

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 7, № 2
2022**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 7, № 2
2022**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 7, No. 2, 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, № 2, 2022

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Е.Д. Борисова, Б.Э. Кожемова, О.О. Константинов, Е.А. Корепанова, В.М. Михеев, А.В. Михнич, В.И. Сухова, П.Н. Астанина, О.В. Коплак, А.А. Аносов**
Влияние наночастиц феррита кобальта в гидрофильной оболочке на проводимость бислойных липидных мембран 185
- Г.А. Агаева, Г.Р. Сафарли, Н.М. Годжаев**
Молекулярное моделирование конформационной подвижности молекулы гиламбатина 194
- Н. Кочарли, С. Гумматова**
Продукция активных форм кислорода при действии ультрафиолетового-В излучения на клетки дрожжей 199
- Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова, Е.С. Серяк**
Оценка пигментного состава микроводоросли *Porphyridium purpureum* по истинному спектру поглощения культуры с применением табличного процессора 204

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- В.В. Костюков, С.В. Леонтьева, Е.В. Савченко, К.А. Рыбакова, Д.П. Воронин**
Photoexcitation of Nile blue dye in aqueous solution: TD-DFT study 209
- Е.В. Сергеева, М.В. Фадеева, И.С. Хавронюк, А.А. Мамонтов, А.Б. Ершов, А.В. Кузнецов**
Опсины гребневика *Mnemiopsis leidyi* и сеть белок-белковых взаимодействий 222
- И.В. Клименко, Т.Ю. Астахова, Е.Н. Тимохина, А.В. Лобанов**
Димеризация фталоцианина алюминия в органической и водно-органической средах 230
- К.Б. Терешкина, Н.Г. Лойко, Э.В. Терешкин, В.В. Коваленко, А.А. Генералова, Ю.Ф. Крупянский**
Структурные особенности кластеров ДНК-DPS при изменении концентрации 4-гексилрезорцина 235
- С.Д. Демухамедова**
Теоретическое квантово-химическое моделирование структуры и свойств дипептида карнозина методом DFT 241

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- А.П. Антонян, З.О. Мовсесян, М.А. Парсаданян, П.О. Вардеванян**
Взаимодействие метиленового синего с одноцепочечными полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU) и с двухцепочечным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU) 251
- А.П. Антонян, А.Г. Карапетян, Н.Г. Петросян, П.О. Вардеванян**
Спектральные характеристики комплексов Hoechst 33258 с БСА.....256
- О.К. Касумов, М.Д. Бахышова, Р.Б. Гасанова, Р.Б. Асланов, Л.А. Мельникова, Д.А. Алиев**
Benzoate group attachment to TEMPO provides enhanced discrimination of liposomes fabricated using human lung normal and carcinoma cells 261
- А.И. Маммедзаде, А.Д. Маммедова, О.К. Касумов**
Structure of silk fibroin nanoparticles: characterization of hydrophobic patches 268
- Т.В. Рыбинская, О.Ю. Портнягина, Е.А. Зелепуга, В.А. Хоменко, Н.Ю. Ким, Е.А. Чингизова, Е.С. Менчинская, В.П. Глазунов, Д.К. Чистюлин, О.Д. Новикова**
Исследование амилоидогенного потенциала неспецифических поринов *Yersinia pseudotuberculosis*273
- А.С. Аверин, Ф.В. Тюрин, К.В. Самодурова, В.Г. Старков, Т.В. Андреева, Ю.Н. Уткин**
Эффекты кардиотоксинов кобры на папиллярной мышце и сердце крысы, перфузируемом по Лангендорфу, не связаны с выбросом адреналина..... 280
- А.Л. Литвиненко, В.М. Некрасов, Е.В. Четвертак, В.П. Мальцев**
Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации аденозиндифосфату методом сканирующей проточной цитометрии в условиях применения антитромбоцитарной терапии 286
- К.Д. Казаринов, В.С. Малинин, В.А. Щелконогов, А.В. Чеканов**
Разработка технологии исследования легочной сурфактантной системы с помощью электрической генерации капиллярных волн (экспресс метод) 293
- О.В. Слатинская, Г.В. Максимов**
Изменение конформации и распределения гемоглобина при изменении объема эритроцита297
- В.А. Щелконогов, О.А. Баранова, А.В. Чеканов, К.Д. Казаринов, Н.С. Шастина, С.Л. Стволинский, Т.Н. Федорова, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин, Г.М. Сорокоумова**
Липосомальная форма с липоевой кислотой и карнозином: получение, антиагрегантное и антиоксидантное действие..... 303
- Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов**
Изменения секреторных процессов в щитовидной железе при сдвиге баланса дейтерия и протия в организме310
- Л.В. Беловолова, М.И. Беловолов, В.М. Парамонов, М.М. Беловолов, М.В. Свистушкин, А.А. Луничева**
Методика исследования вибрационной активности голосовых связок..... 314

- Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, О.А. Могильная, А.П. Пузырь, И.И. Гительзон, В.С. Бондарь**
Система цитохрома P450 может участвовать в светоизлучении высших грибов 320
- Е.М. Малиновская, Е.А. Савинова, В.А. Сергеева, Е.С. Ершова, Е.В. Проскурнина, Л.В. Каменева, О.А. Долгих, Н.Н. Вейко, О.А. Краевая, А.В. Жиленков, П.А. Трошин, С.В. Костюк**
Влияние водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на уровень окислительного стресса и на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность эмбриональных фибробластов легких человека, культивируемых *in vitro*.....325
- Е.А. Никанорова, И.А. Варганова, Я.И. Медведев, В.И. Нагиба**
Апоптоз лимфоцитов при воздействии комбинации физических факторов..... 334

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Д.Н. Маторин, О.В. Яковлева, Д.А. Тодоренко, С.Н. Горячев, А.А. Алексеев**
Использование замедленной флуоресценции хлорофилла водорослей для биотестирования загрязнений..... 339
- И.А. Ильючик, Л.О. Захаревич, В.Н. Никандров**
Влияние Cr₂(SO₄)₃ на состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде источника азота – KNO₃..... 343

CONTENTS

Volume 7, No. 2, 2022

GENERAL BIOPHYSICS

- E.D. Borisova, B.E. Kozhemova, O.O. Konstantinov, E.A. Korepanova, V.M. Mikheev, A.V. Mikhnich, V.I. Sukhova, P.N. Astanina, O.V. Koplak, A.A. Anosov**
Effect of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in hydrophilic coating on the conductivity of bilayer lipid membranes 185
- G.A. Agaeva, G.R. Safarli, N.M. Godjaev**
Molecular modelling of conformational flexibility of hylambatin molecule 194
- N. Kocharli, S. Gummatova**
Production of reactive oxygen species under the action of UV-B radiation on yeast cells..... 199
- D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova, E.S. Seryak**
Evaluation of the pigment composition of microalgae *Porphyridium purpureum* according to the true absorption spectrum of the culture using a spreadsheet processor 204

MODELLING IN BIOPHYSICS

- V.V. Kostjukov, S.V. Leontieva, E.V. Savchenko, K.A. Rybakova, D.P. Voronin**
Photoexcitation of Nile blue dye in aqueous solution: TD-DFT study 209
- E.V. Sergeeva, M.V. Fadeeva, I.S. Khavronyuk, A.A. Mamontov, A.B. Ershov, A.V. Kuznetsov**
Opsins of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and a network of protein-protein interactions..... 222
- I.V. Klimenko, T.Yu. Astakhova, E.N. Timokhina, A.V. Lobanov**
Dimerization of aluminum phthalocyanine chloride in organic and aqua-organic medium 230
- K.B. Tereshkina, N.G. Loiko, E.V. Tereshkin, V.V. Kovalenko, A.A. Generalova, Y.F. Krupyanskii**
Structural peculiarities of DNA-DPS clusters at different concentrations of 4-hexylresorcinol 235
- S.D. Demukhamedova**
Theoretical quantum-chemical simulation of the structure and properties of carnosine dipeptide by the DFT method..... 241

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- A.P. Antonyan, Z.O. Movsesyan, M.A. Parsadanyan, P.O. Vardevanyan**
Interaction of methylene blue with single-stranded polynucleotides poly(rA) and poly(rU) and with double_stranded polynucleotide poly(rA)-poly(rU).....251
- A.P. Antonyan, A.G. Karapetyan, N.G. Petrosyan, P.O. Vardevanyan**
Spectral characteristics of the complexes of Hoechst33258 with BSA.....256
- O.K. Gasymov, M.J. Bakhishova, R.B. Gasanova, R.B. Aslanov, L.A. Melikova, J.A. Aliyev**
Benzoate group attachment to TEMPO provides enhanced discrimination of liposomes fabricated using human lung normal and carcinoma cells261
- A.M. Mammedzade, Ay.J. Mammadova, O.K. Gasymov**
Structure of silk fibroin nanoparticles: characterization of hydrophobic patches 268
- T.V. Rybinskaya, O.Yu. Portnyagina, E.A. Zelepuga, V.A. Khomenko, N.Yu. Kim, E.A. Chingizova, E.S. Menchinskaya, V.P. Glazunov, D.K. Chistyulin, O.D. Novikova**
Study on the amyloidoigenic potential of non-specific *Yersinia pseudotuberculosis* porins273
- A.S. Averin, F.V. Tyurin, K.V. Samodurova, V.G. Starkov, T.V. Andreeva, Yu.N. Utkin**
The effects of cobra cardiotoxins on the papillary muscle and Langendorf perfused rat heart are not associated with adrenaline release 280
- A.L. Litvinenko, V.M. Nekrasov, E.V. Chetvertak, V.P. Maltsev**
Evaluation of the human blood platelets sensitivity to an activation agonist adenosine diphosphate by scanning flow cytometry under conditions of antiplatelet therapy 286
- K.D. Kazarinov, V.S. Malinin, V.A. Shchelkonogov, A.V. Chekanov**
Development of technology for studying the pulmonary surfactant system using electric generation of capillary waves (express method)..... 293
- O.V. Slatinskaya, G.V. Maksimov**
Changes in the erythrocyte hemoglobin conformation and distribution during RBC volume changes297
- V.A. Shchelkonogov, O.A. Baranova, A.V. Chekanov, K.D. Kazarinov, N.S. Shastina, S.L. Stvolinsky, T.N. Fedorova, E.Y. Solovieva, A.I. Fedin, G.M. Sorokoumova**
Liposomal form with lipoic acid and carnosine: production, antiplatelet and antioxidant effect 303
- E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov**
Changes in thyroid morphology and function produced by the shift in deuterium/protium balance in the organism.....310
- L.V. Belovolova, M.I. Belovolov, V.M. Paramonov, M.M. Belovolov, M.V. Svistushkin, A.A. Lunicheva**
Methodology for studying the vibrational activity of the vocal folds..... 314
- N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, O.A. Mogilnaya, A.P. Puzyr, J.I. Gitelson, V.S. Bondar**
Cytochrome P450 system may be involved in the light emission of higher fungi..... 320

E.M. Malinovskaya, E.A. Savinova, V.A. Sergeeva, E.S. Ershova, E.V. Proskurnina, L.V. Kameneva, O.A. Dolgikh, N.N. Veiko, O.A. Kraevaya, A.V. Zhilenkov, P.A. Troshin, S.V. Kostyuk

The effect of water-soluble derivatives of fullene C₆₀ on the level of oxidative stress and on the transcriptional activity of genes regulating pro- and antioxidant activity of human embryonic fibroblast cells (helfs) *in vitro*325

E.A. Nikanorova, I.A. Varganova, Ya.I. Medvedev, V.I. Nagiba

Lymphocytes apoptosis under the action of physical factors combination 334

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

D.N. Matorin, O.V. Yakovleva, D.A. Todorenko, S.N. Goryachev, A.A. Alekseev

Prospects for using delayed fluorescence of algae for contamination biotesting 339

I.A. Ilyuchyk, L.O. Zakharevich, V.N. Nikandrov

Effect of Cr₂(SO₄)₃ on a status of chlorella vulgaris culture cells under the different content of nitrogen source – KNO₃ in the nutrient medium 343

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА В ГИДРОФИЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ НА ПРОВОДИМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Борисова Е.Д., Кожемова Б.Э., Константинов О.О., Корепанова Е.А., Михеев В.М.,
Михнич А.В., Сухова В.И., Астанина П.Н., Коплак О.В., Аносов А.А.

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, г. Москва, 119435, РФ

Поступила в редакцию 14.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0501

Аннотация. Магнитные наночастицы широко используются в медицинских приложениях, например, как контрастные вещества для магнитно-резонансной томографии, для усиления гипертермии, для адресной доставки лекарств, тераностики (терапия + диагностика). При использовании магнитных наночастиц *in vivo* им требуется специальное покрытие, способствующее биосовместимости и минимизирующее потенциальную токсичность в физиологических условиях. В качестве покрытия может быть использован сывороточный альбумин человека или полиэтиленгликоль. В этой работе исследованы взаимодействия кубических магнитных наночастиц феррита кобальта размером 12 и 27 нм с дифитаноилфосфатидилхолиновыми бислойными липидными мембранами. Проводимость мембран менялась в широких пределах – можно выделить две группы мембран: мембраны, проводимость которых (после добавления наночастиц) по сравнению с контролем практически не менялась, и мембраны, проводимость которых при добавлении наночастиц менялась скачком и увеличивалась в широком диапазоне на 0,5-2 порядка. Значимых различий между проводимостями при добавлении одинакового объема наночастиц размером 12 и 27 нм, окруженных сывороточным альбумином человека, не обнаружено. При добавлении наночастиц с оболочкой из полиэтиленгликоля проводимость увеличивалась значительно слабее, чем при добавлении наночастиц с оболочкой из сывороточного альбумина человека. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что магнитные наночастицы с гидрофильным покрытием взаимодействуют с мембранами, что может приводить к появлению метастабильных проводящих пор, которые, в свою очередь, увеличивают интегральную проводимость мембран.

Ключевые слова: бислойные липидные мембраны, магнитные наночастицы, электрическая проводимость, липидные поры.

Магнитные наночастицы (МНЧ) широко используются в медицинских приложениях, например, как контрастные вещества для магнитно-резонансной томографии, для усиления гипертермии, для адресной доставки лекарств, тераностики (терапия + диагностика) [1-3]. При этом при использовании МНЧ *in vivo* им требуется специальное покрытие, способствующее биосовместимости и минимизирующее потенциальную токсичность МНЧ в физиологических условиях. В качестве покрытия может быть использован человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), который является транспортным белком, выполняющим множество функций в организме человека [1]. Также в литературе представлены исследования, в которых МНЧ покрыты полиэтиленгликолем (ПЭГ). ПЭГ является биосовместимым, стабилизирующим поверхностно-активным веществом [4].

