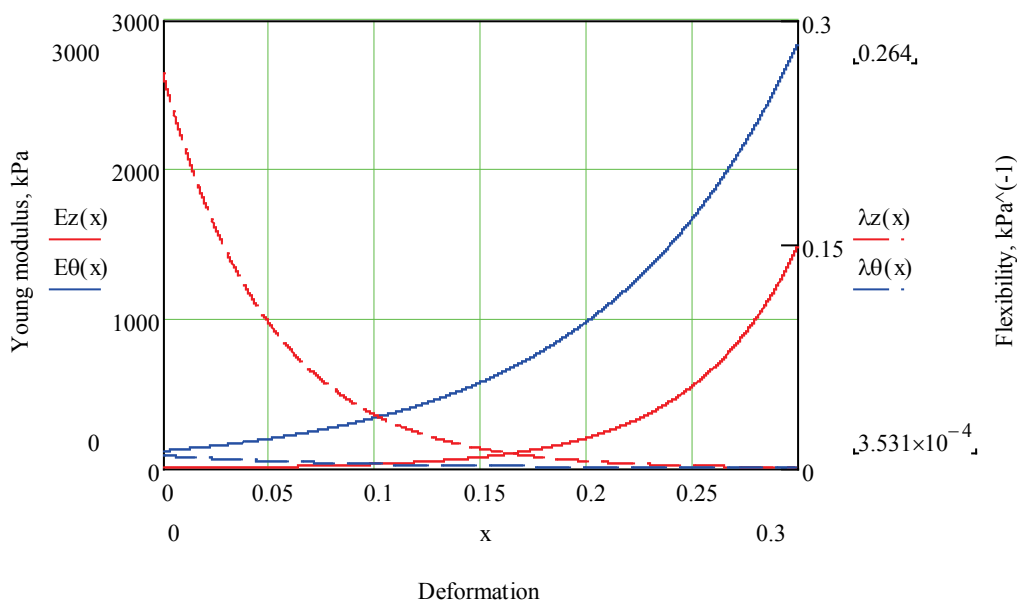


Рисунок 6. Упругие дифференциальные модули Юнга E , кПа и коэффициенты податливости λ , МПа⁻¹ общего желчного протока в продольном (—) и кольцевом (—) направлениях

$E_\theta(\varepsilon_\theta) = 119,24e^{10,61\varepsilon_\theta}$ *кПа* (коэффициент достоверности регрессии 0,98), соответственно. Коэффициенты податливости определялись как $\lambda_z(\varepsilon_z) = E_z^{-1}(\varepsilon_z)$ и $\lambda_\theta(\varepsilon_\theta) = E_\theta^{-1}(\varepsilon_\theta)$ и также представлены на рисунке 6.

Установленная анизотропия биомеханических свойств стенки общего желчного протока может быть связана со сложным механизмом транзита желчи через холедох в двенадцатиперстную кишку. Также отметим, что установленное деформационное поведение желчных путей характерно для биологических проточных систем (артерий, уретры, мочеочника и др.), органов желудочно-кишечного тракта (пищевода и кишечника), резервуаров (желчный и мочевой пузыри) и обеспечивает им одновременно пластичность и прочность. Оно соответствует реологической модели Кельвина-Фойгта вязкоупругого тела и свидетельствует о том, что пассивные под действием внешнего воздействия механические свойства желчных протоков обусловлены растяжением образующих соединительную ткань стенки протоков волокон коллагена и эластина с разными по величине модулями упругости [9].

ВЫВОДЫ

1. Исследование пассивных механических свойств твердых и мягких биологических тканей чрезвычайно информативно и является одним из важнейших направлений биомеханики.

2. В продольном направлении общего желчного протока человека установлено: $\sigma_z(\varepsilon_z) = 0,19(e^{19,89\varepsilon_z} - 1)$ *кПа* и $E_z(\varepsilon_z) = 3,79e^{19,89\varepsilon_z}$ *кПа* (коэффициент достоверности регрессии 0,99), в кольцевом – $\sigma_\theta(\varepsilon_\theta) = 11,24(e^{10,61\varepsilon_\theta} - 1)$ *кПа* и $E_\theta(\varepsilon_\theta) = 119,24e^{10,61\varepsilon_\theta}$ *кПа* (коэффициент достоверности регрессии 0,98), соответственно.

3. Пассивные механические свойства гепатикохоледоха анизотропны. Он легче деформируется (более податлив) в продольном направлении, чем в кольцевом, что может быть связано с весьма сложным механизмом транзита желчи через холедох в двенадцатиперстную кишку.

4. Упругие модули желчного протока являются дифференциальными: при небольших деформациях они малы, обеспечивая высокую растяжимость тканей, а при больших – увеличиваются, гарантируя их прочность. Морфофункциональные особенности такого поведения обусловлены растяжением образующих соединительную ткань стенки протоков волокон коллагена и эластина с разными по величине модулями упругости.

5. Значения модулей Юнга стенки общего желчного протока могут быть учтены при компьютерном моделировании, например, численном анализе внутрипросветных вмешательств, билиарном стентировании, изучении корреляции механического воздействия и билиарной боли.

Список литературы / References:

1. Duang Q., Gregersen H., Duch B., Kassab G. Indicial response functions of growth and remodeling of common bile duct post obstruction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. 420-427.
2. Duch B., Andersen H., Gregerson H. Mechanical properties of the porcine bile duct wall. *BioMed. Engineer. OnL.*, 2004, vol. 3, no. 23, pp. 1-8.
3. Jian C., Wang G. Biomechanical study of the bile duct system outside the liver. *Biomed. Mater. Eng.*, 1991, vol. 1, no. 2, pp. 105-113.
4. Fung Y.C. Elasticity of soft tissues in simple elongation. *American Journal of Physiology*, 1967, vol. 213, no. 6, pp. 1532-1544.
5. Frobert O., Gregersen H., Bjerre J. et al. Relation between zero-stress state and branching order of porcine left coronary arterial tree. *American J. Physiology*, 1998, vol. 275, no 6, part 2, pp. 2283-2290.
6. Сковорода А.Р. Ранняя неинвазивная диагностика тканевых аномалий как задача вычислительной математики. В кн.: *Компьютеры и суперкомпьютеры в биологии*. Под ред. В.Д. Лахно, М.Н. Устинина. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2002, 528 с. [Skovoroda A.R. Early noninvasive diagnostics of tissue anomalies as a problem of computational mathematics. In: *Computers and Supercomputers in Biology*. Edited by V.D. Lakhno, M.N. Ustinina. Moscow-Izhevsk: Institute of Computer Research, 2002, 528 p. (In Russ.)]
7. Бегун П.И., Шукейло Ю.А. *Биомеханика*. СПб.: Политехника, 2000, 464 с. [Runner P.I., Shukeilo Yu.A. *Biomechanics*. St. Petersburg: Polytechnica, 2000, 464 p. (In Russ.)]
8. Грин А., Адкинс Дж. *Большие упругие деформации и нелинейная механика сплошной среды*. Москва: Мир, 1965, 456 с. [Green A., Adkins J. *Large elastic deformations and nonlinear continuum mechanics*. Moscow: Mir, 1965, 456 p. (In Russ.)]
9. Перцов С.С., Стюрева Г.М., Муслов С.А., Синицын А.А., Корнеев А.А., Зайцева Н.В. *Основы биомеханики для стоматологов. Учебное пособие. Для студентов стоматологических факультетов, врачей-стоматологов интернов, ординаторов и слушателей факультетов последипломного образования медицинских вузов*. МГМСУ, 2017, 115 с. [Pertsov S.S., Styureva G.M., Muslov S.A., Sinityn A.A., Korneev A.A., Zaitseva N.V. *Fundamentals of biomechanics for dentists. Study guide. For students of dental faculties, dental interns, residents and students of postgraduate faculties of medical universities*. MGMSU, 2017, 115 p. (In Russ.)]

MEASUREMENT AND CALCULATION OF ELASTIC CHARACTERISTICS OF THE WALL OF THE HUMAN COMMON BILE DUCT**Muslov S.A., Zaitseva N.V., Korneev A.A., Sinitsyn A.A.**

Evdokimov Moscow State Medical University

Delegatskaya str., 20/1, Moscow, 127473, Russia

Received 28.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0489

Abstract. In the work, stress-strain curves in the longitudinal and annular directions were experimentally obtained and the differential elastic modules of the wall of the segment of the human common bile duct on cadaver material were determined. Knowledge of the physico-mechanical properties of the bile ducts can be used to understand the functioning of the entire human biliary system, to clarify aspects of its aging due to qualitative structural and functional changes in tissues, to diagnose diseases and for therapeutic purposes. One of the early manifestations of changes in the properties of the ductal wall caused by the development of a pathological process in it is a violation of its elasticity, which is reflected in an increase in stiffness indicators. It is established in the longitudinal direction of choledochus: $\sigma_z(\varepsilon_z) = 0,19(e^{19,89\varepsilon_z} - 1)$ kPa and $E_z(\varepsilon_z) = 3,79e^{19,89\varepsilon_z}$ kPa (regression confidence coefficient 0.99), in the annular direction – $\sigma_\theta(\varepsilon_\theta) = 11,24(e^{10,61\varepsilon_\theta} - 1)$ kPa and $E_\theta(\varepsilon_\theta) = 119,24e^{10,61\varepsilon_\theta}$ kPa (regression confidence coefficient 0.98), respectively.

Key words: *biliary system, elastic properties, Young's modulus.*

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПОЛЯ ПЛАЗМИДЫ rPF1 И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ХАРАКТЕР ДВИЖЕНИЯ НЕЛИНЕЙНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ ВОЗМУЩЕНИЙ – КИНКОВ

Краснобаева Л.А.^{1,2}, Якушевич Л.В.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Московский тр-т, 2, г. Томск, 634050, РФ

² Томский государственный университет

пр. Ленина, 36, г. Томск, 634034, РФ; e-mail: kla1983@mail.ru

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

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

Поступила в редакцию 04.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0490

Аннотация. В настоящей работе методы математического моделирования применяются для изучения особенностей динамики нелинейных конформационных возмущений – кинков в плазмиде rPF1. Движение кинков рассматривается как движение квазичастиц в потенциальном поле плазмиды. Поведение таких квазичастиц во многом определяется видом и характером этого поля. Для моделирования движения кинка вдоль плазмиды rPF1 использовалось уравнением МакЛафлина-Скотта. С помощью квазиоднородного приближения и блочного метода были рассчитаны энергетический профиль потенциального поля плазмиды rPF1 и построены 2D траектории движения кинков в области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, при этом учитывались эффекты диссипации и воздействия постоянного торсионного поля. Показано, что существуют пороговые значения торсионного поля, ниже и выше которых поведение кинка существенно меняется: происходит переход от циклического движения кинка внутри области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, к поступательному движению и выходу из этой области. Сделаны оценки пороговых значений. Показано, что они зависят от характера энергетического профиля вблизи области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry.

Ключевые слова: кинки ДНК, плазида rPF1, энергетический профиль, 2D траектория, торсионный момент

ВВЕДЕНИЕ

Плазида rPF1, созданная недавно генными инженерами [1], активно применяется для изучения интенсивности и направленности процесса транскрипции в различных последовательностях, которые для этой цели интегрируются в область, расположенную между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry. Изучение структурных и динамических свойств плазмиды rPF1 представляют научный интерес, которые помогут в перспективе прояснить вопрос о том, влияют ли структурные и динамические свойства самой плазмиды на результаты исследования функциональных свойств интегрируемых в нее последовательностей.

В данной работе исследуются динамические свойства нелинейных конформационных возмущений – кинков, активированных в молекуле ДНК [2]. Кинки активно используются для имитации открытых состояний в ДНК [3] и играют важную роль в процессах транскрипции [4-6], репликации [7,8], денатурации [9-11], а также переноса структурных изменений и информации по молекуле ДНК [12]. Поведение кинков во многом определяется видом и характером потенциального поля плазмиды. В отличие от предыдущих работ [13,14] в данной работе с помощью методов математической и теоретической физики были рассчитаны энергетические профили потенциального поля плазмиды, построены графики координаты и 2D траектории движения кинков в области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, при этом учитывались эффекты диссипации и воздействия постоянного торсионного поля. Показано, что существуют пороговые значения торсионного поля, ниже и выше которых поведение кинка существенно меняется: происходит переход от циклического движения кинка внутри области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, к поступательному движению и выходу из этой области. Сделаны оценки пороговых значений. Показано, что они зависят от характера энергетического профиля вблизи области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry.

ДЕТАЛИ СТРУКТУРЫ ПЛАЗМИДЫ rPF1

Полная нуклеотидная последовательность rPF1 была впервые опубликована в работе [15]. Особенность плазмиды rPF1 заключается в ее структуре, а именно: она содержит полиндромную область (участок 3), окруженную генами зеленого (участок 2) и красного (участок 4) белков, еще содержит ген устойчивости к канамицину (Kan) (участок 6) (рис. 1).

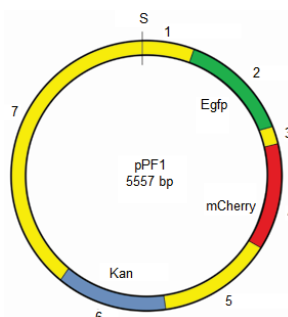


Рисунок 1. Схематическое изображение плазмиды pPF1. Ген зеленого белка (Egfp) - участок 2, ген красного белка (mCherry) - участок 4, и ген устойчивости к канамицину (Kan) – участок 6. S – точка, указывающая начало нумерации последовательности нуклеотидов

Если перенумеровать участки последовательности плазмиды, отвечающие генам и промежуточным областям между ними, начиная от точки S, получим 7 участков. Однако, разбиение последовательности на 7 участков не отражают кольцевой характер плазмиды. Чтобы учесть его, мы объединили участки справа и слева от точки S (1-й и 7-й участки) в единую область и назвали ее областью (7+1). В результате общее число участков уменьшилось на единицу и стало равным шести. Данные о координатах участков, числе аденинов N_A , тимининов N_T , гуанинов N_G , и цитозининов N_C и общее число оснований N на каждом участке представлены в таблице 1.

МОДЕЛЬ И МЕТОДЫ

Для моделирования движения кинка вдоль плазмиды pPF1 воспользуемся уравнением МакЛафлина-Скотта [16]:

$$\frac{dv_k(t)}{dt} = -\frac{\beta}{I} v_k(t) \left[1 - \left(\frac{v_k(t)}{C} \right)^2 \right] + \frac{M_0 \pi}{4\sqrt{IV}} \left[1 - \left(\frac{v_k(t)}{C} \right)^2 \right]^{\frac{3}{2}}, \quad (1)$$

где $v_k(t)$ – скорость кинка, $\beta = \alpha R^2$; α – коэффициент диссипации; R – расстояние от центра масс азотистого основания до сахаро-фосфатной цепочки; I – момент инерции основания; $C = (K' a^2 / I)^{1/2}$ – скорость звука; K' – константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки; a – расстояние между ближайшими парами оснований, M_0 – постоянный внешний момент.

Точное аналитическое решение уравнения (1) было найдено в работе [17]:

$$v_k(t) = \frac{\left[\left(v_0 \gamma_0 - \frac{CM_0 \pi}{4\beta \sqrt{IV}} \right) \exp\left(-\frac{\beta}{I}(t-t_0) \right) + \frac{CM_0 \pi}{4\beta \sqrt{IV}} \right]}{\sqrt{1 + \left[\left(\frac{v_0}{C} \gamma_0 - \frac{M_0 \pi}{4\beta \sqrt{IV}} \right) \exp\left(-\frac{\beta}{I}(t-t_0) \right) + \frac{M_0 \pi}{4\beta \sqrt{IV}} \right]^2}}, \quad (2)$$

где t_0 – время начала движения кинка в рассматриваемом участке основной последовательности; v_0 – начальная скорость кинка, $\gamma = (1 - v_0^2 / C^2)^{-1/2}$.

Полная энергия и энергия покоя кинка определяются формулами:

$$E = E_0 \cdot \gamma, \quad (3)$$

$$E_0 = 8\sqrt{K'IV}. \quad (4)$$

В случае малых скоростей ($v_k \ll C$) формула (3) приобретает следующий вид:

$$E = 8\sqrt{K'IV} \cdot \gamma \cong E_0 + \frac{m v_k^2}{2}, \quad (5)$$

где $m = \frac{E_0}{2C^2}$ – масса кинка. Такой вид формулы (5) указывает на то, что кинк можно рассматривать как квазичастицу, обладающую определенной массой, скоростью и энергией.

Таблица 1. Детали структуры плазмиды pPF1

Номер участка (m)	Координаты участков	N_A	N_T	N_G	N_C	N
1+7	(1-332) + (3382-5557)	549	582	709	668	2508
2 (Egfp)	333..1049	102	172	240	203	717
3	1050-1133	28	28	14	14	84
4 (mCherry)	1134-1841	163	100	220	225	708
5	1842-2568	168	208	165	186	727
6 (Kan)	2569-3381	247	210	162	194	813

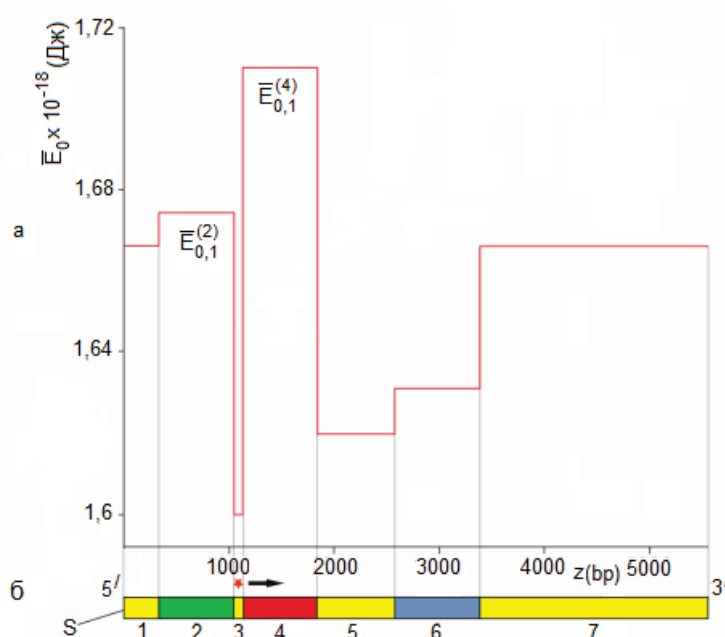


Рисунок 2. Энергетический профиль основной последовательности плазмиды pPF1 (а) и схематическое изображение кинка, движущегося в направлении 5’→3’ (б). Звездочка символизирует кинк. Стрелка указывает направление движения. Вертикальные вспомогательные серые линии указывают границы участков $\bar{E}_{0,1}^{(2)}$ и $\bar{E}_{0,1}^{(4)}$ – высоты энергетических барьеров, отвечающих генам зеленого и красного белков, соответственно

Энергетический профиль основной последовательности плазмиды ppf1. Для построения энергетического профиля мы рассчитали сначала усредненные значения основных динамических параметров плазмиды для каждого из шести участков, плазмиды pPF1 [18]. Формулы усреднения имеют следующий вид:

$$\begin{aligned}
 I_{n,i} &\rightarrow \bar{I}_i = I_A C_{A,i} + I_T C_{T,i} + I_G C_{G,i} + I_C C_{C,i}, \\
 R_{n,i} &\rightarrow \bar{R}_i = R_A C_{A,i} + R_T C_{T,i} + R_G C_{G,i} + R_C C_{C,i}, \\
 K'_{n,i} &\rightarrow \bar{K}'_i = K'_A C_{A,i} + K'_T C_{T,i} + K'_G C_{G,i} + K'_C C_{C,i}, \\
 k_{n,1-2} &\rightarrow \bar{k}_{1-2} = k_{A-T}(C_{A,1} + C_{T,2}) + k_{G-C}(C_{G,1} + C_{C,2}), \\
 \beta_{n,i} &\rightarrow \bar{\beta}_i = \beta_A C_{A,i} + \beta_T C_{T,i} + \beta_G C_{G,i} + \beta_C C_{C,i}.
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Здесь $C_{j,i} = N_{j,i}/N$ – концентрация оснований j -го типа в рассматриваемом участке i -ой цепи; $N_{j,i}$ число оснований j -го типа в этом участке; N – общее число оснований в рассматриваемом участке; $j = A, T, G, C, i = 1, 2$. А также вычислили значения энергий покоя кинков, активированных в каждом из этих участков: для каждого из шести участков основной $\bar{E}_{0,1}$ последовательности. Результаты расчетов представлены в таблице 2, а построенный энергетический профиль показан на рисунке 2.

Из рисунка 2а видно, что энергетический профиль основной последовательности плазмиды pPF1 содержит яму, которая полиндромному участку 3, расположенному между генами зеленого и красного белков. Образование кинка на этом участке наиболее вероятно, так как требует наименьших энергетических затрат.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДВИЖЕНИЯ КИНКА В ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЯМЕ

Для моделирования начала движения кинка в потенциальной яме предположим, что в начальный момент времени кинк активировался в центре ямы ($z_{0,1} = 1092$ по) с нулевой начальной скоростью $v_{0,1} = 0$. Далее под воздействием постоянного торсионного момента M_0 , направленного от 5’ к 3’ концу основной

Таблица 2. Усредненные значения динамических параметров и энергии покоя, рассчитанные для шести участков основной последовательностей плазмиды pPF1

Номер участка	$\bar{I}_1 \times 10^{-44}$ (кг·м ²)	$\bar{K}'_1 \times 10^{-18}$ (Н·м)	$\bar{V}_1 \times 10^{-20}$ (Дж)	$\bar{E}_{0,1} \times 10^{-18}$ (Дж)
1+7	6,21	1,94	2,23	1,67
2 (Egfp)	6,16	1,92	2,28	1,67
3	6,21	1,96	2,04	1,60
4 mCherry)	6,30	1,96	2,32	1,71
5	6,06	1,91	2,14	1,62
6 (Kan)	6,18	1,95	2,13	1,63

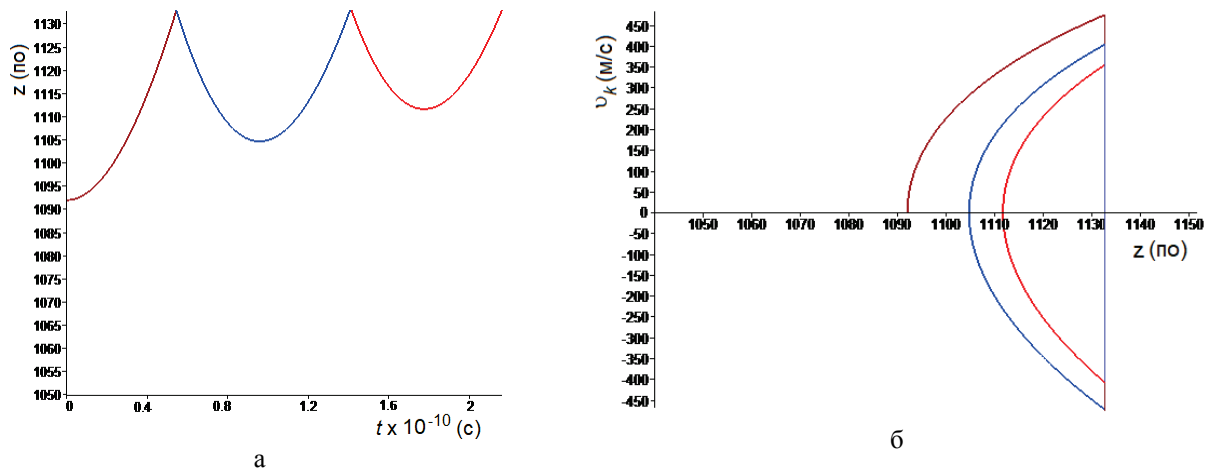


Рисунок 3. Временная зависимость координаты кинка (а), траектория кинка на фазовой плоскости $\{v_k, z\}$ (б). $M_0 = 2,50 \times 10^{-22}$ Дж, $v_0 = 0$

последовательности, кинк начнет движение направо, как это показано на рисунке 2б. На его пути, как видно из рисунка 2а, стоит энергетический барьер, расположенный справа от участка 3. Для преодоления этого барьера и продолжения движения, необходимо выполнить условие:

$$\bar{E}_{0,1}^{(3)} \cdot \gamma_{0,1}^{(3)} > \bar{E}_{0,1}^{(4)}, \quad (7)$$

где введены дополнительные верхние индексы в скобках, указывающие номер участка. Из условия (7) мы нашли формулу для расчета порогового значения скорости кинка:

$$v_{crit,right} = \bar{c}_1^{(3)} \sqrt{1 - \left(\frac{\bar{E}_{0,1}^{(3)}}{\bar{E}_{0,1}^{(4)}} \right)^2}. \quad (8)$$

Подставив значения параметров из таблицы 2 в формулу (8), мы получили $v_{crit,right} = 673,25$ м/с. Как будет показано ниже, этому пороговому значению скорости отвечает пороговое значение момента $M_{0,crit,right} = 4,95 \times 10^{-22}$ Дж.

Случай $M_0 < M_{0,crit,right}$. Мы построили графики координаты и 2D траектории движения кинков на фазовой плоскости $\{v_k, z\}$, когда постоянный внешний момент меньше порогового значения: $M_0 = 2,50 \times 10^{-22}$ Дж $< M_{0,crit,right}$. Определив координату кинка формулой

$$v_k = \frac{dz}{dt}, \quad (9)$$

был построен график временной зависимости координаты (рис. 3а) и траектории движения кинка на фазовой плоскости $\{v_k, z\}$ (рис. 3б). Для удобства фрагменты кривых, относящиеся к разным временным интервалам покрашены в разные цвета: коричневым в первом интервале, синим – во втором и красным – в третьем.

Из графика, представленного на рисунке 3а видно, что кинк, начав движение из центра 3-го участка ($z_{0,1} = 1092$ по) достиг правой границы ($z_{rb} = 1133$ по) в момент времени $t_{rb} = 5,45 \times 10^{-11}$ с (коричневая кривая). Подставив это значение времени в формулу (2) мы нашли скорость кинка у правой границы: $v_{rb} = 476,73$ м/с. Так как эта величина меньше порогового значения скорости $v_{crit,right} = 673,25$ м/с, кинк не смог преодолеть правую границу и отразился от нее. На графиках 3 а, 3 б, хорошо видно, что поведение кинка в первом интервале (0; $5,45 \times 10^{-11}$ с) включает плавное движение к правой границе и резкое вертикальное падение до значения -476,73 м/с.

Затем кинк снова начал плавное движение (синяя траектория), но уже в противоположном направлении. Из рисунка 3б видно, что, пройдя часть пути в направлении к левой границе, он плавно поворачивает к правой границе. Этот поворот на 180° объясняется нарушением баланса сил, способствующих и препятствующих движению кинка, в пользу последних. К моменту времени $1,42 \times 10^{-10}$ с кинк достиг правой границы. Его скорость на правой границе уменьшилась и стала равной 411,50 м/с. Так как эта величина меньше порогового значения скорости, то далее кинк снова отразился от правой границы и как видно из графиков 3 а, 3 б его скорость резко «упала вниз» до значения -411,50 м/с.

Следующий цикл движения кинка, включающий плавное движение от правой границы в направлении левой границы, плавный поворот на 180° не доходя левой границы, плавное движение в направлении правой границ и отражение от этой границы, показан на графиках 3а, 3б красным цветом. Очевидно, что такие циклы будут продолжаться. При этом значения скорости кинка на правой границе будут уменьшаться и в пределе стремиться к нулю.

Случай $M_0 > M_{0,crit,right}$. На рисунке 4 представлены графики временной зависимости координаты и 2D траектории движения кинков на фазовой плоскости $\{v_k, z\}$, когда постоянный внешний момент больше порогового значения: $M_0 = 6,50 \times 10^{-22}$ Дж $> M_{0,crit,right}$. Для удобства фрагменты кривых, относящиеся к разным

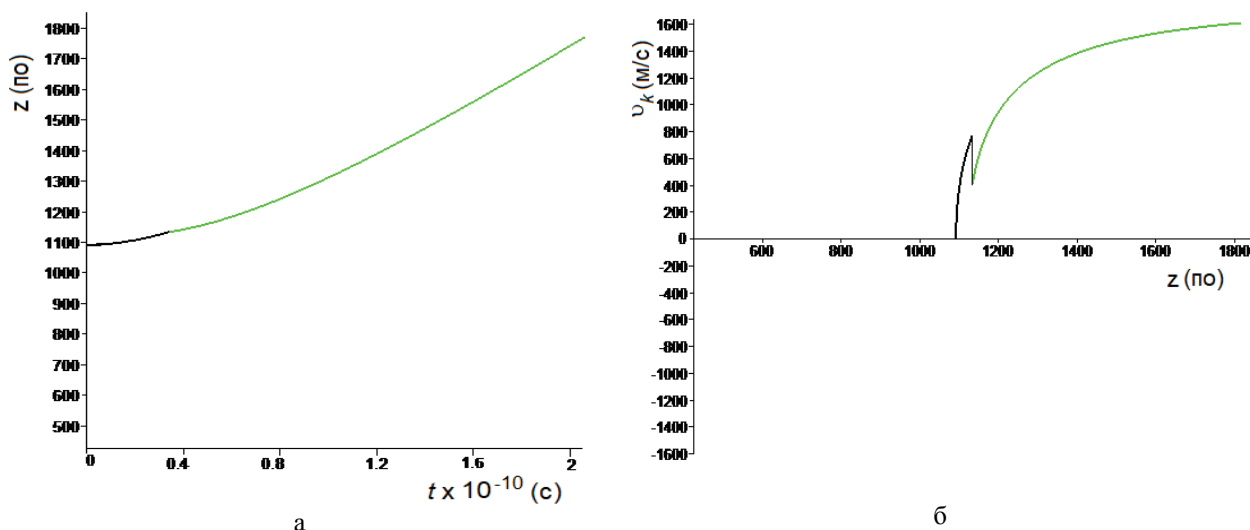


Рисунок 4. Временная зависимость скорости кинка (а), траектория кинка на фазовой плоскости $\{v_k, z\}$ (б). $M_0 = 6,50 \times 10^{-22}$ Дж, $v_0 = 0$

временным интервалам покрашены в разные цвета: черным цветом в первом интервале ($0; 3,42 \times 10^{-11}$ с), зеленым – во втором ($3,42 \times 10^{-11}$ с; $2,10 \times 10^{-10}$ с).

Из графика временной зависимости координаты, представленного на рисунке 4а, видно, что кинк, начав движение из центра 3-го участка ($z_{0,1} = 1092$ по) достиг правой границы ($z_{rb} = 1133$ по) в момент времени $t_{rb} = 3,42 \times 10^{-11}$ с (черная кривая). Подставив это значение времени в формулу (2) мы нашли скорость кинка у правой границы: $v_{rb} = 775,68$ м/с. Так как эта величина больше порогового значения скорости $v_{crit,right} = 673,25$ м/с, кинк смог преодолеть правую границу и войти в 4-ый участок (зеленая кривая). На рисунках 4 а, 4 б хорошо видно, что поведение кинка в интервале ($0; 3,42 \times 10^{-11}$ с) включает плавное движение к правой границе, преодоление ее и продолжение движения в 4-й области.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной работе было промоделировано движение кинков в плазмиде pPF1. Для моделирования движения кинка вдоль плазмиды pPF1 использовалось уравнением МакЛафлина-Скотта с учетом эффектов диссипации и действия постоянного торсионного поля. Неоднородность плазмиды учитывалась с помощью квазиоднородного приближения, используя блочный метод последовательности плазмиды разбивалась на участки, включающих Egfp, mCherry и Kan, а также промежуточные участки между ними, и коэффициенты модельного уравнения усреднялись по каждому из этих участков. На основе рассчитанного энергетического профиля потенциального поля плазмиды было показано, что минимальная энергия для возбуждения кинка соответствует области между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry. Построены графики координаты и 2D траектории движения кинков в области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry. Показано, что существуют пороговые значения торсионного поля, ниже и выше которых поведение кинка существенно меняется: происходит переход от циклического движения кинка внутри области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, к поступательному движению и выходу из этой области. Сделаны оценки порогового значения торсионного поля $M_{0,crit,right} = 4,95 \times 10^{-22}$ Дж

Следует, отметить, что все эти результаты были получены с рядом ограничений. Мы использовали упрощенную модель, учитывающую только один тип внутренних движений: угловые колебания азотистых оснований в одной из двух полинуклеотидных цепей ДНК, вторая цепочка моделируется только как среднее поле. Для нахождения аналитических решений использовали приближение Маклафлина-Скотта, справедливое только для случая малой диссипации. Однако мы полагаем, что разработанный нами подход может быть применим для более точных и сложных моделей для прогнозирования биологических характеристик природных последовательностей ДНК.

Список литературы / References:

1. Masulis I.S., Babaeva Z.Sh., Chernyshov S.V., Ozoline O.N. Visualizing the activity of *Escherichia coli* divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-colour fluorescent reporter vector. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, pp. 11449, doi: 10.1038/srep11449.
2. Zdravkovic S., Satarić M.V., Daniel M. Kink solitons in DNA. *International Journal of Modern Physics B.*, 2013, vol. 31, pp. 1350184.
3. Englander S.W., Kallenbach N.R., Heeger A.J., Krumhansl J.A., Litwin A. Nature of the open state in DNA structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, vol. 77, pp. 7222-7226.
4. Clark D., Pazdernik N. *Biotechnology*, 2nd Edition. Academic Cell, 2015.

5. Zuo Y., Steitz T.A. A structure-based kinetic model of transcription. *Transcription*, 2017, vol. 8, pp. 1-8, doi: 10.1080/21541264.2016.1234821.
6. He Y., Yan C., Fang J., Inouye C., Tjian R., Ivanov I., Nogales E. Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening. *Nature*, 2016, vol. 533, pp. 359-365, doi: 10.1038/nature17970.
7. Bailey L.J., Doherty A.J. Mitochondrial DNA replication: a PrimPol perspective. *Biochem Soc Trans*, 2017, vol. 45, pp. 513-529, doi: 10.1042/BST20160162.
8. Bleichert F., Botchan M.R., Berger J.M. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Science*, 2017, vol. 355, pp. 215-222, doi: 10.1126/science.aah6317.
9. Sicard F., Destainville N., Manghi M. DNA denaturation bubbles: Free-energy landscape and nucleation/closure rates. *J. of Chemical Physics*, 2015, vol. 142, pp. 903-910, doi: 10.1063/1.4905668.
10. Shi C., Shang F., Zhou M., Zhang P., Wang Y., Ma C. Triggered isothermal PCR by denaturation bubble-mediated strand exchange amplification. *Chem. Commun.*, 2016, vol. 52, pp. 11551-11554, doi: 10.1039/C6CC05906F.
11. Singh A.R., Granek R. Manipulation of double-stranded DNA melting by force. *Phys. Rev. E*, 2017, vol. 96, pp. 032417-032422, doi: 10.1103/PhysRevE.96.032417.
12. Dwiputra D., Hidayat W., Zen F.P. Nonlinear dynamics of DNA bubble induced by site specific DNA-protein interaction. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2017, vol. 856, pp. 012005-012009, doi: 10.1088/1742-6596/856/1/011001.
13. Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. Double energy profile of pBR322 plasmid. *AIMS Biophysics*, 2021, vol. 8, no. 2, pp. 221-232, doi: 10.3934/biophy.2021016.
14. Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. Ideas and methods of nonlinear mathematics and theoretical physics in DNA science: the McLaughlin-Scott equation and its application to study the DNA open state dynamics. *Biophysical Reviews*, 2021, pp. 1-24, doi: 10.1007/s12551-021-00801-0.
15. Гриневич А.А., Масулис И.С., Якушевич Л.В. Математическое моделирование поведения транскрипционного пузыря в плазмиде pPF1 и ее модификациях. Связь между энергетическим профилем плазмиды и направлением транскрипции. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 2, с. 248-258. [Grinevich A.A., Masulis I.S., Yakushevich L.V. Mathematical modeling of transcription bubble behavior in the pPF1 plasmid and its modified versions: the link between the plasmid energy profile and the direction of transcription. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 2, pp. 248-258, doi: 10.31857/S0006302921020058. (In Russ.)]
16. McLaughlin D.W., Scott A.C. Perturbation analysis of fluxon dynamics. *Phys Rev A*, 1978, vol. 18, pp. 1652, doi: 10.1103/PhysRevA.18.1652.
17. Краснобаева Л.А., Якушевич Л.В. Влияние диссипации и внешнего поля на динамику локальных конформационных возмущений в ДНК. *Биофизика*, 2007, т. 52, с. 237-243. [Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. Effects of dissipation and external fields on the dynamics of conformational distortions in DNA. *Biophysics*, 2007, vol. 52, pp. 237-243. (In Russ.)]
18. Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. A new approach to studies of nonlinear dynamics of kinks activated in inhomogeneous polynucleotide chains. *Int. J. Nonl. Mech.*, 2008, vol. 43, pp. 1074-1081, doi: 10.1016/j.ijnonlinmec.2008.05.00.b0100.

FEATURES OF THE POTENTIAL FIELD STRUCTURE OF THE PPF1 PLASMID AND THEIR INFLUENCE ON THE CHARACTER OF MOTION OF NONLINEAR CONFORMATIONAL PERTURBATIONS – KINKS

Krasnobaeva L.A.^{1,2}, Yakushevich L.V.³

¹Siberian State Medical University,

Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050, Russia

²Tomsk State University,

pr. Lenina 36, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: kla1983@mail.ru

³Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,

st. Institutskaya 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: kind-@mail.ru

Received 04.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0490

Abstract. In this work, mathematical modeling methods are used to study the features of the dynamics of the nonlinear conformational perturbations, kinks, in the pPF1 plasmid. The motion of kinks is considered as the motion of quasiparticles in the potential field of the plasmid. The behavior of such quasiparticles is largely determined by the type and nature of this field. To simulate the movement of the kink along the pPF1 plasmid, the McLaughlin-Scott equation was used. Using the quasi-homogeneous approximation and the block method, the energy profile of the potential field of the pPF1 plasmid was calculated and 2D kink trajectories were constructed in the region located between the genes of the Egfp and mCherry fluorescent proteins, taking into account the effects of dissipation and exposure to a constant torsion field. It was shown that there are threshold values of the torsion field, below and above which the behavior of the kink changes significantly: there is a transition from the cyclic motion of the kink inside the region located between the genes of the fluorescent proteins Egfp and mCherry to the translational motion and exit from this region. Threshold values have been estimated. It was shown that they depend on the nature of the energy profile near the region located between the genes of the fluorescent proteins Egfp and mCherry.

Key words: DNA kinks, plasmid pPF1, energy profile, 2D trajectory, torsion moment.

УПРУГИЕ СВОЙСТВА КРИСТАЛЛОВ БИОСОВМЕСТИМЫХ СПЛАВОВ НА ОСНОВЕ TiNi С ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ

Муслев С.А.¹, Сухочев П.Ю.²

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова
Делегатская ул., 20/1, г. Москва, 127473, РФ; e-mail: muslov@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские Горы, 1, г. Москва, 119192, РФ

Поступила в редакцию 02.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0491

Аннотация. Представлены собственные и литературные данные по характеристикам упругих свойств кристаллов биосовместимых сплавов на основе никелида титана (нитинола) TiNi с памятью формы, получивших широкое применение в науке, технике и медицине. Оценивали упругие постоянные c_{ij} , коэффициенты податливости s_{ij} , коэффициенты Пуассона μ_{\min} , μ_{\max} , $\langle\mu\rangle$ и упругой анизотропии A , полученные опытным и расчетным путем. Численные значения исследованных параметров детально проанализированы с точки зрения описательной статистики. Для визуализации различий упругих характеристик применены диаграммы “box and whiskers” и диаграмма с областями. Знание упругих постоянных кристаллической решетки TiNi и сплавов на его основе позволило рассчитать значения макроскопических упругих модулей E и G , коэффициента Пуассона μ и их ориентационную зависимость. На основании анализа данных сделан вывод о том, что низкий уровень упругих свойств сплавов на основе TiNi (нитинола) может быть использован, например, при разработке бионических протезов для медицины.

Ключевые слова: биосовместимые сверхэластичные сплавы с памятью формы, TiNi, упругие постоянные, коэффициент Пуассона, ауксетики.

ВВЕДЕНИЕ

Биосовместимые сверхэластичные сплавы с памятью формы на основе никелида титана (нитинола) TiNi широко используются в науке, технике и медицине и сфера их применения продолжает расширяться. Своим необычным термомеханическим поведением эти сплавы обязаны фазовым превращениям мартенситного типа, которые протекают в них при изменении температуры или напряжения [1]. Мартенситные превращения являются сдвиговыми, поэтому изучение упругих постоянных кристаллической решетки сплавов весьма информативно и способно пролить свет на механизм и природу этих превращений. Кроме того, знание параметров упругости материалов с памятью важно при конструировании и изготовлении протезов, имплантов в реконструктивной хирургии, стентов, бионических “nitinol muscles” и других изделий для медицины и робототехники. Однако сведения об упругих постоянных TiNi и сплавов на его основе весьма противоречивы. Частично это связано с тем, что накануне точек переходов они малы и дополнительно уменьшаются (“размягчаются”), достигая к моменту перехода аномально низких значений. Кроме того, результаты измерений и расчетов разрознены, зависят от состава, вида термомеханической обработки сплавов, метода их измерения и расчета. Цель данной работы объединить в одном сообщении известные авторам данные об упругих характеристиках кристаллов TiNi и сплавов на его основе и проанализировать их различия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коэффициенты податливости s_{ij} сплавов рассчитывали по известным формулам для кубических кристаллов [2]:

$$s_{11} = \frac{c_{11} + c_{12}}{(c_{11} + 2c_{12})(c_{11} - c_{12})}, s_{12} = \frac{-c_{12}}{(c_{11} + 2c_{12})(c_{11} - c_{12})}, s_{44} = \frac{1}{c_{44}} \quad (1)$$

Коэффициент Пуассона определяется соотношением $\mu_{\text{х}} = -\varepsilon_{\text{у}} / \varepsilon_{\text{х}}$, где $\varepsilon_{\text{х}}$ и $\varepsilon_{\text{у}}$ – соответственно упругие деформации в направлении нагружения x и поперечном направлении y . Для экстремальных значений коэффициентов Пуассона использовали соотношения [3]:

$$\mu_{\min} = \mu([110], [\bar{1}\bar{1}0]) = -\frac{2c_{11}c_{44} - (c_{11} - c_{12})(c_{11} + 2c_{12})}{2c_{11}c_{44} + (c_{11} - c_{12})(c_{11} + 2c_{12})}, \quad (2)$$

$$\mu_{\max} = \mu([110], [001]) = \frac{4c_{12}c_{44}}{2c_{11}c_{44} + (c_{11} - c_{12})(c_{11} + 2c_{12})}. \quad (3)$$

Как видно минимальные значения коэффициента Пуассона достигаются в системе $([110], [\bar{1}\bar{1}0])$, максимальные – $([110], [001])$. Первый индекс здесь определяет направление продольной деформации в кристаллах, второй – поперечной деформации. Средний коэффициент Пуассона $\langle\mu\rangle$ кристаллов рассчитывали как определенный интеграл [4]:

$$\langle \mu \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_0^\pi d\varphi \int_0^\pi \sin \theta \mu_p(\varphi, \theta) d\theta \quad (4)$$

где $\mu_p(\varphi, \theta)$ – коэффициент Пуассона как функция от 2-х углов, усредненная по поперечным направлениям.

$$\mu_p(\varphi, \theta) = -\frac{A\Gamma_{12} + B(\Gamma_{44} - 2)}{16[C + D(2\Gamma_{12} + \Gamma_{44})]} \quad (5)$$

$$A = 2(53 + 4 \cos 2\theta + 7 \cos 4\theta + 8 \cos 4\varphi \sin^4 \theta), \quad (5a)$$

$$B = -11 + 4 \cos 2\theta + 7 \cos 4\theta + 8 \cos 4\varphi \sin^4 \theta, \quad (5б)$$

$$C = 9 \cos^4 \theta + 6 \sin^4 \theta + 2 \cos 4\varphi \sin^4 \theta, \quad (5в)$$

$$D = 2(\sin^2 2\theta + \sin^4 \theta \sin^2 2\varphi), \quad (5г)$$

$$\Gamma_{12} = \frac{s_{12}}{s_{11}}, \quad (5д)$$

$$\Gamma_{44} = \frac{s_{44}}{s_{11}}. \quad (5е)$$

Коэффициент упругой анизотропии определяли через отношение двух сдвиговых модулей:

$$A = \frac{c_{44}}{C'} \quad (6)$$

где c_{44} – мера сопротивления кристалла сдвигу в плоскости куба [100] вдоль любого направления $\langle 0kl \rangle$, лежащего в этой плоскости, $C' = \frac{c_{11} - c_{12}}{2}$ – модуль сдвига в плоскости {110} в направлении $\langle 1\bar{1}0 \rangle$.