В этой работе исследовали взаимодействия магнитных наночастиц феррита кобальта с дифитаноилфосфатидилхолиновыми бислойными мембранами. Ранее [5] мы изучали, как меняется проводимость азолектиновых мембран при добавлении наночастиц феррита кобальта, диспергированных в толуоле, в мембранный раствор азолектина в декане. Таким образом, мы изучали ситуацию, когда наночастицы уже находятся в мембране. Сейчас мы использовали наночастицы в гидрофильной оболочке (в ЧСА и ПЭГ), которые добавляли в окружающий мембрану раствор электролита, что в большей степени соответствует реальной ситуации, которая может возникнуть при использовании наночастиц при адресной доставке лекарств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали коллоидный раствор флуоресцентно-меченных кубических магнитных наночастиц феррита кобальта CoFe_2O_4 , которые были синтезированы в НИТУ МИСИС, Россия. Для создания гидрофильной оболочки использовали ЧСА (молекулярный вес ~67 кДа) или ПЭГ (молекулярный вес 3500 г/моль). Средняя диагональ образцов наночастиц составляла 12 (МНЧ-12@BDP-TR) и 27 нм (МНЧ-27@BDP-TR или МНЧ-27@sCy5). Концентрации наночастиц: МНЧ-12@BDP-TR 0,85 мг CoFe_2O_4 /мл, МНЧ-27@BDP-TR 1,2 мг CoFe_2O_4 /мл, МНЧ-27@sCy5 $0,77 \pm 0,02$ мг CoFe_2O_4 /мл.

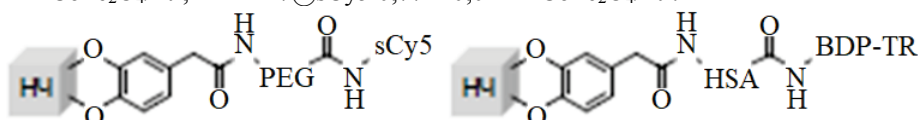


Рисунок 1. Схемы гидрофильных оболочек наночастиц

В этом исследовании флуоресцентных измерений не проводили, поэтому в дальнейшем мы будем использовать следующие обозначения: вместо МНЧ-12@BDP-TR – МНЧ12 ЧСА, вместо МНЧ-27@BDP-TR – МНЧ27 ЧСА, вместо МНЧ-27@sCy5 – МНЧ27 ПЭГ.

Дифитаноилфосфатидилхолин dphpc (Avanti Polar Lipids, Alabaster, США) был использован для формирования плоских бислойных липидных мембран БЛМ в растворе 0,1 М КСl. Мембраны были сформированы на круглом отверстии площадью 0,5 мм² в перегородке тефлоновой кюветы при комнатной температуре 21 ± 1 °С. Мембранный раствор содержал dphpc в х.ч. декане в концентрации 25 мг/мл.

Ток через мембрану измеряли с помощью электродов Ag-AgCl, подключенных к усилителю VA-10X (NPI Electronics GmbH, Германия) с сопротивлением обратной связи 5 ГОм и постоянной времени интегрирования 20 мс. Флуктуации тока через мембрану записывали в компьютер с частотой 1 кГц с помощью 16-разрядного АЦП (L-Card, Россия).

Полученные в экспериментах при постоянном напряжении на мембране токовые треки содержали импульсы. Мы полагаем, что эти импульсы обусловлены сквозными порами. Если рассматривать эти поры как цилиндры и считать, что удельная проводимость в поре равна проводимости в растворе, то радиус пор R определяется известной формулой:

$$R = \sqrt{\frac{gh}{\pi g}}, \quad (1)$$

где $h = 5$ нм – толщина мембраны; G – проводимость поры; $g = 1,04$ См/м – удельная проводимость 0,1 М раствора КСl при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было исследовано 28 мембран: к 10 мембранам добавляли МНЧ12 ЧСА, к 10 – МНЧ27 ЧСА, к 8 – МНЧ27 ПЭГ. Среднее время жизни мембран после полного почернения составляло 82 ± 42 мин (после знака ± указано стандартное отклонение). Сценарий эксперимента был следующим: после посадки мембраны в течение ~15 мин проводили контрольные измерения, потом через каждые ~15 мин в окружающий мембрану раствор, в ближнюю камеру кюветы, добавляли 10, еще 10, еще 40 и еще 40 мкл суспензии наночастиц, а в дальнюю камеру, чтобы исключить перепад давлений, добавляли соответствующий объем раствора. Через ~15 мин после последней добавки в дальнюю камеру кюветы добавляли 100 мкл суспензии наночастиц (100 мкл раствора добавляли в ближнюю камеру), чтобы сравнить концентрации наночастиц в обеих камерах кюветы.

На мембрану подавали постоянное напряжение 25 мВ и регистрировали флуктуации мембранного тока. Проводимость мембран менялась в широких пределах – можно выделить две группы мембран:

1) «непроводящие» мембраны, проводимость которых (после добавления наночастиц) по сравнению с контролем скачком не менялась. Таких мембран было: 50% с МНЧ12 ЧСА, 60% с МНЧ27 ЧСА, 63% с МНЧ27 ПЭГ;

2) «проводящие» мембраны, проводимость которых при добавлении наночастиц менялась скачком и увеличивалась в широком диапазоне на 0,5-2 порядка.

Зависимости проводимости мембран от добавленного в раствор объема наночастиц МНЧ12 ЧСА, МНЧ27 ЧСА, МНЧ27 ПЭГ представлены на рисунке 2. Представлена проводимость, усредненная по временному интервалу между добавками (после последней добавки – до конца записи). Значимых различий между проводимостями при добавлении одинакового объема наночастиц, окруженных ЧСА, нет, поэтому на графике представлен и усредненный результат по мембранам с добавкой МНЧ12 ЧСА, МНЧ27 ЧСА. На графике представлены стандартные ошибки для усредненных результатов. Большие погрешности связаны с большим разбросом данных от мембраны к мембране, в частности с наличием указанных выше двух групп мембран. На графике также представлены аппроксимирующие линии. При добавлении МНЧ с оболочкой из ПЭГ проводимость увеличивалась значительно слабее, чем при добавлении МНЧ с оболочкой из ЧСА.

На рисунке 3 представлены токовые треки (треки проводимости), полученные при мембранном фиксированном потенциале 25 мВ. Каждый трек начинается со скачка тока, после которого следуют разнообразные флуктуации тока: на рисунке 3а-в показаны треки после добавки МНЧ27 ЧСА, на рисунке 3г, д – после добавки МНЧ12 ЧСА, на рисунке 3е, 3ж, 3з – после добавки МНЧ27 ПЭГ. Величины скачков различаются более, чем на порядок от ~3 пА (120 пСм) до ~50 пА (2000 пСм). Для МНЧ с оболочкой из ЧСА после скачка уровень тока остается неизменным в течение длительного времени от секунд до минут. При этом в ряде случаев после скачка проводимости увеличилась дисперсия тока (рис. 3в, 3д; 3г – на некоторых участках). Для МНЧ с оболочкой из ПЭГ ситуация для двух мембран аналогичная (рис. 3ж, 3з), а для одной мембраны открывшиеся поры закрываются через ~1 секунду и значительно повышается дисперсия тока (рис. 3е).

Если считать, что в результате скачка образовывалась цилиндрические проводящие поры, то их радиусы, согласно (1), лежат в диапазоне от 0,4 до 1,7 нм.

Также после последней добавки МНЧ были измерены ВАХ «проводящих» и «непроводящих» мембран. Значимых отличий между ВАХ «проводящих» мембран для МНЧ12 ЧСА и МНЧ27 ЧСА не выявлено, поэтому на рисунке 4 представлена усредненная зависимость, приближенная параболой. ВАХ для «непроводящих» мембран показана для МНЧ27 ПЭГ.

Представленные на рисунке 2 линейные зависимости проводимости от объема добавленных МНЧ из-за колоссального разброса значений могут говорить только о том, что при добавлении МНЧ проводимость мембран

увеличивается, но не могут достоверно определить характер этой зависимости: линейная или нелинейная, если нелинейная, то какая именно? На рисунке 5 приведена медианная зависимость проводимости от объема добавленных МНЧ. Так как число «проводящих» мембран, проводимость которых скачкообразно увеличилась, не превышало половины, то медианная зависимость характеризует проводимость «непроводящих» мембран. Также на рисунке 5 показана средняя проводимость «проводящих» мембран после скачка проводимости. В таблице 1 приведены средние и медианные проводимости для каждой добавки, а также стандартные отклонения. Без МНЧ и при добавке 10 и 20 мкл МНЧ27 ПЭГ медианные проводимости практически равны средним, а стандартное отклонение вдвое меньше среднего значения. Эти данные не противоречат утверждению о распределении проводимости, близком к нормальному. Во всех других случаях медианы меньше средних, а стандартное отклонение превышает среднее значение (при 10 мкл МНЧ12 ЧСА они равны). Это следствие наличия двух групп мембран: «проводящих» и «непроводящих».

Отметим, что проводимость мембран в присутствии МНЧ с ПЭГ значимо меньше, чем в присутствии МНЧ с ЧСА (согласно критерию знаков $p = 0,05$). Это согласуется с данными [6] о том, что добавление ПЭГ вызывает дегидратацию бислоя, что может приводить к уменьшению эффективного размера полярных групп липидов и вызвать более плотную упаковку липидов в мембране, что препятствует возникновению пор. Также экспериментально было показано, что добавление ПЭГ приводит частичному или полному блокированию пор при фазовом переходе, что выражалось в полном исчезновении флуктуаций [7] или уменьшении частоты их появления [8].

Рассмотрим полученные токовые треки. Записи на рисунке 3д, з, ж представляются типичными при добавлении в окружающий мембрану раствор веществ, способствующих увеличению проницаемости мембраны. На записи видны несколько скачков, приводящих к росту проводимости, которые можно связать с возникновением пор. Некоторые поры закрываются, а часть остается открытыми.

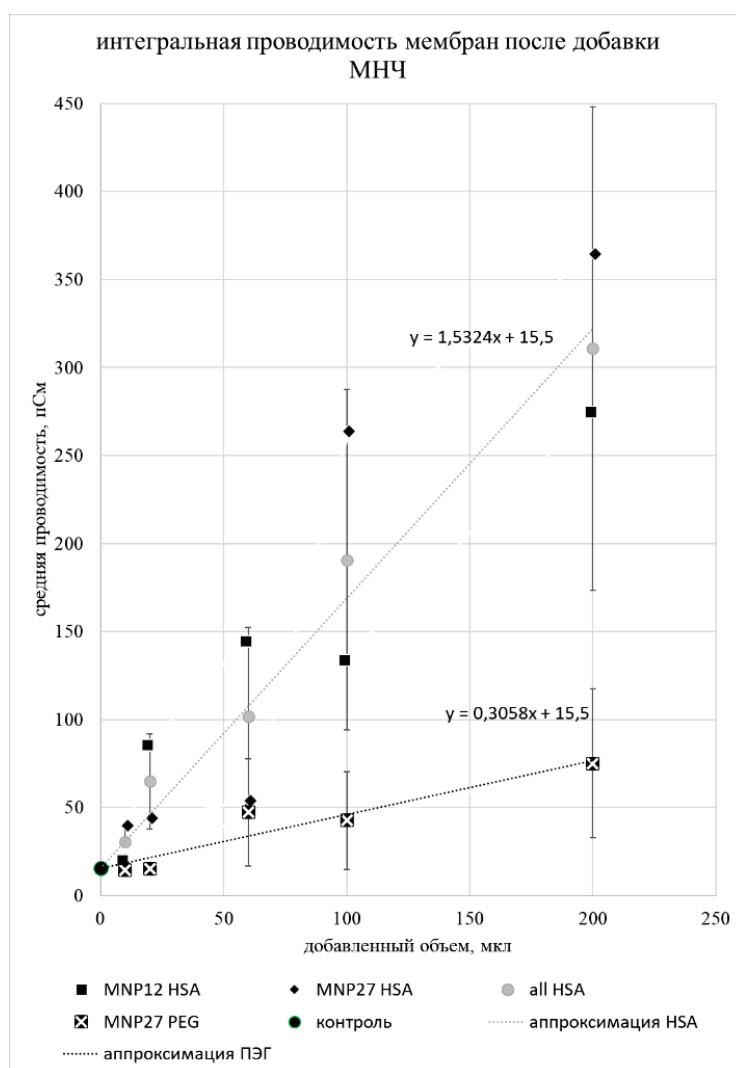
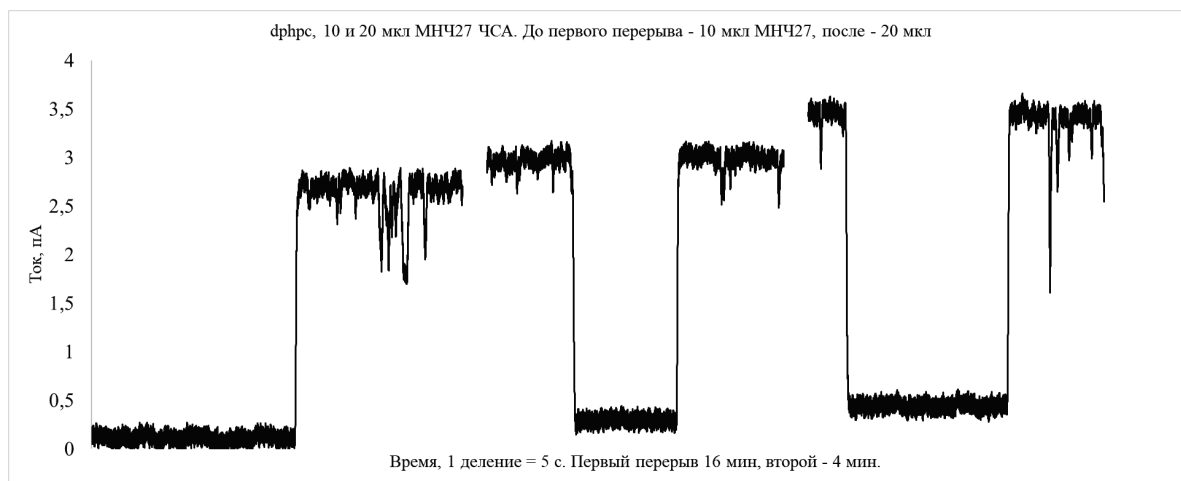
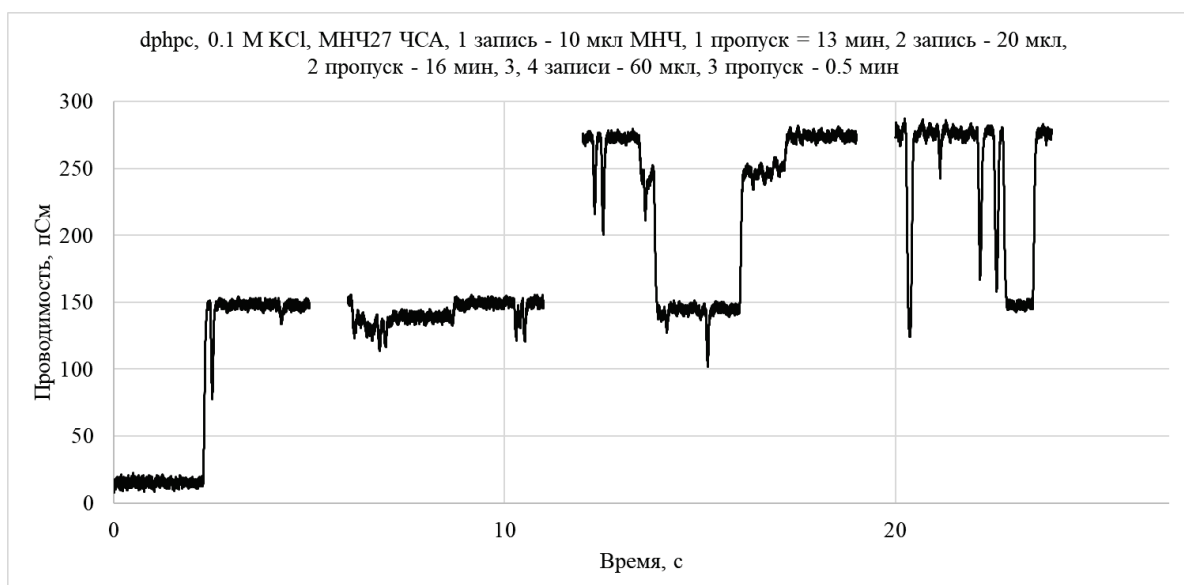


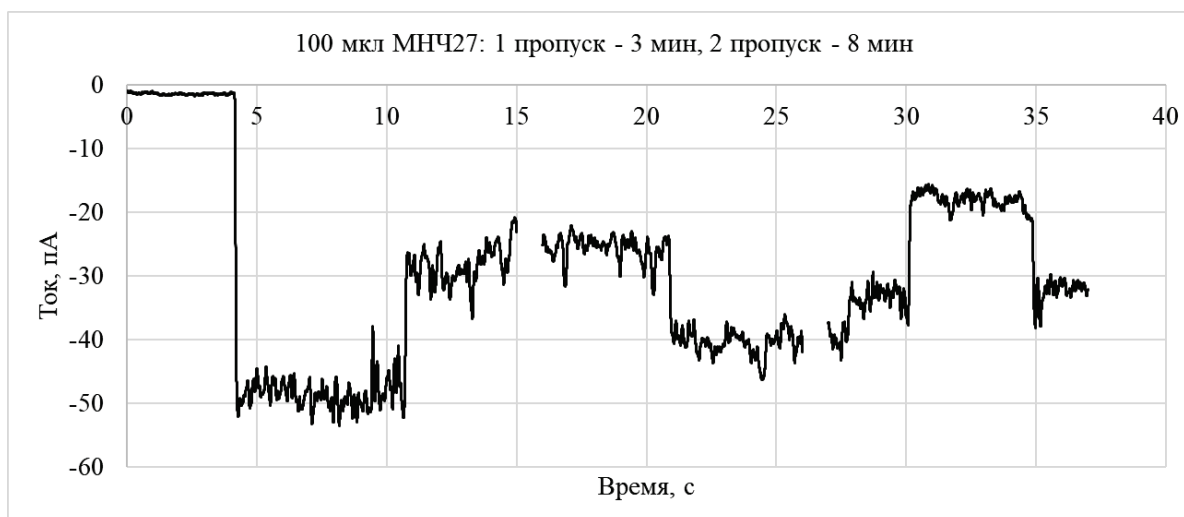
Рисунок 2. Зависимость проводимости БЛМ из dPhrC от объема добавленных в окружающий 0,1 М КСI раствор МНЧ. Указаны стандартные ошибки



а)

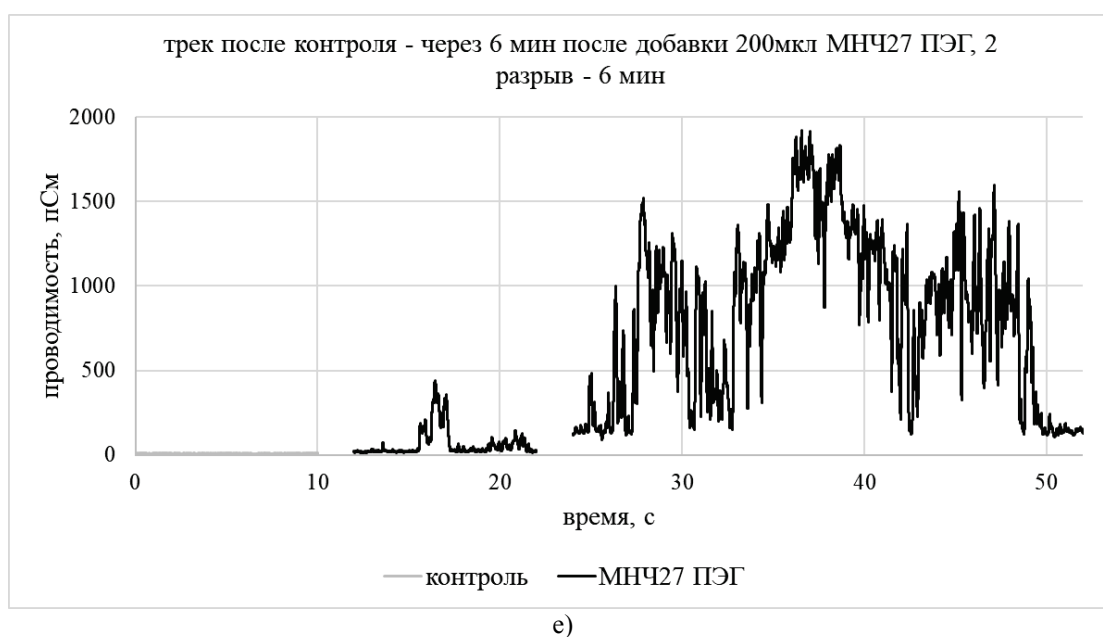
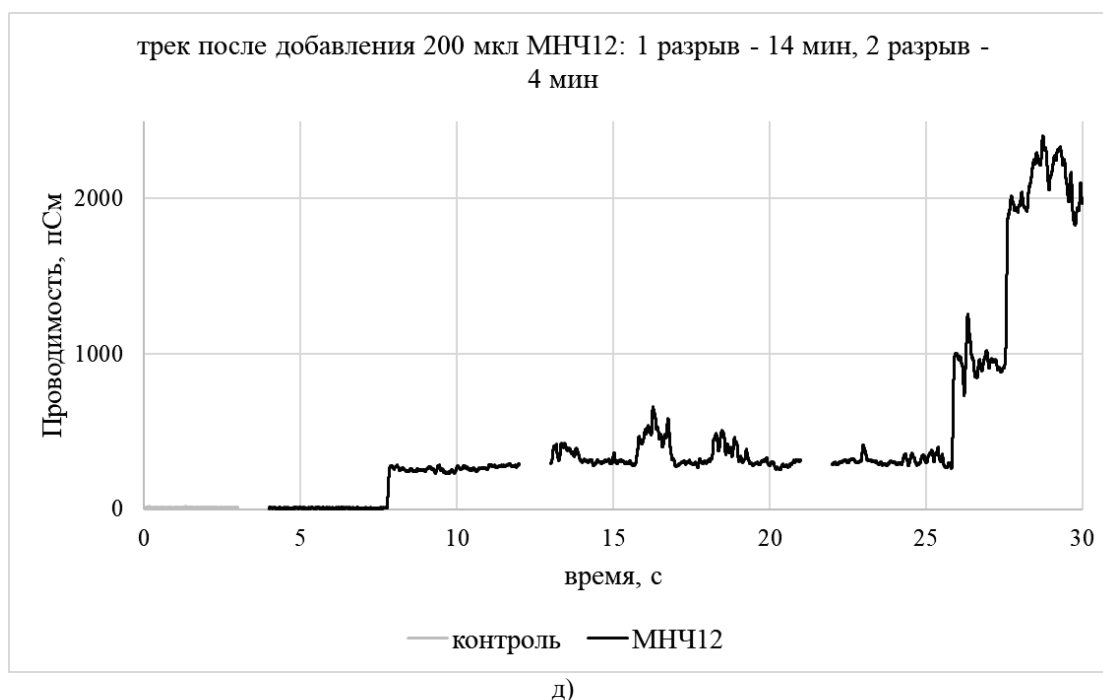
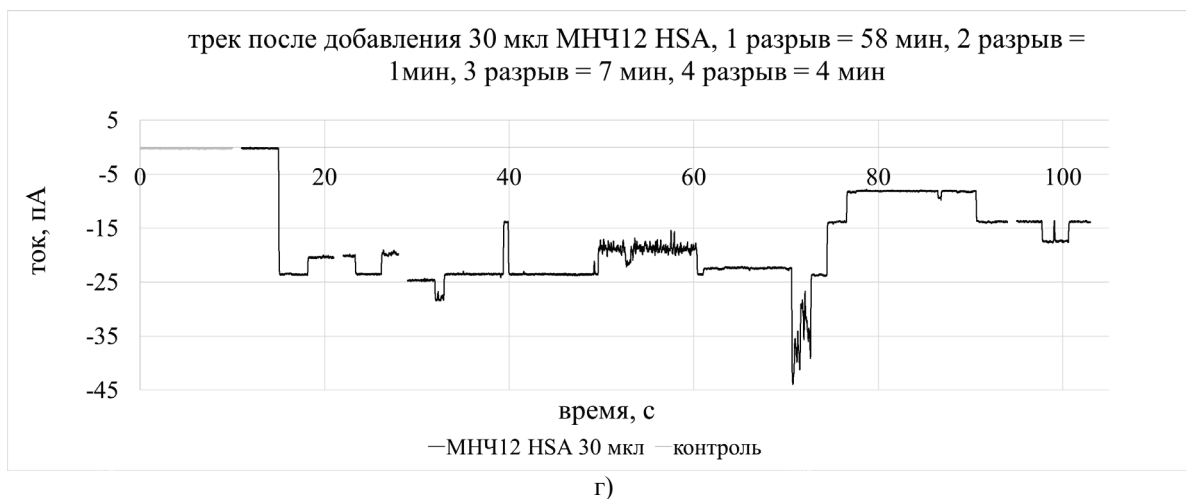


б)

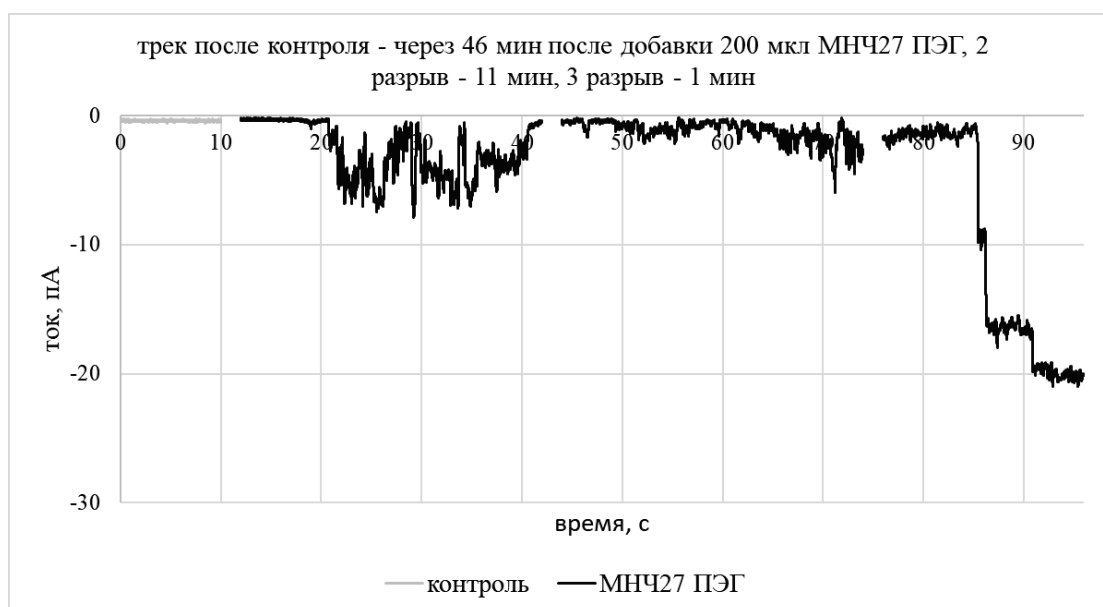


в)

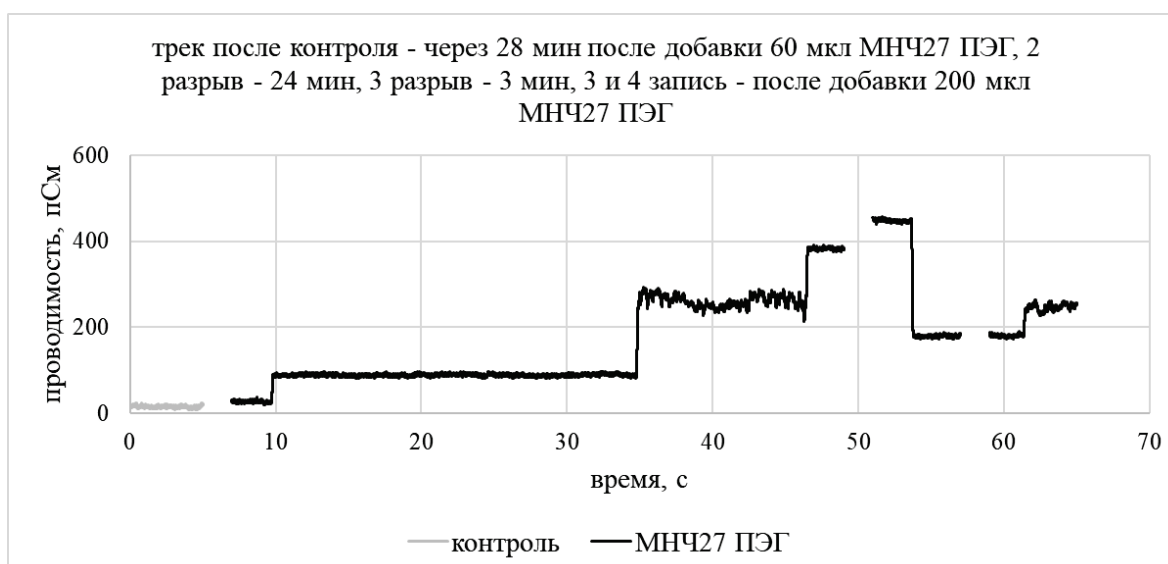
Рисунок 3. Токвые треки (треки проводимости) БЛМ из фрhrs при различных добавках МНЧ27 ЧСА (а, б, в), МНЧ12 ЧСА (г, д), МНЧ27 ПЭГ (е, ж, з). Мембранный потенциал 25 мВ, 0,1 М КСl.



Продолжение рисунка 3



ж)



з)

Продолжение рисунка 3

Запись на рисунке 3б представляется аналогичной: первый скачок проводимости относительно фона (~ 10 пСм) на ~ 140 пСм – возникновение первой поры, затем (с 14-й секунды), проводимость выросла еще на ~ 130 пСм – это может означать возникновение второй поры приблизительно одинакового размера. Момент второго скачка проводимости (время открытия второй поры) зарегистрировать не удалось из-за наводок, возникших, когда в кювету добавляли наночастицы. На записи видно, что одна из пор на некоторое время закрывалась. При этом выделяется участок записи на ~ 18 -19 с – здесь проводимость снизилась только на ~ 25 пСм – это не может быть закрытием одной из открывшихся пор. На записи также видны отрицательные короткие импульсы проводимости амплитудой менее 130 пСм, однако использовать их для определения размера поры нельзя: их длительность меньше времени интегрирования усилителя.

Аналогичная картина представлена на рисунке 3а: можно видеть, что образовалась пора проводимостью около 120 пСм, которая два раза закрывалась на несколько секунд, а потом открывалась вновь. Возможно, но маловероятно, что открывались еще две разные поры, совпадающие по размеру с первой. Заметно увеличение фоновой проводимости на ~ 16 пСм. Интерес представляет участок записи на ~ 13 -й с, где проводимость снизилась только на ~ 40 пСм. Получается, пора на $\sim 0,4$ с уменьшилась в размере, а потом вернулась в прежнее состояние? Это представляется более вероятным, чем предположение, что первый скачок тока связан с одновременным появлением трех пор, которые потом одновременно закрывались и открывались еще два раза.