Угловые зависимости макроскопических модулей Юнга $E(\alpha)$ и сдвига $G(\alpha)$ кристаллов определяли по формулам для кубической системы

$$E(\alpha) = \frac{1}{\frac{c_{11} + c_{12}}{(c_{11} - c_{12})(c_{11} + 2c_{12})} + \left(\frac{1}{c_{44}} - \frac{2}{c_{11} - c_{12}}\right)K(\alpha)}, \quad K(\alpha) = \frac{\sin^2(2\alpha)}{4} \quad (7)$$

и

$$G(\alpha) = \frac{1}{\frac{1}{c_{44}} + \left(\frac{2}{c_{11} - c_{12}} - \frac{1}{c_{44}}\right)M(\alpha)}, \quad M(\alpha) = \sin^2(\alpha) \quad (8)$$

а коэффициенты Пуассона вдоль направления [110] $\mu_{21} = -\frac{s_{12}}{s_{11}}$, $\mu_{31} = -\frac{s_{13}}{s_{11}}$ – по формулам

$$\mu_{21} = -(2s_{12} + s \cos^2 \theta) / (2s_{11} - s), \quad (9)$$

$$\mu_{31} = -(2s_{12} + s \sin^2 \theta) / (2s_{11} - s), \quad (10)$$

где α и θ – углы между произвольным направлением и соответствующими кристаллографическими осями, линейная комбинация коэффициентов податливости $s = s_{11} + s_{12} - s_{44}/2$, равная 0 для упругоизотропных кристаллов. [5]. Как известно, коэффициент Пуассона вдоль оси [100] и диагонали [111] куба не зависит от латерального направления и $\mu_{21} = \mu_{31}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчета упругих постоянных, коэффициентов податливости, коэффициентов Пуассона и упругой анизотропии кристаллов сплавов на основе TiNi представлены на рисунках 1, 2 и в таблице 1. Упругие постоянные измерялись как правило высокочастотным и низкочастотным резонансным методами на монокристаллах различной ориентации, рассчитывались – исходя из “первых принципов”.

Согласно представленным опытным и расчетным данным минимальные значения упругих постоянных TiNi и сплавов на его основе составили: 158,18, 123,66 и 33 ГПа у c_{11} , c_{12} и c_{44} , максимальные – 218, 183 и 71 ГПа, соответственно. Минимальные значения коэффициентов податливости s_{11} , s_{12} и s_{44} равнялись 0,010, -0,017 и 0,014 ГПа-1, максимальные – 0,037, -0,004 и 0,030 ГПа-1, соответственно. Значения коэффициента Пуассона наблюдались в интервалах: от -0,25 до 0,26 у μ_{\min} , 0,49 до 1,10 у μ_{\max} , от 0,37 до 0,45 у $\langle \mu \rangle$ (среднего значения), коэффициента упругой анизотропии – от 1,37 до 4,59. Средние значения составили: 181,58 ГПа (c_{11}), 144,76 ГПа (c_{12}), 46,37 ГПа (c_{44}), 0,021 ГПа-1 (s_{11}), -0,010 ГПа-1 (s_{12}), 0,022 ГПа-1 (s_{44}), -0,16 (μ_{\min}), 0,82 (μ_{\max}), 0,41 ($\langle \mu \rangle$)

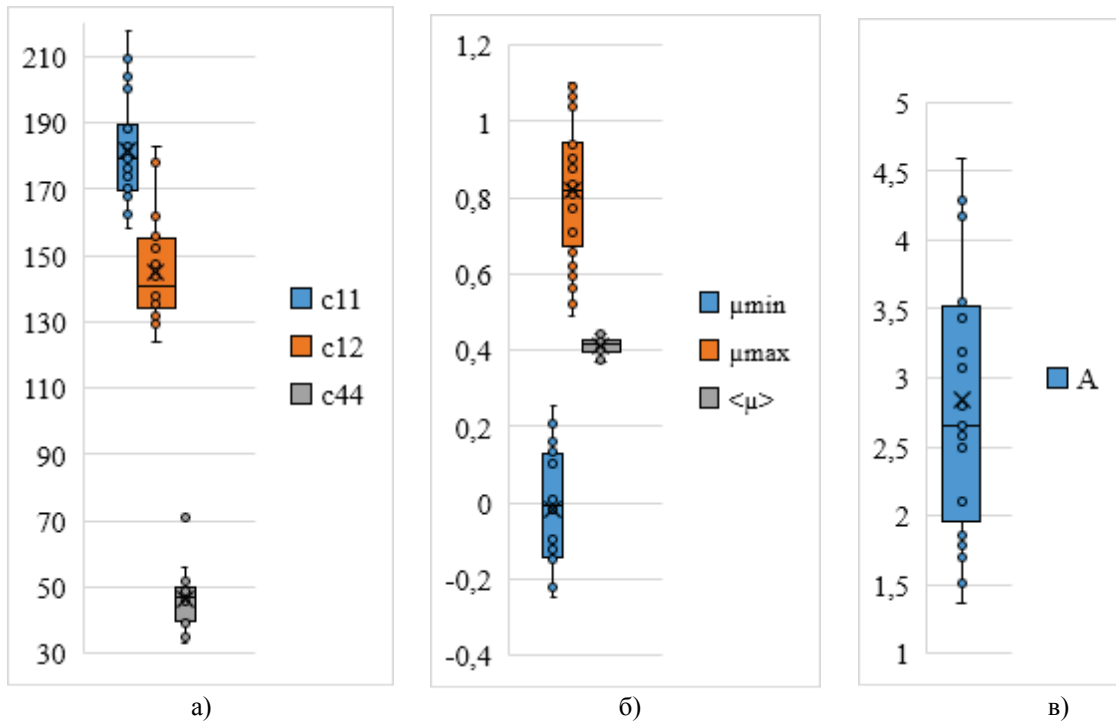


Рисунок 1. Упругие постоянные c_{ij} (а), коэффициент Пуассона μ (б) и коэффициент упругой анизотропии A (в) кристаллов сплавов на основе TiNi

Упругие постоянные TiNi и сплавов на его основе

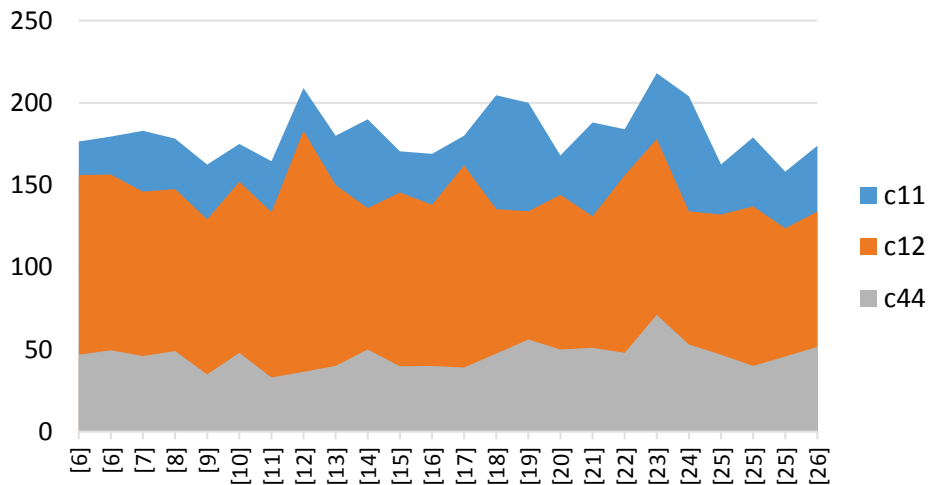


Рисунок 2. Упругие постоянные c_{ij} кристаллов сплавов на основе TiNi

и 2,84 (A). Коэффициент вариации (CV) – 0,08 (c_{11}), 0,10 (c_{12}), 0,17 (c_{44}), 9,82 (μ_{min}), 0,22 (μ_{max}), 0,05 ($\langle \mu \rangle$) и 0,34 (A). Как видно наименьший разброс данных наблюдался у расчетных значений среднего коэффициента Пуассона $\langle \mu \rangle$ 0,05 (5 %). Средний коэффициент вариации при измерениях и расчетах упругих постоянных оказался равным 0,12 (12 %), а $CV(A)$ составил 0,34. Одно из значений ($c_{44} = 71$ ГПа [23]) было квалифицировано при обработке данных как точка выброса (рис. 1а).

Дисперсия опытных данных оказалась выше, чем расчетных: стандартное отклонение (SD) данных, полученных путем измерений равна 19,31 ГПа, путем теоретических расчетов – 11,99 ГПа.

Таблица 1. Упругие постоянные, коэффициенты подалливости, коэффициенты Пуассона и упругой анизотропии в кристаллах сплавов в TiNi и сплавах на его на основе

c_{11}	c_{12}	c_{44}	s_{11}	s_{12}	s_{44}	μ_{\min}	μ_{\max}	$\langle\mu\rangle$	s	A	Метод	Сплав	Ссылка
ГПа			ГПа ⁻¹						ГПа ⁻¹				
176.5	156.1	46.8	0.033	-0.015	0.021	-0.25*	1.10	0.435	0.038	4.58	Расчет	NiTi	[6]
179.5	156.4	49.5	0.029	-0.013	0.020	-0.22	1.06	0.429	0.033	4.28	Расчет	NiTi	[6]
183	146	46	0.018	-0.008	0.021	0.02	0.78	0.41	0.016	2.48	Расчет	NiTi	[7]
178.2	147.6	49	0.022	-0.010	0.020	-0.09	0.91	0.415	0.022	3.20	Расчет	B2-NiTi	[8]
162.4	129.2	34.8	0.020	-0.009	0.028	0.11	0.71	0.416	0.016	2.09	Эксп.	NiTi	[9]
175	152	48	0.029	-0.013	0.020	-0.21	1.05	0.429	0.033	4.17	?	TiNi	[10]
164.5	133.5	33	0.022	-0.009	0.030	0.10	0.73	0.422	0.017	2.12	Эксп.	TiNi	[11]
209	183	36.4	0.026	-0.012	0.027	-0.01	0.88	0.443	0.025	2.8	Эксп.	Ti ₅₀ Ni ₃₀ Cu ₂₀	[12]
180	150	40	0.022	-0.010	0.025	0.00	0.83	0.424	0.021	2.66	Эксп.	Ti-Ni based alloys	[13]
190	136	50	0.013	-0.005	0.02	0.14	0.62	0.385	0.009	1.85	Расчет	NiTi	[14]
170.5	145.5	39.8	0.027	-0.012	0.025	-0.08	0.92	0.428	0.027	3.18	Расчет	NiTi	[15]
169	138	40	0.022	-0.01	0.025	0.01	0.81	0.417	0.020	2.58	Расчет	NiTi	[16]
180	162	39	0.037	-0.017	0.025	-0.21	1.09	0.445	0.043	4.33	Расчет	NiTi	[17]
204.64	135.36	47.52	0.010	-0.004	0.021	0.26	0.49	0.379	0.004	1.37	Расчет	Ni-Ti	[18]
200	134	56	0.010	-0.004	0.017	0.16	0.56	0.37	0.006	1.70	Расчет	TiNi	[19]
168	144	50	0.028	-0.013	0.02	-0.21	1.04	0.422	0.032	4.17	Расчет	TiNi	[20]
188	131	51	0.012	-0.005	0.019	0.14	0.60	0.378	0.008	1.79	Расчет	NiTi	[21]
184	156	48	0.024	-0.011	0.020	-0.12	0.95	0.421	0.025	3.43	Расчет	NiTi	[22]
218	178	71	0.017	-0.007	0.014	-0.15	0.94	0.41	0.018	3.55	Расчет	NiTi	[23]
204	134	53	0.010	-0.004	0.018	0.21	0.52	0.376	0.005	1.51	Расчет	(TiZr)Ni	[24]
162.57	132.04	46.83	0.022618	-0.01014	0.021	-0.08	0.88	0.409	0.022	3.07	Расчет	NiTi	[25]
158.18	123.66	45.69	0.020135	-0.00883	0.021	-0.02	0.79	0.399	0.011	2.65	Расчет	NiTi(Cu)	[25]
173.95	133.9	51.54	0.017396	-0.00757	0.019	-0.01	0.77	0.395	0.018	2.57	Расчет	NiTi(Fe)	[25]
179	137	40	0.016609	-0.0072	0.025	0.14	0.66	0.406	0.015	1.90	Расчет	NiTi	[26]

Красным шрифтом выделены значения $\mu_{\min} < 0$.

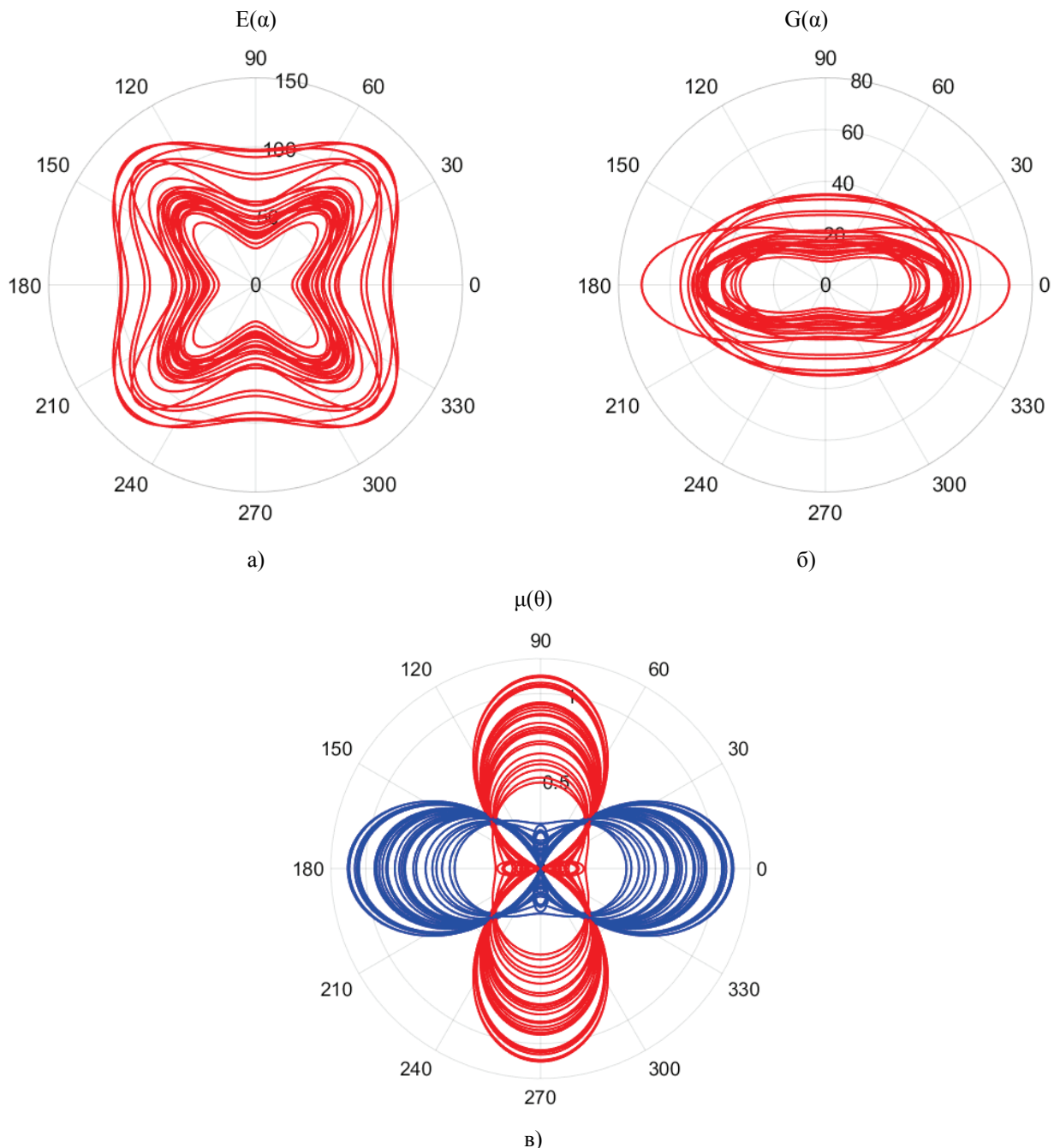


Рисунок 3. Сечения характеристических поверхностей упругих модулей E (а), G (б) и коэффициентов Пуассона $\mu_1(\theta)$ (красные линии) и $\mu_{31}(\theta)$ (синие линии)

Как видно из таблицы 1 и рисунка 1б часть минимальных значения коэффициента Пуассона сплавов меньше нуля $\mu_{\min} < 0$. Известно, что такие материалы (с отрицательным коэффициентом Пуассона) называются ауксетиками. Более подробный анализ показал, что по ряду данных кристаллы TiNi и сплавов на его основе относятся к так называемым частичным ауксетикам, то есть μ может принимать положительные или отрицательные значения в зависимости от ориентации x, y [27]. В этом случае знаки неравенств $s_{12} < 0, s = s_{11} + s_{12} - s_{44}/2 > 0$ или $s_{12} > 0, s = s_{11} + s_{12} - s_{44}/2 < 0$ противоположны. Для всех исследованных в данной работе сплавов $s_{12} < 0$, а $s > 0$. Напомним, что полными ауксетиками являются кристаллы, которые обладают отрицательными значениями коэффициента Пуассона при любой ориентации.

Знание упругих постоянных кристаллической решетки TiNi и сплавов на его основе позволяет рассчитать значения макроскопических упругих модулей – модуля Юнга E и сдвига G и их ориентационную зависимость. Результаты расчета представлены на рис. 3. Также на нем отображена угловая зависимость коэффициента Пуассона. Как отмечалось, экстремумы коэффициента Пуассона в кубических кристаллах могут проявляться при деформации вдоль направлений [100], [110] и [111], а ориентационная зависимость имеет место только для случая [110] [5].

Видно, что зависимости $E(\alpha)$ и $G(\alpha)$ исследованных сплавов представляют собой близкие к конгруэнтным замкнутые линии с центром в начале координат. За счет разницы в величине упругих постоянных ($CV = 0,12$) и

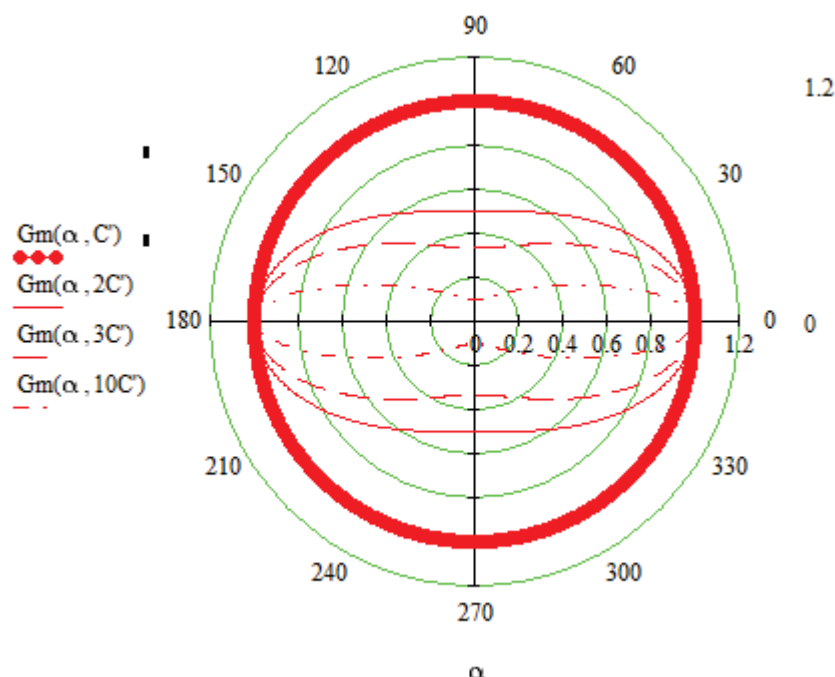


Рисунок 4. Эволюция нормированной функции $Gm(\alpha)$ при росте упругой анизотропии кубической решетки

коэффициента анизотропии ($CV = 0,34$) форма кривых несколько отличается друг от друга. Поверхность, радиус-векторы которой прямо пропорциональны модулю Юнга, имеет форму куба со скругленными углами и углублениями в центре граней, что характерно для кубических кристаллов при $s > 0$ [2]. Наибольшее значение модуля Юнга соответствует направлениям $\langle 111 \rangle$, наименьшее – направлениям $\langle 100 \rangle$ (рис. 1а). В этом направлении модуль Юнга нитиноловых сплавов ближе по величине к биологическим (костным) тканям организма человека, чем к металлам. В сечении (110) наименьшему значению модуля сдвига соответствует направление в кристалле вдоль диагонали грани куба $\langle \bar{1}10 \rangle$ (C'), наибольшему – ребро куба $\langle 001 \rangle$ (c_{44}) (рис. 3б).

Форму сечений характеристической поверхности модуля сдвига можно исследовать детальнее, если представить формулу (8) в виде

$$G(\alpha) = \left[\frac{1}{c_{44}} + \left(\frac{1}{C'} - \frac{1}{c_{44}} \right) \cdot \sin^2(\alpha) \right]^{-1} = \left[\frac{1}{c_{44}} + \left(\frac{c_{44} - C'}{C' \cdot c_{44}} \right) \cdot \sin^2(\alpha) \right]^{-1} = \frac{c_{44}}{1 + \left(\frac{c_{44} - C'}{C'} \right) \cdot \sin^2(\alpha)} = \frac{c_{44}}{1 + \left(\frac{c_{44}}{C'} - 1 \right) \cdot \sin^2(\alpha)}. \quad (9)$$

Как отмечалось выше сдвиговые модули играют основную роль в потере устойчивости кристаллической решетки к фазовым структурным превращениям. Для удобства визуализации введем новую функцию $Gm(\alpha)$ на основе $G(\alpha)$, но без влияния на масштаб параметра c_{44} :

$$Gm(\alpha) = \frac{G(\alpha)}{c_{44}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{c_{44}}{C'} - 1 \right) \cdot \sin^2(\alpha)} = \frac{1}{1 + (A - 1) \cdot \sin^2(\alpha)}. \quad (10)$$

Её график представлен на рисунке 4.

Из рисунка следует, что в полярной системе координат с плавным ростом параметра c_{44} и, соответственно анизотропии A , график функции (10), характеризующей модуль сдвига, изменяет форму от окружности (при $c_{44} = C'$, $A = 1$) до вытянутой узкой фигуры со впадинами по центру с ординатой C' и полушириной 1.

ВЫВОДЫ

1. Средние значения характеристик упругих свойств TiNi и сплавов на его основе составили 181,58 ГПа (c_{11}), 144,76 ГПа (c_{12}), 46,37 ГПа (c_{44}), 0,021 ГПа⁻¹ (s_{11}), -0,010 ГПа⁻¹ (s_{12}), 0,022 ГПа⁻¹ (s_{44}), -0,16 (μ_{\min}), 0,82 (μ_{\max}), 0,41 ($\langle \mu \rangle$) и 2,84 (A), соответственно.

2. Коэффициент вариации данных равен 0,08 (c_{11}), 0,10 (c_{12}), 0,17 (c_{44}), 9,82 (μ_{\min}), 0,22 (μ_{\max}), 0,05 ($\langle \mu \rangle$) и 0,34 (A), соответственно. Средний коэффициент вариации данных измерений и расчетов упругих постоянных составил 0,12 (12 %).

3. Дисперсия опытных данных выше, чем расчетных: стандартное отклонение данных, полученных путем измерений равно 19,31 ГПа, теоретических результатов – 11,99 ГПа, что почти в два раза меньше.
4. Установлено, что кристаллы TiNi и сплавов на его основе могут относиться к частичным ауксетикам.
5. Зависимости $E(\alpha)$ и $G(\alpha)$ исследованных сплавов представляют собой замкнутые линии с центром в начале координат, несколько отличающиеся друг от друга по форме за счет разницы в величине упругих постоянных и коэффициента анизотропии по разным данным.
6. Низкий уровень упругих свойств сплавов на основе TiNi (нитинола) может быть использован при разработке бионических протезов для медицины.

Список литературы / References

1. Муслев С.А. *Предмартенситные состояния в монокристаллах сплавов TiNi-TiFe и TiNi-TiCu: (01.04.07)*. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. Том. гос. ун-т им. В.В. Куйбышева, 1987, 166 с. [Muslov S.A. *Pre-martensitic states in single crystals of TiNi-TiFe and TiNi-TiCu alloys: (01.04.07)*. Diss. ... Candidate of Physical and Mathematical Sciences. Tomsk State University named after V.V. Kuibyshev, 1987, 166 p. (In Russ.)]
2. Nye J.F. *Physical Properties of Crystals: Their Representation by Tensors and Matrices*. Clarendon Press, 1985, 329 p.
3. Муслев С.А., Лотков А.И., Арутюнов С.Д. Экстремумы упругих свойств кубических кристаллов. *Известия ВУЗов. Серия Физика*, 2019, т. 62, № 8 (740), с. 102-111. [Muslov S.A., Lotkov A.I., Arutyunov S.D. Extremes of elastic properties of cubic crystals. *Izvestiya VUZov. Seriya Fizika*, 2019, vol. 62, no. 8 (740), pp. 102-111. (In Russ.)]
4. Wojciechowski K.W. Poisson's ratio of anisotropic system. *Computational methods in science and technology*, 2005, vol. 11, no. 1, pp. 73-79.
5. Муслев С.А., Лотков А.И., Тимкин В.Н. Коэффициент Пуассона TiNi. *Перспективные материалы*, 2021, № 12, с. 5-20. [Muslov S.A., Lotkov A.I., Timkin V.N. The Poisson's Ratio is TiNi. *Perspektivnyye materialy*, 2021, no. 12, pp. 5-20. (In Russ.)]
6. Wang X.F. et al. Extreme Poisson's ratios and their electronic origin in B2 CsCl-type AB intermetallic compounds. *Physical review B*, 2012, vol. 85, 134108.
7. Hatcher N., Kontsevoi O.Y., Freeman A.J. Martensitic transformation path of NiTi. *Phys. Rev. B*, 2009, vol. 80, 144203.
8. Bihlmayer G., Eibler R., Neckel A. Elastic properties of B2-NiTi and B2-PdTi. *Phys. Rev. B*, 1994, vol. 50, 13113.
9. Mercier O., Melton K.N., Gremaud G., Hagi J. Single-crystal elastic constants of the equiatomic NiTi alloy near the martensitic transformation. *J. Appl. Phys.*, 1980, vol. 51, 1833.
10. Gaillac R., Coudert F.-X. *Elastic tensor analysis*. Электронный ресурс. URL: <http://progs.coudert.name/elate/mp?query=mp-571>.
11. Кузнецов А.В., Муслев С.А., Лотков А.И., Хачин В.Н., Гришков В.Н., Пушкин В. Г. Упругие постоянные TiNi вблизи мартенситных превращений. *Известия вузов. Серия Физика*, 1987, № 7, с. 98-99. [Kuznetsov A.V., Muslov S.A., Lotkov A.I., Khachin V.N., Grishkov V.N., Pushin V.G. TiNi elastic constants near martensitic transformations. *Izvestiya VUZov. Seriya Fizika*, 1987, no. 7, pp. 98-99. (In Russ.)]
12. Ren X., Taniwaki K., Otsuka K., Suzuki T., Tanaka K., Chumlyakov Yu.I. Elastic constants of Ti₅₀Ni₃₀Cu₂₀ alloy prior to martensitic transformation. *Philosophical Magazine A*, 1999, vol. 79, no. 1, pp. 31-41.
13. Ren X., Miura N., Zhang J. Otsuka K., Tanaka K., Koiwa M., Suzuki T., Chumlyakov Yu.I. A comparative study of elastic constants of Ti-Ni-based alloys prior to martensitic transformation. *Mat. Sci. Eng. A*, 2001, vol. 312, pp. 196-206.
14. Sestak P. et al. *The elastic constants of austenitic and martensitic phases of NiTi shape memory alloy*. Pp. 120-124.
15. Zengetal Z.-Y. First-principles determination of the structure, elastic constant, phase diagram and thermodynamics of NiTi alloy. *Physica B*, 2010, vol. 405, pp. 3665-3672.
16. Wagner M.F.-X., Windl W. Lattice stability, elastic constants and macroscopic moduli of NiTi martensites from first principles. *Acta Mater*, 2008, vol. 56, pp. 6232-6245.
17. Huang X., Bungaro C., Godlevsky V., Rabe K.M. Lattice instabilities of cubic NiTi from first principles. *Phys.Rev. B*, 2001, vol. 65, 014108.
18. Lai W.S., Liu B.X. Lattice stability of some Ni-Ti alloy phases versus their chemical composition and disordering. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2000, vol. 12, no. L53.
19. Lu J.-M., Hu Q.-M., Yang R. Composition-dependent elastic properties and electronic structures of off-stoichiometric TiNi from first-principles calculations. *Acta Mater*, 2008, vol. 56, no. 4913.
20. Ye Y.Y., Chan C.T., Ho K.M. Structural and electronic properties of the martensitic alloys TiNi, TiPd, and TiPt. *Phys.Rev. B*, 1997, vol. 56, no. 3678.
21. Fang Yu et al. First-Principles Calculations of Structural, Mechanical, and Electronic Properties of the B2-Phase NiTi Shape-Memory Alloy Under High Pressure. *Computation*, 2019, vol. 7, no. 57.
22. Haskins J.B., Lawson J.W. Finite temperature properties of NiTi from first principles simulations: Structure, mechanics, and thermodynamics. *J. Appl. Phys.*, 2017, vol. 121, 205103.

23. Cheng D.Y., Zhao S.J., Wang S.Q., Ye H.Q. First-principles study of the elastic properties and electronic structure of NiTi, CoTi and FeTi. *Philos. Mag. A*, 2001, vol. 81, pp. 1625-1632.
24. Hu Q.M., Yang R., Lu J.M., Wang L., Johansson B., Vitos L. Effect of Zr on the properties of (TiZr)Ni alloys from first-principles calculations. *Phys. Rev. B*, 2007, vol. 76, 224201.
25. Yin J.Y. et al. Micromechanism of Cu and Fe alloying process on the martensitic phase transformation of NiTi-based alloys. *Journal of Structural Chemistry*, 2015, vol. 56, no. 6, pp. 1051-1057.
26. Tan C.L., Tian X.H., Cai W. *Phys. B* (Amsterdam, Neth.), 2009, vol. 404, pp. 3662-3665.
27. Епишин А.И., Лисовенко Д.С. Экстремальные значения коэффициента Пуассона кубических кристаллов. *Журнал технической физики*, 2016, т. 86, вып. 10, с. 74-82. [Epishin A.I., Lisovenko D.S. Extreme values of the Poisson's ratio of cubic crystals. *Journal of Technical Physics*, 2016, vol. 86, iss. 10, pp. 74-82. (In Russ.)]

ELASTIC PROPERTIES OF CRYSTALS OF BIOCOMPATIBLE TINI-BASED ALLOYS WITH SHAPE MEMORY

Muslov S.A.¹, Sukhochev P.Yu.²

¹Moscow State Medical University named after A.I. Evdokimov
Delegatskaya str., 20/1, Moscow, 127473, Russia; e-mail: muslov@mail.ru

²Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory microdistrict, 1, Moscow, 119192, Russia
Received 02.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0491

Abstract. The authors present their own and literature data on the characteristics of elastic properties of crystals of biocompatible alloys based on titanium nickelide (nitinol) TiNi with shape memory, which have been widely used in science, technology and medicine. Elastic constants c_{ij} , malleability coefficients s_{ij} , Poisson coefficients μ_{\min} , μ_{\max} , $\langle\mu\rangle$ and elastic anisotropy A , obtained experimentally and computationally, were evaluated. The numerical values of the studied parameters are analyzed in detail from the point of view of descriptive statistics. To visualize the differences in elastic characteristics, “box and whiskers” diagrams and a diagram with areas are used. Knowledge of the elastic constants of the TiNi crystal lattice and alloys based on it made it possible to calculate the values of macroscopic elastic modules E and G , the Poisson's ratio μ and their orientation dependence. Based on the data analysis, it is concluded that the low level of elastic properties of TiNi (nitinol) based alloys can be used, for example, in the development of bionic prostheses for medicine.

Key words: *biocompatible superelastic shape memory alloys, TiNi, elastic constants, Poisson's ratio, auxetics.*

ФОТОХРОМНЫЕ ЛИГАНДЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ И КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Беликов Н.Е.¹, Демина О.В.¹, Левина И.И.¹, Лукин А.Ю.², Сафинова А.Я.²,
Петровская Л.Е.³, Варфоломеев С.Д.¹, Ходонов А.А.¹

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

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

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

Поступила в редакцию 21.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0492

Аннотация. В настоящей работе рассмотрены проведенные авторами исследования, направленные на разработку новых гибридных структур и способов получения семейства фотохромных меток, способных к фотоуправляемому взаимодействию с неорганическими компонентами, а также результаты изучения их фотохромного поведения и селективности процессов комплексообразования. В работе особое внимание посвящено выбору нужного состава и строения молекул меток и реализации на практике лабораторной технологии синтеза набора целевых соединений с заданными оптическими параметрами. Полученные данные открывают перспективы для использования нового поколения фотохромов, на основе функционализированных спиропиранов, в качестве новых гибридных материалов для создания на их базе: детекторов металлов, компонентов фотохромных систем и прототипов smart-устройств молекулярной электроники.

Ключевые слова: фотохромные метки, спиропираны, квантовые точки, катионы металлов, комплексообразование

ВВЕДЕНИЕ

При создании молекул фотохромных меток с заданными спектральными и фотохимическими параметрами на основе фотохромов ряда спиропирана необходимо наличие электроноакцепторного заместителя по 6-положению, чаще всего нитро-группы, при сохранении места введения молекулярного адреса по 5'-положению молекулы [1-6]. В последние годы, с использованием современных синтетических методов, были широко развернуты исследования по поиску эффективных вариантов введения заместителей различной природы по индолениновому фрагменту молекулы спиропирана с целью получения новых структур фотохромов, содержащих молекулярные адреса различной природы и назначения. Оптическими свойствами таких гибридных систем можно обратимо управлять, воздействуя на них светом с контролируемой длиной волны и / или дополнительными стимулами.

Цель настоящей работы состояла: 1) в дизайне целевых структур молекул, 2) в разработке способов получения новых гибридных фотохромных меток **SP 1 – SP 4**, 3) в изучении их фотохромного поведения и процесса комплексообразования с неорганическими компонентами.

Хорошо известно, что в молекулах спиропиранов при освещении светом с длиной волны $\leq 300 - 350$ нм происходит раскрытие пиранового цикла с образованием окрашенной мероцианиновой формы (B). Данный процесс обратим: обратный переход в спироформу (A) происходит или путем самопроизвольной циклизации в темноте, или при освещении мероцианиновой формы видимым светом.

В химии производных спиропиранов нами ранее был разработан оригинальный путь введения заместителей разнообразного строения при помощи селективного формилирования по Даффу с последующей модификации

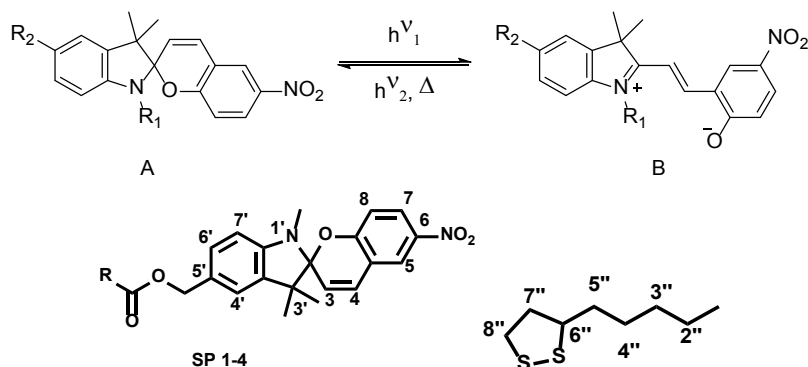


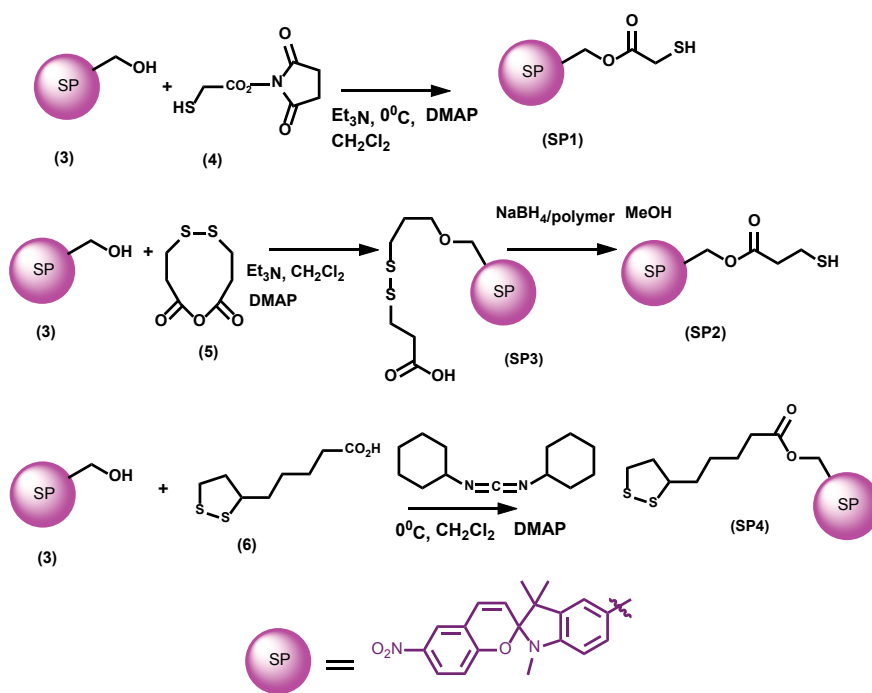
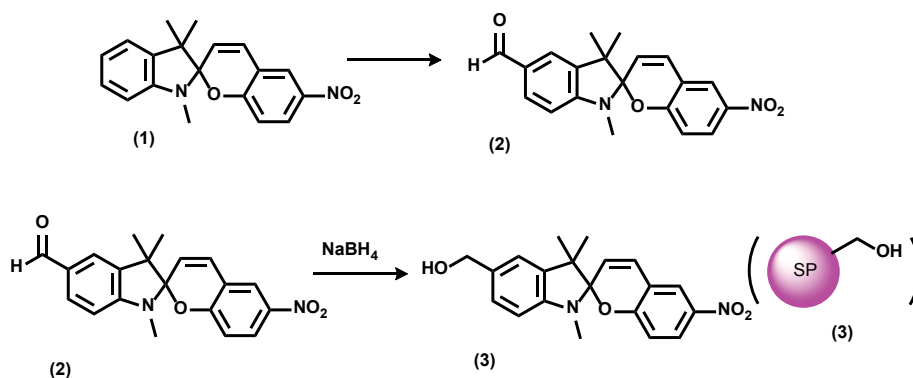
Рисунок 1. Структуры целевых фотохромных лигандов **SP 1 – SP 4**, где $R = HS-(CH_2)_n-$; $n = 1$ (**SP 1**), $n = 2$ (**SP 2**), $HOOC(CH_2)_2SS(CH_2)_2-$ (**SP 3**); (**SP 4**).

формильной функции в 5-м положении молекулы. Исходное соединение 6-нитроспиропиран (рис. 2, 1), было селективно формилировано по C5'-положению индолинового фрагмента в условиях реакции Даффа при помощи запатентованного нами ранее метода (рис. 2), [7,8], давая первый ключевой промежуточный продукт - 6-нитро-5'-формилспиропиран (рис. 2, 2), с выходом 86%. Этот высокоэффективный оригинальный вариант одностадийной прямой модификации молекулы фотохрома выгодно отличался от уже известных ранее реакций электрофильного замещения в ряду производных спиропиранов, проходящих по 5'-му положению индолинового фрагмента. Второй ключевой интермедиат - 5'-гидроксиметил-6-нитроспиропиран (рис. 2, 3) был получен с выходом 46% по ранее разработанному нами методу восстановления 6-нитро-5'-формилспиропирана (рис. 2, 2) боргидридом натрия (рис. 2) [9,10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами были исследованы несколько вариантов введения по 5'-положению молекулы фотохрома фрагментов разной длины и полярности, содержащих терминальную меркаптогруппу, которая проявляет ионофорные или хелатофорные свойства по отношению к целому ряду неорганических мишеней: катионов металлов и/или квантовых точек.

Ранее нами уже были описаны производные 6-нитро-замещенных спиробензопиранов, содержащие молекулярные адреса, присоединенные по 5' положению индолиновой части молекулы фотохрома и пути их получения. Эти производные содержали: 1) фрагменты пропеновой кислоты и ее N-2-меркаптоэтиламида [2] для модификации квантовых точек; 2) реакционно-способные спейсеры с терминальной тройной связью, предназначенные для модификации компонентов и фрагментов нуклеиновых кислот по реакции



Соногаширы [9] 5'-малеинимидные фрагменты, предназначенные для модификации белков, содержащих остатки цистеина [10].

Для получения необходимых производных фотохромов ряда спиропирана (**SP 1 – SP 4**) нами был разработан ряд методов, представленных на рисунках 2, 3.

Ранее были описаны гибридные фотоактивные системы, представляющие собой комплексы катионов металлов или наносистемы на основе квантовых точек с фотохромными лигандами, с терминальной якорной серу-содержащей группой, расположенной в разных положениях молекулы фотохрома в качестве ионофорного фрагмента молекулы. Например, описана фотохромная система на основе квантовых точек QD CdSe–ZnS и CdS и фотохромного лиганда 2-[3',3'-диметил-6-нитроспиро(2H-1-бензопиран-2,2'-индолин)-1'-ил]этилового эфира 5-(1,2-дителиолан-3-ил)пентановой кислоты, в которой бидентантный серу-содержащий фрагмент этилового эфира 5-(1,2-дителиолан-3-ил)пентаноата был введен в положение N1 индолинового фрагмента молекулы спиропирана [11,12]. Топография подобных фотоактивных систем на основе спиропирановых лигандов, содержащих спейсеры с терминальными серу-содержащими группами по положению N1, имеет пространственные ограничения, допускающие реализацию лишь перпендикулярной взаимной ориентации фрагментов молекулярного адреса и 6-нитро группы, как в спиро- (A), так и в фотоиндуцированной мероцианиновой формах (B) фотохрома, что отрицательно сказывается на квантовом выходе реакции раскрытия пиранового цикла и времени жизни фотоиндуцированной мероцианиновой формы (B). Также подходы к их получению требуют применения сложных и многостадийных методов формирования молекулы целевых спиропиранов.

В данной работе в качестве терминальных реакционноспособных групп нами были предложены монодентантные серу-содержащие лиганды - остатки тиогликолевой и 3-меркаптопропионовой кислот и бидентантный серу-содержащий фрагмент 5-(1,2-дителиолан-3-ил)пентаноата (липоевой кислоты 6), которые вводили в положение C5'-индолиновой части молекулы фотохрома через образование сложно-эфирной связи с гидроксильной функцией спирта (3). Выбор указанного набора серу-содержащих лигандов был необходим для последующей модификации неорганических мишеней с целью получения на их основе гибридных фотоактивных систем, представляющих собой комплексы фотохрома с катионами металлов или наносистемы на основе конъюгатов квантовых точек с фотохромными лигандами.

Ацилирование спирта (3) проводили с помощью классической стратегии – активацией карбоксильной функции серу содержащего лиганда под действием ангидридов, активированных эфиров или конденсирующих агентов (DCCD) в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридина. Необходимый реагент для проведения процесса ацилирования спирта (3) – ангидрид 3,3'-дителио-3,3'-дипропионовой кислоты (5) был получен с выходом 65%, как было описано в работе [13].

Целевые фотохромы (**SP 1-4**) были получены с выходами от 43% до 72%, в препаративных количествах, структура всех соединений была охарактеризована набором современных физико-химических методов анализа.

Методы синтеза гибридных фотоактивных систем на основе производных спиропиранов **SP 1 – SP 4** были нами запатентованы [14].

Определенные по стандартным методикам при 25 °С спектрально-абсорбционные и спектрально-флуоресцентные характеристики спиро- (A) и мероцианиновых форм (B) производных спиропиранов **SP 1 – SP 4** приведены в таблице 1, и на рисунках. 4-6.