Указанное противоречие отчетливо проявляется на рисунке 3г. После первого скачка проводимости ~ 960 пСм виден целый ансамбль отрицательных и положительных импульсов тока, связанных, по-видимому, с изменением первоначального размера открывшейся поры. Отметим, что подобную картину мы зарегистрировали, когда добавили гидрофобные наночастицы феррита кобальта, диспергированные в толуоле, в

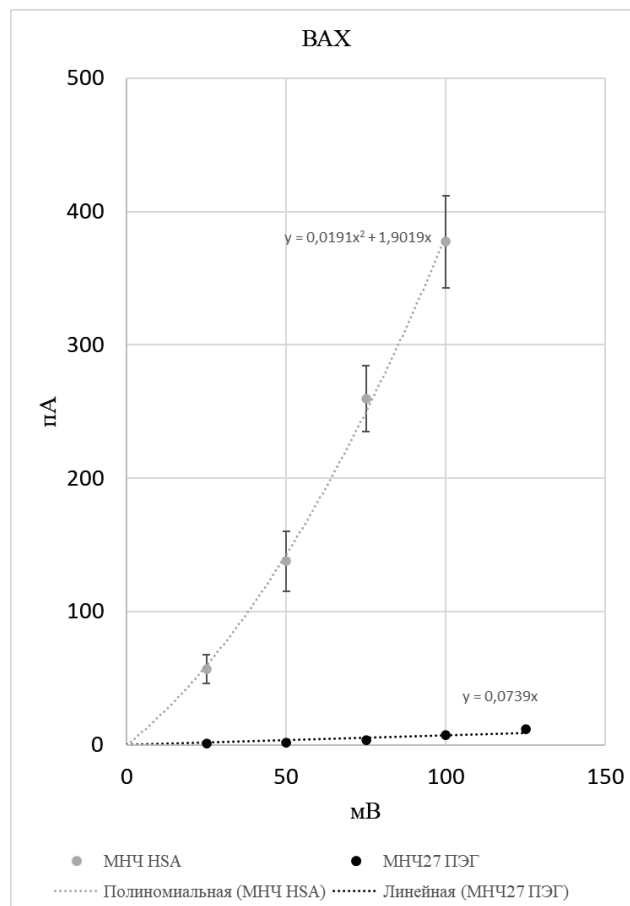


Рисунок 4. ВАХ БЛМ из дрфрс в 0,1 М КСl: 200 мкл МНЧ ЧСА, полученная по трем мембранам (1 мембрана с МНЧ12, 2 – с МНЧ27), у которых был скачок проводимости, и одной мембраны 200 мкл МНЧ27 ПЭГ без скачка проводимости. Представлены аппроксимирующие парабола и прямая. Указаны стандартные ошибки

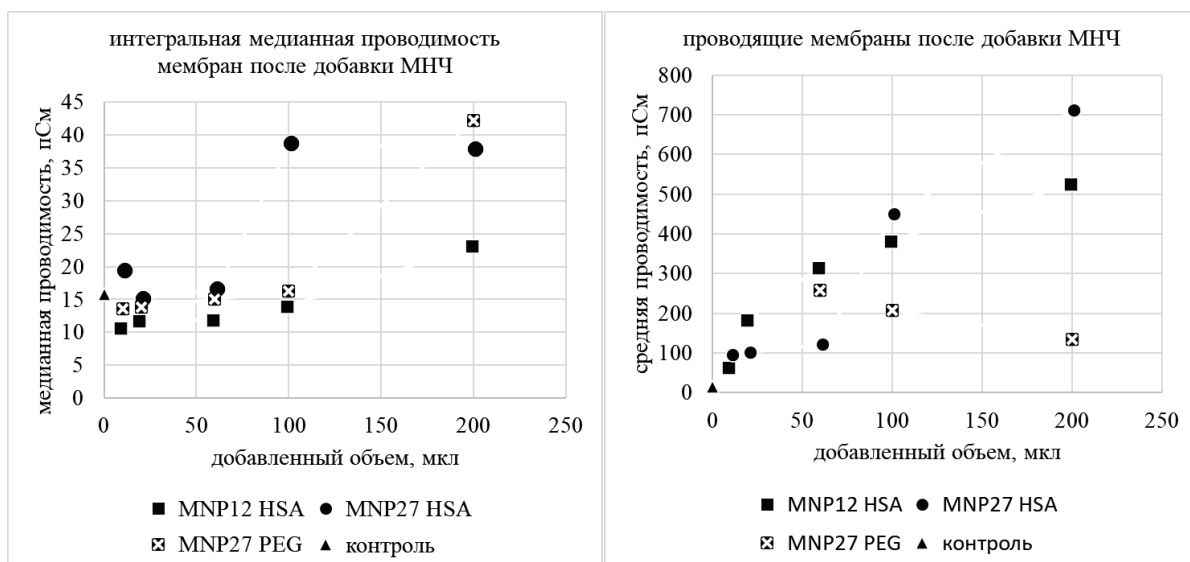


Рисунок 5. Зависимость медианной проводимости мембран и средней проводимости «проводящих» мембран из дрфрс от объема добавленных в окружающий 0.1 М КСl раствор МНЧ

окружающий дрфрс мембрану раствор 0.1 М КСl (рис. 6). Основная доля добавленных частиц сразу ушла на поверхность раствора и расположилась у стенок кюветы, но, видимо, какие-то частицы провзаимодействовали с БЛМ.

Показанные на рисунке 3 импульсы имеют прямоугольную форму, что говорит о метастабильном состоянии возникающих пор. Молекулярная динамика утверждает, что в чисто дрфрс бислоях не могут образовываться гидрофильные поры [9], которые, согласно классической теории [10], являются метастабильными структурами. Возможно, гидрофильная оболочка МНЧ участвует в создании внутренней поверхности мембраны, но это

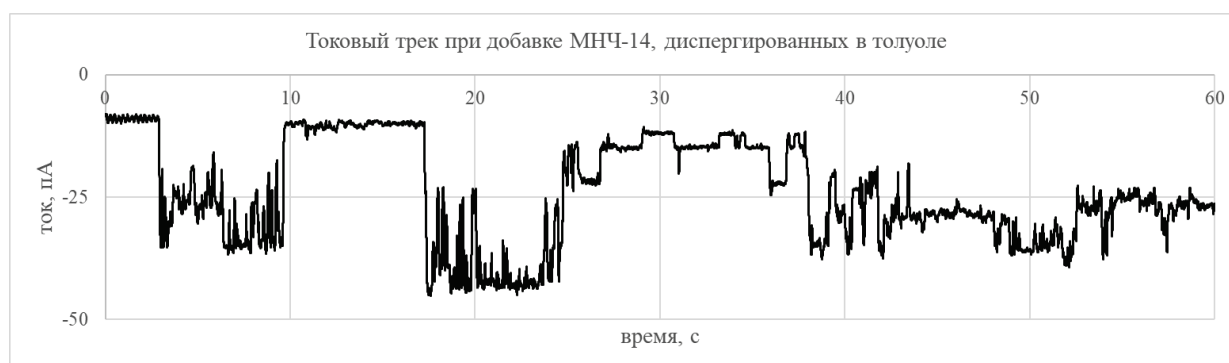


Рисунок 6. Токвый трек БЛМ из dPhrc при добавке МНЧ14, диспергированных в толуоле, в 0,1 М КСl. Мембранный потенциал -50 мВ

Таблица 1. Проводимости мембран в пСм

мкл	МНЧ12 ЧСА			МНЧ27 ЧСА			МНЧ27 ПЭГ		
	среднее	стандартное отклонение	медиана	среднее	стандартное отклонение	медиана	среднее	стандартное отклонение	медиана
0	16	9	16						
10	20	20	11	40	47	21	14	7	14
20	86	155	12	44	51	15	15	8	14
60	145	273	12	54	91	17	47	86	15
100	134	246	14	262	532	27	43	73	16
200	275	406	23	364	721	38	75	104	42

утверждение противоречит данным, представленным на рисунке 6, когда в окружающий мембрану раствор добавлялись гидрофобные частицы без гидрофильной оболочки. Можно предположить, что сама наночастица так связано со структурой поры, что движения наночастицы меняют размер поры.

Отметим работу [11], в которой наночастицы магнетита (Fe_3O_4) диаметром 100 нм, связанные со стрептавидином, взаимодействовали с БЛМ из 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолина в постоянном магнитном поле. Было показано наличие многоуровневых флуктуаций мембранного тока амплитудой ~ 100 пСм. Эти результаты аналогичны нашим (рис. 3а, б, з).

ВЫВОДЫ

1. МНЧ12 и МНЧ27 с гидрофильным покрытием взаимодействуют с dPhrc бислойнными мембранами, что может приводить к появлению метастабильных проводящих пор, которые, в свою очередь, увеличивают интегральную проводимость мембран.
2. По-видимому, указанные проводящие поры в результате взаимодействия с наночастицами могут менять свой размер, оставаясь метастабильными структурами.
3. Если считать, что в dPhrc мембранах могут возникать только гидрофобные поры, то при взаимодействии БЛМ с МНЧ зарегистрированы метастабильные проводящие гидрофобные поры радиусом от 0,4 до 1,7 нм.
4. Проводимость мембран в присутствии МНЧ с ПЭГ значительно меньше, чем в присутствии МНЧ с ЧСА.

Список литературы / References:

1. Chubarov A.S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating. *Magnetochemistry*, 2022, vol. 8, no. 13.
2. Гуляев Ю.В., Черепенин В.А., Вдовин В.А., Таранов И.В., Ярославов А.А., Ким В.П., Хомутов Г.Б. Дистанционная декапсуляция нанокомпозитных липосом, содержащих внедренные проводящие наночастицы, при воздействии импульсного электрического поля. *Радиотехника и электроника*, 2015, т. 60, № 10, с. 1051-1051. [Gulyaev Y.V., Cherepenin V.A., Vdovin V.A., Taranov I.V., Yaroslavov A.A., Kim V.P., Khomutov G.B., Pulsed electric field-induced remote decapsulation of nanocomposite liposomes with implanted conducting nanoparticles. *Journal of Communications Technology and Electronics*, 2015, vol. 60, no. 10, pp. 1097-1108. (In Russ.)]
3. Kislov V., Medvedev B., Gulyaev Y., Taranov I., Kashin V., Khomutov G., Artemiev M., Gurevich S. Organized superstructures at nanoscale and new functional nanomaterials. *International Journal of Nanoscience*, 2007, vol. 6, no. 5, pp. 373-377.
4. Brahmabhatt K., Zhao W., Deng Zh., Mao L., Freeman E. Magnetically responsive droplet interface bilayer networks. Proceedings of the ASME 2015. *Conference on Smart Materials, Adaptive Structures and Intelligent Systems SMASIS2015*, September 21-23, 2015.
5. Аносов А.А., Корепанова Е.А., Коплак О.В., Казаманов В.А., Дерунец А.С., Моргунов Р.Б. Рост электрической проводимости и появление липидных пор под действием магнитных наночастиц CoFe_2O_4 в бислойной липидной мембране. *Электрохимия*, 2022, т. 58, с. 179-187 [Anosov A.A., Korepanova E.A.,

Koplak O.V., Kazamanov V.A., Derunets A.S., Morgunov R.B. The Increase in Electrical Conductivity and the Appearance of Lipid Pores Induced by Magnetic Nanoparticles CoFe₂O₄ in Bilayer Lipid Membranes. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2022, vol. 58, no. 4, pp. 321-328. (In Russ.)]

6. Lehtonen J.Y.A., Kinnunen P.K.J. Changes in the lipid dynamic of liposomal membranes induced by poly(ethylene glycol): free volume alterations revealed by inter- and intramolecular excimer forming phospholipid analogs. *Biophys. J.*, 1994, vol. 66, pp. 1981-1990.

7. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Аносов А.А., Норик В.П., Немченко О.Ю. «Блокирование» полиэтиленгликолем одиночных липидных пор, возникающих в немодифицированных бислойных липидных мембранах при фазовых переходах. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 5, с. 802-809. [Antonov V.F., Smirnova E.Y., Anosov A.A., Norik V.P., Nemchenko O.Y. PEG blocking of single pores arising on phase transitions in unmodified lipid bilayers. *Biophysics*, 2008, vol. 53, pp. 390-395. (In Russ.)]

8. Аносов А.А., Шаракшанэ А.А., Смирнова Е.Ю., Немченко О.Ю. Проницаемость бислоя при фазовом переходе как поток Эрланга гидрофильных пор, возникающих в результате диффузии в пространстве радиусов. *Биологические мембраны*, 2016, т. 33, № 6, с. 387-397. [Anosov A.A., Sharakshane A.A., Smirnova E.Y., Nemchenko O.Y. Bilayer permeability during phase transition as an Erlang flow of hydrophilic pores resulting from diffusion in the radius space. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.*, 2017, vol. 11, pp. 8-16. (In Russ.)]

9. Velikonja A., Kramar P., Miklavcic D., Lebar A.M. Specific electrical capacitance and voltage breakdown as a function of temperature for different planar lipid bilayers. *Bioelectrochemistry*, 2016, vol. 112, pp. 132-137.

10. Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Sokirko A.V. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, vol. 940, pp. 275-287.

11. Mohanta D., Stava E., Yu M., Blick R.H. Creation and regulation of ion channels across reconstituted phospholipid bilayers generated by streptavidin-linked magnetite nanoparticles. *Physical review E*, 2014, vol. 89, 012707.

EFFECT OF COBALT FERRITE MAGNETIC NANOPARTICLES IN HYDROPHILIC COATING ON THE CONDUCTIVITY OF BILAYER LIPID MEMBRANES

Borisova E.D., Kozhemova B.E., Konstantinov O.O., Korepanova E.A., Mikheev V.M., Mikhnich A.V., Sukhova V.I., Astanina P.N., Koplak O.V., Anosov A.A.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Bolshaya Pirogovskaya str., 2, p. 4, Moscow, 119435, Russia
Received 14.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0501

Abstract. Magnetic nanoparticles are widely used in medical applications, for example, as contrast agents for magnetic resonance imaging, to enhance hyperthermia, for targeted drug delivery, theranostics (therapy + diagnostics). When used in vivo, magnetic nanoparticles require a special coating that promotes biocompatibility and minimizes potential toxicity under physiological conditions. Human serum albumin or polyethylene glycol can be used as a coating. In this work, the interactions of magnetic cobalt ferrite nanoparticles (12 and 27 nm size) with diphitanoylphosphatidylcholine bilayer lipid membranes were investigated. The conductivity of membranes varied over a wide range – two groups of membranes can be distinguished – membranes, the conductivity of which (after the addition of nanoparticles) remained practically unchanged compared to the control, and membranes, the conductivity of which, upon the addition of nanoparticles, changed abruptly and increased in a wide range by 0.5–2 orders of magnitude. Significant differences between the conductivities upon the addition of the same volume of 12 and 27 nm nanoparticles surrounded by human serum albumin were not found. When adding nanoparticles with a coating of polyethylene glycol, the conductivity increased much weaker than when adding nanoparticles with a coating of human serum albumin. The results suggest that hydrophilic coated magnetic nanoparticles interact with the membranes, which can lead to the appearance of metastable conducting pores, which, in turn, increase the integral conductivity of the membranes.