В спектрах поглощения фотоиндуцированных окрашенных мероцианиновых форм (B) всех соединений **SP 1–4** наблюдается явление сольватохромизма. В качестве примера на рисунке 2 показаны спектры поглощения растворов соединения **SP 4** в этаноле, толуоле, ТГФ и хлороформе до УФ облучения (спиро-формы – кривые 1, 3, 5 и 7 соответственно) и после УФ облучения (мероцианиновые формы – кривые 2, 4, 6, 8 соответственно). Спектр поглощения фотоиндуцированных мероцианиновых форм соединения **SP 4** в толуоле содержит полосу с характерным максимумом 606 нм и плечом в области 580 нм. В полярном этаноле (кривая 2) спектр фотоиндуцированной мероцианиновой формы соединения **SP 4** характеризуется единственной полосой поглощения $\lambda_B = 541$ нм, которая смещена в коротковолновую область относительно соответствующей полосы в толуольном растворе $\lambda_B = 606$ нм (кривая 4). Максимумы λ_A в спектрах поглощения спиро-форм (A) соединений **SP 1–4** расположены в интервале 330–342 нм и мало зависят от природы растворителя. Все соединения характеризуются высокими значениями эффективности фотоокрашивания $\Delta D_B^{\text{фот}}$ в диапазоне 0,82 – 5,3.

Далее нами был исследован процесс комплексообразования производных спиропиранов **SP 1 – SP 4** с неорганическими компонентами: 1) катионами металлов и 2) квантовыми точками QD CdSe.

Комплексы фотохромных лигандов **SP 1 – SP 4** с катионами металлов получали в этаноле добавлением от 1 до 100 экв. нитратов одно-, двух- и трехвалентных металлов, как описано в экспериментальной части. Об образовании комплекса свидетельствовал гипсохромный сдвиг основной полосы поглощения фотоиндуцированной мероцианиновой формы $\Delta\lambda_B = \lambda_{B(\text{свободный лиганд})} - \lambda_{B(\text{комплекс})}$. Наиболее значительные величины $\Delta\lambda_B$ наблюдали для комплексов с трехвалентными катионами металлов. Все полученные соединения **SP 1–4** образовывали фотоуправляемые системы с катионами металлов с определенной селективностью. Совпадение максимумов полос поглощения фотоиндуцированной мероцианиновой формы с максимумом этой формы в растворе, содержащем ионы металла, свидетельствует об отсутствии в растворе комплексов с этим катионом.

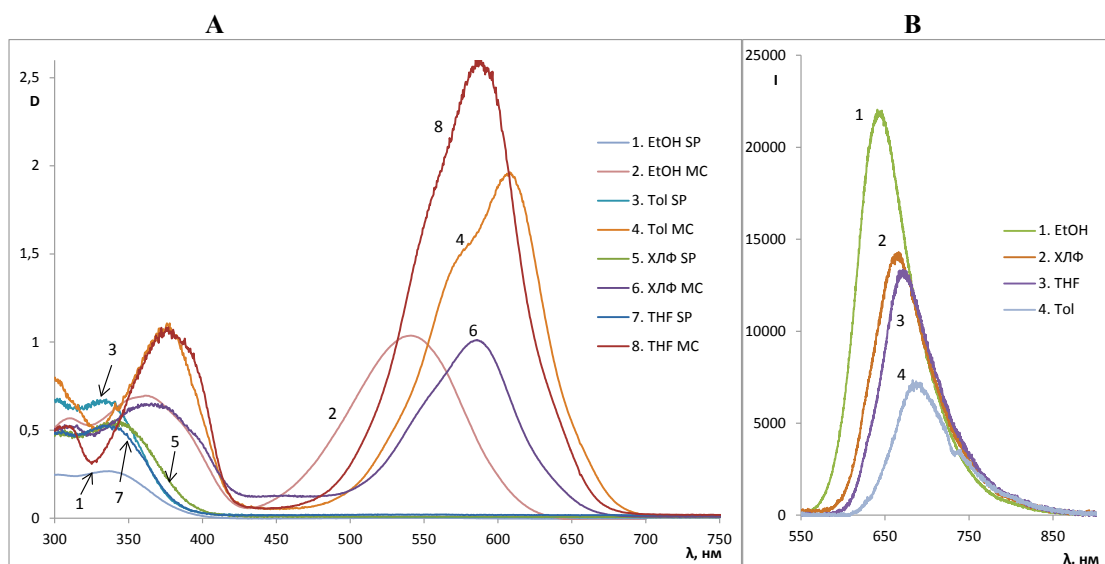


Рисунок 4. А – Спектры поглощения растворов спиро- и мероцианиновой форм **SP 4** в этаноле, толуоле, ТГФ и хлороформе (слева); В – спектры флуоресценции растворов мероцианиновой формы **SP 4** в тех же растворителях (справа). ($C 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$ моль/л).

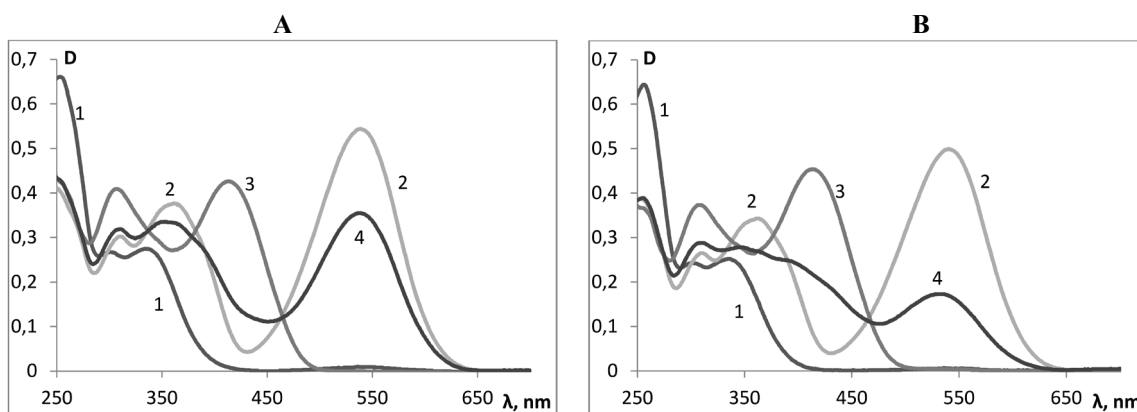


Рисунок 5. А – Спектры поглощения растворов в этаноле спиропирана **SP 3**: спиро-формы (кр. 1), мероцианиновой формы (кр. 2), комплекса мероцианиновой формы с $Al(NO_3)_3$ (кр. 3), комплекса мероцианиновой формы с $La(NO_3)_3$ (кр. 4); В – Спектры поглощения растворов в этаноле спиропирана **SP 4**: спиро-формы (кр. 1), мероцианиновой формы (кр. 2), комплекса мероцианиновой формы с $Al(NO_3)_3$ (кр. 3), комплекса мероцианиновой формы с $La(NO_3)_3$ (кр. 4).

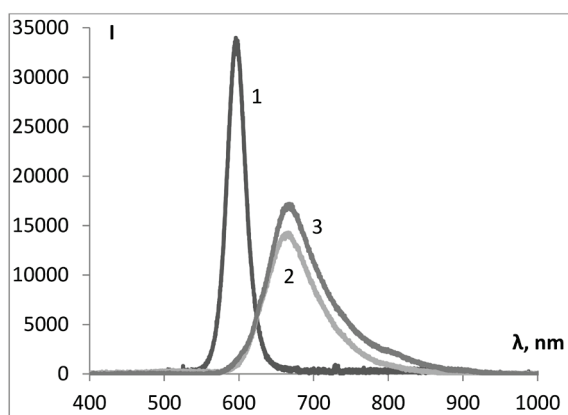
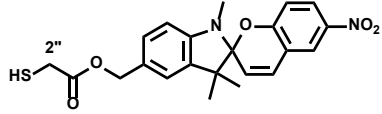
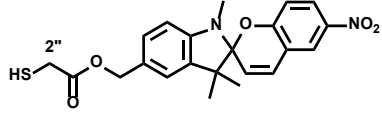
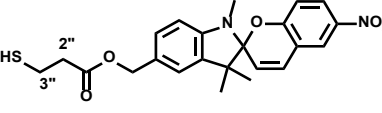
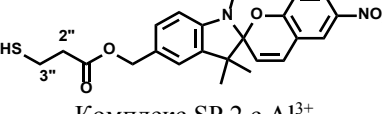
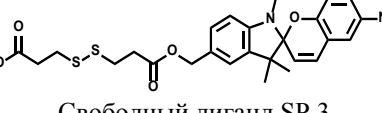
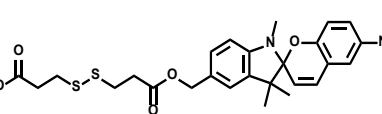
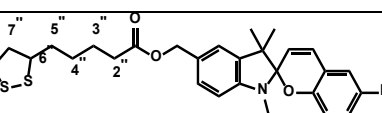
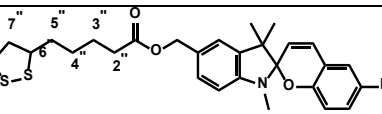


Рисунок 6. Спектры флуоресценции в хлороформе раствора препарата QD CdSe (3,7 нм, кр. 1), раствора мероцианиновой формы спиропирана **SP 4** (кр. 2) и конъюгата **SP 4** с QD CdSe (кр. 3).

Таблица 1. Спектральные характеристики производных спиропиранов **SP 1 – 4** и их комплексов с квантовыми точками и катионами металлов

Структура	Растворитель	λ_A , нм	λ_B , нм	$\Delta D_V^{\text{фот}}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм
 Свободный лиганд SP 1	Этанол	303 330 пл 390пл	295 340пл 390пл, 538	0,82	635
 Комплекс SP 1 с Al^{3+}	Этанол	303 330 пл 390пл	296 330пл 409	0,73	
 Свободный лиганд SP 2	Этанол	256 303 335 пл	256, 307, 346, 390пл, 538	0,93	638
 Комплекс SP 2 с Al^{3+}	Этанол	302, 335	308, 414	1,23	
 Свободный лиганд SP 3	Этанол	302, 335	362, 540	1,78	640
 Комплекс SP 3 с Al^{3+} Комплекс SP 3 с La^{3+}	Этанол	302, 335 302, 335	308, 414 308, 347 , 530	1,91 1,07	~540пл, 640 630
 Свободный лиганд SP 4	Этанол	336	541	1,95	642
	Толуол	334	580пл, 606	3,63	686
	$CHCl_3$	342	587	0,95	663
	ТГФ	336	586	5,30	672
 Комплекс SP 4 с Al^{3+} Комплекс SP 4 с La^{3+} Комплекс SP 4 с QD CdSe	Этанол	301, 336	307, 414	1,59	~540пл, 640
	Этанол	301, 336	310, 350 , 538	0,94	640
	$CHCl_3$				598→670
Препарат QD CdSe 3,7 нм	$CHCl_3$	585			598

λ_A , λ_B – максимумы полос в спектрах поглощения соответственно спиро-формы (А) и фотоиндуцированной мероцианиновой формы (В) производных спиропирана;

$\lambda_{\text{фл}}$ – максимумы полос в спектрах флуоресценции.

$\Delta D_V^{\text{фот}}$ – эффективность фотоокрашивания определяют как максимальное фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы В в состоянии фоторавновесия при одинаковой величине оптической плотности ($D \approx 0,8$) в максимуме полосы поглощения исходной формы А. QD - квантовые точки.

Обнаружено, что изменения максимума полосы поглощения при $\lambda_B = 530\text{--}540$ нм мероцианиновой формы спиропирановых лигандов при взаимодействии с нитратами лития, натрия, калия, магния, кальция, бария, кобальта, никеля не превышают 3–5 нм и не представляют практического интереса. В качестве примеров в

таблице 1 и на рисунке 5А, 5В приведены спектральные характеристики фотоактивных комплексов, включающих лиганды **SP 1–4** с ионами Al^{3+} и La^{3+} .

Хорошо известно, что квантовые точки (QD) являются превосходными FRET-донорами благодаря своему высокому квантовому выходу флуоресценции [2,15-17]. Соединения **SP 1–4** при помощи спейсера с меркаптогруппой могут ковалентно связываться с поверхностью нанокристалла QD CdSe, спектр флуоресценции, которых перекрывается со спектром поглощения мероцианиновой формы спиропирана.

Возможность применения производных спиропиранов с серусодержащими терминальными группами в качестве фотоактивных лигандов для образования гибридных структур с QD была успешно продемонстрирована на следующем примере, в котором в качестве фотохромного лиганда был взят **SP 4**. Вначале были исследованы оптические характеристики препарата QD CdSe с диаметром 3,7 нм. Квантовые точки CdSe диаметром 3,7 нм в растворе хлороформа поглощали в видимой области, с максимумом поглощения 585 нм. Флуоресценцию нанокристаллов CdSe возбуждали при облучении их раствора УФ светом ксеноновой лампы LC-8 фирмы "Hamamatsu" через светофильтр УФС-2 (280-350 нм). Максимум флуоресценции раствора препарата QD CdSe (3,7 нм) в хлороформе приходился на 598 нм, ширина полосы на полувысоте пика составила 30 нм (рис. 6). Было обнаружено, что модификация поверхности QD CdSe фотохромными метками (**SP 1–4**) вызывает тушение их собственной флуоресценции QD (при 598 нм) и индукцию флуоресценции мероцианиновой формы спиропиранового фрагмента лиганда (при 670 нм) при освещении образца в этих условиях. Когда спиропиран находится в спиро-форме, CdSe интенсивно флуоресцирует при 598 нм. При переходе спиропиранового лиганда в фотоиндуцированную окрашенную мероцианиновую форму под действием УФ-облучения исходная флуоресценция нанокристалла CdSe гасится за счет явления FRET. В этих гибридных системах спиро-форма спиропиранового фрагмента лиганда может быть превращена в мероцианиновую форму при облучении светом с длиной волны 300-350 нм (λ_1), причем оптимальная длина волны – это 342 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ спиро-формы **SP 4**). Наоборот, видимый свет с длиной волны больше, чем 520 нм (λ_2) вызывает обратный переход мероцианиновой формы в спиро-форму, причем оптимальная длина волны составляет 587 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ мероцианиновой формы **SP 4**). В то же время, возбуждение флуоресценции нанокристаллов QD CdSe можно проводить, выбрав длину волны в диапазоне от 420 до 470 нм (λ_{ex}), то есть флуоресценцию QD CdSe можно индуцировать без одновременного запуска перехода мероцианиновой формы в спиро-форму или наоборот.

Таким образом, за счет явления резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) происходит тушение флуоресценции QD, обусловленное переносом энергии от QD к мероцианиновой форме фотохромного лиганда. При переходе спиропирана из мероцианиновой формы в спиро-форму, резонансный перенос энергии (FRET) не наблюдается, так как спектр поглощения спиро-формы не перекрывается со спектром флуоресценции нанокристаллов CdSe. В этом случае тушение флуоресценции QD CdSe не наблюдается. Также было показано, что данный процесс может быть реализован в управляемом циклическом режиме с достаточно большим количеством повторений цикла – индукция - гашение флуоресценции образца. Полученные нами результаты показали, что гибридную конструкцию типа “QD CdSe / спиропиран” можно использовать для изучения резонансного переноса энергии флуоресценции, а направленное изменение спектральных свойств спиропирана в процессе фотохромного цикла позволяет управлять флуоресценцией всей системы.

Результаты спектрально-кинетических исследований (**SP 1–4**) показали, что полученные гибридные конструкции “QD CdSe / спиропиран” позволяют обратимо управлять флуоресценцией нанокристаллов CdSe посредством обратимой модуляции абсорбционных свойств фотохромного лиганда, с возможностью использования этого типа гибридных материалов как прототипов smart-устройств в нанофотонике, в частности в качестве молекулярных оптических переключателей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ЯМР-спектры растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре Bruker Avance III-500 (Германия): 1H -ЯМР-спектры с рабочей частотой 500 МГц, ^{13}C -ЯМР-спектры с рабочей частотой 126 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта: дейтерохлороформа (δ (1H -ЯМР) – 7,25 м.д. и (^{13}C -ЯМР) – 77,2 м.д.).

[6-Нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолин]-5'-ил]метилловый эфир 2-меркаптоуксусной кислоты (**SP 1**) (рис. 1)

К охлажденному до -5 °С раствору 300 мг (1,59 ммоль) N-гидроксисукцинимидного эфира тиогликолевой кислоты (4) и 352 мг (1 ммоль) 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолина] (3) в 30 мл абсолютного дихлорометана при перемешивании в атмосфере аргона добавляли 0,44 мл (3,18 ммоль) триэтиламина и затем - 20 мг (0,159 ммоль) 4-(диметиламино)пиридина (DMAP). Реакционную смесь оставляли при перемешивании при 20 °С в течение 3 дней, затем добавляли 100 мл дихлорометана, промывали 1M раствором соляной кислоты до pH 4-5, водой до pH 7, органический экстракт сушили над сульфатом натрия и затем растворитель удаляли. Для выделения целевого продукта использовали флеш-хроматографию на силикагеле, элюент - смесь дихлорометана с 95% этанолом с градиентом последнего от 0% до 40%.

Выход продукта реакции **SP 1** 218 мг (51%), в виде масла, R_f 0,58, система петролейный эфир (т. кип. 40-70 °С) - этилацетат 8:2, по объему, пластинка "Kieselgel 60F₂₅₄", детекция пятен воздействием на проявленную пластинку УФ-света.

Спектр ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,18 (3H, с, 3'a- CH_3), 1,28 (3H, с, 3'b- CH_3), 2,71 (2H, т, J 7,1, 2''- CH_2CO), 2,72 (3H, с, 1'- CH_3), 5,01 (2H, с, 5'- CH_2), 5,84 (1H, д, J 10,4, 3-H), 6,51 (1H, д, J 7,8, 7'-H), 6,76 (1H, д, J 8,6, 8-H), 6,92 (1H, д, J 10,4, 4-H), 7,11 (1H, с, 4'-H), 7,18 (1H, д, J 7,8, 6'-H), 7,99 (1H, д, J 2,4, 5-H), 8,01 (1H, дд, J 8,8/2,8, 7-H).

Масс-спектр $[m/z]$: 426,1 (M^+).

Найдено (%): C 62,05; H 5,29; N 6,52. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$. Вычислено (%): C, 61,96; H, 5,20; N, 6,57.

6-Карбокси-1-{6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[(2H-1-бензопиран-2,2'-индолин)-5'-ил]метоксикарбонил} - 3,4-дитиагексан (**SP 3**) (Схема 2)

К раствору, содержащему 218 мг (1,13 ммоль) ангидрида 3,3'-дитио-3,3'-дипропионовой кислоты (5), 200 мг (0,568 ммоль) 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолина] (3) и 7 мг (0,057 ммоль) 4-(диметиламино)пиридина (DMAP) в 30 мл абсолютного дихлорометана, при перемешивании в атмосфере аргона по каплям добавляли раствор 0,16 мл (1,13 ммоль) триэтиламина в 2 мл абсолютного дихлорометана и перемешивали при 20 °С в течение 48 ч, затем реакционную массу промывали 3% раствором соляной кислоты до pH 4-5, водой до pH 7, органический слой сушили над сульфатом натрия и растворитель удаляли. Целевой продукт **SP 3** выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле, элюент - смесь петролейного эфира (т. кип. 40-70 °С) с этилацетатом с градиентом последнего от 0% до 100%.

Выход продукта реакции 133 мг (43%) в виде масла, R_f 0,28, система – петролейный эфир (т. кип. 40-70 °С) - этилацетат 4:6 по объему, пластинка "Kieselgel 60F₂₅₄", детекция пятен воздействием на проявленную пластинку УФ-света.

Спектры ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,18 (3H, с, 3'a- CH_3), 1,29 (3H, с, 3'b- CH_3), 2,74 (3H, с, 1'- CH_3), 2,77 (4H, тд, J 7,1/2,6, 2'',2'''- CH_2CO), 2,90 (2H, т, J 7,1, 2''- CH_2), 2,95 (2H, т, J 7,1, 3''- CH_2), 5,09 (2H, с, 5'- CH_2), 5,84 (1H, д, J 10,3, 3-H), 6,51 (1H, д, J 7,9, 7'-H), 6,76 (1H, д, J 8,6, 8-H), 6,92 (1H, д, J 10,3, 4-H), 7,08 (1H, д, J 1,4, 4'-H), 7,20 (1H, дд, J 7,9/1,5, 6'-H), 7,99 (1H, д, J 2,4, 5-H), 8,01 (1H, дд, J 8,8/2,7, 7-H).

[6-Нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолин]-5'-ил]метилловый эфир 3-меркаптопропионовой кислоты (**SP 2**) (рис. 3)

133 мг (0,024 ммоль) 6-карбокси-1-{6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[(2H-1-бензопиран- 2,2'-индолин)-5'-ил]метоксикарбонил}-3,4-дитиагексана **SP 3** растворяли в 10 мл этанола, добавляли 12 мг борогидрида на полимерной подложке (Amberlite A-26 ВН₄⁻ форма, Fluka) и встряхивали на шейкере IKA Vortex Genius-3 4 ч, после чего восстановитель отделяли декантированием, промывали 5 мл этанола, этанол упаривали. Целевой продукт **SP 2** выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле, элюент - смесь петролейного эфира (т. кип. 40-70 °С) с этилацетатом с градиентом последнего от 0% до 100%.

Выход продукта реакции 76 мг (71%), в виде масла, R_f 0,87, система петролейный эфир (т. кип. 40-70 °С) - этилацетат 4:6 по объему, пластинка "Kieselgel 60F₂₅₄", детекция пятен воздействием на проявленную пластинку УФ-света.

Спектр ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,18 (3H, с, 3'a- CH_3), 1,29 (3H, с, 3'b- CH_3), 2,72 (3H, с, 1'- CH_3), 2,81 (2H, т, J 7,1, 2''- CH_2CO), 3,77 (2H, т, J 6,0, 3''- CH_2), 4,64 (2H, с, 5'- CH_2), 5,85 (1H, д, J 10,3, 3-H), 6,52 (1H, д, J 7,9, 7'-H), 6,75 (1H, д, J 8,7, 8-H), 6,92 (1H, д, J 10,3, 4-H), 7,12 (1H, д, J 1,3, 4'-H), 7,19 (1H, дд, J 7,9/1,5, 6'-H), 7,99 (1H, д, J 2,6, 5-H), 8,01 (1H, дд, J 8,8/2,6, 7-H).

Масс-спектр $[m/z]$: 440,5 (M^+).

Найдено (%): C 62,65; H 5,43; N 6,42. $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$. Вычислено (%): C, 62,71; H, 5,49; N, 6,36.

[6-Нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолин]-5'-ил]метилловый эфир 5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентановой кислоты (**SP 4**) (рис. 3)

К охлажденному до -5°C раствору 29 мг (0,142 ммоль) 5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентановой кислоты (6) в 30 мл абсолютного дихлорометана при перемешивании в атмосфере аргона по каплям добавляли раствор 40 мг (0,185 ммоль) N,N-дициклогексилкарбодиимида в 5 мл абсолютного дихлорометана и перемешивали в течение 30 мин, после чего добавляли раствор 50 мг (0,142 ммоль) 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро [2H-1-бензопиран-2,2'-индолина] (3) и 23 мг (0,170 ммоль) 4-(диметиламино)пиридина (DMAP) в 10 мл абсолютного дихлорометана. Через 6 ч перемешивания выпавший осадок N, N-дициклогексилмочевины отделяли фильтрованием, фильтрат промывали 3% раствором соляной кислоты до pH 4-5, водой до pH 7, органический слой сушили над сульфатом натрия и затем растворитель удаляли. Целевой продукт **SP 4** выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле, элюент – смесь петролейного эфира (т. кип. 40-70 °С) с этилацетатом с градиентом последнего от 0% до 100%.

Выход продукта реакции 55 мг (72%), в виде масла, R_f 0,60, система петролейный эфир (т. кип. 40-70 °С) – этилацетат 2:1, по объему, пластинка "Kieselgel 60F₂₅₄", детекция пятен воздействием на проявленную пластинку УФ-света.

Спектр ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 1,18 (3H, с, 3'a- CH_3), 1,29 (3H, с, 3'b- CH_3), 1,48 (2H, м, 4''- CH_2), 1,68 (4H, м, 3''- и 5''- CH_2), 1,88 (1H, тд, J 13,8/6,9, 7''- CH_2), 2,36 (2H, т, J 7,4, 2''- CH_2), 2,44 (1H, тд, J 12,1/5,8, 7''- CH_2), 2,73 (3H, с, 1'- CH_3), 3,10 (1H, дт, J 11,1/7,0, 8''- CH_2), 3,16 (1H, дд, J 12,3/7,0/5,6, 8''- CH_2), 3,55 (1H, м, 6''-CH), 5,06 (2H, с, 5'- CH_2), 5,84 (1H, д, J 10,4, 3-H), 6,52 (1H, д, J 7,9, 7'-H), 6,76 (1H, д, J 8,8, 8-H), 6,92 (1H, д, J 10,4, 4-H), 7,07 (1H, с, 4'-H), 7,20 (1H, д, J 7,9, 6'-H), 7,99 (1H, д, J 2,6, 5-H), 8,01 (1H, дд, J 8,8/2,7, 7-H).

Спектр ^{13}C ЯМР (126 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 20,1 / 26,1 (3'- CH_3), 24,9 (3''- CH_2), 28,9 (1'- CH_3), 29,1 (4''- CH_2), 34,4 (2'- CH_2), 34,8 (5''- CH_2), 38,7 (8''- CH_2), 40,4 (7''- CH_2), 52,4 (3'-C), 56,5 (6''-CH), 66,9 (5'- CH_2), 106,6 (2-C), 107,0 (7'-

C), 115,7 (8-C), 118,8 (4a-C), 121,6 (3-C), 122,7 (4'-C), 122,9 (5-C), 126,1 (7-C), 127,4 (5'-C), 128,6 (4-C), 129,2 (6'-C), 136,8 (3'a-C), 141,2 (6-C), 148,1 (7a'-C), 159,8 (8a-C), 173,7 (1''-C).

Масс-спектр $[m/z]$: 540,2 (M^+).

Найдено (%): C 62,25; H 6,03; N 5,12. $C_{28}H_{32}N_2O_5S_2$. Вычислено (%): C, 62,20; H, 5,97; N, 5,18.

Электронные спектры поглощения растворов полученных соединений регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu 1240PC" (Япония) с приставкой для термостатирования образцов. Фотоиндуцированные формы полученных соединений получали облучением светом ксеноновой лампы Hamamatsu модель Lightingcure – LC8 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2. Спектры поглощения фотоиндуцированных форм регистрировали при помощи системы модульных оптоволоконных спектрофотометров фирмы Ocean Optics (США): электронные спектры поглощения получали на спектрофотометре модель HR-2000+, а спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре модель USB4000-FL. Спектрально-абсорбционные и спектрально-флуоресцентные характеристики при 25 °С спиро- (А) и мероцианиновых форм (В) целевых соединений приведены в таблице 1 и на рисунках 4 – 6.

Получение комплексов катионов металлов со спиропирановыми лигандами SP 1-4. Комплексы фотохромных лигандов с катионами металлов получали добавлением от 1 до 100 эквивалентов нитратов одно-, двух- и трехвалентных металлов к раствору 1 эквивалента лиганда в этаноле и последующей засветкой образца светом ксеноновой лампы фирмы Hamamatsu модель Lightingcure – LC8 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2. Процесс контролировали регистрацией спектров поглощения в диапазоне длин волн 350 – 700 нм.

Образцы фотохромных лигандов растворяли в этаноле ($C=10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$ моль/л), измеряли спектры поглощения растворов, определяли максимумы полос поглощения. Затем растворы облучали УФ светом ксеноновой лампы LC-8 фирмы "Hamamatsu" через светофильтр УФС-2, и повторно измеряли спектры поглощения растворов и определяли максимумы полос поглощения в видимой области спектра.

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

Получение конъюгатов QD CdSe с фотохромными лигандами. Препарат квантовых точек QD CdSe 3,7 нм был приготовлен, как описано в работе [18]. Конъюгаты QD CdSe с фотохромными лигандами получали смешиванием растворов компонентов в хлороформе в соотношении молярных концентраций QD CdSe: SP = 1:100. Смесь перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение 2 ч.

В таблице 1 сопоставлены спектральные характеристики гибридных комплексов (конъюгатов), включающих квантовые точки QD CdSe и лиганд SP 4, со спектральными характеристиками исходных компонентов.

Флуоресценцию нанокристаллов CdSe возбуждали облучением их раствора в хлороформе светом ксеноновой лампы фирмы Hamamatsu модель Lightingcure – LC8 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2 (280-350 нм). На рисунке 6 в качестве примера сопоставлены спектры флуоресценции в хлороформе: препарата QD CdSe, 3,7 нм (кривая 1), раствора мероцианиновой формы лиганда SP 4 (кривая 2) и конъюгата SP 4–QD CdSe (кривая 3). Максимум флуоресценции раствора препарата QD CdSe в хлороформе приходится на 598 нм, ширина полосы на полувысоте 30 нм. При освещении образца в этих условиях модификация поверхности квантовых точек QD CdSe фотохромными лигандами вызывает тушение их собственной флуоресценции при $\lambda_{ФЛ}=598$ нм и индукцию флуоресценции при $\lambda_{ФЛ}=670$ нм мероцианиновой формы спиропиранового фрагмента лиганда. При переходе спиропиранового лиганда в окрашенную мероцианиновую форму под действием УФ-облучения флуоресценция исходных квантовых точек QD CdSe исчезает вследствие, по-видимому, явления резонансного переноса энергии флуоресценции. Вместо нее появляется флуоресценция мероцианиновой формы при $\lambda_{ФЛ}=670$ нм. Аналогичные процессы имеют место при использовании в качестве фотохромного лиганда любого из соединений SP 1–4. Процесс фотоуправляемого циклического переключения флуоресценции комплексов квантовых точек QD CdSe со спиропирановыми лигандами может быть проведен неоднократно простым изменением длины волны возбуждающего света с 300-350 нм на 500-530 нм и обратно.

Таким образом, нами было показано, что все новые спиробензопираны SP 1–4 обладали ярко выраженными фотохромными свойствами, поэтому в будущем запланировано исследование возможности практического применения этих соединений в качестве фотоактивных лигандов для создания новых гибридных наноструктур с квантовыми точками и катионами металлов.

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

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

Список литературы / References:

1. *Organic Photochromic and Thermochromic Compounds*. Crano J.C., Gugliemetti R.J. Eds., N.Y., London: Plenum Press., 1999, vol. 1, 2, doi: 10.1007/b114211.
2. Звездин К.В., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Демина О.В., Левин П.П., Бричкин С.Б., Спирин М.Г., Разумов В.Ф., Швеиц В.И., Ходонов А.А. Новые гибридные фотохромные материалы с

переключаемой флуоресценцией. *Российские нанотехнологии*, 2012, т. 7, № 5-6, с. 112-118. [Zvezdin K.V., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Levin P.P., Brichkin S.B., Spirin M.G., Razumov V.F., Shvets V.I., Khodonov A.A. New Hybrid Photochromic Materials with Switchable Fluorescence. *Nanotechnologies in Russia*, 2012, vol. 7, no. 5-6, pp. 308-317, doi: 10.1134/S1995078012030172. (In Russ.)]

3. Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function. *Neuromethods*, 2011, vol. 55, doi: 10.1007/978-1-61779-031-7_1.

4. Willner I., Willner B. Photoswitchable biomaterials as grounds for optobioelectronic devices. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1997, vol. 42, pp. 43-57, doi: 10.1016/S0302-4598(96)05152-5.

5. Демина О.В., Беликов Н.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Новые метки и зонды для решения задач бионанопотоники. *Химическая физика*, 2019, т. 38, № 12, с. 44-47. [Demina O.V., Belikov N.E., Melnikova I.A., Lukin A.Yu., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. New Labels and Probes for the Application in Bionanophotonics. *Russ. J. Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 6, pp. 938-941, doi: 10.1134/S1990793119060162. (In Russ.)]

6. Papazoglou E.S., Parthasarathy A. *Bionanotechnology*. Morgan&Claypool, 2007, doi: 10.2200/S00051ED1V01Y200610BME007.

7. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Швеи В.И., Демина О.В., Барачевский В.А., Ходонов А.А. 5-Формил-замещенные индолиновые спиروبензопираны и способ их получения. Патент РФ № 2358977. Опубликовано 20.06.2009, Бюл. из. № 17. [Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Khodonov A.A. 5-Formyl-substituted indoline spirobenzopyrans and method for their preparation. Patent of the Russian Federation no. 2358977. Published on 06.20.2009, Bull. no. 17. (In Russ.)]

8. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демина О.В., Швеи В.И., Ходонов А.А. Фотохромные производные 5'-винил-6-нитро-спиروبензопирана и способы их получения. Патент РФ № 2458927. Опубликовано 20.08.2012, Бюл. из. № 23. [Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Fomin M.A., Demina O.V., Shvets V.I., Khodonov A.A. Photochromic derivatives of 5'-vinyl-6-nitro-spirobenzopyran and methods for their preparation. Patent of the Russian Federation no. 2458927. Published on 20.08.2012, Bull. no. 23. (In Russ.)]

9. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Demina O.V., Khodonov A.A., Varfolomeev S.D., Shvets V.I. Ethynyl-equipped spirobenzopyrans as promising photochromic markers for nucleic acid fragments. *Mendeleev Communications*, 2013, vol. 23, no. 3, pp. 145-146, doi: 10.1016/j.mencom.2013.05.008.

10. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Demina O.V., Khodonov A.A., Shvets V.I. New maleimide spirobenzopyran derivatives as photochromic labels for macromolecules with sulfhydryl groups. *Mendeleev Communications*, 2014, vol. 24, pp. 245-246, doi: 10.1016/j.mencom.2014.06.020.

11. Tomasulo M., Yildiz I., Raymo F.M. Luminescence Modulation with Semiconductor Quantum Dots and Photochromic Ligands. *Australian J. Chem.*, 2006, vol. 59, no. 3, pp. 175-178, doi: 10.1071/CH05332.

12. Tomasulo M., Yildiz I., Raymo F.M. Nanoparticle-induced transition from positive to negative photochromism. *Inorganic Chim. Acta*, 2007, vol. 360, no. 3, pp. 938-944, doi: 10.1016/j.ica.2006.07.029.

13. Liu C., Yuan J., Luo X., Chen M., Chen Z., Zhao Y., Li X. Folate-Decorated and Reduction-Sensitive Micelles Assembled from Amphiphilic Polymer-Camptothecin Conjugates for Intracellular Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics*, 2014, vol. 11, no. 11, pp. 4258-4269, doi: 10.1021/mp500468d.

14. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Левин П.П., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Фотохромные производные 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолина]. Патент РФ № 2694904, опубликовано: 18.07.2019, Бюл. из. № 20. [Khodonov A.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Levin P.P., Varfolomeev S.D., Demina O.V. Photochromic derivatives of 5'-hydroxymethyl-6-nitro-1',3',3'-trimethylspiro[2H-1-benzopyran-2,2'-indoline]. Patent of the Russian Federation no. 2694904, published: 07.18.2019, Bull. no. 20. (In Russ.)]

15. Разумов В.Ф. Фотоника коллоидных квантовых точек. Под ред. Ключева М.Б. Иваново: Ивановский гос. ун-т, 2017, 272 с. [Razumov V.F. *Photonics of colloid quantum dots*. Klyuev M.B. Ed. Ivanovo Ivanovo State University, 2017, 272 p. (In Russ.)]

16. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. *Российские нанотехнологии*, 2007, т. 2, № 1-2, с. 160-173. [Oleynikov V.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R. Fluorescent semiconductor nanocrystals in biology and medicine. *Nanotechnologies in Russia*, 2007, vol. 2, no. 1-2, pp. 160-173. (In Russ.)]

17. Беликов Н.Е., Демина О.В., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Складнев Д.А., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Исследование технологии селективного маркирования рекомбинантных белков-мишеней и разработка путей синтеза модифицированных квантовых точек CdTe в водных растворах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 88-96. [Belikov N.E., Demina O.V., Lukin A.Yu., Petrovskaya L.E., Skladnev D.A., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Study of the technology of the recombinant target protein selective labeling and development of the synthetic routes for the modified CdTe quantum dots synthesis in aqueous solutions. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 88-96. (In Russ.)]

18. Николенко Д.Ю., Бричкин С.Б., Разумов В.Ф. Неизотермический высокотемпературный коллоидный синтез наночастиц CdSe. *Российские нанотехнологии*, 2009, т. 4, № 11-12, с. 92-95. [Nikolenko D.Yu., Brichkin S.B., Razumov V.F. Nonisothermal High-Temperature Colloidal Synthesis of Cd Se Nanocrystals. *Nanotechnologies in Russia*, 2009, vol. 4, no. 5-6, pp. 790-794, doi: 10.1134/S1995078009110044. (In Russ.)]

PHOTOCHROMIC LIGANDS FOR MODIFICATION OF METAL CATIONS AND QUANTUM DOTS
**Belikov N.E.¹, Demina O.V.¹, Levina I.I.¹, Lukin A.Yu.², Safinova A.Ya.², Petrovskaya L.E.³, Varfolomeev S.D.¹,
Khodonov A.A.¹**

¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS
Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia

²MIREA – Russian Technological University
Vernadsky ave., 78, Moscow, 119454, Russia

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS
Miklukho-Maclay str., 16/10, Moscow, 117997, Russia; e-mail: khodonov@gmail.com

Received 21.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0492

Abstract. In this paper, we consider the studies carried out by the authors aimed at developing new hybrid structures and methods for obtaining a family of photochromic labels capable of photocontrolled interaction with inorganic components, as well as the results of studying their photochromic behavior and the selectivity of complex formation processes. In this paper, special attention is devoted to the choice of the desired composition and structure of label molecules and the practical implementation of laboratory technology for the synthesis of a set of target compounds with specified optical parameters. The data obtained open up prospects for the use of a new generation of photochromes based on functionalized spiropyran as new hybrid materials for the creation on their basis: metal detectors, components of photochromic systems, and prototypes of molecular electronics smart devices.

Key words: *photochromic labels, spiropyran, quantum dots, metal cations, complex formation.*

АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ ПРИЛОЖЕНИЙ В БИОФИЗИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Ткаченко А.Л.

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: tkachenkoal@tksu.ru
Поступила в редакцию 25.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0493

Аннотация. Медицинская биофизика совершенно особенный раздел медицины, изучающий физические процессы, происходящие в организме человека, его строение и функцию в норме и патологии, методы диагностики патологических состояний. На протяжении всего развития этой науки она была теснейшим образом связана с новейшими IT разработками. Различные программные средства ежедневно используются как для обучения новых специалистов, так и для работы уже состоявшихся ученых. В процессе обучения происходит всестороннее изучение человеческого организма на различных уровнях. За столетия изучения человеческого тела накопилось огромное количество информации, ни один ученый не смог бы освоить такой объем данных даже за всю жизнь, если бы все знания не были бы систематизированы и не представлены в удобной форме. Большую роль в выполнении задачи такой обработки информации играют различные информационные технологии, специальные приложения для наглядного изучения человека.

Ключевые слова: информационные приложения, искусственный интеллект, *biodigital*, генетический алгоритм.

На протяжении всего развития этой науки она была теснейшим образом связана с новейшими IT разработками. Различные программные средства ежедневно используются как для обучения новых специалистов, так и для работы уже состоявшихся ученых [1,2]. В процессе обучения происходит всестороннее изучение человеческого организма на различных уровнях. За столетия изучения человеческого тела накопилось огромное количество информации, ни один ученый не смог бы освоить такой объем данных даже за всю жизнь, если бы все знания не были бы систематизированы и не представлены в удобной форме. Большую роль в выполнении задачи такой обработки информации играют различные информационные технологии, специальные приложения для наглядного изучения анатомии человека. Анатомия - одна из сложнейших в понимании и запоминании дисциплин, для помощи студентам и для популяризации науки было создано приложение *biodigital*. Порой при чтении книг по анатомии дается неподъемный пласт сырой, непонятной информации, а потому не представляется возможным понять, как выглядит тот или иной орган, что в свою очередь сильно осложняет обучение и тем более применение знаний на практике, при работе с живым человеком. *biodigital* решает эти проблемы, оно дает визуальное представление о строении частей тела человека и тем самым помогает использовать знания. Приложение представляет собой интерактивную 3d модель человеческого организма с подробной прорисовкой и описанием всех элементов от частей органов до связей, сосудов и лимфатических узлов. Для удобства можно выбрать отдельную область тела, интересующий орган или все тело в целом. Отдельно рассматриваются женский и мужской организм, что дает возможность выделить анатомические особенности. Модели мультимедийны, пользователь может повернуть их различными сторонами, это позволяет лучше понять расположение и форму частей организма [3,4]. Также крайне интересен со стороны микробиологии одноименный раздел в приложении. Вы сможете почти на уровне клеток рассмотреть самые сложные и интересные элементы органов такие, как нефрон, ткань печени, слои клеток сетчатки. И наконец приложение дает возможность изучения не только нормальной, но и патологической анатомии, потому любой человек сможет увидеть, как выглядят кожные заболевания, расслоение аорты или рак. Безусловно приложение способно не только облегчить освоение информации о теле человека, но и расширить кругозор людей, никак не связанных с естественными науками, что способно увеличить количество ученых.

Но не стоит забывать о второй, но не по значению, важной части - генетике. Эта наука занимается всесторонним изучением геномов различных организмов от вирусов до человека. ДНК существ нашей планеты в пересчете на компьютерное исчисление объемов информации составляет миллионы терабайт данных. Еще в 2015 году в одном из академических изданий было предсказано, что к 2025 году суммарный объем геномной информации в несколько раз превысит объем данных, который будет накоплен в астрономии и в социальных сетях. В настоящее время становится понятным, что темпы накопления генетической информации превысили все ожидания. К примеру, объем хранилища генетических данных одного только Broad Institute (США) превышает объем хранилища Facebook.

Однако проводить анализ этой библиотеки вручную даже с материалами, полученными от одного человека, проблематично. С этим помогают информационные технологии, а именно новые алгоритмы для

определения исходного положения генов. Немаловажно и то, что современным катализатором в развитии технологий обработки больших данных являются методы и технологии искусственного интеллекта [5,6]. В современных условиях извлечь из данных полезную информацию традиционными методами достаточно сложно. Потому методы и технологии искусственного интеллекта приобретают теперь стратегическое значение для обработки генетических данных и их приложений. И наконец составление генетических алгоритмов, которые симулируют процесс эволюции, позволяют формировать следующие поколения на основе скрещивания и мутаций. Все это совершенно невозможно реализовать без использования инновационных технологий.

В то же время стоит отметить, что различные информационные технологии позволяют связать обычную жизнь человека с невероятной высотой науки. Для реализации этого ежегодно создаются приложения для упрощения изучения мира и себя. Ярким примером такого приложения является GenePlaza. Оно представляет собой магазин генетических приложений, которым легко и увлекательно пользоваться. Здесь можно найти программы, которые делают все – от расчета вашей предрасположенности к депрессии до прогнозирования ваших математических способностей. Также Пользователи GenePlaza могут разрешить использование своих генетических результатов для биологических исследований. Все это позволит как продвинуть науку в изучении генома человека, так и поспособствует большей медицинской осознанности обычных людей.

Но, безусловно, стоит отметить и российские разработки. Одной из таких является компания «Генотек». Организация позволяет людям провести ДНК тест и узнать о своем происхождении, получить рекомендации по особенностям образа жизни на основе генома [7,8]. И информационные технологии играют ключевую роль в этом. Клиент совершает заказ через сайт компании, через некоторое время ему присылают почтой набор для забора материала, а после материал доставляется в лабораторию. Анализ, как уже упоминалось выше, происходит с помощью сложных программ для секвенирования ДНК. Результат получается в форме электронного файла, а консультации могут проводиться в формате видеосвязи. Работа этой компании – яркий пример применения биомедицины и генетики в сочетании с новейшими технологиями.

Другой компанией, разработки которой являются основополагающими для огромного числа ученых, в том числе и для нас в будущем, служит «SPAdes» под руководством Павла Певзнера. Компания была основана в центре алгоритмической биологии при СПбГУ в 2011 году. Сотрудники лаборатории создали универсальную платформу в виде ассемблера, на основе которой можно разрабатывать программное обеспечение для решения ряда смежных задач [9,10]. Параллельно с развитием самого ассемблера в лаборатории шла разработка различных утилит, предназначенных для решения сопутствующих задач. Например, утилита QUAST помогает ученым сравнивать и визуализировать результаты работы ассемблеров, предназначенных для разных целей. Это важно для конечных пользователей продукта при выборе программы для анализа данных. Эта невероятная разработка, плод труда большого числа инженеров и программистов, безусловно, поможет в будущем биомедикам и генетикам России и всего мира совершать новые открытия и помогать людям.