Key words: bilayer lipid membranes, magnetic nanoparticles, electrical conductivity, lipid pores.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА

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

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0502

Аннотация. Методами молекулярной механики и молекулярной динамики были исследованы особенности пространственной организации молекулы гиламбатина. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности: Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH₂. В отличие от всех других тахикининов, гиламбатин имеет остаток Met, заменяющий обычный Leu в предпоследнем положении. Тахикининовый пептид гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови. В данной работе было проведено исследование конформационной подвижности молекулы гиламбатина методами молекулярной механики и молекулярной динамики. При конформационном расчете пептида учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. На основе фрагментарного анализа были определены стабильные пространственные структуры додекапептида гиламбатина, которые могут быть представлены в виде набора конформаций, характеризующихся относительно лабильным N-концевым тетрапептидом и конформационно жестким C-концевым октапептидом. В рассчитанных стабильных конформационных состояниях были уточнены и энергетически оценены эффективные взаимодействия боковых цепей остатков и водородные связи. Показано, что молекула гиламбатина предпочитительно формирует практически изоэнергетичные конформации с различными структурными типами на N-конце пептидной цепи, переходящими в виток альфа-спирали на C-конце [2]. Методом молекулярной динамики была смоделирована картина внутримолекулярной подвижности стабильных конформаций молекулы гиламбатина как в вакууме, так и в окружении молекул воды. На основе рассчитанных значений двугранных углов были построены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформационных состояний додекапептида гиламбатина.

Ключевые слова: гиламбатин, тахикинин, конформация, молекулярная механика, молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Гиламбатин является единственным нейропептидом из семейства тахикининов, который имеет остаток метионилметионина на C-конце, а не C-концевой трипептид -Gly-Leu-Met-NH₂, который до сих пор был характерным признаком всех членов семейства тахикининов. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности DPPDPNRFYGMМамид. Гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи африканской ракофоридной лягушки *Hylambates maculatus*. Влияние гиламбатина на секрецию глюкокортикоидных гормонов исследовали на крысах. Гиламбатин, вводимый внутривенно в дозированных дозах за 10 и 30 минут до забора крови, значительно повышал как уровень глюкозы в плазме, так и уровень инсулина в плазме, в то время как секреция глюкагона не влияла [1]. Это свойство гиламбатина отличается от свойств других тахикининов - кассинина или вещества Р. Поскольку гиламбатин, как и другие нейропептиды, присутствует в тканях млекопитающих, он может играть роль в регуляции углеводного обмена. Установлено, что тахикинины в той или иной мере могут взаимодействовать с тремя различными типами тахикининовых рецепторов NK₁, NK₂ и NK₃, но предпочтительно взаимодействуют с NK₁ рецептором. Разные типы рецепторов могут присутствовать в одной и той же ткани, но в разных пропорциях. Обладая значительным структурным сходством участков связывания рецепторов, они легко могут активироваться разными тахикининовыми пептидами, одинаковая C-концевая последовательность которых определяет одинаковую активную пространственную структуру и позволяет объяснить отсутствие строгой специфичности во взаимодействии тахикининов с рецепторами. Сопоставление первичных структур известных тахикининов сразу выделяет похожую консервативную C-концевую и различающиеся N-концевые части этих молекул. Научный интерес к тахикининам, несомненно, обусловлен прежде всего широким спектром их биологических свойств. Большая конформационная подвижность пептидов приводит к существованию в растворе набора конформеров, из которых трудно выделить биологически активный. Однако, поиск циклических и конформационно-ограниченных аналогов, без знания полного набора стабильных конформеров природной молекулы таит в себе определённые недостатки. К недостаткам такого подхода относят трудность подбора жесткого аналога и возможные изменения его спектра действия по сравнению с природным пептидом. Кроме того, при конструировании таких аналогов не учитываются конформационные факторы стабильности

структур: структурообразующая роль отдельных остатков, важность внутримолекулярных межостаточных взаимодействий и ориентация боковых цепей отдельных остатков. Поэтому, целесообразно использование методов молекулярного моделирования для определения всех стабильных конформаций пептидных биорегуляторов и выявления их конформационной подвижности.

МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения молекулы гиламбатина проводилось методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептидов учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Расчет проводился согласно фрагментарному анализу молекулы. Используемая в данном исследовании классификация пептидных структур, и потенциальные функции расчетной схемы полумпирического конформационного анализа и их параметризация описана в работах [3-5]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [6]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов φ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Углы φ и ψ основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ($\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), V ($\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, V, L или P) значений углов φ и ψ . Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов, описанной и примененной в работах [6,7]. Расчет стабильных конформаций молекулы проводился с помощью программы [8]. Расчет двугранных углов вращения φ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [9].

Метод молекулярной динамики, основанный на компьютерном решении уравнения движения Ньютона, позволяет проследить конформационное поведение молекулы во времени. Достаточно широкие диапазоны этого метода позволяют обратиться к исследованию от небольших пептидных молекул до белков, в вакууме и в присутствии растворителя [10,11]. Молекулярная динамика молекул проводилась в следующей последовательности:

1. Ввод начальных данных;
2. Минимизация энергии;
3. Нагрев до 300K;
4. Равновесные симуляции и
5. Молекулярное моделирование.

Молекулярная динамика моделирования была выполнена для молекулы гиламбатина в вакууме, а также в среде, имитирующей водное окружение с использованием объема с молекулами воды [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Согласно результатам расчета стабильных конформаций додекапептид гиламбатина обладает заметной конформационной подвижностью [12]. В наборе низкоэнергетических конформаций доминирующей структурами являются структуры, реализующие небольшой α -спиральный сегмент на C-концевом фрагменте. Предполагая, что именно эти структуры являются физиологически активными конформационными состояниями молекулы гиламбатина, можно определить, как изменяются исходные величины двугранных углов предпочтительных конформаций, выбранные из результатов теоретического конформационного анализа, в различных средах в зависимости от времени и температуры. Для этой цели нами были выбраны энергетически самые предпочтительные конформации с α -спиральным сегментом на C-концевом фрагменте.

На первом этапе молекулярного исследования конформационной подвижности молекулы гиламбатина была проведена симуляция динамики в условиях вакуума. Пошаговым изменением температуры на 5 K были определены средние значения кинетической и полной энергий молекулярной системы. Процесс симуляции проводился во временном интервале 7 нс с шагом 0,001 нс. Следует отметить, что процесс нагревания и релаксации составил 1 нс, процесс охлаждения составил 5 нс. Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях вакуума показана на рисунке 1. На следующем этапе молекулярно-динамическое моделирование для молекул в конформации с минимальным значением полной энергии проводилось в гипотетическом кубическом объеме, содержащем 476 молекул воды с наложенными периодическими граничными условиями. Размер ящика с водой подбирался в соответствии с размерами исследуемой молекулы. Согласно результатам проведенного расчета фрагмент 5-12 сохраняет свернутый характер пептидной цепи до и после оптимизации и водородные связи между CO и NH-группами пептидной цепи не разрушаются в процессе молекулярной динамики, несмотря на изменения во внутримолекулярной энергии нейропептида на 10-15 ккал/моль. Заметная конформационная подвижность наблюдается в ориентации боковых цепей остатков аспарагиновой кислоты, расположенных в N-концевой части молекулы, характерные амплитуды движений этих групп составляют порядка ангстрема, а времена релаксации – порядка наносекунд. На рисунке 2 приведена оптимизированная структура гиламбатина в водном окружении. Допустимые изменения величин двугранных углов внутреннего вращения энергетически самой предпочтительной конформации молекулы гиламбатина при моделировании MD в вакууме и водном окружении представлены в таблице. Устойчивость структуры отдельных фрагментов подтверждают также значения двугранных углов в основной цепи молекулы, пределы изменения

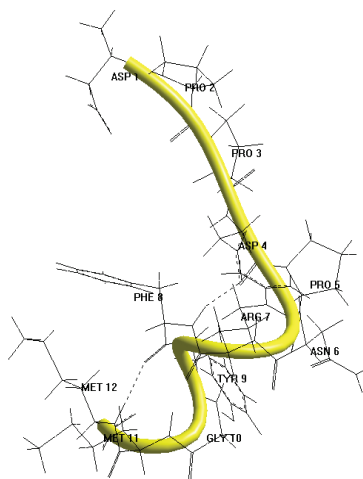


Рисунок 1. Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях вакуума. Желтой линией указана вторичная структура

которых приведены в таблице.

При симуляции как в вакууме, так и в водной среде в глобальной конформации гиламбатина имеют место заметные флуктуации остатков, главным образом, в N-концевой части молекулы. Это, прежде всего варьирование угла ψ остатка Pro³, который изменяется вплоть до перехода из В области в R область конформационного пространства и тем самым меняется конформационное состояние Pro³ в поле исходной конформации.

Таблица 1. Допустимые изменения величин (в градусах) двугранных углов энергетически самой предпочтительной конформации молекулы гиламбатина при моделировании MD в вакууме (верхняя строка) и водном окружении (нижняя строка)

Остаток	Углы основной цепи до и после оптимизации			Углы боковых цепей до и после оптимизации			
	ϕ	ψ	ω	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4
Asp ¹	-66 → -70	137 → 140	177 → 175	185 → 196	94 (+2)		
	-66 → -76	137 → 138	177 → 178	185 → 194	94 (+2)		
Pro ²	-60 → -60	152 → 160	168 → 176				
	-60 → -60	152 → 149	168 → 188				
Pro ³	-60 → -60	146 → -55	182 → 184				
	-60 → -60	146 → -66	182 → 187				
Asp ⁴	-124 → -125	122 → 145	187 → 192	186 → 196	92 (+2)		
	-124 → -126	122 → 155	187 → 198	186 → 192	92 (+2)		
Pro ⁵	-60 → -60	-44 → -50	198 → 173				
	-60 → -60	-44 → -70	198 → 183				
Asn ⁶	-84 → -87	-53 → -55	193 → -169	183 → 173	88 (+2)		
	-84 → -86	-53 → -54	193 → -170	183 → 179	88 (-2)		
Arg ⁷	-101 → -108	-56 → -58	-174 → -178	-56 → -58	183-190		
	-101 → -107	-56 → -54	-174 → -184	-56 → -78	182-194		
Phe ⁸	-64 → -71	-48 → -36	181 → 184	-180 → -168	91-99		
	-64 → -70	-48 → -52	181 → 188	-180 → -167	91-89		
Tyr ⁹	-74 → -60	-30 → -44	-183 → -179				
	-74 → -59	-30 → -54	-183 → -178				
Gly ¹⁰	-62 → -62	-38 → -44	-177 → -175				
	-62 → -61	-38 → -45	-177 → -179				
Met ¹¹	-82 → -94	-55 → -52	-177 → -181	-59 → -59	180	180	180
	-82 → -92	-55 → -52	-177 → -181	-59 → -56	180	181	180
Met ¹²	-86 → -92	-54 → -55	179 → 181	-59 → -59	180	180	180
	-86 → -95	-54 → -55	179 → 181	-59 → -56	180	181	180

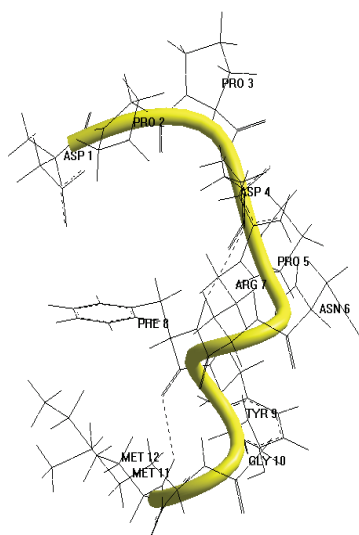


Рисунок 2. Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях явно заданного водного окружения. Желтой линией указана вторичная структура

Следует отметить, такая тенденция к изменению конформационного состояния остатка Pro³ в пределах глобальной конформации молекулы наблюдалась и в результатах теоретического конформационного анализа, т.е. были получены несколько сравнимых по стабильности конформаций, различающихся лишь конформационным состоянием остатка Pro³. При симуляции в водном окружении наблюдается также некоторое варьирование боковых углов остатка Asp⁴, что подтверждает конформационную подвижность этого остатка, несмотря на заряженность его бокового радикала. Следует отметить, что такая подвижность Asp⁴ не чревата потерями в межостаточных взаимодействиях, поскольку имея развернутый в сторону от молекулы отрицательно заряженный радикал Asp⁴ способен взаимодействовать с молекулами воды.

Данное моделирование конформационной подвижности молекулы позволяет заключить, что нейропептид гиламбатин содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование конформаций, необходимых для связывания с рецепторами тахикининов. Полученные результаты могут быть полезны при исследовании механизма действия гиламбатина и создании новых, более эффективных аналогов нейропептидов тахикининового семейства.

Список литературы / References:

1. Gullner H.G., Harris V., Yajima H., Unger R.H., Hylambatin, a structurally unique tachykinin: effects on insulin and glucagon secretion. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1984, vol. 272, no. 2, pp. 304-309.
2. Scheraga H.A. Recent progress in the theoretical treatment of protein folding. *Biopolymers.*, 1983, vol. 22, pp.1-14.
3. Nemethy G., Pottle M.S., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids. *J. Phys.Chem.*, 1983, vol. 87, pp. 1883-1887.
4. Momany F.A., Mc.Guire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides: VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interaction for naturally occurring amino acid. *Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Popov E.M. Quantitative approach to conformations of proteins. *Int. J. Quant. Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
6. Agaeva G.A., Kerimli N.N., Godjaev N.M. Structure-function organization of neurokinin A and neurokinin B molecules I. Theoretical conformational analysis of neurokinin A. *Biofizika*, 2005, vol. 50, no. 2, pp. 203-214.
7. Agaeva G.A., Kerimli N.N., Godjaev N.M. Structure-function organization of neurokinin A and neurokinin B molecules II. Theoretical conformational analysis of neurokinin B. *Biofizika*, 2005, vol. 50, no. 3, pp. 404-412
8. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes. *J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148.
9. Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
10. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, pp. 5179-5188.
11. McCammon J.A., Harvey S.C., Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. *Cambridge Univ. Press*, New York, 1987.
12. Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М. Конформационное поведение молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12). *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 20-25. [Agaeva G.A.,

Safarli G.R., Godzhaev N.M. Konformacionnoe povedenie molekuly hylambatina i ego fragmenta (5-12). *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]

MOLECULAR MODELLING OF CONFORMATIONAL FLEXIBILITY OF HYLAMBATIN MOLECULE

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

Baku State University

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

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2022.0502

Abstract. The features of the spatial organization of the hylambatin molecule were investigated by methods of molecular mechanics and molecular dynamics. Hylambatin consists of twelve amino acid residues in the sequence: Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH₂. Unlike all other tachykinins, hylambatin has a Met residue replacing the usual Leu at penultimate position. The tachykinin peptide hylambatin has been isolated and chemically characterized from methanol extracts of the skin of *Hylambates maculatus*, an African rhacophorid frog. It has been shown that intravenously administered hylambatin significantly increases the level of glucose and insulin in blood plasma. In this paper, the conformational flexibility of the hylambatin molecule was studied by methods of molecular mechanics and molecular dynamics. The conformational calculation of the peptide took into account non-valent and electrostatic interactions, hydrogen bonds and torsion potentials. Based on fragmentary analysis, stable spatial structures of the hylambatin dodecapeptide were determined, which can be represented as a set of conformations characterized by a relatively labile N-terminal tetrapeptide and a conformationally rigid C-terminal octapeptide. In the calculated stable conformational states, the effective interactions of the side chains of residues and hydrogen bonds were refined and energetically evaluated. It has been shown that the hylambatin molecule preferably forms practically isoenergetic conformations with various structural types at the N-end of the peptide chain, passing into the alpha helix at the C-end. By the method of molecular dynamics, the pattern of intramolecular mobility of stable conformations of the hylambatin molecule was modeled both in vacuum and surrounded by water molecules. Based on the calculated values of the dihedral angles, molecular models of energetically preferred conformational states of the hylambatin dodecapeptide were constructed.

Key words: hylambatin, tachykinin, conformation, molecular mechanics, molecular dynamics simulation.

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО-В ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н., Гумматова С.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию 19.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0503

Аннотация. Настоящее исследование посвящено изучению влияния ультрафиолетового-В (УФ-В) излучения на выживаемость и продукцию активных форм кислорода в клетках дрожжей. Установлено, что при действии УФ-В излучения на клетки в зависимости от дозы увеличивается скорость окисления красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF\cdot DA$) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF. При модификации клеток аскорбиновой кислотой до облучения скорость окисления H_2DCF и интенсивность флуоресценции DCF уменьшается. Выживаемость модифицированных клеток увеличивается. Аскорбиновая кислота уменьшает количество АФК в суспензии облученных клеток. При больших дозах ($4,5 \cdot 10^7$ эрг/ mm^2) облучения антиокислительный эффект аскорбиновой кислоты в клетках дрожжей незначителен. Определена концентрация 2-4 динитрофенола (ДНФ) 10^{-7} М как протектора, в которой вещество потенциально способствует проявлению эффекта «мягкого разобщения» в клетках и при влиянии УФ-В излучения на клетки дрожжей способствует снижению производства активных форм кислорода и увеличению выживаемости. Высокие концентрации (10^{-3} М- 10^{-5} М) ДНФ отрицательно влияют на выживаемость клеток дрожжей и продукцию АФК. Таким образом, можно заключить, что при действии УФ-В лучей на клетки дрожжей антиоксиданты возможно могут участвовать в регулировании редокс-гомеостаза.

Ключевые слова: клетки дрожжей, выживаемость, ультрафиолетовое-В излучение, аскорбиновая кислота, 2,4- динитрофенол.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ответных реакций живых организмов на действие неблагоприятных факторов среды является усиление генерации АФК в клетках. Они возникают в реакциях одно, двух и трехэлектронного восстановления кислорода в результате само и ферментативного окисления соединений, в фотоиндуцируемых реакциях и обладают высокой реакционной способностью. Среди АФК выделяют свободнорадикальные частицы – супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), перекисные радикалы (RO_2^{\bullet}) и нейтральные молекулы, такие как пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), озон (O_3) и др. [1,2].

Известно, что накопление активных форм кислорода (АФК) приводит к возникновению окислительного стресса, который определяется как состояние дисбаланса между образованием АФК и способностью антиоксидантной системы (АОС) организма, включая её ферментативные и неферментативные компоненты, нейтрализовать их генерацию [3]. Окислительный стресс является следствием существования живых организмов в среде с высоким содержанием кислорода и сопровождается нарушениями строения и функций всех типов биомолекул, включая нуклеиновые кислоты, липиды и белки [2]. Рядом исследований показано, что регуляторные функции АФК обусловлены обратимой окислительной модификацией аминокислотных остатков в составе белков, главным образом, путем S-сульфенилирования/S-глутатионилирования/S-нитрозилирования/S-перисульфидации остатков цистеина и нитрования остатков тирозина [1,4-15], что обеспечивает поддержание внутриклеточного редокс-гомеостаза и нормальное функционирование клеток. Следовательно, АФК могут иметь не только отрицательное, но и положительное значение в живых системах, выполняя регуляторные функции в клетках. В ходе длительной эволюции живые организмы приобрели адаптивные системы обнаружения, захвата и нейтрализации АФКА и АФГ для защиты клеток от действия их высоких токсичных концентраций и поддержания редокс-гомеостаза [8,13]. В живых организмах возникли сложные приспособительные механизмы, направленные на поддержание концентраций АФКА и АФГ на стабильно низком уровне и их использование для регуляции активности внутриклеточных эффекторов передачи сигнала, инициируемых факторами роста, факторами транскрипции, ферментов и др. [7,13]. Достигается это путем активации в ответ на окислительный стресс эндогенной антиоксидантной системы, состоящей из ферментативных и неферментативных компонентов, которые способны ингибировать реакции окисления и предотвращать образование и дальнейшее распространение образующихся высокореактивных электрофильных продуктов. Среди ферментов, которые могут взаимодействовать с АФКА, следует выделить супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу, пероксиредоксины и др. К неферментативным антиоксидантам относятся витамины, такие как аскорбиновая кислота, альфа-токоферол и ретинол. Кроме того, следует особо выделить вещества, содержащие тиольную группу, такие как глутатион и липоевая кислота, а также дипептид карнозин, мелатонин, билирубин, мочевую кислоту, кофермент Q, ионы переходных металлов, такие как Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} . В физиологических условиях эти системы обезвреживания АФКА действуют скоординировано и способствуют поддержанию редокс-гомеостаза и нормальному функционированию клеток. В клетках млекопитающих и их

внутриклеточных органеллах, включая митохондрии, экспрессируется, как было сказано выше, целый ряд ферментов, вовлеченных в инактивацию АФК, АФА и АФГ. Супероксид анион-радикал, как первичная форма АФК, подвергается реакции дисмутации спонтанно или воздействием супероксиддисмутазы с образованием перекиси водорода. При этом, высокая скорость превращения $\cdot\text{O}_2^-$ в H_2O_2 под действием СОД обеспечивает уменьшение повреждающего действия АФК на клетки [10,16,17].

Известно, что в стрессовых условиях характерно увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), при этом дрожжевые клетки имеют эффективную антиоксидантную систему, способную дезактивировать АФК поддержанием окислительно-восстановительного потенциала клеток. Первая линия ключевых антиоксидантных ферментов защиты включает супероксиддисмутазы СОД и каталазы [9]. Считается, что универсальным механизмом защиты клеток дрожжей в стрессовых условиях: при адаптации к экстремальным рН, при экспозиции с высокими концентрациями прооксидантов и др., является АФК-индуцированное увеличение активности СОД [18].

Нарушение баланса между образованием и утилизацией АФК приводит к их накоплению и усилению ПОЛ, белков, нуклеиновых кислот и др. [16]. Одними из главных мишеней АФК являются липиды мембран, в особенности, ненасыщенные жирные кислоты (ННЖК) [7]. ПОЛ приводит к повреждению липидов, окислению SH-групп белков мембран, инактивации ферментов, нарушению структуры мембран, повышению их проницаемости и гибели клетки [19]. АФК могут активировать нуклеазы, повреждать углеводные мостики между нуклеотидами, что приводит к разрушению цепей ДНК и РНК [1,20]. АФК нарушают структуру тилакоидных мембран, вызывают уменьшение активности хлоропластных ферментов, а также снижают эффективность работы ЭТЦ, повреждая ФС I и II [7].

Таким образом, АФК в клетках низших и высших растений образуются в обычных условиях и принимают участие в метаболизме. Нарушение про и антиоксидантного равновесия при действии неблагоприятных факторов, в том числе низких температур, ведет к их избыточному накоплению, усилению процессов ПОЛ, повреждению макромолекул и гибели клетки [7]. Повышение уровня АФК в клетках, в свою очередь, запускает защитные механизмы, среди которых одним их важнейших считают активизацию работы АОС [14].

Настоящая работа посвящена изучению выживаемости и определению количества АФК в клетках дрожжей при воздействии различных доз УФ-В излучения, а также влияние модификаторов (аскорбиновой кислоты и 2,4-динитрофенола) на эти параметры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Облучение клеток дрожжей осуществляли с помощью ртутной лампы ПРК-4. Доза облучения составляла $1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм², $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм², $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм². Контролем служила суспензия необлученных клеток. Суспензию клеток дрожжей подвергали воздействию УФ-В излучения, затем проводили оценку образования АФК и определяли их жизнеспособность. Клетки дрожжей облучали при 21 °С в присутствии 10-3 М аскорбиновой кислоты (Аск), кроме того, суспензию клеток дрожжей облучали в присутствии 2-4-динитрофенола (ДНФ) в концентрации 10^{-3} М - 10^{-7} М. Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния УФ-В излучения. Для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) суспензию клеток дрожжей *Candida guilliermondii* после десятикратного разведения высевали на твердую среду сусло-агар. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) регистрировали, спустя 24–48 ч инкубации при 30 °С. Выживаемость определяли как процент образовавшихся КОЕ после определенной дозы воздействия к количеству КОЕ до воздействия. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата- $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$. Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$ при деацетилировании эстеразами превращается в H_2DCF . В присутствии АФК H_2DCF окисляется до DCF, который в дальнейшем флуоресцирует в зеленом канале [21]. Для регистрации сигнала использовали спектрофлуориметр. Для определения уровня АФК в клетках дрожжей инкубировали с 50 мкМ $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$ в течение 30 минут, затем определяли интенсивность флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определяли количество АФК, продуцируемого при окислительном стрессе при воздействии УФ-В лучей на дрожжевые клетки. Количество АФК определяли по интенсивности дихлордигидро флуоресцеина при длине волны 488 нм. Флуоресценция зонда возникает при его взаимодействии с АФК, а ее интенсивность характеризует активность свободнорадикальных процессов в клетке.

Избыточное накопление уровня АФК вызывает развитие окислительного стресса, который может вызывать гибель клетки. Клетки дрожжей подвергали облучению в дозе ($1,2 \times 10$ эрг/мм - $4,8 \times 10$ эрг/мм) анализировали изменение изучаемых параметров (рис. 1).

Установлено, что количество АФК в контрольных клетках не увеличивается, а увеличивается их количество после воздействия различных доз УФ-В лучей. Количество АФК не меняется при добавлении антиоксиданта-аскорбиновой кислоты в суспензию контрольных клеток. Однако аскорбиновая кислота уменьшает количество АФК, при воздействии УФ-В излучения на клетки. Из-за воздействия очень высокой дозы УФ-В-лучей

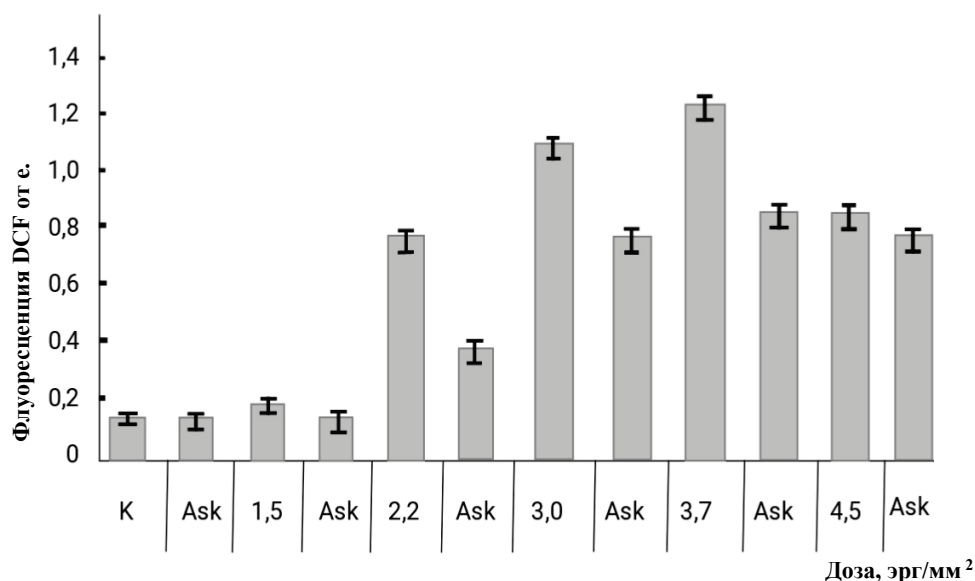


Рисунок 1. Зависимость количества АФК в клетках дрожжей от дозы УФ-В излучения

($4,5 \times 10^4$ эрг/мм²) в клетках наблюдается снижение количества АФК по сравнению с предыдущей дозой ($3,7 \times 10^4$ эрг/мм²), и антиоксидантный эффект аскорбиновой кислоты в этой дозе слаб.

В результате ранее проведенных исследований нами было установлено, что 95% дрожжевых клеток инактивируются при воздействии УФ-В лучей в дозе $4,5 \times 10^4$ эрг/мм².

Из литературы известно, что не только ДНК, но и фотоингибирование клеточного дыхания могут играть роль в процессе инактивации клеток за счет УФ-В-лучей с длиной волны 313 нм [22]. По данным литературы, фосфолипиды в мембране клеток *Candida guilliermondii* составляют 30%. Это позволяет предположить, что АОА (антиоксидантная активность) этой клетки высока. При высоких дозах УФ-В-лучей ускоряется процесс перекисного окисления липидов, так как происходит прямой фотолиз антиоксидантов. Причиной этого является быстрый фотолиз антиоксиданта из-за высокого коэффициента поглощения на этих длинах волн. По-видимому, при облучении клеток дрожжей большими дозами УФ-В излучения уменьшение антиокислительной активности аскорбиновой кислоты связано с использованием аскорбиновой кислоты также в процессе перекисного окисления липидов.

В представленной работе для активизации адаптационных механизмов клеток при воздействии УФ-В излучения в суспензию клеток добавляли различные концентрации ДНФ.

Влияние ДНФ на клетки зависит от соотношения его ионизированной и неионизированной форм в среде. Известно, что снижение потенциала митохондриальной мембраны при концентрациях ДНФ ниже 0,01 мМ связано с увеличением протонной проницаемости митохондриальной мембраны. При длительном применении ксенобиотика происходит ускорение митохондриального дыхания, снижается скорость образования АФК (в микросомальной окислительно-восстановительной цепи), снижается количество гидроперекисей липидов [23].

Уменьшить количество АФК можно путем частичного отделения дыхания от окислительного фосфорилирования при условии сохранения синтеза АТФ для поддержания нормальной жизнеспособности клеток [11,24]. Этот механизм называется «мягким разобщением» («mild» uncoupling). Это достигается за счет увеличения проницаемости митохондриальной мембраны для протонов H⁺, что приводит к увеличению утилизации кислорода. Из-за снижения концентрации кислорода ослабляется процесс образования АФК [25].

Таким образом, снижение продукции АФК является потенциальным механизмом замедления старения клеток [5]. В результате воздействия концентраций «мягкого разобщения» ДНФ кинетика роста и гибели культуры клеток не изменяется, а жизнеспособность не повышается. Считается, что оптимальная концентрация ДНФ находится в пределах от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М [25,23].

При изучении процесса старения дрожжевых клеток установлено, что ДНФ увеличивает как хронологическую, так и репликативную продолжительность жизни [12]. Отмечено, что ДНФ оказывает положительное влияние на различные модельные объекты, но оказывает положительное влияние ДНФ в очень небольшом диапазоне концентрации.

В исследованиях, проводимых нами установлено, что при добавлении ДНФ в суспензию клеток дрожжей при низких (10^{-7} М) концентрациях увеличивается выживаемость клеток и обладает протекторными свойствами, но при высоких концентрациях (1×10^{-4} - 1×10^{-3} М) такой эффект не наблюдается (рис. 2). Схожие данные нами были получены и при изучении влияния ДНФ на миллисекундную эмиссию света акридинового оранжевого в клетках дрожжей [26]. Концентрация ДНФ 10^{-7} мягко разобщающая и защищает клетки дрожжей от повреждения при действии УФ-В излучения.