Если же говорить в целом о научной и учебной деятельности в сфере биомедицины и генетики, ни один ученый или даже студент не обходится без написания работ с упоминанием того или иного вида растения или животного. Но с этим связан ряд проблем. Во-первых, все названия видов и таксономических групп, к которым относится организм, должны указываться на достаточно сложном для полного освоения латинском языке. Это необходимо для понимания учеными, говорящими на разных языках, друг друга. Во-вторых, система названий имеет массу требований. В-третьих, на данный момент известно огромное количество видов, знать которые не под силу никому. На помощь работникам науки приходят различные электронные базы данных таксономических названий, например, GBIF (Global Biodiversity Information Facility). База содержит огромное количество описанных видов растений и животных с описанием их таксономического положения. Данная система защищает биологов от крайне унизительных ошибок в научных работах и способствует качественному учету биоразнообразия нашей планеты.

Еще одна область применения биотехнологий – создание бионических протезов. На данный момент в мире широко развиваются такие направления как кибернетика и нанотехнологии, появляются современные материалы и методы изготовления самих протезов и их деталей - все это поспособствует возникновению протезов, полностью моделирующей функциональную способность конечности человека. Такие протезы называют бионическими. Они представляют собой искусственные роботизированные модели рук или ног, которые как эстетически, так и функционально приближены к собственным рукам и ногам человека. С помощью таких протезов человек может выполнять как некую грубую, требующую силы, работу, так и мелкую, которая требует особой точности при ее выполнении. Бионика (от др.-греч. βίον «живущее») — прикладная наука о применении в технических устройствах и системах принципов организации, свойств, функций и структур живой природы, то есть форм живого в природе и их промышленных аналогах. Таким аналогами стали современные электронные протезы, способные на взаимодействие с нервными клетками человека.

Бионический протез устанавливается следующим образом: на травмированную конечность происходит установка гильзы, которая существует в единичном экземпляре, так как изготавливается для конкретного человека. Сверху гильза имеет DLC- покрытие (Diamond-Like Carbon — алмазоподобное покрытие), которое обеспечивает наилучшую биосовместимость гильзы с тканями человека. В гильзу помещены специализированные датчики — мио-датчики, который отвечает за мышечную активность. С помощью электродов они соединяются с мышцами конечности и за счет этого улавливают мышечные импульсы. Мио-датчики осуществляют передачу мышечных сигналов в микропроцессор, там происходит обработка полученной информации при помощи компьютерных алгоритмов. После обработки информации микропроцессор формирует и направляет сигнал в серводвигатели, которые и приводят в действие подвижные части бионического протеза. На данный момент бионический протез может выполнять два основных действия: «хват» и «щуп». «Хват» позволяет выполнять тяжелые работы, «щуп» соответственно предназначен для мелкой аккуратной работы.

Ряд ведущих компаний мира по производству бионических протезов: Freedom Innovation (США), Endolite (Великобритания), Ottobock (Германия), Ossur (Исландия), Steeper (Великобритания). Каждая из этих компаний вносит существенный вклад в развитие возможностей бионических протезов. Так в современные модели начали встраивать гаджеты, датчики, банковские карты, чипы и многое другое, что также позволяет существенно облегчить жизнь человеку. Стоит предположить, что в будущем бионические протезы станут более функциональными чем природные органы тела. Но на данный момент используется всего 10-20 % возможностей. Для полноценного использования бионических протезов необходимо научиться передавать осязательные чувства протеза, для этого нужно будет связать два пути передачи и обработки информации - от желания совершить движение до стимуляции соответствующего участка коры головного мозга, воспроизводящей осязательные ощущения, чтобы при прикосновении протеза к горячему предмету или при уколе, или ударе током бионический протез автоматически отдергивался. Таким образом, бионические протезы позволяют значительно улучшить качество жизни человека, перенесшего ампутацию. Современные технологии биопротезирования позволяют воссоздавать искусственные пальцы, кисть, локтевую часть, коленные шарниры, тазобедренные шарниры и плечевые шарниры, и многие другие части тела.

Подводя итог всему вышесказанному, хочется отметить, что развитие биотехнологий во многом взаимосвязано с развитием информационных технологий. Без различных программ, разработанных специально для генетиков и биологов, работа в целом невозможна. Это связано с тем, что возможности человеческого ума сильно ограничены, тогда как, если смотреть на темпы развития искусственного интеллекта, различных способов программирования, возникает ощущение, что возможности «механического ума» безграничны.

Список литературы / References:

1. Нефедов Е.И., Протопопов А.А., Хадарцев А.А., Яшин А.А. *Биофизика полей и излучений и биоинформатика*. Тула: Тульский государственный университет, 1998, 333 с. [Nefedov E.I., Protoporov A.A., Khadartsev A.A., Yashin A.A. *Biophysics of fields and radiations and bioinformatics*. Tula: Tula State University, 1998, 333 p., ISBN 5-7679-0149-X. (In Russ.)]
2. Орлов, О.Ю. Биофизика и биоинформатика. *Известия ТРТУ*, 2000, № 2 (16), с. 356-358. [Orlov O.Yu. *Biophysics and bioinformatics*. *Izvestiya TRTU*, 2000, no. 2 (16), pp. 356-358. (In Russ.)]
3. Петров Е.Г., Деркач Л.С., Коваленко Е.В. Интенсификация учебного процесса по курсу биофизика в медицинском вузе. *Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции*, 2008, т. 16, № 4, с. 51-52. [Petrov E.G., Derkach L.S., Kovalenko E.V. Intensification of the educational process in the course of biophysics at a medical university. *Collection of scientific papers based on the materials of the international scientific-practical conference*, 2008, vol. 16, no. 4, pp. 51-52. (In Russ.)]
4. Турсыматова О.И., Ибадуллаева С.Ж. Пути повышения познавательной деятельности студентов при изучении курса «биофизика». *Наука и мир*, 2019, № 4-2 (68), с. 59-60. [Tursymatova O.I., Ibadullaeva S.Zh. Ways to improve the cognitive activity of students in the study of the course "biophysics". *Science and Peace*, 2019, no. 4-2 (68), pp. 59-60. (In Russ.)]
5. Ткаченко А.Л., Лыкова О.М., Шаронов Е.И., Кузнецова В.И. Имитационное моделирование демографических показателей роста и убыли населения. *Modern Economy Success*, 2021, № 3, с. 110-116. [Tkachenko A.L., Lykova O.M., Sharonov E.I., Kuznetsova V.I. Simulation modeling of demographic growth and population decline. *Modern Economy Success*, 2021, no. 3, pp. 110-116. (In Russ.)]
6. Самойлов В.О. Разработка инновационных медицинских технологий на базе достижений квантовой биофизики. *Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета*, 2007, № 2 (50), с. 747-781. [Samoilov V.O. Development of innovative medical technologies based on the achievements of quantum biophysics. *Scientific and Technical Bulletin of St. Petersburg State Polytechnic University*, 2007, no. 2 (50), pp. 747-781. (In Russ.)]

7. Фрисман Е.Я., Жданова О.Л., Неверова Г.П. Эколого-генетические модели в популяционной биофизике. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 5, с. 949-966. [Frisman E.Ya., Zhdanova O.L., Neverova G.P. Ecological-genetic models in population biophysics. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 949-966, doi: 10.31857/S0006302920050130. (In Russ.)]

8. Tkachenko A., Lavrentev D., Denisenko M., Kuznetsova V. Development of a simulation model for the spread of COVID-19 coronavirus infection in Kaluga region. *E3S Web of Conferences*, Almaty, 20-21 of May 2021, doi: 10.1051/e3sconf/202127001003.

9. Мосалев В.И., Ткаченко А.Л. Применение методов бизнес-анализа в медицинской диагностике. *Калужский экономический вестник*, 2022, № 1, с. 60-62. [Mosalev V.I., Tkachenko A.L. Application of business analysis methods in medical diagnostics. *Kaluga Economic Bulletin*, 2022, no. 1, pp. 60-62. (In Russ.)]

10. Ткаченко А.Л., Десятков П.А. Имитационное моделирование динамики распространения ВИЧ инфекции в Калужской области. *Вызовы цифровой экономики: тренды развития в условиях последствий пандемии COVID-19: Сборник статей IV Всероссийской научно-практической конференции, приуроченной к Году науки и технологий в России*, Брянск, 25 мая 2021 года. Брянск: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Брянский государственный инженерно-технологический университет", 2021, с. 282-285. [Tkachenko A.L., Desyatkov P.A. Simulation modeling of the dynamics of the spread of HIV infection in the Kaluga region. *Challenges of the digital economy: development trends in the aftermath of the COVID-19 pandemic: Collection of articles of the IV All-Russian Scientific and Practical Conference dedicated to the Year of Science and Technology in Russia*, Bryansk, 25 May 2021. Bryansk: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bryansk State University of Engineering and Technology", 2021, pp. 282-285. (In Russ.)]

ASPECTS OF THE APPLICATION OF INFORMATION APPLICATIONS IN BIOPHYSICAL MEDICINE

Tkachenko A.L.

Kaluga State University named after K.E. Tsiolkovsky
Stepan Razin str., 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: tkachenkoal@tksu.ru

Received 25.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0493

Abstract. Medical biophysics is a very special branch of medicine that studies the physical processes occurring in the human body, its structure and function in norm and pathology, methods for diagnosing pathological conditions. Throughout the development of this science, it has been closely connected with the latest IT developments. Various software tools are used daily both for training new specialists and for the work of already established scientists. In the process of learning, a comprehensive study of the human body takes place at various levels. Over the centuries of studying the human body, a huge amount of information has accumulated, no scientist would be able to master such a volume of data even in a lifetime if all knowledge were not systematized and presented in a convenient form. Various information technologies and special applications for visual study of a person play an important role in performing the task of such information processing.

Key words: *information applications, artificial intelligence, biodigital, genetic algorithm.*

НЕЙРОЛЕПТИКИ ПОДАВЛЯЮТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹,
Симомян А.О.¹

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

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова
ул. Академика Лебедева, 6, 194044, г. Санкт-Петербург, РФ
Поступила в редакцию 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0494

Аннотация. Галоперидол (производное бутирофенона) и производные фенотиазина хлорпромазин и трифлуоперазин относятся к первому поколению типичных нейролептиков и широко используются в клинической практике для терапии шизофрении и других психических заболеваний. Известно многогранное влияние этих нейролептиков на клеточные процессы. Так, выявлено высокое сродство типичных нейролептиков к рецепторам сигма-1. Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации. Для выявления участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах, исследовали влияние лигандов рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, вызываемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM показано, что галоперидол, хлорпромазин и трифлуоперазин значительно подавляют мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетку, индуцируемые глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: нейролептики, рецепторы сигма-1, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Галоперидол (производное бутирофенона) и производные фенотиазина хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) и трифлуоперазин (ТФП, трифтазин, стелазин) относятся к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) и имеют долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний [1,2]. Известно многогранное влияние этих нейролептиков на клеточные процессы. Так, выявлено высокое сродство типичных нейролептиков к рецепторам сигма-1 [3]. Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикулума, на границе с митохондриями (МАМ – mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) [4-8]. Они могут также транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с другими рецепторами и ионными каналами; встречаются и в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции [5]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая иммунные [6,8,9]. Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты (флувоксамин, сертралин, имипрамин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противокашлевые (декстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) [10-12].

Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами в плазмалемме и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации [4,5,7,13]. В плазмалемме они взаимодействуют с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -, Na^{+} - и K^{+} -каналами, протон-активируемыми ионными каналами (ASICs), NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, μ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами) и другими белками-мишенями [4,5,7]. В мембране эндоплазматического ретикулума рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, с другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) [14] и Ca^{2+} -сенсором белком STIM1 [15]. Обнаружено, что, взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -

сигнализации в клетках: мобилизацию Ca^{2+} из депо [16] и вход Ca^{2+} из наружной среды [13,14,17]. Выявлено их участие в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетках [15,18,19].

Фармакологические аналоги окисленного глутатиона глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксиима и нуклеозида инозина) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [20-23]. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Приводит к более быстрому регрессу тяжести заболевания в более легкую форму [24]. Ранее нами было впервые показано, что дисульфидсодержащие иммуномодуляторы глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [25,26]. Для выявления участия рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксиима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах в целом, представлялось целесообразным исследовать влияние лигандов рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы, что и составило предмет настоящего исследования.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20 – 22 °С через 1 – 2 сут. после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны нами ранее [5]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [13]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [14].

Для выявления участия рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксиима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах использовали лиганды рецепторов сигма-1 - галоперидол (производное бутирофенона) [10,27,28] и два производных фенотиазина ХП [29,30] и ТФП [31,32].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных экспериментах показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксиима (рис. 1а, 3а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а, 4а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Через 20 мин после добавления агентов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 18 , до 135 ± 18 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$) для глутоксиима и 134 ± 20 нМ ($n = 6$; $P < 0,05$) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а, 2а, 3а, 4а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 223 ± 22 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$) и 202 ± 20 нМ ($n = 6$; $P < 0,05$) для глутоксиима и моликсана соответственно.

Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах.

Обнаружено, что предварительная инкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 6 мин до введения 100 мкг/мл глутоксиима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $50,3 \pm 8,4\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на $54,5 \pm 9,5\%$, $n = 7$, $P < 0,05$), индуцируемых глутоксимом (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 30 мкг/мл галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана (рис. 2б). В среднем по данным 7 экспериментов галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на 49,3 % и подавление депозависимого входа Ca^{2+} в клетку на 47,6 %, индуцируемых моликсаном. Это свидетельствует о возможном участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, в макрофагах.

Кроме того, выявлено, что добавление 50 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает значительное (на $51,4 \pm 9,0\%$, $n = 12$; $P < 0,05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 1а, 2а). Это свидетельствует о возможном участии рецепторов сигма-1 не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги, а также подтверждает полученные нами ранее данные о том, что галоперидол подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой, в перитонеальных макрофагах крысы [39].

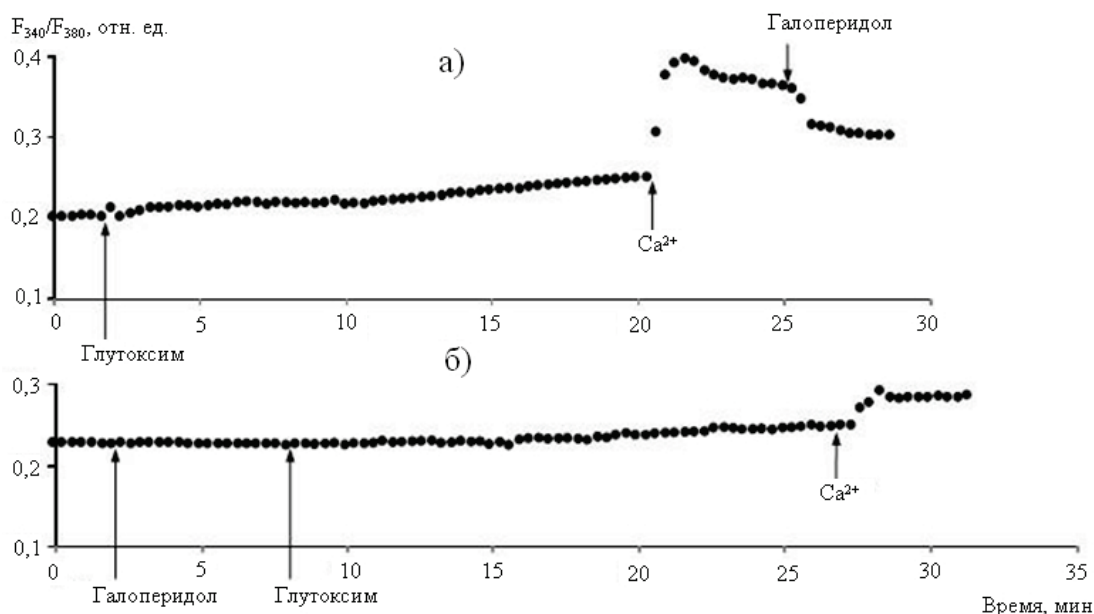


Рисунок 1. Влияние галоперидола на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом в перитонеальных макрофагах крысы. Здесь и на рис. 2-4 – по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fигу-2АМ F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время (мин). а – клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 50 мкг/мл галоперидола; б – макрофаги предварительно инкубировали в течение 6 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Здесь и на рис. 2-4 каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6-8 независимых экспериментов.

Влияние ХП и ТФП на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах.

Обнаружено, что преинкубация перитонеальных макрофагов с 25 мкг/мл ХП в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $58,5 \pm 4,6\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетки (на $59,1 \pm 6,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), индуцируемых глутоксимом (рис. 3б). Предварительная инкубация клеток с 2 мкг/мл ТФП в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима также вызывала подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (на $36,2 \pm 5,7\%$, $n = 8$; $P < 0,05$) и депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $60,7 \pm 7,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), вызываемых глутоксимом (рис. 3в). Сходные результаты были получены в экспериментах по влиянию ХП и ТФП на Ca^{2+} -ответы, вызываемые в макрофагах 100 мкг/мл моликсана (рис. 4б, 4в). Так, подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило в среднем $43,2 \pm 8,9\%$ ($n = 8$; $P < 0,05$) и $63,3 \pm 2,4\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги – $52,3 \pm 9,1\%$ ($n = 8$; $P < 0,05$) и $65,3 \pm 5,0\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$) для ХП и ТФП соответственно.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что лиганды рецепторов сигма-1 нейролептики галоперидол, ХП и ТФП подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что лиганды рецепторов сигма-1 ХП и ТФП подавляют мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [40,41]. Показано также, что ХП ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) [42], а преинкубация клеток с ТФП приводит к существенному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, в клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК-293) [43]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (вещества BD1063 и BD1047) ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [44], а BD1063 значительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в клетках аденокарциномы молочной железы человека (линия MCF7) [45].

Кроме того, известно, что галоперидол, ХП и ТФП ингибируют потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов. Так, ХП обратимо и дозозависимо блокирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L- и T-типов в клетках нейробластомы мыши (линия N1E-115) [46,47], потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы R-типа в нейронах человека [48] и Ca^{2+} -каналы L-типа в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) [49], а ТФП блокирует Ca^{2+} -каналы L-типа в гладкомышечных клетках крысы [50] и нейронах улитки *Helix aspersa* [51]. ХП и галоперидол блокируют потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в гладкомышечных клетках аорты кролика [52].

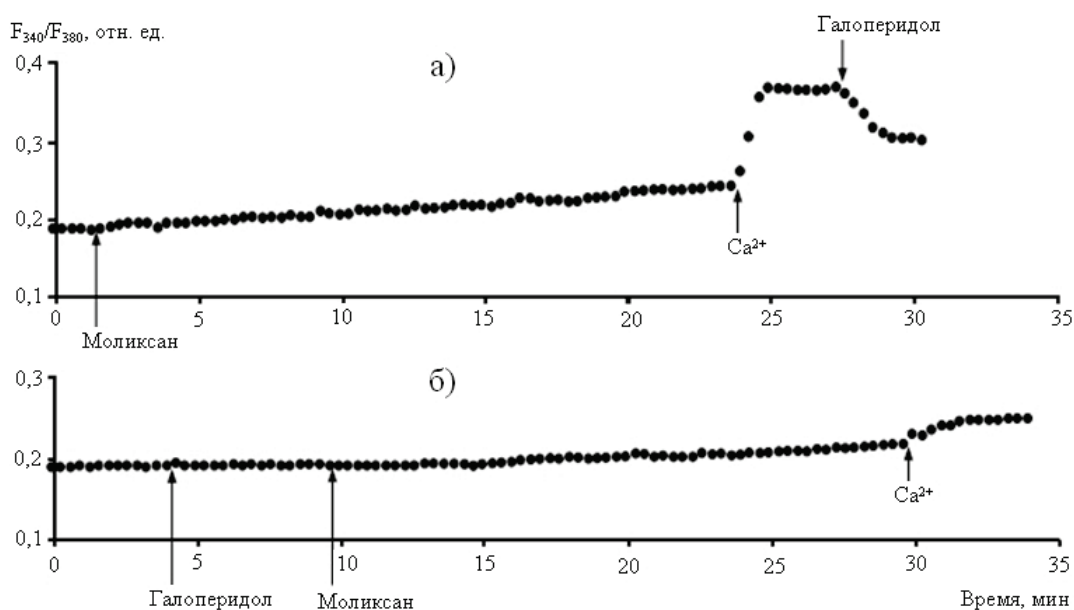


Рисунок 2. Влияние галоперидола на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. *а* – клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 50 мкг/мл галоперидола; *б* – макрофаги предварительно инкубировали в течение 6 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Галоперидол ингибирует Ca^{2+} -каналы L-типа в нейронах гиппокампа мыши [53] и кардиомиоцитах крысы [54], Ca^{2+} -каналы N-, L-, P/Q- и R-типов в симпатических и парасимпатических нейронах крысы [55] и Ca^{2+} -каналы T-типа в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [56].

Результаты настоящей работы о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и нейролептиков галоперидол, ХП и ТФП.

Полученные нами данные свидетельствуют также о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами, в перитонеальных макрофагах крыс и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход Ca^{2+} , модулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа Ca^{2+} – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме [15].

Результаты могут также способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия нейролептиков первого поколения. Кроме того, полученные данные могут иметь значение для терапии заболеваний, опосредованных нарушением функционирования рецепторов, сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций рецепторов сигма-1 приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека [4-8]. Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии нейропсихиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции) [30,57-61], нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза) [7,9,62-65], онкологических [13,66] и сердечнососудистых [8] заболеваний, болевых синдромов [67] и ретинопатий [68]. Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

В последнее время изучается также возможная роль сигма-1 рецепторов в патофизиологии коронавирусной инфекции (COVID-19). Появляются данные, что рецепторы сигма-1 могут быть перспективной терапевтической мишенью при лечении пациентов с COVID-19. Полагают, что рецепторы сигма-1 регулируют ключевые механизмы адаптивного стрессового ответа клеток-хозяев и принимают участие в ранних стадиях репликации вируса [69,70]. Многие перепрофилированные лекарства, включенные в схемы комплексной терапии пациентов с COVID-19, часто идентифицируются как лиганды рецепторов сигма-1. К их числу относятся нейролептики галоперидол, ХП и ТФП [69,71]. Полагают, что наиболее перспективным препаратом является ХП [71–75]. Имеются данные, что катионные амфифильные соединения, к которым относятся фенотиазиновые нейролептики, имеют противовирусную активность и подавляют вход и репликацию РНК

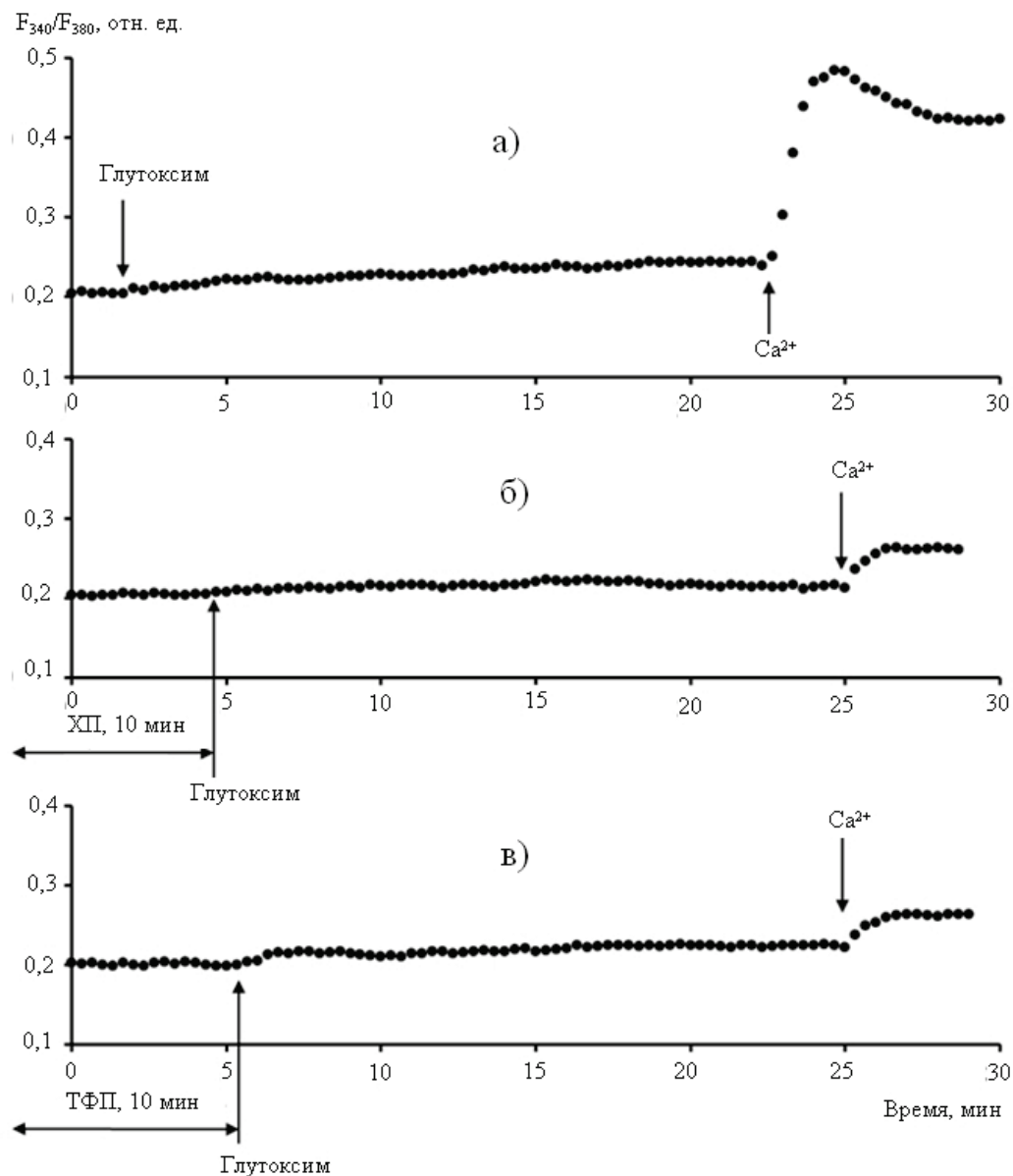


Рисунок 3. Влияние хлорпромазина (ХП) и трифлуоперазина (ТФП) на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом в перитонеальных макрофагах крысы. *a* – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б, в* – макрофаги, находящиеся в бескальциевой среде, инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл ХП (*б*) или в течение 15 мин с 2 мкг/мл ТФП (*в*), затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

вирусов [69,76,77]. Так, показано, что ХП ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках обезьяны (линия VeroE6) и клетках эпителия альвеол человека (линия A549-ACE2) [78]. Кроме того, лиганды рецепторов сигма-1 галоперидол [79] и ХП [80] уже прошли клинические испытания в качестве препаратов для терапии пациентов с COVID-19.

Известно также, что вирусы выработали механизмы нарушения Ca^{2+} -гомеостаза клеток хозяев и увеличивают $[Ca^{2+}]_i$, поскольку Ca^{2+} необходим для проникновения вируса в клетку, для репликации, созревания и освобождения вируса [81,82]. В связи с этим, блокирование вызванного вирусом увеличения $[Ca^{2+}]_i$ путем ингибирования каналов кальциевого выброса в мембране эндоплазматического ретикулума (рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата и риаудиновых рецепторов) или каналов входа Ca^{2+} в плазмалемме (потенциалзависимых и депозависимых Ca^{2+} -каналов) является одним из подходов в терапии вирусных инфекций [82]. Так, обнаружено, что блокаторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов нифедипин и амлодипин снижают смертность и уменьшают риск необходимости искусственной вентиляции легких у пожилых пациентов с COVID-19 и гипертонией [83,84]. Показано также, что внутривенное введение пациентам с тяжелой пневмонией при COVID-19 блокатора депозависимых Ca^{2+} -каналов соединения Аухога стабилизирует эндотелий легких и ингибирует выделение провоспалительных цитокинов, тем самым существенно облегчая и ускоряя выздоровление пациентов [85,86].

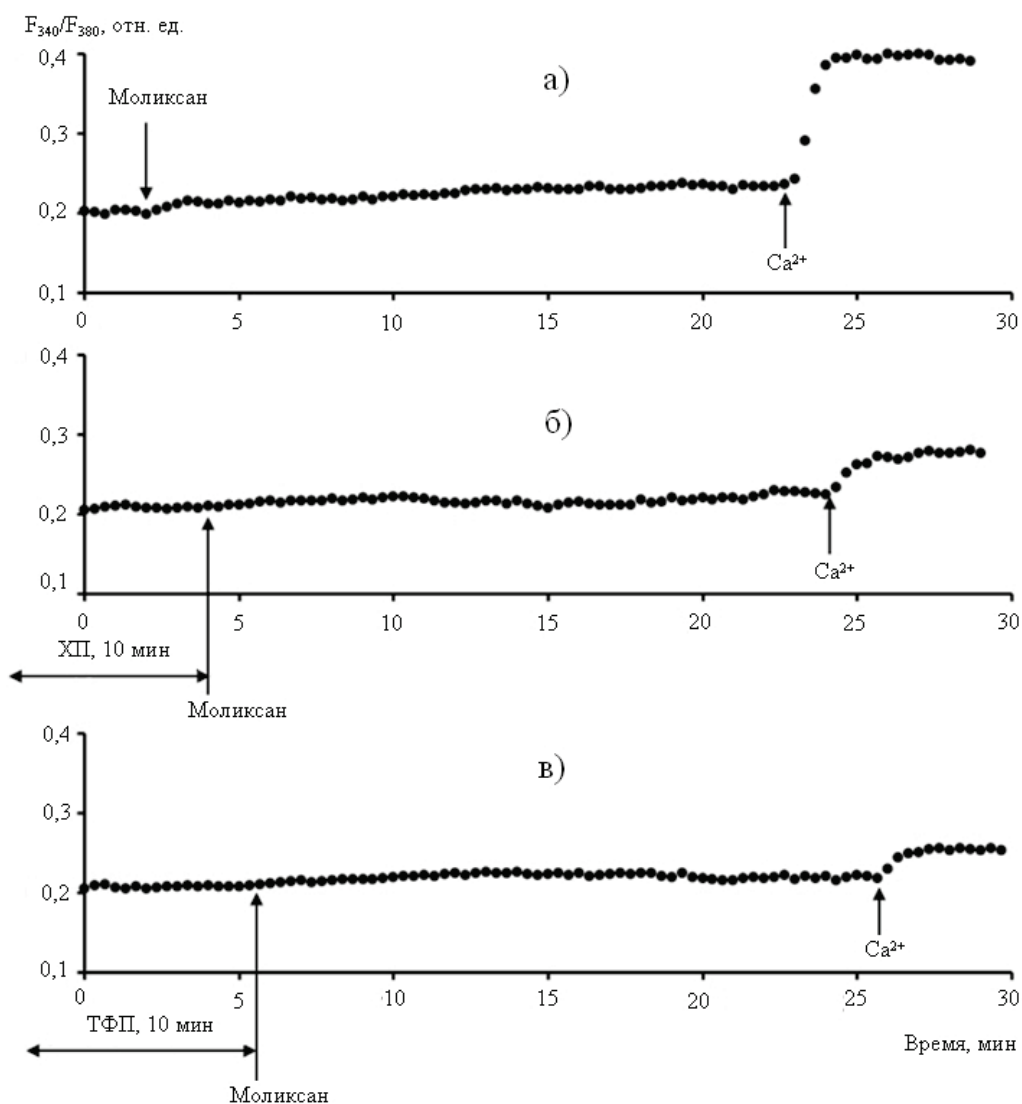


Рисунок 4. Влияние ХП и ТФП на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. *а* – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б, в* – клетки, находящиеся в бескальциевой среде, инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл ХП (*б*) или в течение 15 мин с 2 мкг/мл ТФП (*в*), затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Таким образом, полученные нами данные о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 при действии галоперидола, ХП и ТФП обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами в перитонеальных макрофагах крысы, дополнительно подтверждают многогранность эффектов нейролептиков и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала, как лигандов рецепторов сигма-1.

Работа выполнена в рамках Договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и 05/03-20 от 12.03.2020.

Список литературы / References:

1. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: a review. *Amer. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
2. Ayano G. First generation antipsychotics: pharmacokinetics, pharmacodynamics, therapeutic effects and side effects: A review. *Res. Rev. J. Chem.*, 2016, vol. 5, pp. 53-63.
3. Tam S.W., Cook L. Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H]SKF 10,047 and [3H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, pp. 5618-5621.
4. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
5. Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., Tsai S.-Y. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 262-278.
6. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ R]: Biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2016, vol. 36, no. 4, pp. 327-388.

7. Schmidt H.R., Kruse A.C. The molecular function of σ receptors: past, present, and future. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, vol. 40, no. 9, pp. 636-654.
8. Aishwarya R., Abdullah C.S., Morshed M., Remex N.S., Bhuiyan M.S. Sigmar1's molecular, cellular, and biological functions in regulating cellular pathophysiology. *Front. Physiol.*, 2021, vol. 12, doi: 10.3389/fphys.2021.705575.
9. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
10. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendan C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, no. 4, pp. 344-366.
11. Maurice T., Su T.-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2009, vol. 124, no. 2, pp. 195-206.
12. Chu U.B., Ruoho A.E. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2016, vol. 89, pp. 142-153.
13. Pontisso I., Combettes L. Role of sigma-1 receptor in calcium modulation: possible involvement in cancer. *Genes*, 2021, vol. 12, no. 2, p. 139, doi: 10.3390/genes12020139.
14. Hayashi T., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, 2007, vol. 131, pp. 596-610.
15. Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., Vistal G., Edwardson J. M., Taylor C.W., Murrell-Lagnado R.D. Sigma 1 receptors inhibit store-operated Ca²⁺ entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J. Cell Biol.*, 2016, vol. 213, no. 1, pp. 65-79.
16. Hayashi T., Maurice T., Su T.-P. Ca²⁺ signalling via σ 1-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca²⁺ concentration. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 2000, vol. 293, pp. 788-798.
17. Monnet F.P. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca²⁺: clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell.*, 2005, vol. 97, pp. 878-883.
18. Brailoiu G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., Soboloff J., Abood M.E., Unterwald E.M., Brailoiu E. Cocaine inhibits store-operated Ca²⁺ entry in brain microvascular endothelial cells: Critical role for sigma-1 receptors. *Biochem. J.*, 2016, vol. 473, pp. 1-5.
19. Berlansky S., Humer C., Sallinger M., Frischauf I. More than just simple interaction between STIM and Orai proteins: CRAC channel function enabled by a network of interactions with regulatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 471, doi: 10.3390/ijms22010471.
20. Борисов А.Е., Кожемякин Л.А., Антушевич А.Е., Кетлицкая О.С., Кащенко В.А., Чепур С.В., Кацалуха В.В., Васюкова Е.Л., Новиченков А.О., Мотушук И.Е. Клинико-экспериментальное обоснование регионального и системного введения препаратов группы тиопоэтинов при циррозе печени. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.*, 2001, т. 4, № 2, с. 32-38. [Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., Ketliskaya O.S., Kashchenko V.A., Chepur S.V., Katsalucha V.V., Vasyukova E.L., Novichenkov A.O., Motushchuk I.E. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoetin group medicines for cirrhosis of the liver. *Vestnic hirurgii im. I.I. Grekova*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 32-38. (In Russ.)]
21. Соколова Г.Б., Сеницын М.В., Кожемякин Л.А., Перельман М.И. Глутоксим в комплексной терапии туберкулёза. *Антибиотики и химиотерапия*, 2002, т. 47, № 2, с. 20-23. [Sokolova G.B., Sinityn M.V., Kozhemiakin L.A., Perel'man M.I. Glutoxim in the complex treatment of tuberculosis. *Antibiot. Khimioter.*, 2002, vol. 2, pp. 20-23. (In Russ.)]
22. Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Ладанова Т.В., Бурова Е.Б. Патофизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки. *Вестник Рос. Военно-мед. акад.*, 2013, т. 3, № 43, с. 32-37. [Antushevich A.A., Antonov V.G., Grebenyuk A.N., Antushevich A.E., Ladanova T.V., Burova E.B. Pathophysiological rationale of effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. *Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii.*, 2013, vol. 3, no. 43, pp. 32-37. (In Russ.)]
23. Толстой О.А., Цыган В.Н., Климов А.Г., Степанов А.В., Антушевич А.Е. Экспериментальная оценка эффективности препарата моликсан по восстановлению работоспособности вирусинфицированных лабораторных животных. *Известия Рос. военно-мед. акад.*, 2019, т. 38, № 1, с. 271-277. [Tolstoy O.A., Tsygan V.N., Klimov A.G., Stepanov A.V., Antushevich A.E. Experimental evaluation of the efficiency of the drug molixan on restoring the operation of virus-infected laboratory animals. *Bull. Russ. Military Med. Acad.*, 2019, vol. 38, no. 1, pp. 271-277. (In Russ.)]
24. Dubina M.V., Gomonova V.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V., Sayganov S.A. Pathogenesis-based pre-exposure prophylaxis associated with low risk of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a designated COVID-19 hospital, 2020, doi: 10.1101/2020.09.25.20199562.
25. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах. *Цитология*, 2008, т. 50, № 5, с. 452-461. [Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Cell Tiss. Biol.*, 2008, vol. 2, no. 3, pp. 322-332. (In Russ.)]
26. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние препарата моликсан на процессы Ca²⁺-сигналикации в макрофагах. *Цитология*, 2011, т. 53, № 9, с. 708. [Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I.,

- Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of drug molixan on Ca^{2+} signaling processes in macrophages. *Tsitologiya*, 2011, vol. 53, p. 708. (In Russ.)]
27. Whittemore E.R., Ilyin V.I., Woodward R.M. Antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by σ site ligands: potency, subtype-selectivity and mechanisms of inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 1997, vol. 282, pp. 326-338.
28. Cobos E.J., Del Pozo E., Baeyens J.M. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, 2007, vol. 102, pp. 812-825.
29. Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H. Binding of umespirone to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.*, 1990, vol. 29, pp. 181-184.
30. Hayashi T., Su T.-P. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*, 2004, vol. 18, no. 5, pp. 269-284.
31. Schuster D.I., Arnold F.J., Murphy R.B. Purification, pharmacological characterization and photoaffinity labeling of sigma receptors from rat and bovine brain. *Brain Res.*, 1995, vol. 670, pp. 14-28.
32. Hanner M., Moeblus F.F., Flandorfer A., Knaus H.G., Striessnig J., Kempner E., Glossman H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pp. 8072-8077.
33. Conrad R.E. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: *Manual of macrophages methodology*. N.-Y.: Marcell Dekker, 1981, pp. 5-11.
34. Randriamampita C., Trautmann A. Ionic channels in murine macrophages. *Cell. Biol.*, 1987, vol. 105, pp. 761-769.
35. Monahan R.A., Dvorak H.F., Dvorak A.M. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes. *Blood*, 1981, vol. 58, pp. 1089-1099.
36. Bruce J.I.E., Elliott A.C. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.*, 2000, vol. 131, pp. 761-771.
37. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566, doi: 10.1074/jbc.M109518200.
38. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
39. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет депозависимый вход Ca^{2+} в макрофагах. *Доклады Академии наук*, 2018, т. 480, № 5, с. 613-616. [Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. *Doklady Biochem. Biophys.*, 2018, vol. 480, no. 1, pp. 162-165. (In Russ.)]
40. Harper J.L., Shin Y., Daly J.W. Loperamide: A positive modulator for store-operated calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, pp. 14912-14917.
41. Harper J.L., Daly J.W. Inhibitors of store-operated calcium channels: Imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Dev. Res.*, 1999, vol. 47, pp. 107-117.
42. Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., Kim K.-T. Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British J. Pharmacol.*, 2001, vol. 132, pp. 411-418.
43. Wang L., Zhang L., Li S., Zheng Y., Yan X., Chen M., Wang H., Putney J.W., Luo D. Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated Ca^{2+} entry by calsequestrin. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, pp. 1-12.
44. Amer M.S., McKeown L., Tumova S., Liu R., AL Seymour V., Wilson L.A., Naylor J., Greenhalgh K., Hou B., Majeed Y., Turner P., Sedo A., O'Regan D. J., Li J., Bon R.S., Porter K.E., Beech D.J. Inhibition of endothelial cell Ca^{2+} entry and transient receptor potential channels by sigma-1 receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.*, 2013, vol. 168, pp. 1445-1455.
45. Gasparre G., Abate C., Carlucci R., Berardi F., Cassano G. The σ_1 receptor agonist (+)-pentazocine increases store-operated Ca^{2+} entry in MCF7 σ_1 and SK-N-SH cell lines. *Pharmacol. Rep.*, 2017, vol. 69, pp. 542-545.
46. Ogata N., Yoshii M., Narahashi T. Differential block of sodium and calcium channels by chlorpromazine in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.*, 1990, vol. 420, pp. 165-183.
47. Ogata N., Narahashi T. Potent blocking action of chlorpromazine on two types of calcium channels in cultured neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1990, vol. 252, no. 3, pp. 1142-1149.
48. McNaughton N.C.L., Green P.J., Randall A.D. Inhibition of human α_{1E} subunit-mediated Ca^{2+} channels by the antipsychotic agent chlorpromazine. *Acta Physiol. Scand.*, 2001, vol. 173, pp. 401-408.
49. Ito K., Nakazawa K., Koizumi S., Liu M., Takeuchi K., Hashimoto T., Ohno Y., Inoue K. Inhibition by antipsychotic drugs of L-type Ca^{2+} channel current in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, vol. 314, no. 1-2, pp. 143-150.
50. Nakazawa K., Higo K., Abe K., Tanaka Y., Saito H., Matsuki N. Blockade by calmodulin inhibitors of Ca^{2+} channels in smooth muscle from rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 109, pp. 137-141.
51. Cruzblanca H., Gamino S.M., Bernal J., Alvarez-Leefmans F.J. Trifluoperazine enhancement of Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type Ca^{2+} currents in *Helix aspersa* neurons. *Invert. Neurosci.*, 1998, vol. 3, no. 4, pp. 269-278.
52. Flaim S.F., Brannan M.D., Swioart S.C., Gleason M.M., Muschek L.D. Neuroleptic drugs attenuate calcium influx and tension development in rabbit thoracic aorta: Effects of pimozide, penfluridol, chlorpromazine, and haloperidol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, pp. 1237-1241.

53. Church J., Fletcher E.J. Blockade by sigma site ligands of high voltage-activated Ca^{2+} channels in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurones. *Brit. J. Pharmacol.*, 1995, vol. 116, pp. 2801-2810.
54. Tarabova B., Novakova M., Lacinova L. Haloperidol moderately inhibits cardiovascular L-type calcium current. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2009, vol. 28, pp. 249-259.
55. Zhang H., Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J. Neurophysiol.*, 2002, vol. 87, pp. 2867-2879.
56. Santi C.M., Cayabyab F.S., Sutton K.G., McRory J.E., Mezeyova J., Hamming K.S., Parker D., Stea A., Snutch T.P. Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22, no. 2, pp. 396-403.
57. Tsai S-Y., Hayashi T., Mori T., Su T-P. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 184-189.
58. Tsai S-Y., Pokrass M.J., Klauer N.R., De Credico N.E., Su T-P. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2014, vol. 18, no. 12, pp. 1461-1476.
59. Ishikawa M., Hashimoto K. The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J. Receptor, Ligand Channel Res.*, 2010, vol. 3, pp. 25-36.
60. Hayashi T. Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs. *J. Pharmacol. Sci.*, 2015, vol. 127, no. 1, pp. 2-5.
61. Voronin M.V., Vakhitova Y.V., Seredenin S.B. Chaperone Sigma1R and antidepressant effect. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 19, doi: 10.3390/ijms21197088.
62. Ryskamp D., Wu J., Geva M., Kusko R., Grossman I., Hayden M., Bezprozvanny I. The sigma 1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.*, 2017, vol. 97, pp. 46-59.
63. Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.*, 2019, vol. 13, 862, doi: 10.3389/fnins.2019.00862.
64. Yang K., Wang C., Sun T. The roles of intracellular chaperone proteins, sigma receptors, in Parkinson's disease (PD) and major depressive disorder (MDD). *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, doi: 10.3389/fphar.2019.00528.
65. Herrando-Grabulosa M., Gaja-Capdevila N., Vela J.M., Navarro X. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.*, 2020, vol. 178, no. 6, pp. 1336-1352.
66. Kim F.J., Maher C.M. Sigma1 pharmacology in the context of cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2017, vol. 244, pp. 237-308.
67. Merlos M., Burgueño J., Portillo-Salido E., Plata-Salaman C.R., Vela J.M. Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 964, pp. 85-107.
68. Smith S.B., Wang J., Cui X., Mysona B.A., Zhao J., Bollinger K.E. Sigma 1 receptor: a novel therapeutic target in retinal disease. *Prog. Retin Eye Res.*, 2018, vol. 67, pp. 130-149.
69. Vela J.M. Repurposing sigma-1 receptor ligands for COVID-19 therapy? *Front. Pharmacol.*, 2020, vol. 11, doi: 10.3389/fphar.2020.582310.
70. Hashimoto K. Repurposing of CNS drugs to treat COVID-19 infection: Targeting the sigma-1 receptor. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 2021, vol. 271, no. 2, pp. 249-258.
71. Plaze M., Attali D., Petit A.-C., Blatzer M., Simon-Loriere E., Vinckier F., Cachia A., Chretien F., Gaillard R. Repurposing chlorpromazine to treat COVID-19: The reCoVery study. *L'Encephale.*, 2020, vol. 46, no. 3, pp. 169-172.
72. Muric N.N., Arsenijevic N.N., Milica M., Borovcanin M.M. Chlorpromazine as a potential antipsychotic choice in COVID-19 treatment. *Front. Psychiatry*, 2020, vol. 11, doi: 10.3389/fpsy.2020.612347.
73. Nobile B., Durand M., Courtet P., Van de Perre P., Nagot N., Moles J.P., Olie E. Could the antipsychotic chlorpromazine be a potential treatment for SARS-CoV-2? *Schizophrenia Res.*, 2020, vol. 223, pp. 373-375.
74. Stip E. Psychiatry and COVID-19: The role of chlorpromazine. *Can. J. Psychiatry*, 2020, vol. 65, no. 10, pp. 739-740.
75. Stip E., Rizvi T.A., Mustafa F., Javaid S., Aburuz S., Ahmed N.N., Abdel Aziz K., Arnone D., Subbarayan A., Al Mugaddam F., Khan G. The large action of chlorpromazine: translational and transdisciplinary considerations in the face of COVID-19. *Front. Pharmacol.*, 2020, vol. 11, doi: 10.3389/fphar.2020.577678.
76. Otręba M., Korsmider L., Rzepecka-Stojko A. Antiviral activity of chlorpromazine, fluphenazine, perphenazine, prochlorperazine, and thioridazine towards RNA-viruses. A review. *Europ. J. Pharmacol.*, 2020, vol. 887, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173553.
77. Gitahy Falcao Faria C., Weiner L., Petriguet J., Hingray C., Ruiz De Pellon Santamaria A., Villoutreix B.O., Beaune P., Leboyer M., Javelot H. Antihistamine and cationic amphiphilic drugs, old molecules as new tools against the COVID-19? *Med. Hypotheses.*, 2021, vol. 148, doi: 10.1016/j.mehy.2021.110508.
78. Plaze M., Attali D., Prot M., Petit A.-C., Blatzer M., Vinckier F., Levillayer L., Chiaravalli J., Perin-Dureau F., Cachia A., Friedlander G., Chretien F., Simon-Loriere E., Gaillard R. Inhibition of the replication of SARS-CoV-2 in human cells by the FDA-approved drug chlorpromazine. *Int. J. Antimicrobial Agents.*, 2021, vol. 57, no. 3, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106274.
79. Hoertel N., Sanchez-Rico M., Vernet R., Jannot A.-S., Neuraz A., Blanco C., Lemogne C., Airagnes G., Paris N., Daniel Ch., Gramfort A., Lemaitre G., Bernaux M., Bellamine A., Becker N., Limosin F. Observational study of haloperidol in hospitalized patients with COVID-19. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 2, e0247122, doi: 10.1371/journal.pone.0247122.

80. Hoertel N., Sanchez-Rico M., Vernet R., Jannot A-S., Neuraz A., Blanco C., Lemogne C., Airagnes G., Paris N., Daniel Ch., Gramfort A., Lemaitre G., Bernaux M., Bellamine A., Beeker N. Observational study of chlorpromazine in hospitalized patients with COVID-19. *Clin. Drug Investigation*, 2021, vol. 41, no. 3, pp. 221-233.
81. Zhoua Y., Freyb T.K., Yanga J.J. Viral calciomics: interplays between Ca^{2+} and virus. *Cell Calcium*, 2009, vol. 46, no. 1, pp. 1-17.
82. Chen X., Cao R., Zhong W. Host calcium channels and pumps in viral infections. *Cells*, 2019, vol. 9, iss. 1, 94, doi: 10.3390/cells9010094.
83. Solaimanzadeh I. Nifedipine and amlodipine are associated with improved mortality and decreased risk for intubation and mechanical ventilation in elderly patients hospitalized for COVID-19. *Cureus*, 2020, vol. 12, no. 5, e8069, doi: 10.7759/cureus.8069.
84. Zhang L.-K., Sun Y., Zeng H., Wang Q., Jiang X., Shang W.-J., Wu Y., Li Sh., Zhang Y.-L., Hao Z.-N., Chen H., Jin R., Liu W., Li H., Peng K., Xiao G. Calcium channel blocker amlodipine besylate therapy is associated with reduced case fatality rate of COVID-19 patients with hypertension. *Cell Discovery*, 2020, vol. 6, no. 1, art. no. 96, doi: 10.1038/s41421-020-00235-0.
85. Miller J., Bruen C., Schnaus M., Zhang J., Ali S., Lind A., Stoecker Z., Stauderman K., Hebbar S. Auxora versus standard of care for the treatment of severe or critical COVID-19 pneumonia: Results from a randomized controlled trial. *Crit. Care*, 2020, vol. 24, art. no. 502, doi: 10.1186/s13054-020-03220-x.
86. Berlansky S., Sallinger M., Grabmayr H., Humer C., Bernhard A., Fahrner M., Frischauf I. Calcium signals during SARS-CoV-2 infection: Assessing the potential of emerging therapies. *Cells*, 2022, vol. 11, art. no. 253, doi: 10.3390/cells11020253.

NEUROLEPTICS ATTENUATE Ca^{2+} RESPONSES INDUCED BY GLUTOXIM AND MOLIXAN IN MACROPHAGES

Milenina L.S.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹, Simonyan A.O.¹

¹ Saint-Petersburg State University

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

² S.M. Kirov Military Medical Academy

Akademik Lebedev st. 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia

Received 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0494

Abstract. Haloperidol (butyrophenone derivative) and phenothiazine derivatives chlorpromazine and trifluoperazine belong to the typical first-generation neuroleptics and are widely used in clinical practice for treatment of schizophrenia and other mental diseases. Their multifaceted effect on cellular processes is well known. Thus, a high affinity of typical neuroleptics for sigma-1 receptors was revealed. Sigma-1 receptors are ubiquitous multifunctional ligand-operated molecular chaperones in the endoplasmic reticulum membrane with a unique history, structure, and pharmacological profile. Acting as chaperones, sigma-1 receptors modulate a wide range of cellular processes in health and disease, including Ca^{2+} signaling processes. To elucidate the involvement of sigma-1 receptors in Ca^{2+} signaling processes in macrophages, the effect of sigma-1 receptor ligands on Ca^{2+} responses induced by disulfide-containing immunomodulators glutoxim and molixan in rat peritoneal macrophages was investigated. Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown that haloperidol, chlorpromazine and trifluoperazine significantly suppress both Ca^{2+} mobilization from intracellular Ca^{2+} stores and subsequent store-dependent Ca^{2+} entry, induced by glutoxim or molixan in peritoneal macrophages. The data obtained indicate the possible involvement of sigma-1 receptors in the complex signaling cascade triggered by glutoxim or molixan and leading to intracellular Ca^{2+} concentration increase in macrophages. The results also suggest the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Key words: neuroleptics, sigma-1 receptors, intracellular Ca^{2+} concentration, macrophages.

**IN SILICO АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
МОЛЕКУЛ ЦЕЛЛЮЛАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ****Холявка М.Г.^{1,2}, Ковалева И.Ю.², Бруева М.С.², Богомолов Д.Ю.², Панкова С.М.^{2,3},
Королева В.А.^{2,3}, Артюхов В.Г.²**¹ Севастопольский государственный университет

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

² Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

³ Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394006, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0495

Аннотация. Пространственная структура фермента во многом определяет механизм его функционирования. В частности, изменение количества, структуры и локализации внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле энзима могут менять его термостабильность, механизм диффузии субстрата к активному центру, а также особенности взаимодействия с микроокружением. Исследованы состав, локализация и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima*, связанных с различными лигандами и имеющих аминокислотные замены. Расчет параметров пор, туннелей и полостей осуществляли в программном обеспечении Mole. Выдвинуто предположение о влиянии данных модификаций на изменение структуры представленных в работе ферментов. Проанализированные в работе данные имеют значительную ценность для понимания процессов конформационных перестроек в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при их связывании с различными лигандами и при наличии точечных мутаций, что может быть полезным при проектировании на основе данных белков промышленных катализаторов и изучении их физиологической роли внутри организма-производителя.

Ключевые слова: *in silico* анализ, целлюлазы, молекулярный комплекс, туннели, полости, поры, изменение конформации.

Целлюлоза является одним из самых распространенных органических материалов в мире, и использование отходов целлюлозной промышленности в качестве сырья для производства этанола является многообещающим подходом к устойчивому удовлетворению текущих и будущих потребностей в энергии [1]. Ферментативный гидролиз целлюлозы является наиболее эффективным путем ее промышленной переработки, поскольку биокатализаторы обладают высокой специфичностью и активностью. Кроме того, среди продуктов реакции в данном случае практически отсутствуют токсичные соединения, что приводит к снижению экологической нагрузки производственного процесса, а также затрат на утилизацию отходов.

Целлюлазы продуцируются различными организмами: грибами, бактериями, актиномицетами, простейшими животными, растениями. Все целлюлазы катализируют гидролиз β -1,4-гликозидных связей. Однако существует множество топологий фермента, начиная от белков, состоящих полностью из β -листов, до β/α -белков и заканчивая полностью α -спиральным белком [2].

Известно, что пространственная структура фермента во многом определяет механизм его функционирования. Так, изменения количества, структуры и локализации внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле энзима могут менять его термостабильность, механизм диффузии субстрата к активному центру, а также взаимодействия с микроокружением [3].

Значительный вклад в изменение конформации биокатализатора вносит его связывание с соединениями различной природы. В качестве таковых могут выступать активаторы, ингибиторы, остатки сахаров, компоненты биомембран и т.д. Изучение изменений пространственной структуры белка при его взаимодействии с различными лигандами дает понимание того, как может варьировать механизм его функционирования в различных условиях [4].

Существенные изменения структуры белковой молекулы наблюдаются также при внесении направленных мутаций. Такие модификации энзимов призваны скорректировать их физико-химические свойства с целью дальнейшего применения либо более детального изучения особенностей биокатализатора. При внесении направленных мутаций также необходимо исследование пространственной структуры белка для более глубокого понимания того, как будет функционировать новая конформация фермента и каким образом она изменилась в результате модификации.

Целью настоящей работы было изучение состава, локализации и структуры внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при связывании с различными лигандами и наличии направленных мутаций.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования выступили целлюлазы из *Thermotoga maritima* (3AMM, 3AMN, 3AMQ, 3VHO и 3VHN) (табл. 1).

Таблица 1. Лиганды, связанные с молекулой целлюлазы из *Thermotoga maritima* в различных моделях

Модель	Лиганды
3AMM	Олигомер 4 молекул β -D-глюкозы
3AMN	4-O- β -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопираноза
	Целлобиоза
3AMQ	β -D-глюкоза
3VHN	Целлобиоза
3VHO	Лиганды отсутствуют

Расчет параметров пор, туннелей и полостей осуществляли в программном обеспечении Mole. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщающееся с поверхностью молекулы. Под «порой» – свободное пространство внутри глобулы, сообщающееся с ее поверхностью только через одно отверстие, т.е. углубление на поверхности или в толще молекулы. Под «туннелем» мы подразумевали сквозное отверстие в белковой глобуле, т.е. свободное пространство внутри молекулы, сообщающееся с ее поверхностью через два и более отверстий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле целлюлазы из *Thermotoga maritima*, связанной с различными лигандами.

В составе модели 3AMM обнаружено 5 внутренних полостей с суммарным объемом 748,24 Å³. В 3AMN обнаружено 4 полости с общим объемом 566,17 Å³. Наибольшее количество полостей (6) с наибольшим суммарным объемом (822,11 Å³) наблюдается в составе модели 3AMQ, что, вероятно, может указывать на наибольшую декомпактизацию целлюлазы из *Thermotoga maritima* при связывании с β -D-глюкозой. (рис. 1, табл. 2).

В составе модели 3AMM обнаружены 2 туннеля, сообщающиеся общей пустотой, у молекулы 3AMN – 2 туннеля, находящиеся в разных областях молекулы, в целлюлазе 3AMQ – 3 туннеля, два из которых находятся в одной области молекулы и сообщаются общей пустотой (рис. 2, табл. 3). Профили туннелей представлены на рисунках 3-5.

Установлено, что в данных моделях имеется один общий туннель, аминокислотный состав которого не меняется в зависимости от связанного с целлюлазой лиганда. Это может свидетельствовать о высокой консервативности участка молекулы, в котором находится данный туннель, и, вероятно, о его значительной роли в функционировании фермента. На это также указывает идентичная структура данного туннеля во всех трех моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*.

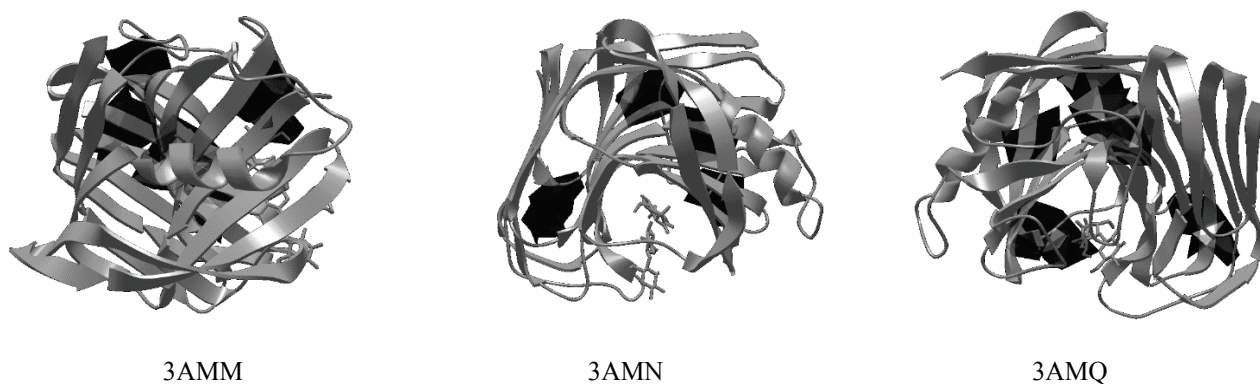


Рисунок 1. Локализация внутренних полостей в различных моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*

Таблица 2. Параметры внутренних полостей в составе моделей пространственной структуры целлюлазы из *Thermotoga maritima*

3AMM			3AMN			3AMQ		
Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)
1. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	169,7	1. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	10	153,24	1. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Gln125, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	12	164,7
2. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Gln125, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Glu134, Trp178	13	161,22	2. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	151,62	2. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	148,51
3. Leu23, Asn24, Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Ala240, Phe242	13	159,53	3. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	138,06	3. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	146,29
4. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	150,97	4. Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	10	123,25	4. Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Ala240, Phe242	11	143,74
5. Pro18, Leu19, Ser20, Tyr69, Tyr70, Gly71, Thr79, Ala80, Ser83	9	107,05				5. Pro18, Leu19, Ser20, Tyr69, Tyr70, Gly71, Thr79, Ala80, Glu81, Ser83	10	120,98
						6. Val97, Val99, Met115, Phe139, Phe158, Val194, Lys195, Phe196	8	94,98
Общий объем		748,24			566,17			822,11

Таблица 3. Туннели в составе моделей пространственной структуры целлюлазы из *Thermotoga maritima*

3AMM	3AMN	3AMQ
1. Ile156, Pro157, Phe158, Trp169, Phe201, Phe196, Asp197, His200	1. Ile28, Leu53, Ser54, Leu63, Thr237, Pro55, Pro235, Lys238	1. Phe101, Leu160, Arg193, Val194, Val189, Phe139, Phe158, Leu185, Asp187
2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200	2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200	2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200
		3. Leu85, Met92, Phe95, Phe223, Leu253, Tyr70, Ile251

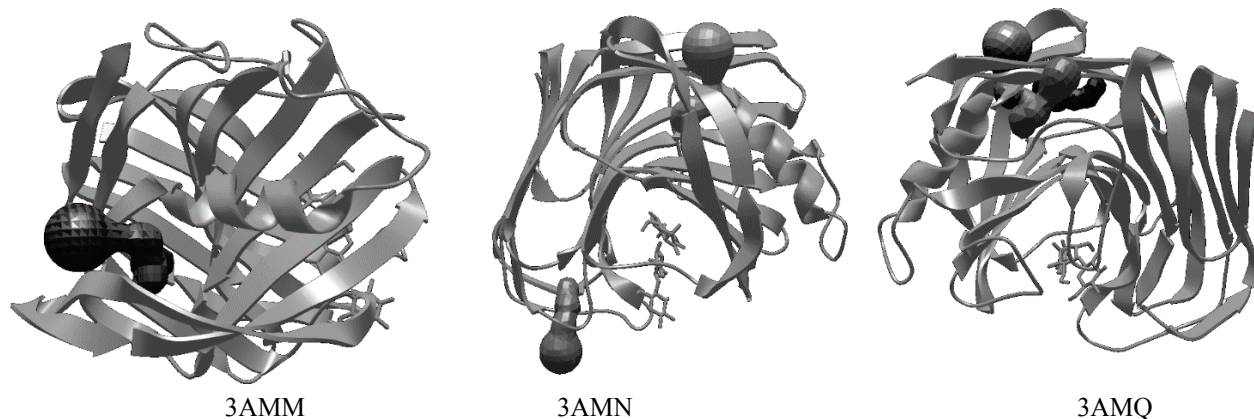


Рисунок 2. Локализация туннелей в различных моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*

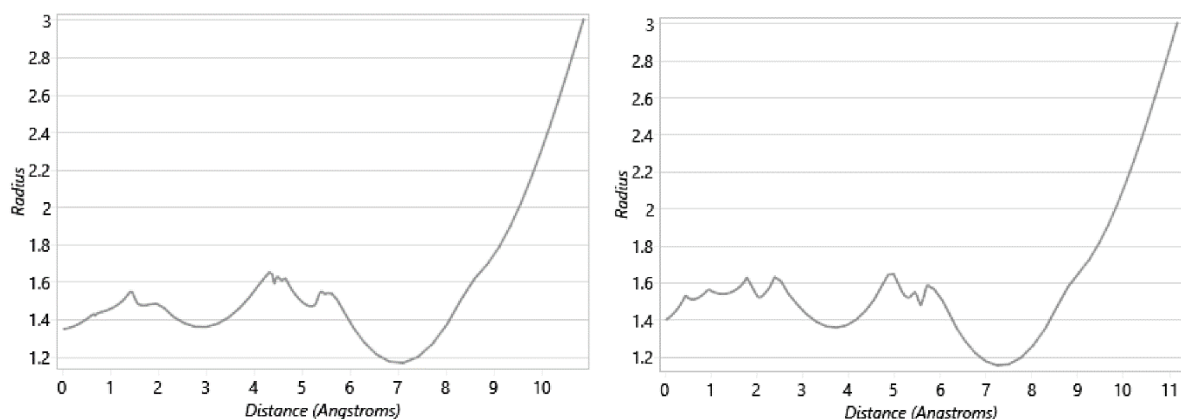


Рисунок 3. Профили туннелей в модели 3AMM

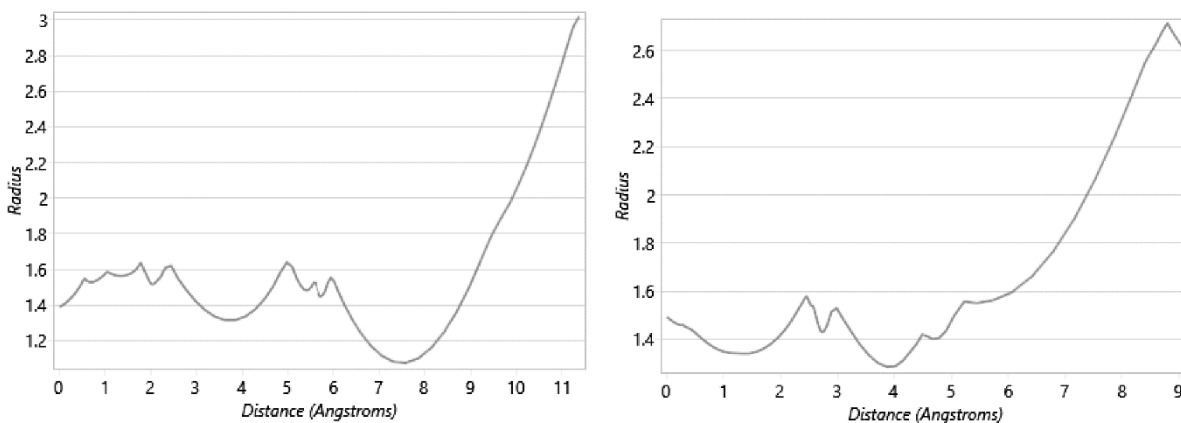


Рисунок 4. Профили туннелей в модели 3AMN

Наибольшее количество туннелей было обнаружено в составе модели 3AMQ, что, вероятно, как и в случае с внутренними полостями, может указывать на наиболее значительное декомпактизирующее действие β -D-глюкозы на целлюлазу из *Thermotoga maritima*. Поры не были обнаружены ни на одной из рассмотренных моделей.

Состав и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле целлюлазы из *Thermotoga maritima* с заменой аминокислот Arg60 и Tyr61. Для исследования были выбраны модели 3VHO и 3VHN с заменами в аминокислотах Arg60 и Tyr61. Кроме того, в модели 3VHN присутствует лиганд целлобиоза. В данных моделях обнаружено 3 и 4 полости общим объемом 414,02 и 660,18 Å³ соответственно (табл. 4). Большее количество полостей и их объем в модели 3VHN, вероятно, обусловлено декомпактизирующим действием лиганда. Для туннелей наблюдается обратная картина – в модели 3VHO обнаружено пять туннелей. В то же время, в модели 3VHN выявлено три туннеля (рис. 6-9, табл. 5). В обоих изученных нами моделях было обнаружено по одной поре (рис. 10, 11).

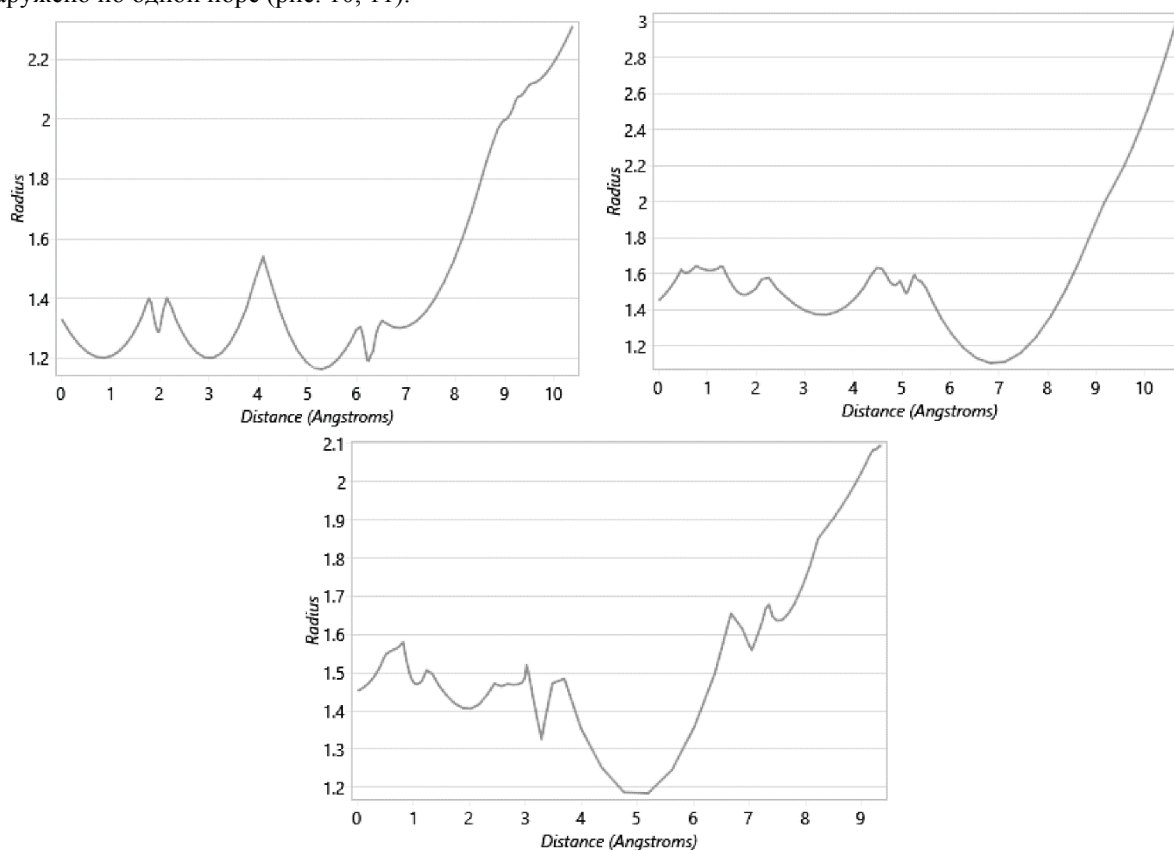


Рисунок 5. Профили туннелей в модели 3AMQ

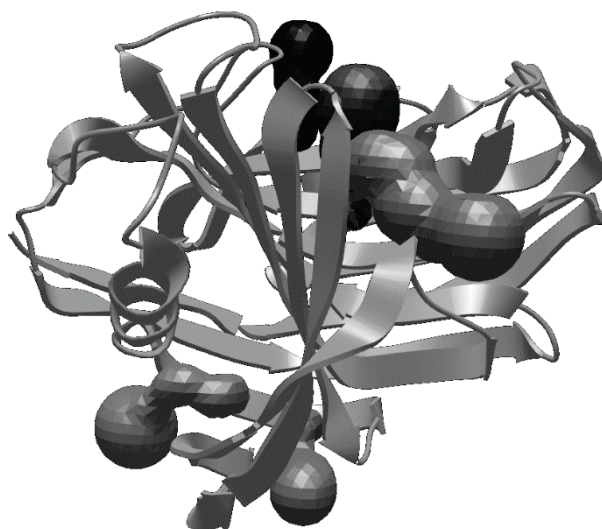


Рисунок 6. Локализация туннелей в модели 3VHO

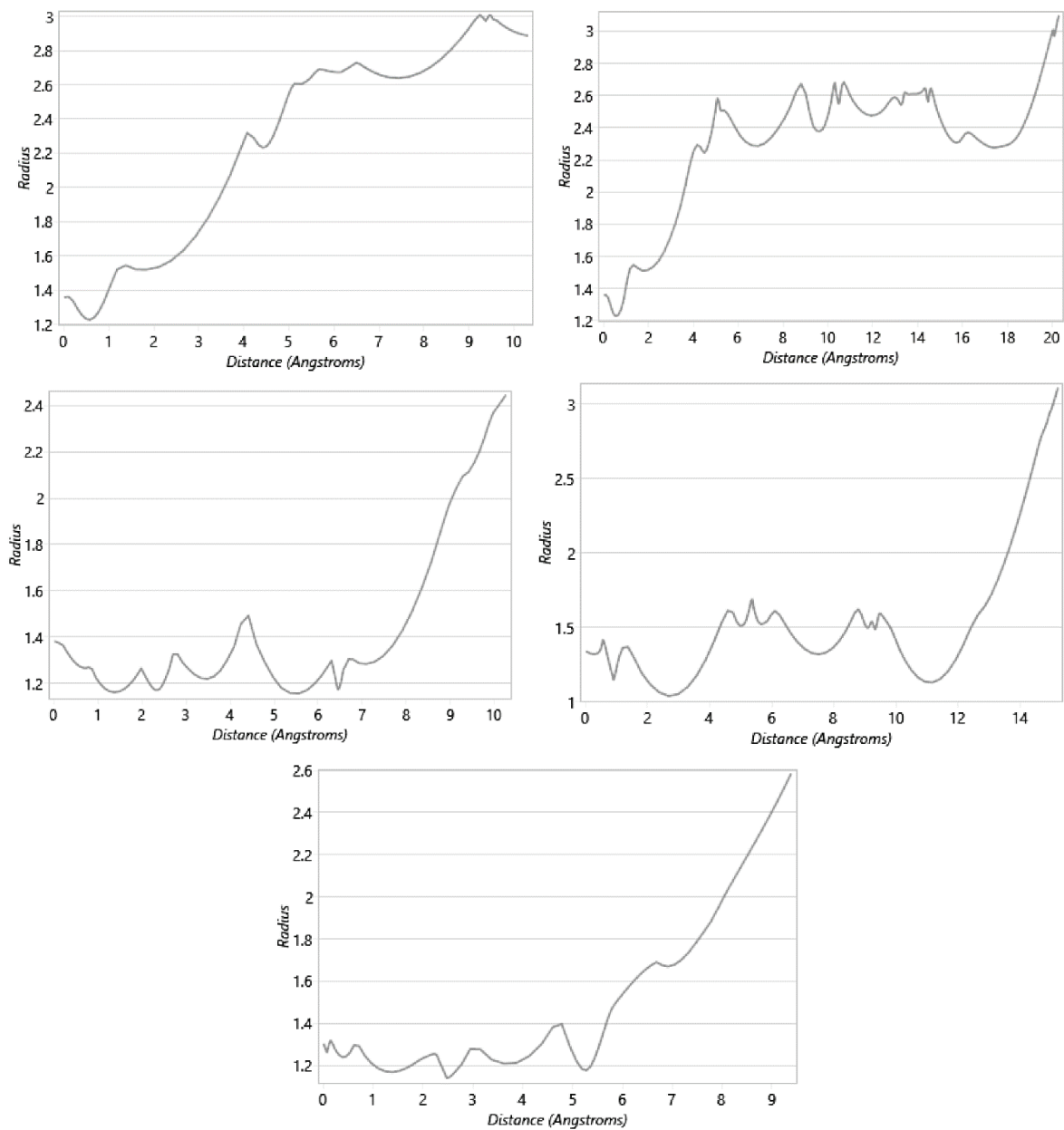


Рисунок 7. Профили туннелей в модели 3VHO

Таблица 4. Параметры внутренних полостей в составе моделей пространственной структуры мутантных целлюлаз из *Thermotoga maritima*

3VHO			3VHN		
Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)
1. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Trp226	8	144,20	1. Met115, Glu116, Thr117, Ile135, Met136, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Trp226	11	176,20
2. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	135,83	2. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	175,57
3. Leu23, Asn24, Leu25, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	10	133,99	3. Glu22, Leu23, Asn24, Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Met37, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	14	171,12
			4. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	137,29
Общий объем		414,02			660,18

Таблица 5. Туннели в составе моделей пространственной структуры мутантных целлюлаз из *Thermotoga maritima*

3VHO	3VHN
1. Trp26, Tyr65, Glu116, Trp118, Met136, Glu134, Glu231	1. Tyr65, Trp75, Met136, Glu231, Glu116, Trp26, Glu134, Trp118,
2. Trp26, Tyr65, Val62, Gly61, Glu116, Met136, Glu134, Gly147, Thr145, Pro146, Trp176, Tyr180, Glu231	2. Tyr65, Met136, Glu231, Glu116, Trp26, Glu134, Arg60, Tyr180, Trp176, Arg60, Val62, Gly147, Thr145, Gly61
3. Phe139, Phe158, Pro157, Ile156, Trp169, Val194, Lys195, Phe196, Asp197, Phe201, His200	3. Ile156, Pro157, Phe158, Trp169, Phe201, Phe196, Asp197, His200
4. Phe101, Phe139, Phe158, Leu160, Val189, Leu185, Asp187, Gly192, Arg193, Val194	
5. Thr9, Ser20, Met21, Glu22, Tyr69, Glu76, His78	

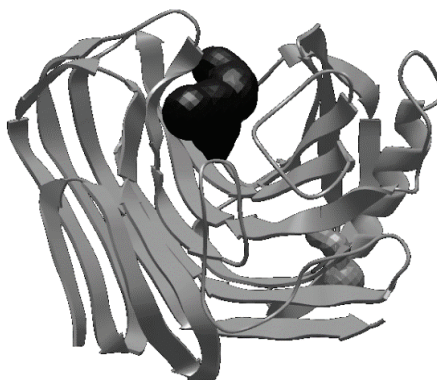


Рисунок 8. Локализация туннелей в модели 3VHN

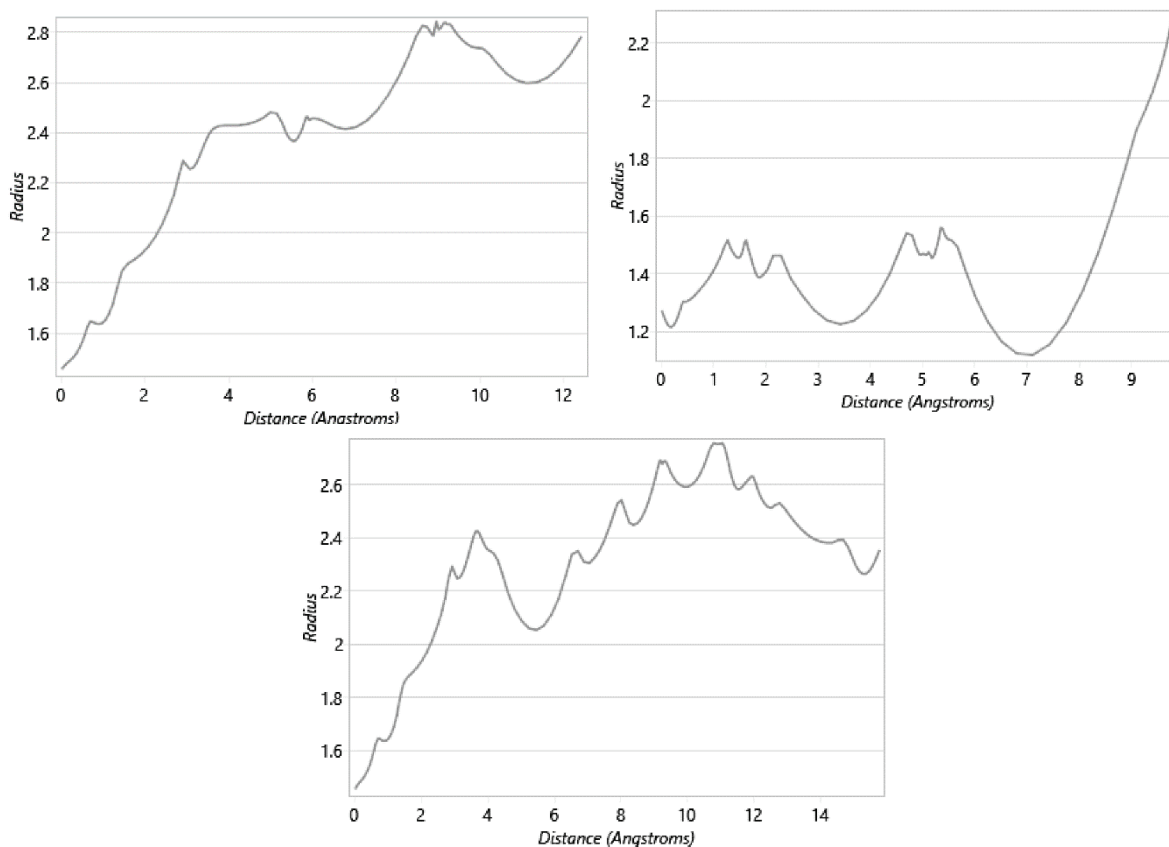
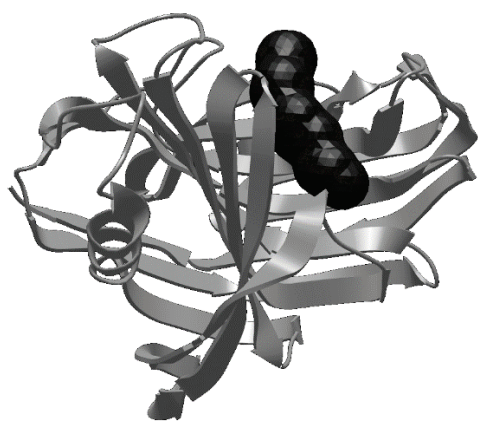
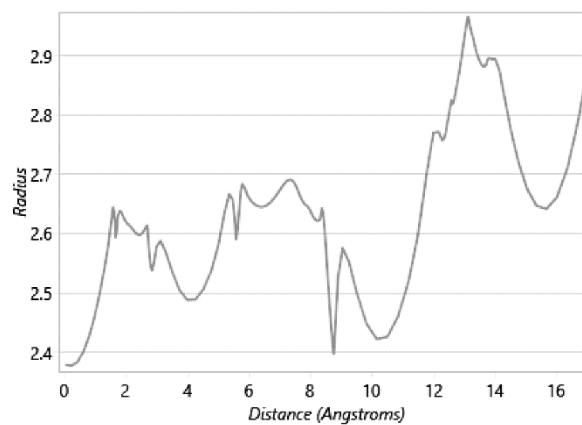


Рисунок 9. Профили туннелей в модели 3VHN

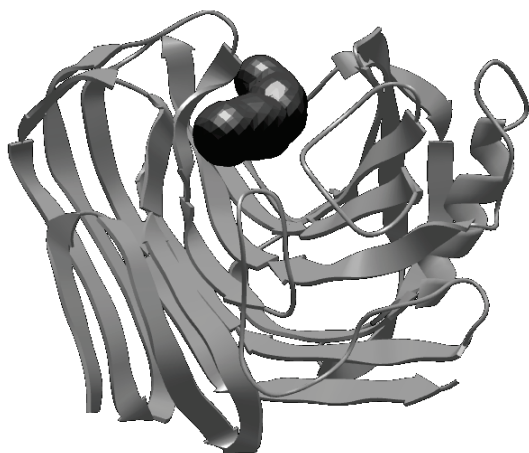


Расположение



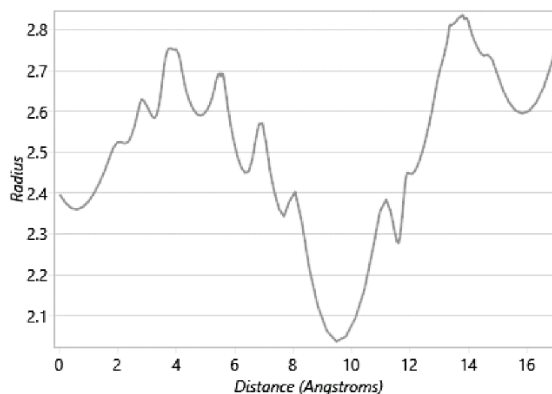
Профиль поры

Рисунок 10. Локализация и профиль поры в модели 3VNO



Расположение

Рисунок 11. Локализация и профиль поры в модели 3VHN



Профиль поры

ВЫВОДЫ

1. В составе модели 3AMM целлюлазы из *Thermotoga maritima* обнаружено 5 внутренних полостей с суммарным объемом 748,24 Å³. В молекуле 3AMN выявлено 4 полости с общим объемом 566,17 Å³. 6 полостей с суммарным объемом 822,11 Å³ наблюдалось в составе модели 3AMQ.
2. В моделях 3AMM и 3AMN обнаружено по два туннеля, в 3AMQ модели их было выявлено три. Показано наличие общего для всех трёх моделей туннеля.
3. Поры в составе моделей 3AMM, 3AMN и 3AMQ отсутствуют.
4. В моделях 3VHO и 3VHN обнаружено 3 и 4 полости общим объемом 414,02 и 660,18 Å³, 5 и 3 туннеля соответственно, а также по одной поре.

Представленные в работе данные имеют значительную ценность для понимания процессов конформационных перестроек в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при их связывании с различными лигандами и при наличии точечных мутаций, что может быть полезным при проектировании на основе данных белков промышленных катализаторов и изучении их физиологической роли внутри организма-продуцента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №21-74-20053

Список литературы / References:

1. Saxena A., Ragauskas A.J. Water transmission barrier properties of biodegradable films based on cellulose whiskers and xylan. *Carbohydrate polymers*, 2009, vol. 78, no. 2, pp. 357-360.
2. Dashiban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 2010, vol. 1, no. 1, p. 36.
3. Богомолов Д.Ю., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Селеменев В.Ф. Изучение *in silico* структурных особенностей липаз из различных продуцентов. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2021, т. 21, № 4, с. 555-567. [Bogomolov D.Yu., Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Selemenev V.F. *In silico* study of the structural features of lipases from various producers. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*, 2021, vol. 21, no. 4, pp. 555-567. (In Russ.)]
4. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение (учебное пособие)*. Воронежский государственный университет. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 261 с. [Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilized biological systems: biophysical aspects and practical application (textbook)*. Voronezh State University. Voronezh: VSU Publishing House, 2017, 261 p. (In Russ.)]

IN SILICO ANALYSIS OF THE FEATURES OF THE SPATIAL ORGANIZATION OF CELLULASE MOLECULES FROM DIFFERENT PRODUCERS**Holyavka M.G.^{1,2}, Kovaleva I.Yu.², Brueva M.S.², Bogomolov D.Yu.², Pankova S.M.^{2,3}, Koroleva V.A.^{2,3}, Artyukhov V.G.²**¹Sevastopol State University

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

²Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

³Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Studencheskaya st., 10, Voronezh, 394006, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Received 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0495

Abstract. The spatial structure of the enzyme largely determines the mechanism of its functioning. In particular, changes in the number, structure, and localization of internal cavities, tunnels, and pores in an enzyme molecule can change its thermal stability, the mechanism of substrate diffusion to the active site, and the features of interaction with the microenvironment. The composition, localization, and structure of internal cavities, tunnels, and pores in *Thermotoga maritima* cellulases associated with various ligands and having amino acid substitutions have been studied. The parameters of pores, tunnels, and cavities were calculated using the Mole software. An assumption was put forward about the effect of these modifications on the change in the structure of the enzymes presented in the work. The data analyzed in this work are of significant value for understanding the processes of conformational rearrangements in the molecules of cellulases from *Thermotoga maritima* when they are bound to various ligands and in the presence of point mutations, which can be useful in designing industrial catalysts based on these proteins and studying their physiological role within the producer organism.

Key words: *in silico analysis, cellulases, molecular complex, tunnels, cavities, pores, conformational change.*

СТЕПЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И ПОЛИМОРФИЗМ rs652438 ГЕНА MMP-12 ПРИ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Текуцкая Е.Е.^{1,2}, Гусарук Л.Р.^{1,2}, Павлюченко И.И.^{1,2}

¹ Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 3500400, РФ; e-mail: tekytska@mail.ru

² Кубанский государственный медицинский университет

ул. им. Митрофана Седина, 4, г. Краснодар, 350063, РФ; e-mail: gusaruk@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0496

Аннотация. В работе приводится сравнительный анализ степени окислительного повреждения ДНК при мультифакториальных заболеваниях (буллезном эпидермолизе (БЭ) и бронхиальной астме (БА)). Степень окислительных повреждений ДНК оценивали по уровню концентрации 8-оксогуанина (8-охоG) в сыворотке крови, определяемого методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами. Установлено, что концентрация модифицированного основания 8-охоG у больных БЭ в 2,1 раза выше по сравнению с контрольной группой. При БА этот показатель по сравнению с контролем меняется незначительно. Различная концентрация 8-охоG при БЭ и БА свидетельствует о выраженности структурных повреждений ДНК при БЭ и практически отсутствии окислительной модификации ДНК при БА, что может свидетельствовать о различных механизмах патофизиологических нарушений при данных нозологиях на клеточном уровне. Определено содержание 8-охоG в ДНК крови здоровых доноров и больных БЭ и БА после воздействия переменным магнитным полем (МП) напряженностью (550 ± 30) А/м в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro*. Показано, что после обработки МП наблюдается достоверное повышение уровней содержания 8-охоG в ДНК для обеих групп, сложным образом зависящее от частоты. Полученный эффект объясняется генерацией АФК при воздействии МП и нарушением процессов репарации ДНК. Проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов локуса rs652438 гена *mmp12* при БА. Показано наличие достоверных различий в частоте гетерозигот. В контрольной группе этот показатель в 2,3 больше, чем при БА. Частота аллеля G в группе здоровых доноров составила 0,15, у пациентов с БА-0,06. Значение показателя отношения шансов свидетельствует, что влияние минорного аллеля G носит протекторный характер, снижая риск развития БА для его обладателей.