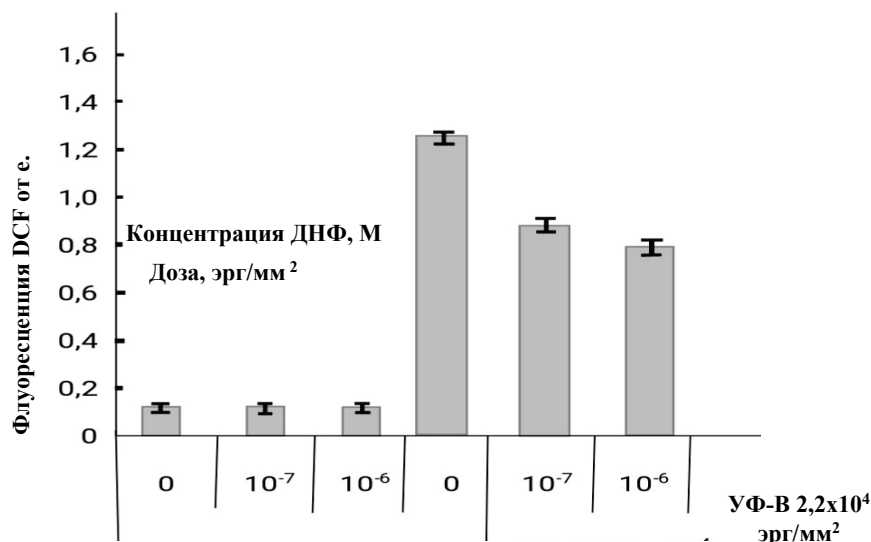


Рисунок 2. Зависимость количества АФК в клетках дрожжей от концентрации ДНФ после воздействия УФ-В излучения (доза УФ-В $2,2 \times 10^4$ эрг/мм²).

Из представленных данных следует, что при действии на клетки УФ-В лучами увеличивается скорость окисления зонда (H_2DCF) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF, но при модификации клеток аскорбиновой кислотой и ДНФ концентрацией 10^{-7} М скорость окисления и интенсивность DCF уменьшается. Кроме того, увеличивается жизнеспособность модифицированных клеток. Таким образом, можно заключить, что при действии УФ-В лучей на клетки дрожжей антиоксиданты возможно могут участвовать в регулировании редокс-гомеостаза.

Список литературы / References:

- Mittler R. ROS are good. *Trends Plant Sci.*, 2017, vol. 22, pp. 11-19.
- Noctor G. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochem.*, 2015, vol. 112, pp. 33-53.
- Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, vol. 86, pp. 715-748.
- Adams L., Franco M.C., Estevez A.G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 240, pp. 711-717.
- Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.*, 2000, vol. 35, no. 6-7, pp. 811-820, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00135-2.
- Egea J., Fabregat I. European contribution to the study of ROS: a summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology*, 2017, vol. 13, pp. 94-162.
- Gill S.S. Tuteja Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010, vol. 48, pp. 909-930.
- He L., He T. et al Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, vol. 44, pp. 532-553.
- Herrero E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 1780, pp. 1217-1235.
- Inupakutika M.A. et al The evolution of reactive oxygen species metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2016, vol. 67, pp. 5933-5943.
- Korshunov S.S. et al High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 416, no. 1, pp. 15-18.
- Mookerjee S.A. et al Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech. Ageing Dev.*, 2010, vol. 131, no. 7-8, pp. 463-472.
- Niki E. Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, vol. 595, pp. 19-24.
- Noctor G. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochem.*, 2015, vol. 112, pp. 33-53.
- Ray P.D., Huang, B.W et al Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation and signaling. *Cell Signaling*, 2012, vol. 24, pp. 981-990.
- Креславский В.Д., Аллахвердиев С.И. и др. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений*, 2012, т. 59, № 2, с. 163-178. [Kreslavskij V.D., Allahverdiev S.I. et al. Signal'naja rol' aktivnyh form kisloroda pri stresse u rastenij. *Fiziologija rastenij*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 163-178. (In Russ.)]
- Ursini F., Maiorino M., Forman H.J. Redox homeostasis: the golden mean of healthy living. *Redox Biology*, 2016, vol. 8, pp. 205-215.

18. Секова В.Ю. и др. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к pH-стрессу. *Прикладная биох. и микробиол.*, 2015, т. 51, № 6, с. 570-577. [Sekova V.Ju. et al. Okislitel'no-vosstanovitel'nyj status jekstremofil'nyh drozhzhej *Yarrowia lipolytica* pri adaptacii k rN-stressu. *Prikladnaja biokh. i mikrobiol.*, 2015, vol. 51, no. 6, pp. 570-577. (In Russ.)]
19. Sharma P., Sharma P., Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.*, 2012, art. id 217037, pp. 1-26, doi: 10.1155/2012/217037.
20. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, vol. 33, pp. 8-13.
21. Suzuki N., Suzuki N., Koussevitzky S. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 259-270.
22. Фрайкин Г.Я. Молекулярные механизмы деструктивных, защитных и регуляторных фотобиологических процессов. моногр. Фрайкин Г. Я.; М:000 "АР-консалт", 2016, 88 с. [Frajkin G.Ja. *Molekuljarnye mehanizmy destruktivnyh, zashhitnyh i reguljatornyh fotobiologicheskix processov*. monogr. Frajkin G. Ja.; М:000 "AR-konsalt", 2016, 88 p. (In Russ.)]
23. Подалько В.И. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте. *Успехи геронтологии*, 2010, т. 23, № 1, с. 98-103. [Podal'ko V.I. Vlijanie 2,4-dinitrofenola na intensivnost' okislitel'nyh processov v pecheni krysv v dlitel'nom jeksperimente. *Uspexi gerontologii*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 98-103. (In Russ.)]
24. Starkov A.A. Mild uncoupling of mitochondria. *Bioscience Rep.*, 1997, vol. 17, no. 3, pp. 273-279.
25. Моргунова Г.В., Кармушаков А.Ф. и др. Изучение влияния «мягкого разобщения» 2,4-динитрофенолом на рост последующую гибель в стационарной фазе культуры клеток китайского хомячка. *Вестн. Моск. Ун-Та. сер. 16. Биология*, 2019, т. 74, № 3, с. 207-214. [Morgunova G.V., Karmushakov A.F. et al. Izuchenie vlijanija «mjagkogo razobshhenija» 2,4-dinitrofenolom na rost posledujushhuju gibel' v stacionarnoj faze kul'tury kletok kitajskogo homjachka. *Vestn. Mosk. Un-Ta. ser. 16. Biologija*, 2019, vol. 74, no. 3, pp. 207-214. (In Russ.)]
26. Гумматова С.Т., Кочарли Н.К. и др. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей. *Фундаментальные исследования*, 2011, № 11, с. 590-593. [Gummatova S.T., Kocharli N.K. et al. Vlijanie 2,4-dinitrofenola na intensivnost' msek-ZJeS AO v kletkah drozhzhej. *Fundamental'nye issledovanija*, 2011, no. 11, pp. 590-593. (In Russ.)]

PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES UNDER THE ACTION OF UV-B RADIATION ON YEAST CELLS.

Kocharli N., Gummatova S.

Baku State University

Z. Khalilova str., 23, Baku, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Received 19.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0503

Abstract. The present investigation is devoted to the study of the effect of ultraviolet-B (UV-B) radiation on the survival and production of reactive oxygen species in yeast cells. It has been determined that under the action of UV-B radiation on cells, depending on its dose, the rate of oxidation of the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF•DA) increases and a high intensity of DCF fluorescence is observed. When cells are modified with ascorbic acid before irradiation, the rate of H₂DCF oxidation and the intensity of DCF fluorescence decreases. The survival rate of modified cells is increased. Ascorbic acid reduces the amount of ROS in the suspension of irradiated cells. At high doses (4.5-10 erg/mm²) of irradiation, the antioxidant effect of ascorbic acid in yeast cells is negligible. The concentration of 2-4 dinitrophenol (DNF) 10⁻⁷ M was determined as a protector, in which the substance potentially contributes to the manifestation of the effect of "soft uncoupling" in cells and, under the influence of UV-B radiation on yeast cells, helps to reduce the production of reactive oxygen species and an increase in survival. High concentrations (10⁻³M–10⁻⁵ M) of DNP adversely affect the survival of yeast cells and ROS production. So, it can be concluded that under the action of UV-B rays on yeast cells, antioxidants can possibly participate in the regulation of redox homeostasis.

Key words: yeast cells, survival, ultraviolet-B radiation, ascorbic acid, 2,4-dinitrophenol.

ОЦЕНКА ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРОСЛИ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* ПО ИСТИННОМУ СПЕКТРУ ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТАБЛИЧНОГО ПРОЦЕССОРА

Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Серяк Е.С.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0504

Аннотация. В работе описан метод математического разделения спектра поглощения культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* с применением табличного процессора – программой Microsoft Excel. Данный метод представляет анализ и разделение перекрывающихся полос пигментов в нативном спектре поглощения культуры. Спектры культуры были записаны на спектрофотометре вблизи и на расстоянии от входного окна интегрирующей сферы. Рассчитан истинный спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние в области от 400 до 750 нм. Истинный спектр поглощения культуры аппроксимировали математической моделью, в которой неизвестными параметрами являются концентрации хлорофилла *a*, В-фикоэритрина, R-фикоцианина, аллофикоцианина и суммарных каротиноидов. Модели пигментов представлены суммой кривых нормального распределения. Реализация вычислений, выполняющих подбор концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнена при помощи табличного процессора с использованием инструмента «Поиск решения». Предлагаемый способ математической обработки спектра может быть использован как экспресс метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде. Применение данного метода позволяет оценить вклад пигментов в общий спектр поглощения культуры.

Ключевые слова: порфиридиум, каротиноиды, хлорофилл *a*, фикобилины, истинный спектр поглощения, гауссианы, табличный процессор.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в культурах микроводорослей продолжает оставаться одной из сложнейших задач в теоретическом и практическом плане. Как правило необходимо взять пробу из культуры, разрушить клетку с последующим извлечением пигмента из раствора [1-5]. Однако, данный метод является затратным по времени и реактивам. Возникает вопрос о нахождении быстрого и точного метода по определению количественного и качественного пигментного состава культуры микроводоросли.

Известно, что спектр поглощения культуры микроводорослей несёт в себе информацию о пигментном составе. Чтобы получить данные из спектра, применяются математические модели, которые заключаются в том, что нужно описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми Гаусса [6,7]. На сегодняшний день остаётся актуальна разработка экспресс-методов определения содержания пигментов в клетках микроводорослей. Развитие информационных систем позволило существенно сократить сроки проведения экспресс-анализов [8].

В настоящей работе выполнен анализ и разделение перекрывающихся полос пигментов в нативном спектре поглощения культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* с использованием табличного процессора Microsoft Excel.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для разделения истинного спектра поглощения на модели отдельных пигментов использовались спектры культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew & Ross (1965). Культивирование проводилось аналогично, как представлено в работе [9]. Освещённость составляла 5 клк.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄). Кварцевые кюветы располагали в стандартном положении и на расстоянии от входного окна ИС.

Для определения истинного спектра поглощения использовали подход, предложенный в [10,11]:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (1)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее опубликованных работах [12-15] показано, что спектр поглощения культуры микроводоросли описывается суммой кривых Гаусса (2):

$$D_{Pigment} = C_{Pigment} \times \varepsilon_{Pigment} \sum_{i=1}^N a_N \exp \left(-0.5 \left(\frac{\lambda - \lambda_{p_N}}{\sigma_N} \right)^2 \right), \quad (2)$$

где:

- $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед;
- D_{max} – амплитуда пика N, отн. ед;
- λ – длина волны, нм;
- $\lambda_{max} = \lambda_{p_N}$ – положение максимума пика N, нм;
- σ – полуширина пика N, нм.
- $D_{Pigment}$ – оптическая плотность отдельного пигмента, отн. ед;
- $C_{Pigment}$ – концентрация отдельного пигмента (г/л);
- $\varepsilon_{Pigment}$ – экстинкция пигмента ($\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);
- N – количество кривых Гаусса, примененных при описании пигмента;
- a_N – амплитуда пика, отн. ед.

В предыдущем исследовании [16] составлена модель спектра поглощения культуры *P. purpureum* для красной области (550–750 нм). Модель всего спектра ($D(\lambda)$) красной водоросли представляет собой сумму оптических плотностей хлорофилла *a* (D_{Chla}), суммарных каротиноидов ($D_{sum.car}$) и фикобилиновых пигментов, представленные В-фикоэритрином (D_{B-PE}), R-фикоцианином (D_{R-PC}) и аллофикоцианином (D_{APC}):

$$D(\lambda) = D_{B-PE} + D_{R-PC} + D_{APC} + D_{Chla} + D_{sum.car}. \quad (3)$$

Для расчёта концентрации пигментов *P. purpureum* использованы следующие коэффициенты экстинкции водных растворов фикобилиновых пигментов [17]: В-фикоэритрина – (545 нм) $10,0 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; R-фикоцианин (615 нм) $7,0 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; аллофикоцианин (650 нм) $5,8 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Коэффициент экстинкции хлорофилла *a* в нативной форме [18] – $76 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Коэффициент экстинкции общих каротиноидов по литературным данным составляет $250 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [1].

Результаты математического разделения спектра культуры *P. purpureum* на отдельные кривые представлен на рисунке 1. Значения параметров моделей нативных пигментов (для удобства расчетов приведены к 1), обозначены в таблице 1.

Решение оптимизационной задачи нахождения концентрации в культуре микроводорослей проводилось с использованием табличного процессора MS Excel при помощи надстройки «Поиск решения». При этом параметры поиска решения задавались следующим образом:

- оптимизировалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений, стремилась к минимуму;
- поиск решения проводился методом общего понижающего градиента (ОПГ) с точностью сходимости 0,0000001;
- случайное начальное значение было принято равным 1;
- ограничения искомым значений концентрации были заданы в интервале от (0; ∞).