Ключевые слова: буллезный эпидермолиз, бронхиальная астма, окислительное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, полиморфизм гена MMP-12

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – Epidermolysis bullosa, клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, включающих около 30 генотипических и фенотипических форм. Все они характеризуются врожденной склонностью к образованию булл (пузырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника, дыхательной, мочеполовой систем. Нарушение целостности кожи происходит даже в ответ на незначительное механическое воздействие [1]. Эрозивно-язвенные дефекты могут сохраняться на коже от одного месяца до нескольких лет, являясь предрасполагающим фактором к образованию плоскоклеточного рака кожи - основной причины преждевременной смерти больных [2]. Внекожные проявления и их осложнения в других эпителизированных органах делают БЭ мультисистемным заболеванием с высокой смертностью [3]. Бронхиальная астма (БА) является широко распространенным хроническим заболеванием, которым страдает 300 млн человек в мире. Основой патогенеза БА является затяжной воспалительный процесс, включающий морфологические и функциональные изменения бронхиального дерева, характеризующиеся существенным вкладом в их развитие наследственной компоненты [4]. Таким образом, БА и БЭ, относятся к мультифакториальным заболеваниям и, исходя из этого, возникают при взаимодействии неблагоприятных факторов наследственной и не наследственной природы, действие которых в итоге суммируется.

Известно, что высокореакционные клеточные метаболиты, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, воздействие электромагнитным полем приводит к активации процессов свободно-радикального окисления и, как следствие, накоплению в клетках активных форм кислорода (АФК). Вызывая окислительную модификацию различных клеточных структур, они действуют, в том числе, на ее генетический материал, приводя к повреждению азотистых оснований ДНК, дестабилизируя геном. Наиболее распространенным продуктом такой окислительной модификации азотистых оснований является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-охоG). Причина этого в том, что именно гуанин имеет самый низкий из всех азотистых оснований окислительно-восстановительный потенциал [5].

В организме выработана многоуровневая система защиты и репарации генетического аппарата. Образуюсь при повреждении ДНК, 8-охоG устраняется или модифицируется за счет наличия мультифакторной системы антиоксидантной защиты и системы эксцизионной репарации. В результате функционирования фермента 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазы происходит последовательный гидролиз N-гликозидной связи с 3'конца от повреждения и связывание 8-охоG активным центром. Накапливаясь в биологических жидкостях, 8-охоG служит одним из лучших биомаркеров генотоксического оксидативного стресса при различных патофизиологических

состояниях и экзогенных воздействиях [6]. С образованием 8-охоГ в ДНК тесно связывают такие процессы в организме как канцерогенез, воспаление, старение, развитие ряда возрастных патологий. По данным ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) уровень эндогенного 8-охоГ в ДНК составляет ~ 1 8-охоГ на 10^6 Г. При генотоксическом оксидативном стрессе этот показатель увеличивается в несколько раз.

При экзогенных воздействиях определенные клеточные процессы, и среди них генерация АФК, многими авторами считаются ответственными за влияние на структуру ДНК [6-8]. Низкоинтенсивные переменные МП не вызывают тепловые эффекты напрямую, эти поля могут воздействовать опосредованно, изменяя концентрацию или активность некоторых кинетически значимых молекул в водном растворе, в частности перекиси водорода.

MMP-12 – металлоэластаза, расщепляя растворимый и нерастворимый эластин, вызывает деградацию фибронектина, ламинина, витронектина, артериальное ремоделирование [9]. Ген, кодирующий этот фермент, является частью кластера генов *MMP*, локализован на 11 хромосоме (11q22.2-q22.3), содержит 10 экзонов и 9 интронов, экспрессируется преимущественно тканевыми макрофагами. Прослеживается тесная связь *MMP-12* с заболеваниями бронхолегочной системы и о значительная роль соответствующего энзима в реакциях легких на неблагоприятные факторы. Для гена *MMP-12* известно несколько полиморфных вариантов, при которых измененная структура гена приводит к изменению его функционала [10].

Цель настоящей работы заключалась в изучении ассоциации полиморфных вариантов rs652438 гена *MMP12* при БА и БЭ и оценка характера окислительного повреждения ДНК, как следствие патологического процесса и ответной реакции генома на индуцированный переменным МП окислительный стресс после воздействия МП *in vitro*.

Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по уровню концентрации 8-охоГ в сыворотке крови, содержание которого определяли методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами наборами реагентов DNA Damage, ELISA на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan. Выделение ДНК производили сорбционным методом, используя наборы реагентов «ДНК-Сорб В». Типирование полиморфного варианта rs652438 гена *MMP12* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе Rotor-Gene (Qiagen, Германия). Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях оксидативной нагрузки образцы цельной крови в выборке из 8 больных БЭ (орфанная патология, ограниченное число больных и трудности с забором биоматериала для исследований) 20 больных БА и 20 условно здоровых доноров [11] обрабатывали переменным МП частотой 3, 30 и 50 Гц в соответствии с методикой, описанной ранее [12].

В группе больных БЭ уровень содержания 8-охоГ изменялся от 10,0 до 22,2 нг/мл и в среднем составлял $14,8 \pm 2,1$ нг/мл, что в 2,1 раза выше, чем в контроле. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

При БА уровень изучаемого метаболита составил в среднем по выборке $9,4 \pm 1,7$ нг/мл, что сопоставимо с контролем. Это дает основание не рассматривать БА как фактор выраженного ОС, проявляющегося на субклеточном уровне и значимо влияющего на целостность наследственного аппарата. Почти двукратное увеличение концентрации 8-охоГ при БЭ свидетельствует о значительной степени нарушения структуры молекулы ДНК. Так как большая часть 8-охоГ образуется в результате воздействия АФК, наблюдаемая в данном случае дестабилизация генома происходит в результате наличия оксидативного генотоксического стресса, который формируется в результате активации реакций свободно-радикального окисления и недостаточности систем антиоксидантной защиты. Выработанная в организме система защиты, призвана восстановить повреждения, однако, имеющее место при БЭ накопление 8-охоГ, может служить триггером мутаций, которые способны ослабить процессы эксцизионной репарации, не позволяя обеспечить восстановление структуры ДНК. При воздействии низкоинтенсивным переменным МП частотой 3 Гц концентрация 8-охоГ достоверно увеличивалась при БЭ, достигая 14,8 нг/мл. Дальнейшее увеличение частоты до 30 Гц и 50 Гц не изменяло этот параметр, оставляя количество 8-охоГ на уровне 14,4 и 13,4 нг/мл соответственно, что говорит о максимальной модификационной подверженности к окислительной модификации в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты. При БА воздействие МП частотой 3 Гц достоверно увеличивало концентрацию изучаемого метаболита до 18,0 нг/мл. При 30 Гц показатель 8-охоГ оставался на уровне предыдущего значения – 17,4 нг/мл, а при 50 Гц снижался до 8,2 нг/мл.

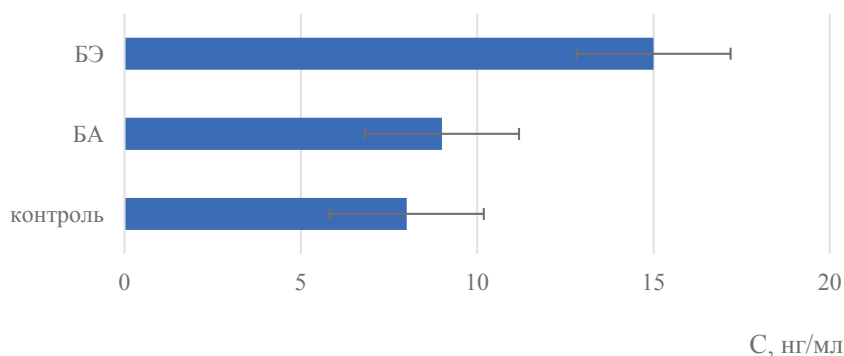


Рисунок 1. Содержание 8-охоГ в сыворотке крови здоровых (контроль), больных БЭ и больных БА. ($U = 1,5$; U критическое = 3 при $p \leq 0,01$; U критическое = 7 при $p \leq 0,05$). С-концентрация 8-охоГ

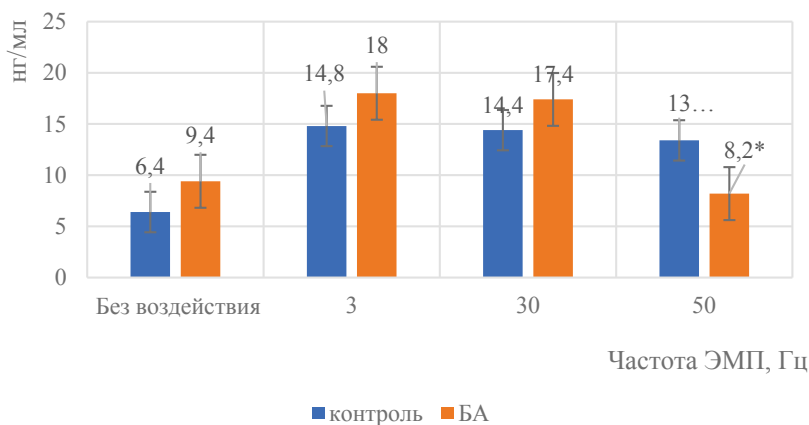


Рисунок 2. Концентрация 8-охоG (нг/мл) в сыворотке здоровых и больных БА в зависимости от частоты переменного МП

Для выявления степени подверженности к окислительной модификации генетического материала в условия фонового состояния системы про- /антиоксиданты у условно здоровых доноров и в условиях ОС у пациентов с БА проведены исследования с индукцией окислительного напряжения под воздействием электромагнитного поля *in vitro*. Характер влияния ЭМП на концентрацию 8-охоG в контрольных образцах крови и при БА представлен на рисунке 2.

Исходный уровень в контрольных образцах составляет 6,4 нг/мл. При воздействии поля интенсивностью 3 Гц концентрация 8-охоG, достоверно увеличивается, достигая 14,8 нг/мл ($U_{\text{эмп}}=10$, $U_{\text{крит}}=23$; $p<0,05$). Дальнейшее изменение частоты до 30 Гц и 50 Гц не меняет этот параметр, оставляя количество 8-охоG на уровне 14,4 и 13,4 нг/мл соответственно, что говорит о максимальной модификационной подверженности к окислительной модификации в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты.

При БА исходный уровень изучаемого метаболита составил 9,4 нг/мл. Воздействие МП частотой 3 Гц достоверно увеличивает его концентрацию до 18,0 нг/мл ($U_{\text{эмп}}=22,5$, $U_{\text{крит}}=23$; $p<0,05$). При 30 Гц показатель 8-охоG остается на уровне предыдущего значения – 17,4 нг/мл, а при 50 Гц снижается до 8,2 нг/мл ($U_{\text{эмп}}=20,5$; $U_{\text{крит}}=23$; $p<0,05$). Индуцированный ЭМП ОС, проявляется практически одинаковой степенью окислительного повреждения генома, что подтверждает достоверное повышение концентрации 8-охоG в обеих группах.

Определены частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs652438 гена *MMP12* в контрольной группе и при БА. Выяснилось, что в контрольной группе условно здоровых доноров преобладающим является генотип AA – 68 человек, что составляет 73%. На долю генотипа AG – приходится 25% (23 человека), генотипа GG – 2% (2 человека). В группе больных БА так же преобладающим оказался генотип AA. Его носителями являются 75 человек, что составляет 88% от общего количества наблюдаемых больных. Гетерозиготный генотип AG имеют 9 человек – 11% и гомозиготный генотип по аллелю GG в данной группе выявлен у одного пациента, что составляет менее 1%. Сопоставление частот генотипов между двумя группами показало наличие достоверных различий для гетерозигот. В контрольной группе этот показатель в 2,3 больше, чем при БА ($p<0,05$). Частоты генотипов AA и GG достоверно не отличаются.

При БА практически во всех случаях происходит ремоделирование дыхательных путей, деградация компонентов внеклеточного матрикса легочной ткани и ее повреждение. *MMP12*, являясь выделяемой макрофагами эластазой, расщепляет эластин, что приводит к потере эластичности бронхиального дерева при бронхо-легочной патологии. Одной из причин этого является высокая активность гена *MMP-12*, не контролируемая тканевыми ингибиторами металлопротеиназ. Протекторный эффект полиморфного варианта локуса rs652438 в отношении развития БА на наш взгляд обусловлен снижением экспрессивности гена *MMP12*, и как следствие, снижением степени деструкции бронхиального дерева. Подавление активности гена может происходить если между аллелями A и G наблюдается разница в способности респонсивных элементов промотора связываться с транскрипционным фактором. Очевидно, для аллеля G это взаимодействие является менее эффективным, чем для аллеля A. С другой стороны, вызванная данным полиморфизмом замена аспарагина на серин сопровождается изменением структуры кодируемого фермента, что тоже может приводить к ингибированию, снижению его активности и агрессивности.

Таким образом, повышение концентрации 8-охоG в биологических жидкостях наблюдаемых пациентов, являющегося молекулярным маркером генотоксического стресса, дает основание считать, что при БЭ происходит значительное окислительное повреждение структуры ДНК, нарушающее молекулярно-генетический статус организма. Возможно, это является одной из причин замедления процессов эксцизионной репарации. Выявление характера повреждения генетического материала клеток при БЭ может внести определенный вклад в дальнейшее понимание этиологии и патогенеза данной патологии. Напротив, при БА количество изучаемого метаболита не отличается от контроля, и это позволяет предположить, что репарационные механизмы при данной патологии, в отличие от БЭ в целом сохраняются, что, вероятно, объясняется наличием достаточных резервов

системы клеточной антиоксидантной защиты у данной категории больных. Установлено, что характер окислительного повреждения ДНК, вызванного действием МП, свидетельствует о более раннем по сравнению с контролем истощении адаптационных механизмов генома при БА. Показан протекторный эффект в отношении развития БА у носителей аллеля G в популяции Краснодарского края. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию этиологии и особенностей патофизиологических процессов при БА и БЭ в условиях индуцированного окислительного стресса.

Список литературы / References:

1. Shinkuma S. Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clinical, cosmetic and Investigational Dermatology*, 2015, vol. 8, pp. 275-284, doi: 10.2147/CCID.S54681.
2. Kiritsi D., Gacia M., Brander R., Has C., Meijer R., Esca mez M.J., Kohlhase J., van der Akker P., Scheffer H., Jonkman M.F., del Rio M., Bruckner-Tuderman L., Pasmooij A.M.G. Mechanisms of Natural Gene Therapy in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, vol. 134, pp. 2097-2104, doi: 10.1038/jid.2014.118.
3. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., McGrath J.A., Riedl R., Robinson C. EB-2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018, vol. 138, pp. 1010-1016, doi: 10.1016/j.jid.
4. Kachkovska V.V., Kovchun A.V., Moyseyenko I.O., Dudchenko I.O., Prystupa L.N. Arg16Gly Polymorphism in the β 2-adrenoceptor gene in patients with bronchial asthma. *Wiadomosci Lekarskie*, 2021, vol. 74, no. 5, pp. 1200-1203.
5. Ba Xueqing, Aguilera-Aguirre L., Rashid Q.T.A.N., Basci A., Radak Z., Sur S., Hosoki K., Hegde M.L., Boldogh I. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, vol. 15, no. 9, pp. 16975-16997, doi: 10.3390/ijms150916975.
6. Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Oxidative Damage to DNA under the Action of an Alternating Magnetic Field. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 564-568, doi: 10.1134/S0006350920040247.
7. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Генерация активных форм кислорода под влиянием СВЧ-излучения и их генотоксическое действие. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2018, т. 52, № 1, с. 56-61. [Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Ilchenko G.P. Generation of reactive oxygen species under the influence of microwave radiation and their genotoxic effect. *Aerospace and Ecological Medicine*, 2018, vol. 52, no. 1, pp. 56-61, doi: 10.21687/0233-528X-2018-52-1-56-61. (In Russ.)]
8. Yokus B., Zulkuf M., Dasdag S. et al. Extremely low frequency magnetic fields cause oxidative DNA damage in rats. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2008, vol. 84, no. 10, pp. 789-795.
9. Шадрина А.С., Плиева Я.З., Кушлинский Д.Н., Филлипенко М.Л., Чанг В.Л., Кушлинский Н.Е. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матричных металлопротеиназ в норме и при патологии. *Альманах клинической медицины*, 2017, т. 45, № 4, с. 266-279. [Shadrina A.S., Plieva Ya.Z., Kushlinsky D.N., Fillipenko M.L., Chang V.L., Kushlinsky N.E. Classification, regulation of activity, genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in normal and pathological conditions. *Almanac of Clinical Medicine*, 2017, vol. 45, no. 4, pp. 266-279, doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279. (In Russ.)]
10. Strelkova M.I., Senatorova G.S., Polyakov V.V. The role of polymorphisms of matrix metalloproteinases' polymorphisms 1 and 12 in the formation of wheezing syndrome among children with recurrent bronchitis. *Wiadomosci Lekarskie*, 2021, vol. 74, no. 7, pp. 1595-1599.
11. Павлюченко И.И., Гусарук Л.Р., Текуцкая Е.Е. База данных результатов исследования полиморфных вариантов генов и степени окислительных повреждений ДНК в популяции жителей отдельного региона. Свидетельство о регистрации базы данных 2022621020, 05.05.2022. Заявка № 2022620895 от 28.04.2022. [Pavlyuchenko I.I., Gusaruk L.R., Tekutskaya E.E. *Database of the results of the study of polymorphic variants of genes and the degree of oxidative damage to DNA in a population of residents of a particular region*. Database registration certificate 2022621020, 05/05/2022. Application No. 2022620895 dated 04.28.2022. (In Russ.)]
12. Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Влияние переменного магнитного поля на хемилюминесценцию лимфоцитов периферической крови человека и производство ими провоспалительных цитокинов. *Биофизика*, 2022, т. 67, № 1, с. 113-120. [Tekutskaya E.E., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Effect of an alternating magnetic field on the chemiluminescence of human peripheral blood lymphocytes and their production of pro-inflammatory cytokines. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 113-120, doi: 10.31857/s0006302922010112. (In Russ.)]

THE DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA AND MMP-12 GENE rs652438 POLYMORPHISM IN MULTIFACTORIAL DISEASES UNDER OXIDATIVE STRESS**Tekutskaya E.E.^{1,2}, Gusaruk L.R.^{1,2}, Pavlyuchenko I.I.^{1,2}**¹Kuban State University*Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 3500400, Russia; e-mail: tekytska@mail.ru*²Kuban State Medical University*Mitrofan Sedin st., 4, Krasnodar, 350063, Russia; e-mail: gusaruk@yandex.ru*

Received 06.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0496

Abstract. The paper presents a comparative analysis of the degree of oxidative DNA damage in epidermolysis bullosa (EB) and bronchial asthma (BA). The degree of oxidative damage to DNA was assessed by the level of 8-oxoguanine (8-oxoG) concentration in blood serum, determined by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies. It was found that the concentration of the modified base 8-oxoG in patients with BE is 2.1 times higher than in the control group. In BA, this indicator changes insignificantly compared to the control. Different concentrations of 8-oxoG in BE and BE indicate the severity of structural DNA damage in BE and the almost absence of oxidative DNA modification in AD, which may indicate different mechanisms of pathophysiological disorders in these nosologies at the cellular level. The content of 8-oxoG in the blood DNA of healthy donors and patients with BE and AD was determined after exposure to an alternating magnetic field (MF) of (550 ± 30) A/m in the frequency range from 3 to 60 Hz in vitro. It was shown that, after MP treatment, there was a significant increase in the levels of 8-oxoG in DNA for both groups, which depended in a complex way on frequency. The effect obtained is explained by the generation of ROS under the influence of magnetic fields and the disruption of DNA repair processes. An analysis of the association of polymorphic variants of the rs652438 locus of the mmp12 gene in AD was carried out. The presence of significant differences in the frequency of heterozygotes was shown. In the control group, this figure is 2.3 more than in BA. The G allele frequency in the group of healthy donors was 0.15, in patients with AD - 0.06. The value of the odds ratio indicates that the influence of the minor allele G is protective in nature, reducing the risk of developing AD for its owners.

Key words: *epidermolysis bullosa, bronchial asthma, oxidative DNA damage, 8-oxoguanine, MMP-12 gene polymorphism*

ДЕЙСТВИЕ КВЧ ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 5,6 ММ НА БИООБЪЕКТЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Жорина Л.В., Матвеев И.Д., Анисеев В.Н.

Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана
(национальный исследовательский университет)

ул. 2-я Бауманская, д. 5, к. 1, г. Москва, 105005, РФ; e-mail: larisa7777@li.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0497

Аннотация. Терапевтическое воздействие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм известно в физиотерапии более полувека. Однако причина такого лечебного действия до сих пор точно не установлена. В этой работе мы провели исследования на основе предположений других авторов. Тушение синглетного кислорода при воздействии КВЧ излучения было проверено на методе фотодинамического воздействия на суспензию эритроцитов. Инкубированная с фотосенсибилизатором Радахлорин в течение получаса суспензия эритроцитов затем одновременно облучалась КВЧ и излучением на 652 нм. Обнаружено, что доза начала фотодинамического эффекта при облучении только видимым излучением и одновременно и видимым излучением и КВЧ излучением совпадают в пределах погрешности измерения. Такой результат может быть вызван недостаточностью количества погашенного синглетного кислорода либо отсутствием эффекта тушения. Терапевтическое действие КВЧ излучения объясняют также расширением мелких сосудов кожи при КВЧ воздействии, что должно привести к повышению температуры поверхности кожи. Нами проведено наблюдение за изменением температуры ладоней правой и левой руки с помощью тепловизора при воздействии КВЧ излучением на акупунктурную точку ТВ5. Наблюдение проводилось в течение 35 минут, 15 из которых проводилось облучение. Обнаружен системный эффект изменения температуры синхронно на обеих ладонях. Повышение средней по площади температуры ладони до 1,5 К наблюдалось только в 41,7% случаев. Подъем температуры активирует иммунную систему, что, по-видимому, и приводит к лечебному действию КВЧ излучения. В то же время установлено, что действие КВЧ излучения на длине волны 5,6 мм существенно зависит от индивидуума и не имеет однозначного характера.

Ключевые слова: КВЧ излучение с длиной волны 5,6 мм, фотодинамическое воздействие, Радахлорин, эритроциты, тепловидение, температура кожи человека.

Терапевтическое воздействие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм известно в физиотерапии более полувека. КВЧ излучение оказывает выраженное обезболивающее, спазмолитическое, иммуномодулирующее действие, широко применяется в разных областях медицины: гастроэнтерологии, урологии, гинекологии, пульмонологии, оториноларингологии, проктологии, кардиологии, хирургии, стоматологии, дерматологии, педиатрии, косметологии, ангиологии и др. Однако причина такого лечебного действия до сих пор точно не установлена. Имеется несколько версий [1]. Например, в работах [2,3] установлено тушение синглетного кислорода при воздействии КВЧ излучения на частоте 41,95 ГГц (длина волны 7,15 мм) плотностью мощности 50 мкВт/см² и в диапазоне частот 53,57...78,33 ГГц (диапазон длин волн 5,6...3,8 мм) мощностью 0,2...1,5 мкВт. Проведенные исследования показали, что при включении в комплексное лечение пневмоний КВЧ терапии достоверно уменьшается уровень гидроперекисей липидов, увеличивается суммарная антиокислительная активность сыворотки крови, уменьшается дисбаланс свободнорадикального перекисного гомеостаза [4]. В методе фотодинамического воздействия одним из результатов передачи энергии, поглощённой фотосенсибилизатором (ФС), является производство синглетного кислорода, в результате чего и происходит гибель клеток, накопивших ФС. Использование этого эффекта даёт возможность проверки факта тушения синглетного кислорода при КВЧ воздействии *in vitro*.

Терапевтическое действие КВЧ излучения объясняют также расширением мелких сосудов кожи при КВЧ воздействии [5]. Электромагнитное излучение КВЧ-диапазона оказывает положительное влияние на систему микроциркуляции и на состояние стенок артериол и венул, увеличивая скорость и интенсивность капиллярного кровотока, отмечается увеличение калибра артериол [4]. Такое влияние на систему микроциркуляции должно приводить к увеличению температуры поверхности тела [6,7].

Целью работы является проверка наличия эффекта тушения синглетного кислорода, выработанного в результате фотодинамического эффекта в суспензии эритроцитов, при облучении КВЧ излучением с длиной волны 5,6 мм, а также наблюдение изменения температуры поверхности кожи человека при точечном воздействии того же излучения.

МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ

Первый из поставленных опытов имел следующую схему. Суспензия эритроцитов в физрастворе (0,9% NaCl) была инкубирована в течение получаса с ФС, а затем одновременно облучалась КВЧ излучением и светодиодным матричным облучателем (рис. 1). Дополнительно проведены контрольные наблюдения

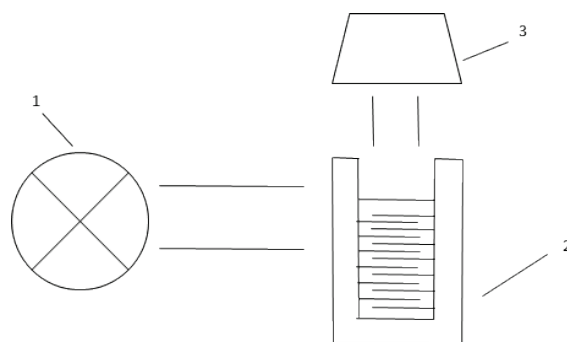


Рисунок 1. Схема облучения суспензии эритроцитов матричным облучателем и КВЧ облучателем: 1 – матричный облучатель; 2 – кювета с исследуемой жидкостью; 3 – КВЧ-облучатель

фотодинамического эффекта (ФДЭ) при облучении суспензии эритроцитов только светодиодным матричным облучателем и только КВЧ излучением.

В качестве фотосенсибилизатора использовался Радахлорин (РХ), предоставленный компанией «Рада-Фарма» (Россия), в форме, предназначенной для внутривенного введения. Первоначально препарат (3,5 мг/мл) разводили в 0,9% растворе NaCl (физиологический раствор) по инструкции фирмы «Рада-Фарма». В суспензии эритроцитов РХ был в четырёхсоткратном разведении. В качестве исследуемых образцов были использованы образцы крови с добавлением гепарина натрия для стабилизации свойств суспензии эритроцитов в ходе серии опытов (каждая серия измерений проводилась в течение одного рабочего дня в одинаковых условиях). Кровь можно рассматривать как взвесь эритроцитов в почти прозрачной среде. Изменение формы эритроцита приводит к изменению оптических характеристик взвеси. Суммарная экстинкция минимальна при полной сферуляции эритроцитов. Полный гемолиз крови приводит к резкому падению оптической плотности. За основу методики эксперимента взят тот факт, что в результате фотодинамического воздействия кровь из классической мутной среды превращается в раствор, близкий к коллоидному. Согласно приведенным выше рассуждениям, увеличение оптического пропускания образцов будет означать увеличение количества погибших клеток. Пропускание взвеси эритроцитов измеряли с помощью фотоколориметра КФК-2. Состояние эритроцитов контролировали визуально с помощью поляризационно-интерференционного микроскопа типа BIOLAR.

Для облучения образцов использовались следующие источники:

Облучение суспензии эритроцитов для фотодинамического воздействия проводилось с помощью светодиодной матрицы с длиной волны максимума излучения 652 нм, полушириной спектра излучения на полувысоте 14 нм и плотностью мощности 3,5 мВт/см².

При расчете дозы облучения для ФДЭ учитывали мощность излучателя, время облучения, площадь засветки и потери мощности на границе стекло-воздух кюветы, которая составляла около 4%. Дозой начала ФДЭ считалась такая доза облучения светодиодным матричным облучателем, при которой пропускание суспензии эритроцитов увеличивалось на 10%.

Источником КВЧ излучения служил прибор КВЧ-НД2, плотность мощности излучения которого на расстоянии 18 мм, измеренная прибором Narda NBM-550, составила 130 мкВт/см². Длина волны излучения 5,6 мм. Облучение суспензии эритроцитов проводилось в ближнем поле рупорной антенны, расположенной вертикально, суспензия находилась на расстоянии 1 см от открытого конца рупора, т.е. в ближней зоне антенны (рис. 1).

Суспензия эритроцитов в физрастворе (0,9% NaCl) была инкубирована в течение получаса с РХ, а затем одновременно облучалась КВЧ и светодиодным матричным облучателем. КВЧ излучение попадало непосредственно на суспензию эритроцитов (рис. 1). На выходе из суспензии эритроцитов плотность мощности КВЧ излучения составила 30 мкВт/см². Облучение образца проводилось в течение 1 минуты, затем измерялось пропускание образца. Облучение повторялось до полной гибели клеток.

Для изучения уровня микроциркуляции при «точечном» облучении человека КВЧ излучением нами проведено наблюдение за изменением температуры ладоней правой и левой руки с помощью тепловизора при воздействии КВЧ излучением на акупунктурную точку ТВ5 (Вай Гуан) на тыльной стороне правого предплечья. Акупунктурная точка выбрана, обращая внимание на отсутствие фатальных эффектов после воздействия. Точка Вай Гуань находится во впадине между лучевой и локтевой костями, на лучевой стороне сухожилий общего разгибателя пальцев. Человек, согласившийся принять участие в эксперименте, за 15-20 минут до воздействия закатывал рукав на правой руке, чтобы привыкнуть к температуре окружающей среды, и старался ничего не делать правой рукой. Затем человек находил точку Вай Гуань на расстоянии трех пальцев от запястья (рис. 2). Мы прижимали палец к найденной точке, человек двигал пальцами, и, если в этой точке мы не чувствовали движений сухожилий и мышц, значит, мы нашли нужную точку. Затем человек садился перед столом так, чтобы правая рука могла удобно лежать, а объектив тепловизора был направлен на раскрытую ладонь. В эксперименте принимало участие 12 человек обоих полов от 20 до 70 лет. Наблюдение проводилось в течение 35 минут, 15 из которых проводилось облучение.



Рисунок 2. Определение положения точки Вай Гуань

Для измерения температуры использовали тепловизор Thermal Expert™ TE-V1 (Республика Корея). Он имеет неохлаждаемый микроболометрический детектор с форматом матрицы 640×480 и шагом пикселя 17 мкм. Частота кадров меньше 9 Гц. Тепловая чувствительность (NETD) составляет около 50 мК, диапазон регистрируемых длин волн – 8...14 мкм, диапазон измеряемых температур – -10 °С...120 °С. Камера располагалась на штативе и была направлена на ладонь испытуемого. С помощью тепловизионной камеры фотографировали ладонь испытуемого в ходе эксперимента, воздействуя точечно КВЧ излучением на точку Вай Гуань. Снимали термограммы ладони правой руки, на которую производили воздействие, в течение 15 мин каждую минуту и после воздействия в течение 20 мин каждую минуту. Также одновременно каждую минуту снимали термограмму левой руки, на которую воздействие не производилось. Полученные термограммы обрабатывали в программе TE_Analyst 1.13. Среднюю температуру T_{cp} рассчитывали по площади ладони обнаженной руки с помощью той же программы. Стандартное отклонение рассчитанных параметров не превышало 0,5 К. Для описания наблюдаемых эффектов рассчитывали отклонение ΔT_{cp} средней температуры от исходного значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе результатов измерения увеличения оптического пропускания обнаружено, что доза начала ФДЭ при облучении только матричным облучателем ($4,04 \pm 0,23$ Дж) и одновременно и матричным облучателем, и КВЧ облучателем ($3,81 \pm 0,31$ Дж) совпадают в пределах погрешности измерения. Контрольные измерения оптического пропускания неинкубированной с РХ суспензии эритроцитов, облучённой только КВЧ излучением, показали отсутствие ФДЭ. Также было измерено изменение оптического пропускания образца, инкубированного с РХ в течение 60 минут и облучённого одновременно и матричным облучателем, и КВЧ облучателем. При этом в качестве подтверждения теории о накоплении РХ в клетках оказалось, что доза начала эффекта (3,48 Дж) ниже, чем для эритроцитов, инкубированных 30 минут, что означает накопление РХ в клетках в большем количестве и, как следствие, синглетного кислорода после облучения вырабатывается больше, доза начала эффекта снижается. Облучение КВЧ при этом никак не повлияло на ФДЭ.

Описанный результат совпадения доз начала ФДЭ может быть вызван недостаточностью количества потушенного синглетного кислорода либо отсутствием эффекта тушения как такового. В данном эксперименте на дозу начала ФДЭ не повлияло ни снижение жёсткости мембран, ни повышение прочности эритроцитов при воздействии КВЧ излучения [5].

Обратимся теперь к тепловизионным наблюдениям. Изменение температуры поверхностью кожи человека, измеренное с помощью термографии, однозначно коррелирует с уровнем микроциркуляции в коже [6,7]. При воздействии КВЧ излучением на акупунктурную точку ТВ5 (Вай Гуань) на тыльной стороне правого предплечья обнаружено, что изменение температуры происходило синхронно на обеих ладонях, что говорит о наличии системного эффекта. Повышение T_{cp} , соответствующее росту уровня микроциркуляции, наблюдалось только в 41,7% случаев. На обеих ладонях к 35 минуте наблюдения (20й минуте после окончания воздействия) оно составило около 1,5 К. Рост температуры на 1 К к 5 минуте после начала облучения, а затем постепенное падение до уровня на 0,4 К ниже первоначального значения к 35 минуте наблюдения отмечалось в 16,7% случаев. Вероятно, при воздействии КВЧ излучения возможна активация некоторых веществ, которые заставляют гипоталамус поднимать температуру тела. Подъём температуры на 1 градус в несколько раз активует иммунную систему. Стимуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток КВЧ излучением носит универсальный характер [4]. Это, по-видимому, и приводит к лечебному действию КВЧ излучения. В то же время установлено, что действие КВЧ излучения на длине волны 5,6 мм существенно зависит от индивидуума и не имеет однозначного характера.

Список литературы / References:

1. Drean Y., Mahamoud Y.S., Page Y., Habauzit D., Quément C., Zhadobov M., Sauleau R. State of knowledge on biological effects at 40–60 GHz. *Comptes Rendus Physique*, 2013, vol. 14, pp. 402-411, doi: 10.1016/j.crhy.2013.02.005.
2. Gareyev A.B., Yakushina V.S., Chemeris N.K., Fesenko E.E. Modification of production of reactive oxygen

species in mouse peritoneal neutrophils on exposure to low-intensity modulated millimeter wave radiation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, vol. 46, pp. 267-272.

3. Овощникова Л.В., Корягин А.С., Елисеева А.А. Влияние КВЧ-излучения на систему крови и перекисное окисление липидов при экспериментальной лучевой болезни. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия: Биология*, 2001, № 2, с. 31-36. [Ovoshnikova L.V., Koryagin A.S., Eliseeva A.A. Influence of EHF radiation on the blood system and lipid peroxidation in experimental radiation sickness. *Bulletin of the Nizhny Novgorod University. N.I. Lobachevsky. Series: Biology*, 2001, no. 2, pp. 31-36. (In Russ.)]

4. Истомина И.С. Квч-терапия в клинической практике (Часть II) *Физиотерапия, бальнеология и реабилитация*, 2012, № 6, с. 38-45. [Istomina I.S. EHF-therapy in clinical practice (Part II). *Physiotherapy, balneology and rehabilitation*, 2012, no. 6, pp. 38-45. (In Russ.)]

5. Чуян Е.Н., Трибрат Н.С. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на процессы микроциркуляции. *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия*, 2008, т. 21 (60), № 1, с. 156-166. [Chuyan E.N., Tribirat N.S. Influence of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency on microcirculation processes. *Scientific notes of the Taurida National University named after V.I. Vernadsky. Series: Biology, chemistry*, 2008, vol. 21 (60), no. 1, pp. 156-166. (In Russ.)]

6. Sagaidachnyi A.A., Volkov I.Y., Fomin A.V., Skripal A.V. Investigation of thermal wave propagation within the model of biological tissue and the possibility of thermal imaging of vasomotor activity of peripheral vessels. *Russian Journal of Biomechanics*, 2019, vol. 23, no. 2, pp. 209-217.

7. Sagaidachnyi A.A., Fomin A.V., Usanov D.A., Skripal A.V. Thermography-based blood flow imaging in human skin of the hands and feet: a spectral filtering approach. *Physiol Meas.*, 2017, vol. 38, no. 2, pp. 272-288, doi: 10.1088/1361-6579/aa4eaf.

THE EFFECT OF EHF RADIATION WITH A WAVELENGTH OF 5.6 MM ON BIOLOGICAL OBJECTS IN VITRO AND IN VIVO

Zhorina L.V., Matveev I.D., Anikeev V.N.

Bauman Moscow State Technical University

2nd Baumanskaya st., 5, build. 1, Moscow, 105005, Russia; e-mail: larisa7777@li.ru

Received 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0497

Abstract. The reason for therapeutic effect of EHF radiation with a wavelength of 5.6 mm has not been precisely established yet. In this work, we conducted research based on the assumptions of other authors. The quenching of singlet oxygen under the influence of EHF radiation was tested using the method of photodynamic action on a suspension of erythrocytes. The suspension of erythrocytes, incubated with the photosensitizer, was then simultaneously irradiated with EHF and radiation at 652 nm. It was found that the dose of the onset of the photodynamic effect when irradiated only with visible radiation and simultaneously with both visible radiation and EHF radiation coincides within the measurement error. Such a result can be caused by insufficient amount of quenched singlet oxygen or by the absence of the quenching effect. The therapeutic effect of EHF radiation is also explained by the expansion of small skin vessels during EHF exposure, which should lead to an increase in the temperature of the skin surface. We have observed the change in the temperature of the palms using a thermal imager when exposed to EHF radiation on the acupuncture point TB5. The observation was carried out for 35 minutes. The irradiation was during 15 minutes. A systemic effect of temperature change synchronously on both palms was found. An increase in the area-average temperature of the palm up to 1.5 K was observed only in 41.7% of cases. The rise in temperature activates the immune system, which, apparently, leads to the therapeutic effect of EHF radiation. At the same time, it has been established that the effect of EHF radiation at a wavelength of 5.6 mm significantly depends on the individual and is not unambiguous.

Key words: EHF radiation with a wavelength of 5.6 mm, photodynamic effect, Radachlorin, erythrocytes, thermal imaging, human skin temperature.

НАНОСЕКУНДНЫЕ МИКРОВОЛНОВЫЕ ИМПУЛЬСЫ ВЛИЯЮТ НА СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Большаков М.А.^{1,3}, Самойлова А.В.^{1,3,4}, Гостюхина А.А.^{1,2,3}, Дорошенко О.С.^{2,3},
Кутенков О.П.¹, Зайцев К.В.², Ростов В.В.¹

¹Институт сильноточной электроники СО РАН
пр. Академический, 2/3, г. Томск, 634055, РФ

²Томский НИИКиФ ФФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России
ул. Р. Люксембург, 1, г. Томск, 634009, РФ

³Национальный исследовательский Томский государственный университет
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, РФ

⁴Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0498

Аннотация. На 17 культурах стволовых клеток (СК), выделенных из бедренной кости лабораторных крыс «Wistar» экспериментально исследовано изменение скорости пролиферации клеток *in vitro* после облучения 4000 наносекундных микроволновых импульсов с пППМ 140 и 1500 Вт/см² при частотах повторения импульсов 8 и 13 Гц. Установлено, что воздействие наносекундным ИПМИ с обеими интенсивностями оказывает влияние на скорость пролиферации СК. После воздействия 4000 импульсов ИПМИ с пППМ 140 и 1500 Вт/см² и частотой повторения импульсов 8 Гц наблюдалось ингибирование пролиферации клеток относительно контрольной группы. После воздействия с частотой повторения импульсов 13 Гц при тех же самых интенсивностях имело место стимулирование пролиферации, в результате чего количество стволовых клеток в исследуемых культурах увеличивалось. Основной выявленной закономерностью является зависимость эффекта (от частоты повторения импульсов и, отчасти, от интенсивности). Понимание закономерностей позволит выбирать и использовать наиболее оптимальный режим воздействия для достижения необходимого результата, а знание первичного механизма позволит усилить или ослабить эффект, в частности, сочетанным воздействием ИПМИ с другими факторами.

Ключевые слова: наносекундные микроволновые импульсы, стволовые клетки, пролиферация, эффекты.

Для клеточной трансплантологии и терапии особый интерес и важность представляют новые методы масштабирования стволовых клеток для дальнейшего эффективного использования в регенеративной медицине. В настоящее время особое внимание уделяется исследованиям, посвящённым оценке пролиферативного потенциала и регенеративных возможностей СК. Для регулирования этих процессов используются дорогостоящие и труднодоступные импортные специализированные питательные среды, которые, не смотря на их эффективность, требуют продолжительного применения для получения необходимого количества стволовых клеток. Полагают, что эффективным способом активации пролиферации стволовых клеток могут быть различные физические факторы [1]. Существенный научный интерес с точки зрения влияния на пролиферативные способности клеточных культур может представлять использование наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ). При малых длительностях импульсов излучение имеет высокую напряженность электрического поля, может варьировать по частоте повторения импульсов, их количества, что позволяет использовать разные варианты воздействия для достижения необходимого биологического эффекта. Как было установлено ранее, ИПМИ при определённых параметрах эффективно влияет на функциональное состояние целого ряда клеток и тканей [2-5].

Целью настоящей работы являлось экспериментально оценить способность наносекундных микроволновых импульсов изменять скорость пролиферации стволовых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 17 культурах СК, выделенных из бедренной кости лабораторных крыс «Wistar» общепринятым стандартным методом [6]. Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами биоэтики [7]. На 12-14 сутки культивирования формировался 95-100% монослой стволовых клеток, которые далее подвергались воздействию ИПМИ. Жизнеспособность СК после культивирования составляла 91,5±2%. Полученные культуры были разделены на группы: контрольная – культуры клеток, которые не подвергались никаким воздействиям и располагались в CO₂ инкубаторе и облученные группы – культуры клеток, которые подвергались однократному воздействию ИПМИ. Просмотр клеток и их подсчёт проводился на микроскопе Optika XDS-2SFL (Италия) при 20-кратном увеличении. Каждая культура до начала эксперимента содержала в себе 5–8 (×10⁶) СК.

Облучение стволовых клеток наносекундным ИПМИ. В качестве источника ИПМИ использовался лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО «Тантал», Россия). Облучение СК проводилось в культуральных флаконах в дальней зоне рупора антенны сечением 40×90 мм на расстоянии 20 см от культуры клеток, что обеспечивало равномерное воздействующие поле. Клетки облучались однократно 4000 импульсами ИПМИ (несущая частота генератора 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс) с частотами повторения импульсов 8 и 13 Гц и длительностью экспозиции 8 и 5 минут, соответственно. Пиковые интенсивности 140 и 1500 Вт/см² оценивались с помощью стандартных методик на основе антенных измерений и калориметрических калибровок [8]. Во время радиочастотного электромагнитного воздействия осуществлялся температурный контроль с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия). По скорости роста температуры в клеточной культуре рассчитывалось значение удельной поглощаемой мощности (УПМ) в соответствие с [9].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statsoft STATISTICA for Windows 8.0. При обработке результатов они проверялись на нормальность распределения исследуемого признака с помощью критерия Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде процента (%) стволовых клеток в культуре [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что стволовые клетки, выделенные из бедренной кости лабораторных крыс, по своему состоянию являются чувствительными к воздействию наносекундным ИПМИ. Облучение наносекундными микроволновыми импульсами влияет на скорость пролиферации СК и эффект зависит от частоты повторения импульсов.

Было установлено, что после воздействия 4000 импульсов ИПМИ с пППМ 140 и 1500 Вт/см² при частоте повторения импульсов 8 Гц происходит ингибирование пролиферации стволовых клеток в культуре как относительно контрольной группы и обучаемых клеток до воздействия (табл. 1). Облучение стволовых клеток ИПМИ с теми же интенсивностями, но при частоте повторения импульсов 13 Гц инициировало стимуляцию пролиферации, что сопровождалось увеличением количества стволовых клеток в исследуемых культурах (табл. 1). При продолжительном наблюдении (в течение 20 дней) за культурами клеток, облученных с интенсивностью 140 Вт/см² и частотой 13 Гц было отмечено более быстрое образование монослоя на 4-6 суток в сравнении с контролем (12-14 суток).

Проведенный термометрический контроль нагрева клеточных культур показал, что после воздействия 4000 импульсов при частоте повторения импульсов 13 Гц и интенсивности ИПМИ 140 Вт/см² нагрев в культуре не превышал 0,1°C. На линейном участке роста температуры продолжительностью 40-50 с скорость нагрева была оценена приблизительно как 0,002 градуса за секунду. Значение УПМ при такой скорости роста температуры составила около 1.0 Вт/кг. Исходя из этого представляется, что первичный физический механизм влияния наносекундного ИПМИ на стволовые клетки имеет нетепловую природу.

Физиологический механизм формирования эффекта ИПМИ на СК можно рассматривать как итоговый баланс контроля скоростей пролиферации двумя противоположно молекулярно-клеточными системами, активируемыми воздействием ИПМИ. При этом воздействие с частотой повторения 13 Гц активирует преимущественно процессы стимуляции пролиферации, в то время как после облучения с частотой повторения 8 Гц инициируется процесс ингибирования. Механизм подобной частотной зависимости, возможно, аналогичен тому, что предполагает модель «частотно-энергетических окон» W.R. Adey [11]. Согласно этой модели, наибольший эффект формируется при оптимальных интенсивностях электромагнитного микроволнового воздействия, частоте модуляций и важную роль играют ионы кальция. В процессе управления скоростью пролиферации клеток принято учитывать ряд обстоятельств: пути передачи сигналов, время их проведения, уровень и длительность конкретного сигнала, поскольку эти переменные влияют на физиологический клеточный

Таблица 1. Количество стволовых клеток лабораторных крыс в культуре после воздействия наносекундным ИПМИ (в % по отношению к контрольным значениям)

Группа		Исходное количество СК, % (n×10 ⁶)	Через 24 часа, %		Через 72 часа, %	
			1	2	1	2
Контроль		100 (5,9)	101	101	105	105
8 Гц	140 Вт/см ²	100 (7,9)	125	94	40	31
	1500 Вт/см ²	100 (6,7)	93	78	61	56
13 Гц	140 Вт/см ²	100 (6,1)	112	109	120	123
	1500 Вт/см ²	100 (7,6)	120	110	144	131

Примечание: результаты представлены в виде показателя % СК в культуре; 1 – показатель % СК в облученной культуре по отношению к контролю в соответствующие часы измерения; 2 – показатель % СК внутри соответствующей облученной культуры в сравнении исходными значениями

ответ [12]. В реализации перечисленных обстоятельств ключевую роль играют также ионы кальция [13]. Подобное совпадение актуализирует использование модели W.R. Adey применительно к регулированию пролиферации стволовых клеток воздействием ИПМИ.

По результатам, полученным при выполнении исследования, основной выявленной закономерностью является зависимость эффекта (по его величине и характеру реализации) от частоты повторения импульсов и, отчасти, от интенсивности. Понимание закономерностей позволит выбирать и использовать наиболее оптимальный режим воздействия для достижения необходимого результата, а знание первичного механизма позволит усилить или ослабить эффект, в частности, сочетанным воздействием ИПМИ с другими факторами (химическими, фармакологическими и др.).

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что облучение СК наносекундными импульсными микроволнами допускает изменение их скорости пролиферации. Это допускает возможность в управлении скорости роста клеток *in vitro*. Исходя из этого становятся актуальными дальнейшие исследования и уточнения оптимальных режимов воздействия ИПМИ (пППМ, частота повторения импульсов, количество импульсов и повторности воздействия). При этом такие биофизические показатели воздействия необходимо выявлять из конкретных задач регенеративной медицины при замещении в поврежденной ткани специфических клеток, репродуцируемых из стволовых клеток. Более того, при разработке портативного оборудования на основе наносекундного ИПМИ для персонализированной медицины с последующим их внедрением и активным использованием в учреждениях медицинского профиля также необходимо учитывать эти данные.

Список литературы / References:

1. Москвин С.В., Ключников Д.Ю., Антипов Е.В., Горина А.И., Киселева О.Н. Воздействие непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro*: обзор литературы и собственные исследования. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 2016, № 2, с. 32-42. [Moskvin S.V., Klyuchnikov D.Yu., Antipov E.V., Gorina A.I., Kiseleva O.N. The influence of continuous low-intensity laser radiation at the red (635 nm) and green (525 nm) wavelengths on the human mesenchymal stem cells *in vitro*: a review of the literature and original investigations. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kul'tury*, 2016, no 2, pp. 32-42. (In Russ.)]
2. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В., Большаков М.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*, 2010, № 333, с. 161-163. [Zharkova L.P., Knyazeva I.R., Ivanov V.V., Bolshakov M.A., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Repetitive pulsed X-ray and microwaves effect on peroxide level in isolated hepatocytes. *Vestnik TSU*, 2010, no. 333, doi: 10.17223/15617793 (In Russ.)]
3. Князева И.Р., Медведев М.А., Жаркова Л.П., Гостюхина А.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Большаков М.А. Действие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на процессы регенерации. *Бюллетень сибирской медицины*, 2011, т. 10, № 6, с. 109-113. [Knyazeva I.R., Medvedev M.A., Zharkova L.P., Gostyukhina A.A., Kutenkov O.P., Rostov V.V., Bolshakov M.A. The influence of nanosecond microwave pulses on the regeneration processes. *The Bulletin of the Sib. Med.*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 109-113. (In Russ.)]
4. Кереев А.В., Большаков М.А., Жаркова Л.П. и др. Эффект воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на эпидидимальную жировую ткань мышей. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2014, т. 54, № 6, с. 606-612. [Kereev A.V., Bolshakov M.A., Zharkova L.P. i dr. Effekt vozdejstviya nanosekundnogo impul'sno-periodicheskogo mikrovolnovogo izlucheniya na epididimal'nyuyu zhirovuyu tkan' myshej. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2014, vol. 54, no. 6, doi: 10.7868/S0869803114060071. (In Russ.)]
5. Кереев А.В., Большаков М.А., Ходанович М.Ю., Немирович-Данченко Н.М., Кутенков О.П., Ростов В.В. Оценка степени активности белка c-fos в структурах мозга мышей на воздействие наносекундных микроволновых импульсов. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 2, с. 179-184. [Kereev A.V., Bolshakov M.A., Khodanovich M.Yu., Nemirovich-Danchenko N.M., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Evaluation of mice brain reactions after nanosecond microwave pulses using c-fos expression. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2017, vol. 57, no. 2, pp. 179-184, doi: 10.7868/S0869803117020072. (In Russ.)]
6. Шахов В.П. и др. *Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей*. Томск: STT, 2004, 386 с. [Shahov V.P. i dr. *Vvedenie v metody kul'tury kletok, bioinzhenierii organov i tkanej*. Tomsk: STT; 2004, 386 p. (In Russ.)]
7. РФ ГОСТ Р-53434-2009 *Принципы надлежащей лабораторной практики*. М.: Стандартинформ, 2010. [RF GOST R-53434-2009 *Principles of Good Laboratory Practice*. М.: Standartinform, 2010. (In Russ.)]
8. Klimov A.I., Eltchaninov A.A., Konobeeva E.Yu. Measurements of Parameters of X-Band High-Power Microwave Pulses. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Fizika. Russian Physics Journal*, 2006, vol. 49, no. 11, pp. 431-434.
9. Bolshakov M.A., Alekseev S.I. Bursting Responses of Lymnaea Neurons to Microwave Radiation. *Bioelectromagnetics*, 1992, vol. 13, no. 3, pp. 119-129, doi: 10.1002/bem.2250130206.
10. Медик В.А. *Статистика в медицине и биологии*. М.: Медицина, 2000, 412 с. [Medic V.A. *Statistics in medicine and biology*. М.: Medicine, 2000, 412 p. (In Russ.)]
11. Adey W.R. Biological effects of electromagnetic fields. *J. Cell Biochem*, 1993, vol. 51, no. 4, pp. 410-416.

12. Hou J.F. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Laser Surgery Medicine*, 2008, vol. 40, no. 10, pp. 726-733.

13. Kaivosoja E. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, vol. 9, no. 1, pp. 31-40.

NANOSECOND MICROWAVE PULSES AFFECT STEM CELL PROLIFERATION RATE

Bolshakov M.A.^{1,3}, Samoylova A.V.^{1,3,4}, Gostyukhina A.A.^{1,2,3}, Doroshenko O.S.^{2,3}, Kutenkov O.P.¹, Zaitsev K.V.², Rostov V.V.¹

¹ Institute of High Current Electronics SB RAS
Akademicheskoy Ave., 2/3, Tomsk, 634055, Russia

² Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

R. Luxembourg Str., 1, Tomsk, 634009, Russia

³ National research Tomsk State University
Lenin Str., 36, Tomsk, 634050, Russia

⁴ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Moscow tract, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

Received 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0498

Abstract. On 17 cultures of stem cells (SK) isolated from the femur of laboratory rats «Wistar», the change in the rate of cell proliferation in vitro after irradiation with 4000 nanosecond microwave pulses with a pPFD of 140 and 1500 W/cm² at pulse repetition rates of 8 and 13 Hz was experimentally studied. It has been established that exposure to nanosecond RPMR with both intensities affects the rate of proliferation SK. After exposure to 4000 RPMR pulses with 140 and 1500 W/cm² pPFD and a pulse repetition rate of 8 Hz, inhibition of cell proliferation was observed relative to the control group. After exposure to a pulse repetition rate of 13 Hz at the same intensities, stimulation of proliferation took place, as a result of which the number of stem cells in the studied cultures increased. The main revealed pattern is the dependence of the effect (on the pulse repetition rate and, in part, on the intensity). Understanding the patterns will allow choosing and using the most optimal mode of exposure to achieve the desired result, and knowledge of the primary mechanism will make it possible to enhance or weaken the effect, in particular, the combined effect of RPMR with other factors.

Key words: nanosecond microwave pulses, stem cells, proliferation, effects.

МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, РФ; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0499

Аннотация. На основании анализа ранее полученных данных об однотипности функционирования физико-химической системы регуляции окислительных процессов в биологических системах разной сложности и данных литературы о способности фосфолипидов к спонтанной агрегации в полярных средах предложены четыре модельные системы на основе природных липидов для первичной оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты. Это низкотемпературное автоокисление лецитина в полярной среде, математическая обработка УФ-спектров лецитина и его смесей с компонентами водной среды по методу Гаусса, спонтанная агрегация лецитина в различных полярных средах, величина ξ -потенциала образованных частиц. В качестве модельных токсикантов использовали тиофосфат натрия и ионы двухвалентной меди. Показано, что масштаб влияния тиофосфата натрия на кинетику окисления лецитина зависит от исходной интенсивности окисления лецитина и состава его фосфолипидов. Это согласуется с ранее полученными данными по влиянию химических токсикантов при поступлении их в организм на состояние процессов перекисного окисления липидов в органах животных. Установлено, что ионы меди участвуют в инициации окисления лецитина и образуют комплекс с его фосфолипидами. Это влияет на способность лецитина к спонтанной агрегации и электрофоретические свойства сформированных частиц. Таким образом, лабильность липидного компонента природных липидов позволяет выявить воздействие компонентов природной среды на биологические системы разной сложности уже на уровне сложных биологических модельных систем.

Ключевые слова: лецитин, автоокисление, УФ-спектрометрия, метод Гаусса, светорассеяние, мицеллообразование, ξ -потенциал, тиофосфат натрия, ионы двухвалентной меди.

На состав природной воды, представляющей собой сложную многокомпонентную систему, существенное влияние оказывает и способность различных загрязнителей перемещаться на значительные расстояния от источников загрязнения. Выявленная способность воды к самоорганизации вследствие образования водородных связей обусловила интерес исследователей к изучению структуры жидкой воды. Уже к началу XXI века был накоплен обширный экспериментальный материал, результаты которого позволили сформулировать следующие представления. Было показано, что неорганические соли, антиоксиданты и низкомолекулярные органические соединения даже в незначительных количествах оказывают влияние как на структурное состояние воды, так и на физико-химические свойства мембран биологических объектов [1-6]. Необходимо отметить, что нормальное функционирование сложных систем обусловлено протеканием в них окислительных процессов, играющих важную роль как в оценке качества воды, так и в регуляции метаболизма в биологических системах разной сложности [7,8]. Стационарность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) поддерживается физико-химической системой регуляции, а однотипность функционирования этой системы на разных уровнях организации биологических объектов (мембранном, клеточном, органном) [9] позволяет предложить использование модельных систем для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты.

В связи с изложенным целью работы явилась разработка четырех модельных систем на основе природных липидов для быстрой оценки воздействия компонентов водной среды на сложные биологические объекты

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели природных липидов был выбран соевый лецитин, представляющий собой смесь природных липидов, среди которых не менее 50% составляют фосфолипиды (ФЛ). В работе использован 10%-ный водно-этанольный раствор лецитин-стандарта («БИОЛЕК», Харьков, Украина). После вскрытия ампулы и отгонки исходного растворителя готовили растворы лецитина либо в дистиллированной воде (окисление, мицеллообразование, УФ-спектрометрия), либо в хлороформе (анализ состава липидов). Тиофосфат натрия и ионы двухвалентной меди были выбраны как модель загрязнителей. Для приготовления растворов тиофосфата натрия использовали реагент марки ОСЧ фирмы Sigma-Aldrich и трижды дистиллированную воду. Растворы ионов Cu^{2+} готовили из кристаллогидрата сульфата меди марки ХЧ после предварительного прокалывания соли в сушильном шкафу при 105°C . Все растворы готовили непосредственно перед экспериментом.

Спонтанное окисление лецитина проводили при 20°C . За ходом окисления следили по накоплению продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБК-АП). Их содержание определяли на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ («ЭКРОС», Россия) при длине волны 532 нм по методу, описанному в работе [10], и относили к 1 мг лецитина в пробе.

Спектрофотометрические измерения водных растворов лецитина, тиофосфата натрия, ионов меди и их смесей проводили в кварцевых кюветах толщиной 1 см в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм, используя спектрофотометр “Shimadzu UV-1700 PharmaSpec” (Shimadzu, Япония). Полученные дифференциальные УФ-спектры подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver путем минимизации суммы квадратов разности между экспериментальным и расчетным спектрами после аппроксимации на уровне $10^{-3} - 10^{-5}$. Количество функций Гаусса при аппроксимации зависело от вида спектра.

Качественный состав липидов лецитина анализировали методом ТСХ, используя стеклянные пластинки размером 9×12 см, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: дистиллированная вода в соотношениях 12,5:7,5:2:1 в качестве мобильной фазы [11]. Хроматограммы проявляли в парах йода. Количественный анализ содержания отдельных фракций проводили после удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их до неорганического фосфата спектрофотометрически по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты при 815 нм (ПЭ5400ВИ, Россия). Методические подробности и оценка обобщенных показателей состава липидов приведены в работах [12,13].

Размер и дзета-потенциал (ζ -потенциал) агрегатов лецитина в водной среде определяли методом динамического рассеяния света, используя прибор Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при температуре 25°C и угле рассеяния 173° . Прибор снабжен гелий-неоновым лазером (длина волны 633 нм) и автоматической программой Zetasizer Software 6.20 для сбора и первичной обработки данных. Измерения проводили спустя 2-4 час после приготовления растворов. Подробности измерений приведены в работе [13].

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel, и пакет компьютерных программ KINS [14]. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с высокой лабильностью липидов коммерческие препараты природных ФЛ разных партий отличаются друг от друга по соотношению фракций ФЛ и содержанию ФЛ в составе общих липидов [15,16]. Используемые в работе партии лецитина также существенно различались по составу липидов, что обуславливало и разное исходное состояние в этих образцах параметров систем регуляции ПОЛ. Так, доля ФЛ в составе общих липидов лецитина варьировала от $39,1 \pm 0,1\%$ до $74,2 \pm 4,3\%$. В составе любой партии лецитина среди фракций ФЛ превалирует фосфатидилхолин (ФХ), являющийся одним из основных компонентов ФЛ биологических мембран органов млекопитающих. Поскольку именно ФЛ являются основным субстратом окисления в любых биологических объектах, а фракции ФЛ имеют неодинаковую способность к окислению, то выявлены существенные различия как в исходном содержании ТБК-активных продуктов, так и кинетики их накопления при окислении. Это следует из сравнительного анализа кинетических кривых окисления лецитина (рис. 1, кривые 1, 3), исходное содержание ТБК-активных продуктов у которых различается в 1,75 раза.

Эти различия, с нашей точки зрения, могут быть использованы для оценки последствий воздействия компонентов среды на биологические объекты в зависимости от исходного состояния параметров их системы регуляции ПОЛ. Для проверки этого предположения в работе были использованы тиофосфат натрия и сульфат меди. Поскольку соединения восстановленной серы играют важную роль в токсигенизации водной среды [7], то в качестве модельного соединения был выбран тиофосфат натрия (ТФ), обладающий выраженными восстановительными свойствами [17]. Оказалось, что масштаб и направленность влияния добавок ТФ на интенсивность ПОЛ автоокисления лецитина, как и при поступлении химических токсикантов в малых дозах в организм млекопитающих [18], существенно зависит от исходного состояния процесса окисления (рис. 1, кривые 2, 4). В партиях лецитина, характеризующихся более высокой интенсивностью ПОЛ, присутствие ТФ в среде уменьшает содержание продуктов окисления от $0,510 \pm 0,008$ ($n=4$) до $0,75 \pm 0,04$ ($n=3$), в то время как при низкой интенсивности окислительных процессов ($[ТБК-АП]_0 = 1,43 \pm 0,01$, $n=3$) внесение ТФ либо не оказывает влияния

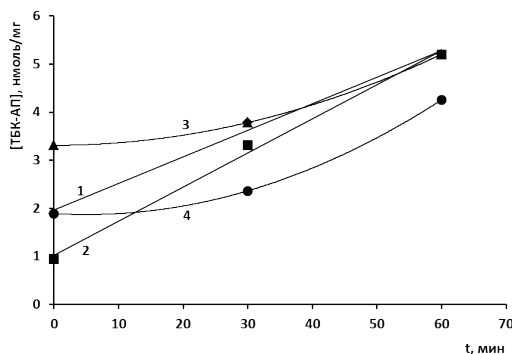


Рисунок 1. Кинетические кривые накопления ТБК-активных продуктов при окислении разных партий лецитина (1 и 3) в дистиллированной воде и в присутствии тиофосфата натрия (2 и 4). $[LS] = 3,89 \times 10^{-5}$ М, $[ТФ] = 3,87 \times 10^{-5}$ М, температура окисления 20°C

на интенсивность ПОЛ, либо увеличивает интенсивность окисления лецитина на 40-50% в зависимости от количественного соотношения более легко- и более трудноокисляемых фракций ФЛ в образце, которое характеризует способность самих липидов к окислению [12].

Ионы Cu^{2+} , обладая выраженными токсическими свойствами [19], являются и инициаторами ПОЛ [20]. Действительно, их присутствие в реакционной среде увеличивает скорость окисления лецитина, что иллюстрируют данные, представленные на рисунке 2. При этом ранее было показано, что в присутствии ионов меди начальная скорость процесса окисления возрастает с ростом доли ФЛ в составе общих липидов лецитина [21]. Это позволяет предположить, что участие ионов меди в процессах окисления на стадии их иницирования является одним из важных этапов формирования токсичных свойств водной среды.

Участие ТФ в регуляции окислительных процессов более многогранно, что следует из данных, представленных на рисунке 3. Как видно, зависимость между воздействием ТФ на интенсивность окисления лецитина и содержанием в нем ФЛ в составе общих липидов имеет сложный характер.

Математическая обработка УФ-спектров водных растворов лецитина, ТФ, Cu^{2+} и их смесей позволила выявить как взаимодействие между компонентами среды, так и образование ими комплексов с лецитином. Ранее было установлено, что ТФ образует комплексы с лецитином [18], что проявлялось в сдвигах максимумов и изменении их интенсивности полос поглощения, характерных для лецитина и ТФ, и появлении дополнительной полосы поглощения при $\lambda=247,9$ нм.

В данных экспериментах была использована партия лецитина, характеризующаяся следующими показателями: доля ФЛ равна $74,2 \pm 4,3\%$ ($n=8$), относительное содержание фосфатидилхолина $88,4 \pm 0,5\%$ ($n=5$), а соотношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ равно $0,074 \pm 0,004$. В УФ-спектрах этой партии лецитина выявлены 3 полосы поглощения с максимумами при 196,4 нм ($D=0,183$), обусловленным наличием сложноэфирных и несопряженных двойных связей; 228,4 нм ($D=0,036$), характеризующим наличие сопряженных двойных связей, и 266,3 нм ($D=0,017$), связанным с наличием кетодиенов. Низкие величины оптической плотности максимумов полос поглощения при 228,4 нм и 266,3 нм соответствуют определенному методом ТСХ количественному составу ФЛ данной партии лецитина, содержащей 93,3% более трудноокисляемых фракций ФЛ. Поскольку липиды этой партии лецитина характеризуются высоким содержанием ФЛ, то неудивительно, что в присутствии ионов меди наблюдается резкое ускорение процесса окисления лецитина, а в УФ-спектрах смеси лецитина и Cu^{2+} обнаружено увеличение в 1,75 раза интенсивности полосы поглощения кетодиенов ($\lambda=265,9$ нм, $D=0,030$). При этом наблюдается снижение интенсивности полосы поглощения сопряженных двойных связей в 5,6 раза и появление двух новых полос поглощения: $\lambda=237,7$ нм ($D=0,026$) и $\lambda=331,0$ нм ($D=0,013$). Следовательно, помимо участия в реакции иницирования ПОЛ, ионы меди образуют комплекс с ФЛ лецитина. Этот комплекс настолько прочен, что после инкубации смеси лецитина с Cu^{2+} в течение 30 мин последующее добавление в среду ТФ уже не оказывает влияния на интенсивность процесса автоокисления лецитина и $[\text{ТБК-АП}] = 21,3 \pm 0,4$ нмоль/мг лецитина ($n=4$) не изменяется в течение 60 мин. Анализ УФ-спектров показал, что ионы меди образуют комплексы и с лецитином, и с ТФ, а сам лецитин также взаимодействует с комплексом $[\text{ТФ}+\text{Cu}^{2+}]$. Это следует как из сдвигов максимумом полос поглощения индивидуальных компонентов и комплекса ТФ с ионами меди в области 194-196 нм и 227-228 нм и их интенсивности, так и появления двух новых полос поглощения в области 296,2 нм и 365,2 нм (рис. 4).

Среди параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ важную роль играет структурное состояние липидного компонента мембран [12]. Ранее было показано, что размер агрегатов ФЛ зависит от природы ФЛ, а гидродинамическое равновесие при их спонтанной агрегации устанавливается после определенного времени экспозиции раствора [16]. Нами экспериментально показано, что динамическое равновесие в водных растворах лецитина устанавливается спустя 1,5 час после приготовления и сохраняется в течение 2-4,5 час. Прежде всего необходимо отметить, что разные партии лецитина в процессе спонтанной агрегации в дистиллированной воде, несмотря на различия количественного состава их ФЛ, формируют частицы преимущественно одного гидродинамического диаметра. Однако размер частиц и их ξ -потенциал зависят от содержания ФЛ в составе общих липидов и количественного соотношения фракций ФЛ. Это следует из данных, представленных в таблице на примере двух образцов лецитина.

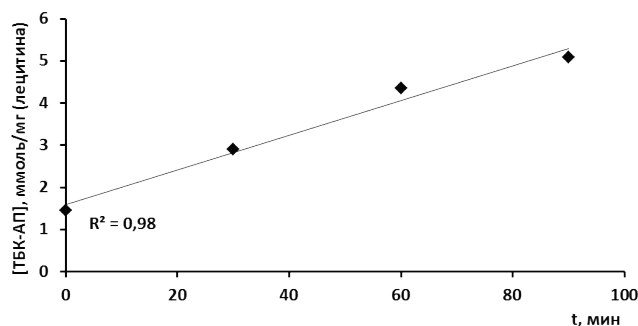


Рисунок 2. Влияние ионов Cu^{2+} на динамику накопления ТБК-активных продуктов при автоокислении лецитина: $[\text{Cu}^{2+}] = [\text{лецитин}] = 3,87 \times 10^{-5}$ М

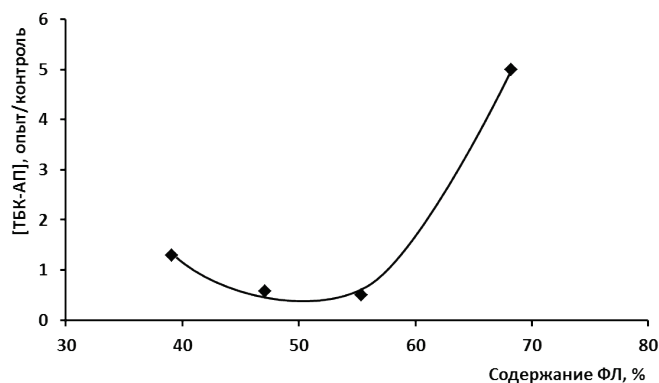


Рисунок 3. Влияние тиофосфата натрия на относительное увеличение содержания ТБК-активных продуктов при спонтанном автоокислении лецитина в дистиллированной воде в зависимости от доли фосфолипидов в составе его общих липидов: [ТФ] = [лецитин] = $3,87 \times 10^{-5}$ М

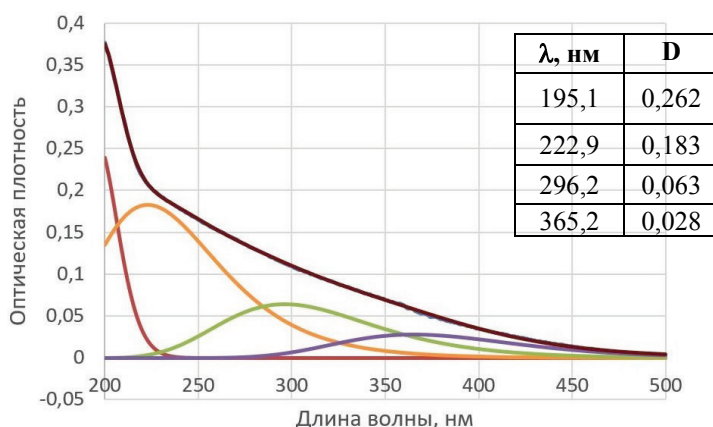


Рисунок 4. УФ-спектры лецитина с комплексом [ТФ+Cu²⁺] в дистиллированной воде и его гауссианы при эквимольных концентрациях реагентов $3,87 \times 10^{-5}$ М. Черная линия – общий и расчетный спектры

В экспериментах по влиянию ионов меди на способность лецитина к спонтанной агрегации и электрофоретические свойства образованных частиц был использован лецитин, имеющий следующие характеристики: доля ФЛ в составе общих липидов составляла $68,2 \pm 3,4\%$ (n=7), содержание ФХ $90,6 \pm 0,7\%$ (n=5), а доля более трудноокисляемых фракций ФЛ была 94,45 %. Внесение в раствор лецитина ионов меди в концентрации $3,9 \times 10^{-5}$ М; аналогично выше приведенным результатам с лецитином (образец 2), привело к смешению и изменению интенсивности максимумов полос поглощения лецитина, а также появлению двух новых полос поглощения при 242,5 нм (D=0,011) и 348,8 нм (D=0,004). Это соответствует и выше представленным данным об образовании комплекса ионов меди с ФЛ лецитина. Как и в других экспериментах, лецитин в дистиллированной воде формировал частицы преимущественно одного размера: $d=955 \pm 55$ нм (n=5), доля которых составляла $95,8 \pm 1,7\%$ (n=5). Несмотря на то, что Cu²⁺ в концентрации $3,9 \times 10^{-5}$ М оказывали лишь слабое влияние на размер агрегатов лецитина ($d=1100 \pm 50$ нм, n=5), выявлено существенное уменьшение отрицательной величины их ξ -потенциала от $-32,0 \pm 0,65$ mV (n=15) для частиц лецитина до $-18,4 \pm 0,6$ mV (n=15) для комплекса лецитина с Cu²⁺.

Таблица 1. Влияние состава липидов лецитина на параметры его мицеллообразования в дистиллированной воде, [лецитин] = $4,4 \times 10^{-5}$ М

Показатель	Доля ФЛ в составе общих липидов лецитина, %ФЛ	Содержание ФХ в составе ФЛ, %Р	Сумма более трудноокисляемых фракций ФЛ, %Р	Средний гидродинамический диаметр (d) основной фракции, нм	Содержание основной фракции частиц, %	Ξ -потенциал, mV
Образец 1	65.5 ± 8.0 n* = 6	84.1 ± 1.4 n = 5	90.6 ± 2.1	650 ± 45 n = 5	94.0 ± 0.3 n = 5	-36.8 ± 0.6 n = 5
Образец 2	74.2 ± 4.3 n = 8	88.4 ± 0.5 n = 5	93.35 ± 0.70	1020 ± 35 n = 10	80.0 ± 1.7 n = 5	-30.9 ± 1.0 n = 15

Примечание: *n - число измерений и/или число хроматографических дорожек

Таким образом, уже на уровне сложных модельных биологических систем (природные липиды и их смеси с восстановленными соединениями серы, ионами двухвалентной меди) выявляются различия механизмов их воздействия на биологические объекты. Компоненты среды участвуют в образовании комплексов с фосфолипидами, оказывают влияние на структурное состояние и электрофоретические свойства мембран, модифицируют интенсивность процессов ПОЛ. Совокупность полученных результатов и анализ литературы позволяют рассматривать предложенные четыре модельных системы в качестве адекватных и достаточно экспрессных систем для оценки воздействия природной воды на биологические объекты. Это влияние водной среды на автоокисление модельного субстрата (лецитина); использование математической обработки УФ-спектров по методу Гаусса для оценки комплексообразования компонентов среды с ФЛ био-объектов; влияние природной воды на способность лецитина к спонтанной агрегации и величины ζ -потенциала сформированных частиц для оценки последствий воздействия компонентов среды на структурное состояние мембран биологических объектов.

Список литературы / References:

1. Ло Ш., Ли В. Наноструктуры в очень разбавленных водных растворах. *Росс. Химический ж.*, 1999, т. 43, № 5, с. 40-48. [Lo Sh., Li V. Nanostructures in a very dilution water solutions. *Rossiysky Kimichesy Zhurnal*, 1999, vol. 43, no. 5, pp. 40-48. (In Russ.)]
2. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. *Росс. Химический ж.*, 1999, т. 43, № 5, с. 3-11. [Burlakova E.B. Peculiarities in the action of the biologically active substances at the ultra-low doses and the physical factors of the low intensity. *Rossiysky Kimicheskyy Zhurnal*, 1999, vol. 43, no. 5, pp. 3-11. (In Russ.)]
3. Шишкина Л.Н., Полякова Н.В., Мазалецкая Л.И., Беспалько О.Ф., Кушнирева Е.В. Противолучевые свойства феноксана при низкоинтенсивном γ -облучении в малой дозе. *Радиаци. биология. Радиоэкология*, 1999, т. 39, № 2-3, с. 322-328. [Shishkina L.N., Polyakova N.V., Mazaletskaia L.I., Bepal'ko O.F. The radioprotective properties of Phenoxane under low dose and low-intensity γ -irradiation. *Radiacz. Biologiya. Radioekologiya*, 1999, vol. 39, no. 2-3, pp. 322-328. (In Russ.)]
4. Zhernovkov V.R., Roshchina I.A., Zubareva G.M., Shmatov G.P., Lokshin B.V., Palmina N.P. The Study of Thyrotropin-Releasing Hormone Effect in a Wide Concentration Range on the Aquifer System by IR-Spectroscopy Method. *Water*, 2010, vol. 27, pp. 58-68.
5. Belov V.V., Belyaeva G.P., Shmatov G.P., Zubareva G.M., Palmina N.P. IR spectroscopy of thin water layers and the mechanisms of action α -tocopherol in ultra low concentrations. *Doklady Physical Chemistry*, 2011, vol. 439, no. 1, pp. 123-126.
6. Kononov A.I., Mal'tseva E.L., Ryzkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Yu.V., Kasparov V.V., Pal'mina N.P. Formation of Nanoassociates is a Factor Determining Physicochemical and Biological Properties of Highly Diluted Solutions. *Doklady Physical Chemistry*, 2014, vol. 456, no. 2, pp. 86-89.
7. Svydkiy V.O., Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I., Vichutinskaya E.V., Zaitseva N.I., Semenyak L.V. Intoxication of the Natural Aqueous Medium Resulting from Disbalance of Redox and Free-Radical Intrabasin Processes. *Russ. J. Phys. Chemistry B*, 2017, vol. 11, no. 4, pp. 643-651.
8. *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. C. Vigo-Pelfrey. Boston: CRC Press, 1991, vol. 3, 300 p.
9. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. Similarity Functioning of the Physicochemical Regulatory System of the Lipid Peroxidation on the Membrane and Organ Levels. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspective*. Eds. R. Orlicki, C. Cienciala, L.P. Krylova, J. Pielichowski, G.E. Zaikov, N.Y.: Nova Science Publishers, 2013, pp. 151-157.
10. Isakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 1980, vol. 15, no. 3, pp. 137-140.
11. *Биологические мембраны: методы*. Под ред. Дж.Б.С. Финдлея, В.Х. Эванза. М.: Мир, 1990, 423 с. [*Biologicheskiye membrany: metody*. Eds. J.B.C. Findley, W.H. Evans. Moscow, 1990, 423 p. (In Russ.)]
12. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах. *Радиаци. биология. Радиоэкология*, 2004, т. 44, № 3, с. 289-295. [Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. A new approach to assessment of biological consequences of exposure to low-dose radiation. *Radiacz. Biologiya. Radioekologiya*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 289-295. (In Russ.)]
13. Шишкина Л.Н., Смирнова А.Н., Мазалецкая Л.И., Дубовик А.С., Швыдкий В.О. Взаимосвязь физико-химических свойств с составом липидов из листьев и сока алоэ древовидного. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 148-153. [Shishkina L.N., Smirnova A.N., Mazaletskaia L.I., Dubovik A.S., Shvydkiy V.O. Interrelation of the physicochemical properties with composition of lipids from leaves and juice of Aloe arborescens Mill. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 148-153. (In Russ.)]
14. Брин Э.Ф., Травин С.О. Моделирование механизмов химических реакций. *Химическая физика*, 1991, т. 10, № 6, с. 830-837. [Brin E.F., Travin S.O. Modeling mechanisms of the chemical reactions. *Khimicheskaya fizika*, 1991, vol. 10, no. 6, pp. 830-837. (In Russ.)]
15. Hielscher R., Hellwig P. Specific far infrared spectroscopic properties of phospholipids. *Spectroscopy: An International J.*, 2012, vol. 27, iss. 5-6, pp. 525-532.

16. Marakulina K.M., Kramor R.V., Lukanina Yu.K., Plashchina I.G., Polyakov A.V., Fedorova I.V., Chumicheva I.Yu., Kutchin A.V., Shishkina L.N. Effect of Nature of Phospholipids on the Degree of Their Interaction of Isobornylphenol Antioxidants. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2016, vol. 90, no. 2, pp. 286-292.
17. Neumann H., Steinberg I.Z., Katchalski E. Reduced properties of Phosphorothioate. *J. Amer. Chem., Soc.*, 1965, vol. 87, pp. 3841-3848.
18. Shishikina L.N., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Role of the Lipid Peroxidation in the Assessment of Exposure to Chemical Toxicants on Bio-Objects. *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2021, vol. 15, no. 5, pp. 861-867.
19. Lyalina E.I., Fokina A.I., Ashikhmina T.Ya., Olkova A.S., Beresneva E.V., Darovskikh I.V., Yarmolenko A.S. Comprehensive chemical-toxicological research of copper (II) sulfate solutions containing reduced glutation. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*, 2018, no. 2, c. 101-107.
20. Jones C.M., Burkitt M.J. EPR spin-trapping evidence for the direct, one electron reduction of tert-butylhydroperoxide to the tert-butoxyl radical by copper (II): paradigm a previously overlooked reaction in the initiation of lipid peroxidation. *J. Amer. Chem., Soc.*, 2003, vol. 125, no. 23, pp. 6946-6954.
21. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О. Воздействие химических токсикантов на регуляцию окислительных процессов. *Биомедицинский журнал*, 2022, т. 21, с. 799-809. [Shishikina L.N., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Action of the chemical toxicants on regulation of the oxidative processes. *Medline.ru*, 2020, vol. 21, pp. 799-809. (In Russ.)]

MODEL SYSTEMS FOR THE ESTIMATION OF INFLUENCE OF THE WATER MEDIUM COMPONENTS ON THE BIOLOGICAL OBJECTS

Shishkina L.N., Dubovik A.S., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Received 05.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0499

Abstract. Following four model systems on the base on the natural lipids to estimate the action of the water medium components on the biological objects were presented by using the earlier obtained data about the similarity functioning of the physicochemical regulatory system of the oxidation processes in the biological objects of varying complexity and the ability of phospholipids to the self-aggregation in the polar medium: the low temperature autoxidation of lecithin in the polar medium, the mathematic analysis of UV-spectra of lecithin and its mixtures with the water medium components by Gauss method, the self-aggregation of lecithin in the different polar medium, the ξ -potential value of the formed particles. As the model toxicants sodium thiophosphate and copper(II) ions were used. Scale of the sodium thiophosphate influence on the lecithin oxidation kinetics is shown to depend on the initial intensity of the lecithin oxidation and composition of its phospholipids. It is agree with the earlier obtained data about the influence of the chemical toxic agents under their intake into the body on the lipid peroxidation state in tissues of animals. In is established that the copper ions participate in the initiation of lecithin oxidation and form complex with its phospholipids. This influences on the ability of lecithin to the self-aggregation and electrophoretic properties of formed particles. Thus, the lipid component lability of the natural lipids allows us to reveal the action of components of the natural medium on the biological systems of various complexity even on the level of the complex biological model systems.

Key words: lecithin, autoxidation, UV-spectroscopy, Gauss method, dynamic light scattering, formation of micelles, ξ -potential, sodium thiophosphate, copper(II) ions.

ЭКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ, КАК СТРАТЕГИЯ И ТАКТИКА: СУПЕР-МОЛЕКУЛЯРНО-ПРОТЕОМНОГО, МОРФО-ДИНАМИЧЕСКОГО ДИЗАЙНА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Иванова Э.А.

Уфимский институт биологии РАН,
пр. Октября 69, г. Уфа, 450054, РФ; e-mail: fiona_belobor@mail.ru
Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0500

Аннотация. В ракурсе эко-генетической адаптации растений, с позиции междисциплинарной науки – супрамолекулярной физико-химии, рассмотрена динамика супрамолекулярных топологически ассоциированных структур тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ): Нп-нуклеоплазмы, ХрI-эу-, ХрII-гетеро- хроматинов и ядерного матрикса. На поверхности раздела которых, представлена протео-супермолекулярная реорганизация ансамблей: «линкерных», «коровых» гистонов и негистонов, макрокинетика которых имеет важное значение для понимания особенностей биохимических процессов в генетических подсистемах растения (корень→мезокотиль→колеоптиль) переходного периода от гетеротрофного к автотрофному развитию растений. Показан алгоритм особенностей биологической специфичности морфогенеза и структурной устойчивости генетико-протеомной основы ТХМ, как модельной системы коллекционных зародышей семян пшениц, в процессе их органоспецифического, координированно-закономерного роста при переключении подпрограмм развития, где проведен экспериментальный анализ протеомного позиционирования в супермолекулярных ансамблях: «линкерных», «коровых» и «негистоновых» белков в разных генетических подсистемах (мезокотиль→корень→высокодифференцированный зародыш) соответственно: донора (яровой)→переведенного в озимый (донор озимый-фенотип)→переведенного вновь в яровой-фенотип. На основании распределения нуклеосомного аргинин-богатого «корового» гистона (H3-H4)' на поверхности раздела ТХМ: донора (яровой) Нп=ХрI (мезокотиль)→переведенного в озимый (донор озимый-фенотип) Нп>ХрII≥ЯМ (корень)→переведенного вновь в яровой-фенотип Нп>ХрI>ЯМ>ХрII (высокодифференцированный зародыш); предполагается возможное переключение генетических подпрограмм развития в генетических подсистемах целостного организма, которое осуществляется за счёт комбинаторного принципа протеомных ансамблей, потенциальных эпигенетических сетей «гистонового кода», в условиях экосистемы окружающей среды.

Ключевые слова: протеомика, интерфазная топология хроматина, супрамолекулярная биохимия, карิโอгеномика, пшеница, сигнальные системы

В монографии [1] с восхищением описано, как решаются в мире растений многие проблемы из области экологии, энергетики, передачи информации и так далее. Эти проблемы, выполняемые растениями, рассматриваются в качестве модельных систем, по выражению автора [1]: «лучшими, в мире инженерами». Они эффективны, экологически безупречны и одновременно просты. Человек учится у растений, постигает их способы и методы в решении уже своих проблем. Молекулярная физико-химия, занимающаяся строением и свойствами биологически функциональных молекул и атомно-молекулярным истолкованием явлений жизнедеятельности, за короткое время стала широко развитой наукой, активно делающей шаги навстречу возрастающей сложности изучения запрограммированных супрамолекулярных систем, вплоть до экосистем [2,3].

Расшифровка молекулярно-генетических основ адаптации организма или популяции остаётся фундаментальной темой в поисках подходов к их анализу, и знанию локальных стресс адаптаций в понимании пути от генома, генотипа к фенотипу. Фундаментальной базовой, основой этого направления, бесспорно, является супрамолекулярная физико-химия-биохимия, которая развивается как физико-химия ансамблей, удерживаемых нековалентными взаимодействиями. Через понятия распознавания и самопроцессов она пришла к концепции информации (пассивной и активной) и запрограммированных систем, всё более становясь физико-химией молекулярной информации [4], изучающей её хранение на молекулярном уровне, а также считывание, передачу и обработку информации на супрамолекулярном уровне. Таким образом, супрамолекулярная химия – в высшей степени междисциплинарная область науки, включающая химические, физические, биологические аспекты рассмотрения более сложных, чем молекулы, физико-химических систем, связанных в единое целое посредством межмолекулярных (нековалентных) взаимодействий. Она стремительно расширяет границы химической науки до физических и биологических явлений. Три главных: понятия – 1) фиксация (связывание), 2) распознавание и 3) координация – заложили фундамент супрамолекулярной химии [3].

В настоящее время современная генетика находится на взлете [5]. Как пишет автор [5], новые факты обнаруживаются настолько быстро, что едва хватает времени на то, чтобы просто осознать их появление. Ещё труднее уловить многочисленные связи между ними. По словам [5], с известной долей субъективности, он

отмечает несколько новых направлений генетических исследований, которые достаточно явно обозначились к настоящему времени, и могут определять некоторые будущие направления генетических исследований.

Информационной макромолекулой генома эукариот является ДНК, которая неравномерно распределена по нескольким хромосомам в виде комплексов с многочисленными белками. ДНК – белковые комплексы эукариот получили название хроматина. На протяжении клеточного цикла хроматин претерпевает высокоупорядоченные структурные морфогенетические преобразования в виде последовательных конденсаций – деконденсаций, где экспрессией генов управляют большие надмолекулярные комплексы [5].

В данной работе представлен растительный объект кариогеномной природы, выбранный селекционерами для рассмотрения его адаптационных возможностей морфогенетической реорганизации жизнедеятельности в разных условиях окружающей среды. Совокупность внешних признаков хромосомного набора эукариот получила название кариотипа. Эти признаки широко используются в биологической систематике.

Цель данной работы представить анализ адаптационно-фенотипически-морфо-динамической системы ядерного протеома на уровне топологически ассоциированных зон тотального хроматина в целых зародышах пшениц, после их проклёвывания во временном интервале: 24ч, 30ч, 36ч и последующего дифференцированного роста генетических подсистем (мезокотиль, корень→колеоптиль) во временном интервале (42ч, 48ч), как возможных конформационно-локальных зон, способных к восприятию и преобразованию стресс сигналов окружающей среды.

В качестве модельного объекта исследования взяты семена суперэлиты пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Артемовка (*liform* – яровая; *SUBTAXA* – *lutescens*; *ORIGIN_COUNTR* – Украина), из которой был выведен стрессоустойчивый озимый сорт Мироновской 808 (*liform* – озимая; *SUBTAXA* – *lutescens*; *ORIGIN_COUNTR* – Украина), а затем Мироновской яровой (*liform* – яровая; *SUBTAXA* – *lutescens*; *ORIGIN_COUNTR* – Украина), по данным Украинского Мироновского научно-исследовательского института селекции и семеноводства этот сорт был получен путём «расшатывания» наследственности озимой Мироновской 808, то есть, изменением цикла развития озимой формы. Семена любезно получены из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Весь экспериментальный объём работы представлен в виде таблицы 1 [6,7], а также таблиц 2-3. Методические особенности работы подробно изложены в ссылках на патенты в статьях [8-16]. В работе подробно приводится анализ экспериментальных данных супермолекулярной протеомики, на поверхности раздела, архитектурной организации тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ), клеточных ядер донора [14] яровой пшеницы-Артемовки, фенотипическая пластичность которой позволила селекционерам вывести из неё стрессоустойчивый озимый сорт [15,16], а далее была предпринята попытка вновь из выведенного озимого сорта, вывести яровой.

Фенотип организма представляет собой результат взаимодействий между генотипом и средой в каждый данный момент его жизни и на каждом этапе его индивидуального развития [17]. Чтобы осознать во всей полноте роль генетических факторов в жизни и эволюции организмов необходимо знать и понимать, в какой степени окружающая среда может влиять на проявление наследственных потенций, в которых формируется молекулярно-генетическая (трёхгеномная: ядро, митохондрии [18], хлоропласты [19]) система интегративно-физиологической биологии развития.

«Свойства сорта – его генотип – важнейшее условие урожая. Сорт всегда результат многолетней работы. Иногда для его создания требуется до 20 лет упорного и кропотливого труда. И ускорить этот процесс никак нельзя. Очень сомнительно, что сорт можно вывести за 2-3 года. Такова вообще специфика творчества, имеющего дело с биологическими объектами. Как считал крупный советский селекционер В.Н. Ремесло, выведенный хороший сорт однолетних культур, сохраняя свои исходные ценные качества, живет очень недолго – каких-нибудь 5-8 лет. Потом он нуждается в поддержке и обновлении» [20].

В связи с этим в данной работе, на живой модельной системе сортов пшениц: донора Яровой→ озимый→ вновь яровой, предлагается рассмотреть свойства супра-блоковой организации ТХМ клеточных ядер, как системы, способной обеспечить возможность выбора части информации, реализуемой в признаки адаптации к окружающей среде. Одной из важнейших задач биологии развития является представление о живом организме как целостной системе на каждом этапе его онтогенеза. То есть, в задачу данной работы входило, ни много - ни мало, представить онто-морфо-физиолого-интегративную, пространственно-временную целостность фазовых алгоритмов развития организма, в основе которых произошли топологические перестройки ТХМ клеточных ядер (табл. 1). Естественно, что такие перестройки осуществляются координировано, и их результатом является переход в новое стационарное состояние всей системы в целом. Однако, многие детальные механизмы таких процессов пока не совсем ясны. Общая методология подобного анализа живого организма, как целостной системы, заключается в разложении биологических событий на ряд фазовых дискретных, гено-морфо-физиолого-, контролируемых составляющих (табл. 1).

Чтобы разобраться, каким образом происходит самоорганизация супермолекулярного протеома хроматиновых фибрилл, выбран способ анализа разделения тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ) клеточных ядер на относительно независимые супра-блоки, с применением обычных методов свойственных для белковой химии (табл. 1), [6,7]. То-есть, клеточное ядро представлено в виде 4х разделённых поверхностных зон, представляющих собой супра-блоки гетерополимерных супрамолекулярных структур: Нп, ХрI, ХрII, ЯМ, из которых выделены поверхностные протеомные супермолекулярные комплексы, представленные 5-тью суперкомпонентным ядерным протеомом: Нгб; Н1; (Н2А+Н2В), (Н3+Н4)', (Н3+Н4)" (табл. 1).

Рассмотрение структурно-топологических переходов генетической матрицы растений с позиции супрамолекулярных блоков, имеющих разную степень кампактизации (лабильный, эу-, гетеро - хроматин), имеет давнюю историю [21,22]. Однако, в настоящее время, ученых интересует, как формируются на тотальной хроматиновой матрице, непосредственно друг от друга транскрипционно активные и неактивные зоны, при участии протеомных – линкерных и коровых «барьерных» нуклеосомных элементов, отделяющих их друг от друга. Считают, что этот процесс обеспечивается не результатом первичной нуклеотидной последовательности, а особенностями вторичной структуры ДНК [23]. С этой позиции, ученые всё больше начинают присматриваться, что же происходит внутри нуклеосомного кора, а также, и на поверхности его сближения с коровой и линкерной ДНК в процессах развития и формирования стресс-сигнальных систем. То-есть, рассматривается регуляция хроматина с позиции «функциональности в хроматин-зависимых процессах», которые базируются на боковой поверхности глобулярного октамера всех четырёх коровых гистонов: $2(H2A+H2B)2(H3+H4)$, совместно образующих скаффелд-полиэдр гистонового октамера, вокруг которого обёрнута коровая ДНК.

Рассмотрение, глобулярных коровых доменов: $2(H2A+H2B)+2(H3+H4)$, на уровне их взаимосвязи с ДНК с позиции неструктурированных хвостов выступающих из нуклеосомы, как боковой поверхности сигнальной системы, находятся в ракурсе внимания биоинформационного анализа эволюции топологии боковых сетей [24], а также рассмотрения перспектив регулирования тотального хроматина в процессе взаимодействия с факторами окружающей среды. Считают, что структура хроматина является единственным прямым фенотипическим признаком, в становлении которого принимают участие как кодирующие, так и не кодирующие последовательности ДНК.

Таблица 1. Биохимический анализ клеточных ядер индуцированных к органоспецифическому, координированно-закономерному росту, проросших зародышей пшеницы

1.1. Возраст проросших зародышей, ч (коллекционные семена из ВИРа)					
24	30	36	42	органы	48
Цель высокодифференцированный зародыш			Колеоптиль Мезокотиль Корень		
1.2. Выделение клеточных ядер					
1.3. Выделение супра -структур-блоков при повышении ионной силы солевого градиента, способствующего ослаблению электростатического взаимодействия					
0,14 M NaCl		0,35 M NaCl		2M NaCl	
6M GuHCl					
Нуклеоплазма, «Лабильный хроматин» (Hn)		«Эу»-хроматин, непрочносвязанный с ЯМ (XpI)		«Гетеро»-хроматин, прочносвязанный с ЯМ (Xp II)	
				Ядерный матрикс (ЯМ)	
1.4. Градиентное элюирование GuHCl-гуанидингидрохлоридом, на поверхности раздела негистоновых и гистоновых – супер -комплексов-ансамблей из супра -структур-блоков, методом ионнообменной хроматографии на IRC-50 (Heidelberg), подготовленной к работе по описанию [6-8]					
Ступенчатые концентрации - GuHCl, %					
6,0 - негистоновые "кислые" белки - (Hгб) 8,9 - лизинбогатый, линкерный гистон - (Hl) 10,6 - умеренно-лизинбогатые «коровые» гистоны - (H2A+H2B) 13,0 - обогащенные аргинином «коровые» гистоны - (H3+H4) 40,0 - аргинин-богатые «коровые» гистоны - (H3+H4)"					

Изменение ионных параметров среды, окружающей клетки, приводит к изменению организации хроматина и изменению выхода мутаций в несколько раз. В свою очередь, некодирующие последовательности ДНК, через структуру хроматина, способны обеспечить выбор спектра экспрессируемых генов.

С функциональной точки зрения различают эухроматин и гетерохроматин. Эухроматин характеризуется меньшей, по сравнению с гетерохроматином, компактизацией ДНК. В нём, главным образом, локализуются активно экспрессирующие гены. Что касается гетерохроматина, то было мнение о его генетической инертности. Однако, сейчас в нём находят активно экспрессирующиеся гены. В процессе гетерохроматизации могут быть вовлечены протяженные участки хромосом и даже целые хромосомы. Гетерохроматизация определенных участков хромосом часто сопровождается подавлением транскрипции имеющихся в них генов. Вопрос о структурной организации хроматина в интерфазных ядрах всё ещё далек от своего разрешения. Так как, это прежде всего, связано со сложностью и морфо-динамичностью его структуры, которая легко меняется даже при незначительных экзогенных воздействиях. Большинство знаний о структуре хроматина было получено *in vitro* на препаратах фрагментированного хроматина.

В соответствии с распространенной точкой зрения различают три уровня морфогенетической организации ДНК хроматина у эукариот: 1) нуклеосомная фибрилла - *10-нм фибриллы «бусы на нитке»*- наиболее изученной; нити которой компактизируются в 2) соленоид – точная структура его пока неизвестна, или нуклеомер; *30 нм фибриллы*, которые сворачиваются в петли 3) петельно-доменная структура, включающая хромомеры, *300 нм – в гигантские (в 50-200 т.п.н.) петельные домены*, закрепленные на белковой скелетной структуре ядра – ядерном матриксе [25].

Нуклеосомные фибриллярные структуры, в которых нуклеосомы расположены как бусы на нитке рассматриваются в качестве низшего уровня упаковки ДНК эукариот в хроматине. Экспериментально нуклеосомные фибриллы можно выделить при низкой ионной силе и в присутствии двухвалентных ионов металлов. Нуклеосомы, входящие в состав фибрилл, диаметром 10 нм, расположены более или менее равномерно вдоль молекулы ДНК на расстоянии 10-20 нм друг от друга. В их состав входят по четыре пары молекул 2(Н2А+ Н2В), 2(Н3+ Н4) и одна молекула гистона Н1 [5]. В работе [25] большое внимание уделено «гистоновому коду» эпигенетическим механизмам. Нуклеосомная глобула состоит из восьми молекул гистонов: **тетрамера (Н3-Н4)₂**, находящегося в центре глобулы и двух димеров (Н2А-Н2В) по её бокам. Между «бусами на нитке» находится спейсерная ДНК. Важным принципом организации гистонового октамера является построение его из двух модулей: двух гетеродимеров гистонов Н2А-Н2В и тетрамера (Н3-Н4). Расположение гистонов по ходу молекулы ДНК является следующим; димеры Н2А-Н2В контактируют с ДНК на входе и выходе из нуклеосомной частицы, а тетрамер (Н3-Н4), соприкасается с центральной частью накрученного на нуклеосомную глобулу фрагмента ДНК. Гистоны контактируют с фосфодиэфирным остовом молекулы ДНК.

Важно, что азотистые основания не участвуют во взаимодействиях с гистонами, поэтому связывание ДНК с нуклеосомной глобулой не является специфичным в отношении последовательности ДНК. Два витка ДНК расположены на нуклеосомной глобуле параллельно, так, что бороздки ориентированы одинаково. Благодаря этому между витками ДНК остается достаточно места для прохождения наружу N-хвостовых доменов гистонов Н2В и Н3; N –хвостовые домены гистонов Н2А и Н4 выходят за пределы глобулы со стороны плоских поверхностей нуклеосомной глобулы. Гистон Н1 связывается с концами молекулы ДНК, входящей и выходящей из минимальной нуклеосомы, замыкая два полных витка двойной спирали [25]. Совокупность сигналов, экспонированных на поверхности нуклеосом (включая как присутствие вариантов гистонов, так и наличие того или иного спектра модификаций основных и вариантных форм гистонов), представляет особый эпигенетический код, называемый также гистоновым кодом. Этот код может считываться различными белками, регулирующими конденсацию хроматиновой фибриллы и участвующими тем или иным образом в репликации, транскрипции, репарации ДНК и других генетических процессах. Значение различных комбинаций сигналов гистонового кода ещё только начинает изучаться [25]. Стабильность комплекса гистонов в составе коровой частицы определяется взаимодействием их глобулярных частей, поэтому удаление гибких плеч в условиях мягкого протеолиза не сопровождается разрушением комплекса. N-концевые плечи гистонов, по-видимому, обеспечивают их взаимодействие со специфическими участками ДНК. Так, N-концевые домены гистона Н3 контактируют с участками ДНК на входе в коровую частицу и выходе из неё, тогда как соответствующий домен гистона Н4 связывается с внутренней частью ДНК нуклеосомы [5].

Фибриллярная цепь нуклеосом на втором уровне упаковки хроматина свернута в симметрично построенный соленоид, содержащий нуклеомеры. Симметрия соленоида нарушается при взаимодействии с ним негистоновых белков. Следует иметь в виду, что точная структура соленоида пока неизвестна. Считается, что в физиологических условиях Н1 стабилизирует 30-нм фибриллу, не изменяя существенным образом характер упаковки нуклеосомных глобул. Какова бы ни была структура 30-нм хроматиновой фибриллы, существуют убедительные данные, показывающие, что для обеспечения компактной упаковки нуклеосомных глобул важны взаимодействия с соседними глобулами. Особенно важным для формирования 30-нм фибриллы является взаимодействие семи экспонированных на поверхности нуклеосомы отрицательно заряженных аминокислотных остатков (большая часть которых принадлежит молекуле гистона Н2А) с N-концевым доменом (аминокислотные остатки 16-25) гистона Н4 соседней нуклеосомы. Способность к формированию 30-нм фибриллы может существенным образом измениться посредством различных модификаций этих доменов. Наибольший эффект имеет ацетилирование Н4 по позиции К16; эта модификация полностью препятствует образованию 30-нм фибриллы [25].

В интерфазных ядрах эукариот нити хроматина, в которых ДНК упакована в форме солеоида, содержащего нуклеомеры, организованы в виде топологически независимых петель, длина которых в среднем составляет 50-100 т.п.о. Такой способ пространственной укладки нитей хроматина рассматривается как следующий уровень конденсации хроматина (и ДНК) у эукариот, а *сами петли получили название хромомеров*. С помощью электронного микроскопа обнаружено, что нити хроматина в хромомерах имеют дополнительную специфическую укладку в виде розеток [26], собранных у основания, от которого отходят малые петли длиной ~ 5 т.п.о. Образование хромомеров становится возможным благодаря наличию у их оснований определенных последовательностей нуклеотидов, которые специфически взаимодействуют с ядерным матриксом, называемым скеффолдом (скелетом) – сетчатообразной структурой внутри интерфазных ядер, образованный белками и РНК, гексозами [27]. Эти участки хромосомной ДНК, взаимодействующие с ядерным матриксом MAR (Matrix Associated Region) или SAR (Scaffold Associated Region) и часто обозначаются как MAR/ SAR последовательности [5]. Выяснилось, что активно транскрибируемые гены организованы в петли небольшого размера (~ 10 т.п.о.), тогда как «молчащие» гены находятся преимущественно в составе более крупных петель, которые содержат несколько транскрипционных единиц и, в свою очередь, образуют дополнительные петли в виде розеток. Как правило, MAR/SAR последовательности фланкируют гены, однако в ряде случаев их обнаруживают и внутри генов, но в составе интронов. Представлены данные обобщающие характеристики MAR/SAR последовательностей: длина которых составляет 300-1000 п.о. - все они содержат многочисленные сайты ДНК-белкового взаимодействия и обогащены АТ-парами. MAR/SAR последовательности являются чрезвычайно важными в функциональном отношении последовательностями геномной ДНК эукариот. Одной из основных функций, которую им приписывают в настоящее время, может быть, пространственное разграничение функциональных доменов хроматина в интерфазных ядрах эукариот, необходимое для эффективной и независимой экспрессии генов, находящихся в этих доменах.

Как известно, протеом генетических структур про- и эукариот обогащен белками, богатыми аргинином. По данным [28] отмечается высокая консервативность аргинин-богатого гистона - H4 по аминокислотной последовательности у всех 3-х представителей эукариотических царств. Это свидетельствует о его важной роли в сохранении и реализации генетической информации в процессах, возможно, видовой структуризационной упаковки ДНК. Следует отметить, что интересным было сообщение М. С. Гельфанда [29] по поводу аминокислот, из которых только аргинин способен связываться с ДНК. Интересной особенностью эукариотического аргинин-богатого гистона H4 является наличие определенных повторяющихся последовательностей, значение которых находится в стадии расшифровки. Есть мнение, что H4 образуется из коротких пептидов [28]. В интерфазной хроматиновой организации эукариот боковые группы гистона H4 выходят на функциональную поверхность нуклеосома. Все эти данные в настоящее время стали объектом внимания супрамолекулярной химии, имеющей дело с *супер*-молекулярными ансамблями и супрамолекулярными блоками.

По мнению [2], основная проблема биологии - топологическая, основное понятие которой гомеоморфизм. Однако, в данном случае у растений, согласно [2] о гомеоморфизме, можно говорить только по отношению к отдельным органам, таким как: лист, мезокотиль, корень. Что касается аргинина, то можно сказать, что он выступает в роли биохимической связи, воспроизводящей механическое и резонансное соотношение. Относительно ядерного матрикса, как полиэдра, можно сказать, что это основание - поверхность геометрического многоугольника, который проявляет себя тем, что запускает динамику и кинетику специфики особенностей биологии развития. Следует иметь в виду, что обычные экспериментальные данные приводятся в виде усредненных результатов анализа пространственной организации генома в сотнях тысяч клеток.

В данном контексте рассмотрена локализация и динамика периодов распределения протеомных, возможно «барьерных», суперкомплексов на поверхности раздела в *супра*-блоках гетерополимерных структур в течение физиологических особенностей целого зародыша развивающегося в сторону органоспецифического, координированно-закономерного роста проростка (табл. 2: 24ч-30ч-36ч), а также в его активных энерго-генетических периодах генетических подсистем органогенеза: мезокотили, взаимосвязанного с инициацией роста и развития сигнальных систем: корень-колеоптиль (табл. 3: 42ч-48ч).

Топологическому аспекту биологического морфогенеза, на уровне пространственной формы и фенотипа гомеоморфизма [2,15,16], обращает внимание то, что в таблице 2 в органогенезе 36ч зародышей донорской яровой-Артемовки и озимой культур, четко прослеживается различие на поверхности раздела всех *супра*-блоков ТХМ и их протеомных супермолекулярных ансамблей, которое выражено в том, что у Артемовки-яровой ТХМ функционирует во взаимосвязи с линкерной ДНК (где фигурируют только протеом H1, H6), а у озимой ТХМ взаимосвязана, как с линкерной, так и с коровой ДНК (где фигурирует ((H2A+H2B)(H3+H4')) коровый протеом. То-есть, протеомные супермолекулярные ансамбли ТХМ донорских яровой и озимой 36ч зародышей имеют разные точки локализации взаимосвязей с линкерной и коровой ДНК. По-видимому, это локальные зоны физико-химических взаимосвязей. Что касается долговременно сложившейся стрессоустойчивости Мироновской 808, то при репрограммировании, на фенотипическом уровне супермолекулярной реорганизации, этот сорт, в качестве озимого донора, так просто не сдает свои позиции сорту Мироновской яровой (табл. 2), которая сразу фиксируется при участии (H3+H4)"- в период 24-30ч роста проростка и только в период активного деления клеток 36ч передает свои функциональные возможности линкерному протеому, H6, H1 - нуклеоплазмы и коровым (H2A+H2B) (H3+H4)' гистонам соответственно в: ХрII, ХрI, ЯМ.

Следующая фенологическая фаза прорастания, представленная в таблице 1 (42ч-48ч), характеризуется ярко выраженным органоспецифическим, координированно-закономерным ростом проростка на уровне мезокотили и

активным ростом зародышевой оси, морфогенетической основы «сигнального языка» побега и корня, где ростовые процессы осуществляются вследствие деления клеток. Меняется не просто протеом, но и его взаимосвязи. Идут фазовые тектонические протеомные сдвиги в плане, алгоритмических физико-химических свойств, последовательного процессинга биологии развития.

В контексте данной статьи, я останавливаюсь только на ярко выраженном результате эксперимента, который получен у **яровой (донора) – Артемовки** (табл. 3) с **мезокотилем (42ч)**, так как именно в этот период, на поверхности раздела, удалось выделить коровые $(H3+H4)''-[Hп] \rightarrow (H3+H4)''[ХрI]$ гистоны в функциональной взаимо-связке с протеомом H1 – Hгб соответственно (мезокотиль→корень) **супра-блоков**: Hп, ХрII и ЯМ. Выявленный в мезокотиле аргинин-богатый протеом $(H3+H4)''$ выделяется при жёстком экстрагировании, в то время как, обогащенные аргинином гистоны $(H3+H4)'$, выделяются при экстракции в три раза слабее (табл. 1., 4). Ранние данные [7,8] показали, что фракция $(H3+H4)'$ представляет собой полный комплект нуклеосомных белков, обогащенных аргинин-богатой фракцией, в то время как $(H3+H4)''$ представляет собой блок аргинин-богатых гистонов, только со следами других нуклеосомных гистонов.

Выведенный из ярового донора Артемовки **озимый сорт – Мироновская 808** (табл. 3) характеризуется **активным ростом зародышевой оси, как морфогенетической основы «сигнального языка» побега и корня (42ч)**, и сопровождается выявлением **в корневой системе аргинин-богатого протеома $(H3+H4)''$** в блоках **Hп, ХрII, ЯМ** в соединении с коровым протеомом $(H2A+H2B) \geq H1$ блока ХрI.

Следуя рассуждениям [30], можно предположить, что именно в 42ч период, все вместе взятые генетические подсистемы (мезокотиль, корень→колеоптиль) целостного организма могут являться источником эпигенетической информации для ростового морфогенеза, который на супермолекулярном уровне генетической подсистемы – мезокотилия у Артемовки (42ч), проявляется с позиции локализации $(H3+H4)'' Hп \rightarrow ХрI$. При перепрограммировании пшеницы: донора яровой → озимую, наиболее восприимчивой становится корневая генетическая подсистема $(H3+H4)''$ Hп, ХрII, ЯМ (42ч), представляя собой локальные стресс зоны адаптации, на пути от генома, генотипа к фенотипу, формируя свой паттерн фиксации самопроцессирования в структурную устойчивость.

Таблица 2. Особенности позиционирования протеомных супермолекулярных ансамблей на поверхности раздела топологически – ассоциированных супрамолекулярных блоков тотального хроматина в пространственно-временных периодах роста и развития зародышей яровой и выведенной из неё озимой пшеницы, из которой вновь вывели яровой сорт

Супраблоки тотального хроматина	Протеомные супермолекулярные структуры-ансамбли		
	24ч Артемовка-яровая-донор	Мироновская 808	Мироновская яровая
Hп	$(H3+H4) \geq Hгб$	H1	$(H3+H4)'' \geq (H3+H4)' > Hгб \geq H1 > (H2A+H2B)$
Хр I	$(H3+H4)' \geq H1$	$(H2A+H2B)$	$Hгб \geq (H3+H4)' > (H3+H4)'' \geq H1 > \dots$
Хр II	$Hгб = (H2A+H2B)$	Hгб	$(H2A+H2B) > H1 > (H3+H4)' > (H3+H4)'' > Hгб$
ЯМ	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) \geq H1 \geq (H3+H4)'' > Hгб > \dots$
30 ч			
Hп	$(H3+H4)'$	$(H3+H4)'$	$(H3+H4)'' > Hгб > (H2A+H2B) > H1 \geq (H3+H4)'$
Хр I	Hгб	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) > Hгб > H1 \geq (H3+H4)' > \dots$
Хр II	$Hгб = (H2A+H2B)$	Hгб	$(H3+H4)'' > (H3+H4)' > H1 > (H2A+H2B) > Hгб$
ЯМ	H1	$(H2A+H2B)$	$H1 > Hгб \geq (H3+H4)' > (H2A+H2B) > \dots$
36 ч			
Hп	Hгб	H1	$Hгб > H1 > (H2A+H2B) > \dots$
Хр I	H1	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)' \geq H1 \geq Hгб > \dots$
Хр II	Hгб	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) > (H3+H4)' > H1 > Hгб > \dots$
ЯМ	H1	Hгб	$(H3+H4)' \geq Hгб > (H2A+H2B) = H1 > \dots$

Таблица 3. Особенности реорганизации *супер*молекулярного протеома на поверхности раздела топологически-ассоциированных *супра*-блоков ТХМ в процессе инициации ростового морфогенеза генетических подсистем целостного организма яровой и выведенной из неё озимой пшеницы, из которой вновь выведен яровой сорт

Блоки тотального хроматина	Органогенез	Протеомные <i>супер</i> молекулярные ансамбли-структуры		
		Яровая-донор	Озимая	Яровая
		42 ч.		
Нп	Колеоптиль	HI	$(H2A+H2B) \geq HI \geq Hгб$	$(H3+H4) > Hгб \geq HI \geq (H2A+H2B) > \dots$
	Мезокотиль	$(H3+H4)''$	$HI \geq Hгб$	$Hгб \geq (H2A+H2B) > HI > \dots$
	Корень	HI	$(H3+H4)'' \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4) > (H2A+H2B) > Hгб > HI > \dots$
Хр I	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) > HI \geq Hгб > (H3+H4) > \dots$
	Мезокотиль	$(H3+H4)''$	$(H2A+H2B)$	$HI = Hгб > \dots$
	Корень	$(H2A+H2B)$	$(H2A+H2B) \geq HI$	$(H3+H4) > HI \geq (H2A+H2B) > Hгб > \dots$
Хр II	Колеоптиль	$(H3+H4)'$	$HI \geq Hгб$	$(H2A+H2B) \geq (H3+H4) > Hгб > HI > \dots$
	Мезокотиль	HI	$(H3+H4)'$	$(H3+H4) > HI > (H2A+H2B) > Hгб > \dots$
	Корень	HI	$(H3+H4)' + (H3+H4)''$	$Hгб > HI > \dots$
ЯМ	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$(H3+H4)'$	$HI \geq Hгб > (H3+H4)' > (H2A+H2B) > \dots$
	Мезокотиль	Hгб	Hгб	$(H2A+H2B) > Hгб \geq (H3+H4)' > HI > \dots$
	Корень	$Hгб \geq HI$	$Hгб \geq HI \geq (H3+H4)''$	$Hгб = HI > (H2A+H2B) > \dots$
48 ч.				
Нп	Колеоптиль	$(H3+H4)'$	Hгб	$Hгб > HI > \dots$
	Мезокотиль	$(H2A+H2B)$	HI	$Hгб \geq (H2A+H2B) > (H3+H4)' > HI > \dots$
	Корень	HI	$(H2A+H2B) \geq Hгб$	$HI > Hгб > (H2A+H2B) > (H3+H4)' > \dots$
Хр I	Колеоптиль	Hгб	$HI \geq (H3+H4)' \geq Hгб$	$HI > Hгб > \dots$
	Мезокотиль	$Hгб \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4)'$	$(H3+H4)' > Hгб > (H2A+H2B) \geq HI > \dots$
	Корень	$(H2A+H2B) \geq HI \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4)'$	$(H3+H4)' > (H2A+H2B) > Hгб \geq HI > \dots$
Хр II	Колеоптиль	$(H2A+H2B)$	$HI \geq (H3+H4)'$	$(H3+H4)' > (H2A+H2B) > Hгб \geq HI > \dots$
	Мезокотиль	$(H3+H4)'$	$(H2A+H2B) \geq (H3+H4)'$	$HI > (H2A+H2B) > (H3+H4)' > Hгб > \dots$
	Корень	$(H3+H4)'$	$HI \geq Hгб$	$(H2A+H2B) > (H3+H4)' > HI > Hгб > \dots$
ЯМ	Колеоптиль	$HI \geq Hгб$	Hгб	$HI > (H2A+H2B) > Hгб > \dots$
	Мезокотиль	$(H3+H4)'$	$Hгб \geq HI \geq (H2A+H2B)$	$(H3+H4)' > HI \geq (H2A+H2B) = Hгб > \dots$
	Корень	$(H2A+H2B)$	HI	$Hгб > (H3+H4)' > (H2A+H2B) > HI > \dots$

Что касается долговременно сложившейся стрессоустойчивости Мироновской 808, в качестве донора для сорта *Мироновской яровой* (табл. 2), то последний фиксируется при участии $(H3+H4)''$ - только в период **24-30ч** роста проростка. То-есть, протеомные супермолекулярные ансамбли ТХМ озимой и выведенного из неё ярового сорта, во временн- 36ч периоде высокодифференцированном развитии зародышей, имеют разные точки локализации взаимосвязей с ДНК. По-видимому, это локальные зоны физико-химических взаимосвязей, где в период активного деления клеток происходит непосредственная взаимосвязь с энергетической внутриклеточной

митохондриальной системой. В фенологической 48ч фазе Мироновской яровой, на поверхности раздела протеомных супермолекулярных ансамблей в супра-блоках ТХМ, не выявлены коровые ($H3+H4$)" (табл. 3).

Вопросы о том, как происходит перепрограммирование клеток и механизмы, контролируемые это процессирование, по-прежнему находятся в центре внимания исследователей. Считают, что фундаментальная эпигенетика является той научной дисциплиной, в которой наиболее сложно делать какие-либо прогнозы.

И все же можно утверждать лишь то, что эпигенетические механизмы будут продолжать неожиданно проявлять себя в самых непредсказуемых областях науки. Например, в области природы циркадных ритмов – естественных околосуточных циклических колебаний физиологических и биохимических процессов, свойственных подавляющему большинству клеток. Доказано, что гистоновая ацетилтрансфераза является ключевым белком, участвующим в установлении этого ритма [31], а сам ритм регулируется, по меньшей мере, еще и другими эпигенетическими факторами. Мы слишком привыкли думать о геноме в линейных терминах, представляя его состоящим из оснований в виде цепочки, которая может прочитана только последовательно и без затей. Реальность же состоит в том, что разные области генома согнуты и свернуты, и, контактируя между собой, они создают новые комбинации и регуляторные подгруппы.

Исторический путь от анализа морфологической адаптации к морфогенетической [21,22], но уже с новым информационным содержанием: морфогенетический→молекулярный→надмолекулярный→... всё больше приобретает физико-химическое истолкование [32] в области молекулярной биологии развития [33-36], что сближает эти познания с физикой, наукой издавна опирающейся на математику, способствовавшей развитию в понимании общих закономерностей, с которыми сталкивается биология [2,3,32].

Эти биофизические закономерности могут рассматриваться как структуры в многомерном пространстве, куда внесён топологический подход, как способ мышления в «определении и создании логических схем биологической специфичности морфогенеза и структурной устойчивости» [2]. Весь этот арсенал мыслей и знаний биологии развития вплотную подходит к плодотворному использованию возможностей, которые открывает супрамолекулярная химия [3] как «химия запрограммированных несущих информацию молекул» [3].

Предполагается, что топологическая динамика реорганизации нуклеосомного протеома, на поверхности доменов ТХМ, может выполнять функцию «барьерных комбинаторного принципа [5] элементов» на уровне «белковых ансамблей биологических сетей» [37] при переключении подпрограмм развития, вызванных условиями окружающей среды.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № НИОКТР АААА-А18-118022190104-7. В работе использована приборная база Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН. Благодарю сотрудников, которые ранее помогли в выполнении данного направления работы.

Список литературы / References

1. Патури Ф. *Растения – гениальные инженеры природы* (перевод с немецкого Ю.И. Куколёва). Москва: Издательство «Прогресс», 1982, 271 с. [Paturi F.R. *Geniale ingenieure der natur*. Econ Verlag Dusseldorf-Wien, 1974, 271p. (In Russ.)]
2. Том Р. *Структурная устойчивость и морфогенез*. М.: Логос, 2002, 117 p. [Tom R. *Structural Stability and Morphogenesis*. М.: Logos, 2002, 280 p. (In Russ.)]
3. Лен Ж.М. *Супрамолекулярная химия*. Новосибирск: «Наука», 1998, 334 с. [Lehn J.M. *Supramolecular chemistry*. Novosibirsk: Science, 1998, 333 p. (In Russ.)]
4. Шайтан К.В. Фундаментальные закономерности формирования пространственных структур конформационно подвижных молекул. *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*, Сочи: Кубанский государственный университет, 2019, т. 1, с. 36. [Shaitan K.V. The fundamental laws of the formation of spatial structures of conformationally mobile molecules. *Collection of scientific papers of the VI Congress of Biophysicists of Russia*, Sochi: Kuban State University, 2019, vol. 1, p. 36. (In Russ.)]
5. Патрушев Л.И. *Экспрессия генов*. М.: Наука, 2000, 830 с. [Patrushev L.I. *Gene expression*. Moscow: Nauka, 2000, 800 p. (In Russ.)]
6. Иванова Э.А. Фракционирование растительных гистонов на колонках с амберлитом ИРЦ-50. *Материалы третьей научной конференции молодых учёных*, Башкирский филиал АН СССР, Совет молодых учёных, Уфа, 1972, с. 54-55. [Ivanova E.A. Fractionation of plant histones on columns with amberlite IRC-50. *Materials of the third scientific conference of young scientists*, Bashkir Branch of the USSR Academy of Sciences, Council of Young Scientists, Ufa, 1972, pp. 54-55. (In Russ.)]
7. Иванова Э.А., Гилязетдинов Ш.Я., Ахметов Р.Р. Модификация гистонов растений и влияние фитогормонов на интенсивность этого процесса. *Растительные белки и их биосинтез*, М.: «Наука», 1975, с. 301-305. [Ivanova E.A., Gilyzidinov Ch.Y., Akhmetov R.R. Modification of plant histones and the effect of phytohormones on the intensity of this process. *Plant proteins and their biosynthesis*, М.: Science, 1975, pp. 301-305. (In Russ.)]
8. Иванова Э.А., Ахметов Р.Р. Модификация негистоновых белков в проростках растений. *Физиология растений*, 1987, т. 34, № 3, с. 507-512. [Ivanova E.A., Akhmetov R.R. Modification of non-histon proteins in plant seedlings. *Physiology plants*, 1987, vol. 34, no. 3, pp. 507-512. (In Russ.)]

9. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Физиолого-биохимический анализ интерфазных ядер в процессе прорастания семян пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*, Киев, 1992, т. 24, № 6, с. 577- 583. [Ivanova E.A., Vafina G.H., Physiological and biochemical analysis interphase nuclei in the process of wheat seed germination. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 1992, vol. 24, no. 6, pp. 577-583. (In Russ.)]
10. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С. Анализ локализации протеазочувствительных сайтов Arg-X в динамике супраструктур интерфазного хроматина при индукции ростового морфогенеза зрелых зародышей яровой и озимой пшеницы. *Физиология и генетика*, Киев, 2014, т. 46, № 3, с. 202-211. [Ivanova E.A., Vafina G.H., Ivanov R.S. Analysis of localization of protease-sensitive sites of Arg-X in the dynamics of suprastructures of interphase chromatin during induction of growth morphogenesis of mature embryos of spring and winter wheat. *Physiology and genetic*, 2014, vol. 46, no. 3, pp. 202-211. (In Russ.)]
11. Ivanova E.A., Vafina G.H., Ivanov R.S. Initial morphogenetic features of proteome of suprastructures of interphase chromatin for germination of mature germs in conditions of adapting to winter in wheat. *Journal of stress physiology and biochemistry*, 2015, vol. 11, no. 4, pp. 29-42. (In Russ.)
12. Ivanova E.A. Arg-X proteo-processing as model system for organization of karyogenomics Interphase chromatin of mature germs of wheat, formed in the conditions of cold stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2017, vol. 13, no. 4, pp. 65-73. (In Russ.)
13. Ivanova E.A. On the question of epigenetic mechanisms of kariogenomic winter wheat in the concept of supramolecular biochemistry. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2019, vol. 15, no. 3, pp. 14-20. (In Russ.)
14. Ivanova E.A. Analysis of the proteomics of chromatin suprastructures as areas of replication (origins) and perception of signal and stress systems in the development of spring wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2020, vol. 16, no. 4, pp. 22-34. (In Russ.)
15. Ivanova E.A. Stress resistance on the example of supramolecular-genetic level of plant development. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 2021, vol. 17, no. 4, pp. 17-29. (In Russ.)
16. Иванова Э.А. Супермолекулярная реорганизация протеомных ансамблей супрамолекулярных структур хроматина растений в стрессовых условиях окружающей среды. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 179-185. [Ivanova E.A. Supermolecular reorganization of proteomic ensembles of supramolecular structures of plant chromatin under stress environmental conditions. *Russian Journal of Biological and Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 179-185. (In Russ.)]
17. Реймерс Н.Ф. *Популярный биологический словарь*. М.: Наука, 1991, 235 с. [Reimers N.F. *Popular biological dictionary*. М.: Nauka, 1991, 235 p. (In Russ.)]
18. Колесников А.А. Митохондриальный геном. Нуклеоид. *Биохимия*, 2016, т. 81, № 10, с. 1322-1331. [Kolesnikov A.A. Mitochondrial genome. Nucleoid. *Biochemistry*, 2016, vol. 81, no. 10, pp. 1322-1331. (In Russ.)]
19. Кузнецов В.В. Хлоропласты. Структура и экспрессия пластидного генома. *Физиология растений*, 2018, 65, № 4, с. 243-255. [Kuznetsov V.V. Chloroplasts. Structure and expression of the plastid genome. *Plant Physiology*, 2018, vol. 65, no. 4, pp. 243-255. (In Russ.)]
20. Реймерс Ф.Э. *Растение во младенчестве*. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1987, с. 11. [Reimers F.E. *Plant in infancy*. Novosibirsk: Science, Siberian branch, 1987, p. 11. (In Russ.)]
21. Конарев В.Г. *Цитохимия и гистохимия растений*. М.: Высшая школа, 1966. [*Cytochemistry and histochemistry of plants*. Israel program for scientific translation, Jerusalem 1972.]
22. Конарев В.Г. *Морфогенез растений и молекулярно-биологический анализ*. Санкт-Петербург: РАСХН, ВИР им. Н.И.Вавилова, 1998, 370 с. [Konarev V.G. *Morphogenesis and molecular-biological analysis of plants*. Sanct-Peterburg, VIR, 1998, 370 p. (In Russ.)]
23. Шабарина А.Н., Глазков М.В. Барьерные элементы хроматиновых доменов и ядерная оболочка. *Генетика*, 2013, т. 49, № 1, с. 30-36. [Shabarina A.N., Glazkov M.V. Barrier elements of chromatin domains and the nuclear envelope. *Genetics*, 2013, vol. 49, no. 1, pp. 30-36. (In Russ.)]
24. Финкельштейн А.В., Птицин О.Б. *Физика белка*. Москва: Книжный дом, 2005, 460 с. [Finkelstein A.V., Ptitsin O.V. *Physics of protein*. Moscow: Book house, 2005, 460 c. (In Russ.)]
25. Разин С.В., Быстрицкий А.А. *Хроматин: упакованный геном*. Москва. БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009, 170 с. [Razin S.V., Bystritsky A.A. *Chromatin: packed genome*. Moscow. BINOMIAL. Laboratory of knowledge. 2009, 170 c. (In Russ.)]
26. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Особенности анализа ядерных «трипсиноподобных» и «ингибитор-трипсиновых» комплексов колеоптилей в течение постэмбриональной фазы онтогенеза пшеницы. *Известия АН серия биологическая*, 2000, № 5, с. 624-630. [Ivanova E.A., Vafina G.H. Features of the analysis of nuclear "trypsin-like" and "inhibitor-trypsin" complexes of coleoptiles during the postembryonic phase of wheat ontogenesis. *Izvestiya AN biological series*, 2000, no. 5, pp. 624-630. (In Russ.)]
27. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Анализ надмолекулярных структур клеточного ядра при активации хроматина. *Доклады академии наук*, 2006, т. 406, № 3, с. 419-421. [Ivanova E.A., Vafina G.H. Analysis of supramolecular structures of the cell nucleus during chromatin activation. *Reports of the Academy of Sciences*, 2006, vol. 406, no. 3, pp. 419-421. (In Russ.)]
28. Smith E.L., De Lange R.J., Bonner J. Chemistry and biology of the histones. *Physiol. Revs.*, 1970, vol. 50, no. 2, pp. 159-170.
29. Гельфанд М.С. Эволюция регуляторных систем. *Материалы докладов V съезда биофизиков России*, Ростов –на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015, т. 1, с. 19. [Gelfand M.C. The evolution

of regulatory systems. *Materials of reports of the V Congress of Biophysicists of Russia*, Rostov-on-Don: Publishing House of the Southern Federal University, 2015, vol. 1, p. 19. (In Russ.)]

30. Барлоу П.У. Деление клеток в меристемах и значение этого процесса для органогенеза и формообразования растений. *Онтогенез*, 1994, т. 25, № 5, с. 5-38. [Barlou P.U. Cell division in meristems and the importance of this process for plant organogenesis and morphogenesis. *Ontogenesis*, 1994, vol. 25, no. 5, pp. 5-38. (In Russ.)]

31. Кери Н. *Эпигенетика*, Ростов-на-Дону, Феникс, 2012, с. 324. [Carey N. *Epigenetics*, Rostov-on-Don, Phoenix, 2012, p. 324. (In Russ.)]

32. Волькенштейн М.В. *Горизонты теоретической биофизики. Будущее науки* (международный ежегодник, вып. 13). М.: «Знание», 1980, с. 118-134. [Volkenstein M.V. *Horizons of theoretical biophysics. The future of science* (International Yearbook, issue 13). М.: "Knowledge", 1980, pp. 118-134. (In Russ.)]

33. Боннер Д.Ж. *Молекулярная биология развития*. М.: «Мир», 1967, 178 с. [Bonner D.J. *Molecular biology of development*. М.: "Mir", 1967, 178 p. (In Russ.)]

34. Подгорная О.И. *Роль структурированности ядра в морфогенезе. Теоретические и математические аспекты морфогенеза*. М.: Наука, 1987, с. 106-115. [Podgornaya O.I. *The role of the structuring of the nucleus in morphogenesis. Theoretical and mathematical aspects of morphogenesis*. М.: Nauka, 1987, pp. 106-115. (In Russ.)]

35. Иванова Э.А. Особенности «структурированных процессов» в интерфазных ядрах у пшеницы, выведенной в условиях холодового стресса. *Экобиотех*, 2019, т. 2, № 4, pp. 1-6. [Ivanova E.A. Features of "structured processes" in interphase nucleus wheat bread under cold stress. *Ecobiotech*, 2019, vol. 2, no. 4, pp. 1-6, doi: 10.3 1163/2618-964X-2019-2-4-000-000. (In Russ.)]

36. Ivanova E.A. *Stress resistance on the example of supramolecular-genetic level of plant development*. doi: 10.18699/PlantGen2021-082. (In Russ.)

37. Булгаков В.П., Цициашвили Г.Ш. Биоинформационный анализ белковых сетей: поиск статистик и топологий, наиболее адекватно отвечающих запросам экспериментальных биологов. *Биохимия*, 2013, т. 78, № 10, с. 1405-1411. [Bulgakov V.P., Tsitsiashvili G.Sh. Bioinformatic analysis of protein networks: search for statistics and topologies that most adequately meet the needs of experimental biologists. *Biochemistry*, 2013, vol. 78, no. 10, pp. 1405-1411. (In Russ.)]

ECO-GENETIC STRESS-RESISTANCE OF PLANTS AS STRATEGY AND TACTICS: SUPERMOLECULAR-PROTEOMIC, MORPHO-DYNAMIC DESIGN OF PHYSICO-CHEMICAL NATURE OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Ivanova E.A.

Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences,

69 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia; e-mail: fiona_belobor@mail.ru

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0500

Abstract. From the standpoint of eco-genetic adaptation of plants, from the position of interdisciplinary science – supramolecular physical chemistry, the dynamics of supramolecular topologically associated structures of the total chromatin matrix (TChrM) is considered: Np-nucleoplasm, ChrI-eu-, ChrII-heterochromatin and nuclear matrix. On the interface of which, the proteo-supramolecular reorganization of ensembles is presented: "linker", "core" histones and non-histones, the macrokinetics of which is important for understanding the features of biochemical processes in the genetic subsystems of a plant (root → mesocotyl → coleoptile) of the transition period from heterotrophic to autotrophic plant development. An algorithm for the features of the biological specificity of morphogenesis and structural stability of the genetic and proteomic basis of the TChrM model system, collection germs of wheat seeds, in the process of their organ-specific, coordinated-regular growth when switching development subprograms is shown where an experimental analysis of proteomic positioning in supermolecular assemblies was carried out: "linker", "core" and "non-histone" proteins in different genetic subsystems (mesocotyl → root → highly differentiated embryo), respectively: donor (spring) → transferred to winter (donor winter-phenotype) → transferred back to spring-phenotype. Based on the distribution of nucleosomal arginine-rich "core" histone (H3-H4) on the TChrM interface: donor (spring) Np=ChrI (mesocotyl) → transferred to winter (donor winter-phenotype) Np>ChrII≥NM (root)→transferred again into the spring phenotype Np>ChrI>NM>ChrII (highly differentiated embryo); possible switching of genetic subroutines of development in the genetic subsystems of the whole organism is assumed, which is carried out due to the combinatorial principle of proteomic ensembles, potential epigenetic networks of the "histone code", in the conditions of environmental ecosystems.

Key words: Proteomics, Interphase chromatin topology, Supramolecular biochemistry, Karyogenomics, wheat, signaling systems.

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 7, № 1, 2022

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 7, No. 1, 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