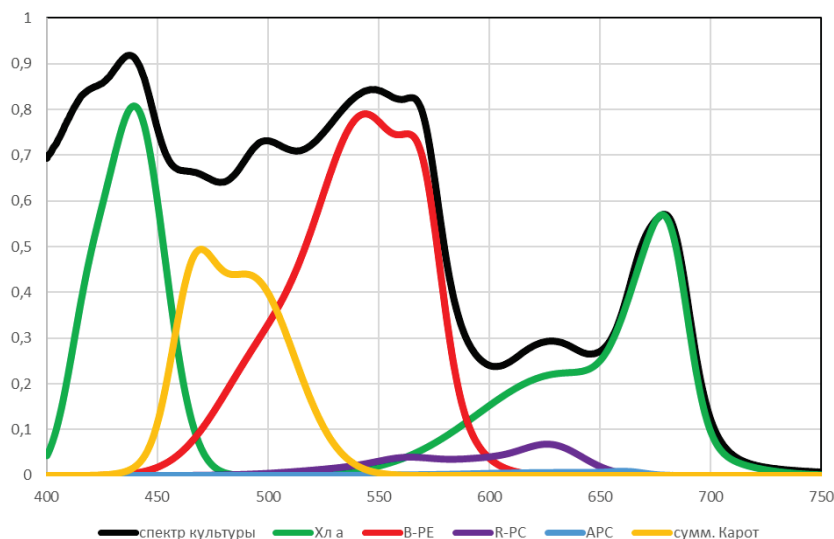


Рисунок 1. Пример разделения спектра поглощения культуры *P. purpureum*

Таблица 1. Параметры моделей пигментов

пигмент	параметр	№ пика				
		1	2	3	4	5
хлорофилл <i>a</i>	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,4584	1,3936	0,3917	0,5428	0,3618
	σ полуширина пика, нм	9,03	12,99	38,54	12,05	7,94
	λ_{max} положение максимума пика, нм	417,8	440,2	633,4	673,3	683
В-фикоэритрин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,2902	0,9791	0,3565	-	-
	σ полуширина пика, нм	20,94	22,43	8,31	-	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	497,1	544,8	570,3	-	-
R-фикоцианин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,3157	0,2605	0,33	0,9421	-
	σ полуширина пика, нм	32,8	12,9	14,3	14,4	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	555,8	563,5	596,7	627,8	-
аллофикоцианин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,2418	0,4053	0,4389	0,6459	-
	σ полуширина пика, нм	37,7	20,6	14,1	7,3	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	595,5	618,6	647,3	662,6	-
суммарные каротиноиды	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,5902	0,8812	-	-	-
	σ полуширина пика, нм	9,16	19,8	-	-	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	465,5	491,8	-	-	-

В предлагаемом нами методе расчета в табличном процессоре все коэффициенты экстинкции, а также характеристики отдельных пиков могут быть изменены. Авторы готовы выслать файл для автоматизации расчета на электронную почту заинтересованным лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан автоматический расчёт с помощью табличного процессора MS Excel, позволяющий быстро и точно определить концентрации фотосинтетических пигментов красной морской водоросли *P. purpureum* в области 400 – 750 нм. Для использования данного метода необходимо только наличие программного обеспечения Microsoft Excel и истинного спектра поглощения культуры, компенсированного на рассеяние.

Список литературы / References:

1. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли суммарных каротиноидов в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl.: учебно-методическое пособие.* РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, Севастополь, 2017, 12 с. [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl.: educational and methodological manual.* RAS, A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Sevastopol, 2017, 12 p. (In Russ.)]
2. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие.* РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского. Севастополь, 2017, 21 с. [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of C-phycoerythrin and allophycocyanin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Cold extraction: a teaching aid.* Russian Academy of Sciences, Institute of Marine Biological Research, A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 21 p. (In Russ.)]
3. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1179-1187, doi: 10.1104/pp.91.3.1179.
4. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015, т. 25, № 1, с. 35-40. [Kopytov Yu.P. et al. The method of complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algologiya*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 35-40. (In Russ.)]
5. Zdenko G., Bumba L., Schrofel A., Herbstova M., Nebesarova J., Vacha F. Organisation of Photosystem I and Photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concepts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1767, no. 6, pp. 725-731, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.01.021.
6. Коваленко А.В., Вовк С.М., Плахтий Е.Г. Метод декомпозиции суммы гауссовых функций, составляющих экспериментальный спектр фотолуминесценции. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2021, т. 88, № 2, с. 297-302. [Kovalenko A.V., Vovk S.M., Plakhtii Y.G. The Sum Decomposition Method for the Gaussian Functions Comprising the Experimental Photoluminescence Spectrum. *Zhurnal Prikladnoii Spektroskopii*, 2021, vol. 88, no. 2, pp. 297-302. (In Russ.)]
7. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analyt. Chem.*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.

8. Гаврилов П.Е., Лелеков А.С., Малахов А.С., Умеров Э.Э. Экспресс-метод определения спектра поглощения культуры микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 4, с. 758-762. [Gavrilov P.E., Lelekov A.S., Malakhov A.S., Umerov E.E. Express method for determining the absorption spectrum of microalgae culture. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 758-762. (In Russ.)]
9. Гудвиллович И.Н., Лелеков А.С., Мальцев Е.И., Куликовский М.С., Боровков А.Б. Рост культуры *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) и продукция В-фикоэритрина при различной освещённости. *Физиология растений*, 2021, т. 68, № 1, с. 103-112. [Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Maltsev E.I., Kulikovskiy M.S., Borovkov A.B. The growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) culture and the production of B-phycocerythrin in different light conditions. *Fiziologiya rastenij*, 2021, vol. 68, no. 1, pp. 103-112, doi: 10.31857/S0015330320060056. (In Russ.)]
10. Merzlyak M.N., Naqvi, K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2000, vol. 58, pp. 123-129. doi: 10.1016/S1011-1344(00)00114-7.
11. Ключкова В.С., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Ширяев А.В., Бучельников А.С., Шупова Е.В. Изменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 543-547. [Klochkova V.S., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Shiryaev A.V., Buchelnikov A.S., Shupova E.V. Changes in the optical density spectrum of the enrichment culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 543-547. (In Russ.)]
12. Чернышев Д.Н., Тренкеншу Р.П. Модель реконструкции спектра поглощения красной области *Spirulina platensis* in vivo по характеристикам растворов хлорофилла а и фикобилинов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 4, с. 467-471. [Chernyshev D.N., Trenkenshu R.P. Model of reconstruction of the absorption spectrum of the red region of *Spirulina platensis* in vivo according to the characteristics of solutions of chlorophyll a and phycobilins. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 467-471. (In Russ.)]
13. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *Dunaliella salina*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, т. 1, № 1, с. 51-56. [Chernyshev D.N., Borovkov A.B. Separation of absorption spectrum of acetone extract *Dunaliella salina*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 51-56. (In Russ.)]
14. Гулин А.С., Тренкеншу Р.П., Чернышев Д.Н. Декомпозиция красной области спектра поглощения – начальный метод оценки пигментного состава микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 239-245. [Gulin A.S., Trenkenshu R.P., Chernyshev D.N. Decomposition of the red region of the absorption spectrum is the initial method for assessing the pigment composition of microalgae. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 239-245. (In Russ.)]
15. Чернышев Д.Н., Горбунова С.Ю., Тренкеншу Р.П. Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 55-56. [Chernyshev D.N., Gorbunova S.Yu., Trenkenshu R.P. Separation of the absorption spectra of the culture and acetone extract of the microalgae *Tetraselmis viridis* into the spectra of individual pigments. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 55-56. (In Russ.)]
16. Чернышев Д.Н., Ключкова В.С., Лелеков А.С. Разделение спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в красной области. *Материалы IX Сабининских чтений*, 2022. [Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Separation of the absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. in the red area. *Materialy IX Sabininskih chtenij*, 2022. (In Russ.)]
17. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины*. М.: ВИНТИ, 1990, 193 с. [Stadnichuk I.N. Phycobiliproteins. М.: VINITI, 1990, 193 p. (In Russ.)]
18. Myers J., Graham J.R., Wang R.T. On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). *J. Phycol.*, 1978, vol. 14, no. 4, pp. 513-518, doi: 10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x.

EVALUATION OF THE PIGMENT COMPOSITION OF MICROALGAE PORPHYRIDIUM PURPUREUM ACCORDING TO THE TRUE ABSORPTION SPECTRUM OF THE CULTURE USING A SPREADSHEET PROCESSOR**Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Seryak E.S.**

Sevastopol State University

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

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0504

Abstract. The paper describes a method for mathematical separation of the absorption spectrum of the culture of the red seaweed *Porphyridium purpureum* using a spreadsheet processor - the Microsoft Excel program. This method represents the analysis and separation of overlapping pigment bands in the native absorption spectrum of a culture. The culture spectra were recorded on a spectrophotometer near and at a distance from the entrance window of the integrating sphere. The true absorption spectrum is calculated, compensated for scattering in the region from 400 to 750 nm. The true absorption spectrum of the culture was approximated by a mathematical model in which the unknown parameters are the concentrations of chlorophyll a, B-phycoerythrin, R-phyocyanin, allophycocyanin, and total carotenoids. Pigment models are represented by the sum of normal distribution curves. The implementation of calculations that perform the selection of pigment concentrations by minimizing the sum of squared deviations between the true absorption spectrum and its mathematical model was performed using a spreadsheet using the "Search for a solution" tool. The proposed method of mathematical processing of the spectrum can be used as an express method for determining the concentration of pigments in culture, without isolating pure pigments. The application of this method makes it possible to evaluate the contribution of pigments to the total absorption spectrum of the culture.

Key words: *porphyridium, carotenoids, chlorophyll a, phycobilins, true absorption spectrum, gaussians, tabular processor.*

PHOTOEXCITATION OF NILE BLUE DYE IN AQUEOUS SOLUTION: TD-DFT STUDY

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

Sevastopol State University

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

Received 12.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0505

Abstract. The vibronic absorption spectra of Nile blue (NB) oxazine dye in an aqueous solution using 13 hybrid functionals, the 6-31++G(d,p) basis set, and the IEFPCM solvent model were calculated. It turned out that the O3LYP functional provided the best agreement with the experiment. Various parameters of the NB cation in the ground and excited states (IR spectra, atomic charges, dipole moments, and transition moment) were obtained. Maps of the distribution of electron density and electrostatic potential have been built. The influence of four strong hydrogen bonds of the dye with water molecules on the absorption spectrum was analyzed. It has been shown that two from these bonds were strengthened upon NB excitation and two ones were weakened. It was found that explicit assignment of water molecules strongly bound to the dye leads to a redshift of the spectrum as a whole and worsened its shape.

Key words: TD-DFT, vibronic transitions, aqueous solution, Nile blue, absorption spectrum.

INTRODUCTION

The Nile blue (NB, Fig. 1) is a highly fluorescent oxazine dye (see reviews [1,2]). The NB was firstly synthesized by Möhlau and Uhlmann in 1896 together with the Nile red (NR) [3].

In the NB molecule, the diethylamino group is an electron donor, and the amino group is an acceptor. The latter contains the positive single charge of the NB molecule. In contrast to electrically neutral NR, the solubility and fluorescence intensity in the water of positively charged NB is much higher. As in the case of NR, the optical properties of an NB depend significantly on its environment. In particular, the absorption and emission maxima of NB also have a redshift (bathochromic) with increasing solvent polarity [1,2]. This positive solvatochromism indicates a greater stabilization of the excited state of the NB molecule by the more polar solvent in comparison with the ground state. Consequently, the magnitude of the dipole moment of NB in the excited state should be greater than in the ground state [4]. However, unlike neutral NR, the positive charge of the NB determines the dependence of its spectral characteristics on pH as well [5]. Besides, the NB molecule is capable of uptake an electron from the solvent and giving it a proton [6]. The spectrophotometrically determined ionization constant of NB in water is $pK_a=3.1$ [7]. Due to the low sensitivity of NB to small changes in pH, it is recommended to use NB derivatives for its measurement [8]. Therefore, NB is used as a reference signal when measuring pH with the more sensitive FITC [9].

NB forms non-covalent complexes with nucleic acids (both by intercalation and by binding to the minor groove). In the complexes, the NB fluorescence is quenched. This allows it to be used to determine the concentration of nucleic acids. The study of the binding of the NB to DNA was performed by optical [10-14] and electrochemical methods [15-18]. The NB and its derivatives are used as DNA-sensitizing drugs for the photodynamic therapy of cancer [10,19-21] and bacterial [22] diseases. The main mechanism of DNA sensitization is the electron transfer from DNA to NB [11,23,24]. The optical absorption spectrum of the complex of NB with DNA was modeled in Ref. [24] considering this process by the TD-DFT method.

Spectrophotometric studies of NB aggregation on clay sheets [25] showed that NB molecules are capable of forming both J- and H-aggregates. The aggregation of NB in water and an aqueous solution of urea was investigated using adsorption spectrophotometry and interpreted within the framework of the exciton theory in Ref. [26]. The thermodynamics of NB dimerization in water was studied spectrophotometrically [27-31] and using NMR [32]. Aggregation of NB is enhanced by its interaction with colloidal suspensions of SiO₂ and SnO₂ [33], bile salts [34], and single-stranded nucleic acid molecules [12].

NB and its derivatives are used as a fluorescent probe for nanoparticles [35], lysosomes [10,36], proteins [37], protein-ligand complexes [38], micelles [39,40], as well as a Raman detector [41-43]. NB chromophore is a part of sensors [44-47]. The change in the optical characteristics of the NB upon its binding with inorganic compounds is used to detect their traces [48-52]. The NB is also used for optical analysis of the content of anionic surfactants in a sample [53]. The

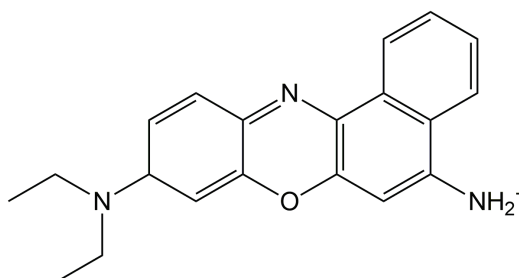


Figure 1. Chemical structure of Nile blue

high photostability of the NB allows it to be used as a laser dye [54] and in solar cells [55]. NB is used in histology and microbiology: its aqueous solution stains acidic components such as phospholipids and nucleic and fatty acids dark blue, while neutral lipids (triglycerides) - pink or red [56,57]. Hydrolysis of the NB produces the NR, which can be used to identify weak fingerprints [58].

Experimental studies of the optical characteristics of the NB were carried out on gold electrodes [59,60], in a monolayer on the surface of quartz glass [61], upon interaction with silver nanoparticles [62], ferrocene [63], graphene oxide [64], quantum dots (fluorescent nanoparticles) [65,66], rhodamine 110 [67] and other objects. Many NB derivatives with improved target characteristics (reduced phototoxicity, increased solubility, stronger luminescence, etc.) have been synthesized [68-72].

A significant number of experimental works are devoted to the study of the optical characteristics of NB itself in various solvents: solvatochromism [5,73-81], absorption [82-86] and emission [87-90] mechanisms, relaxation of excited states [91-94], Raman [95] and two-dimensional electronic (photon echo) [96-99] spectra for the analysis of excited states, nonlinear optical properties [100]. In the context of this work, the experimental results of other authors on solvatochromism and absorption mechanisms are especially interesting for us.

Solvatochromism. In an alkaline aqueous solution (0.1M NaOH or NH₄OH), the heterocyclic nitrogen atom of the NB molecule is hydroxylated, which causes the appearance of a new absorption band with $\lambda_{\max} \approx 520$ nm (the solution becomes red) [5,73]. In a strongly acidic medium (1M HCl) [5], this nitrogen atom is protonated; the charge of the NB molecule becomes equal to +2 (at low acidity of the solvent, protonation of NB can be photoinduced, i.e., the excited NB molecule undergoes it [74]). This causes a decrease in the intensity of the absorption band with $\lambda_{\max} = 635$ nm and the appearance of an additional absorption band with $\lambda_{\max} = 460$ nm (green solution) [5]. In proton-acceptor and electron-donor solvents (aniline, N,N-dimethylaniline, N,N-dimethylaniline) NB under the action of light loses a proton or attaches an electron, while its fluorescence is quenched [6,75-77]. In Ref. [78], based on experimental data, the values of the NB dipole moments in an excited state in various solvents were calculated. As mentioned above, NB exhibits a shift in the absorption and emission maxima to longer wavelengths with increasing solvent polarity. In this case, in the gas phase, they are, respectively, (580±10) nm and (628±1) nm, i.e., less than the corresponding values for most polar solvents, but more than for nonpolar ones [82].

Absorption mechanisms. In Ref. [84], the saturation of the $\pi \rightarrow \pi^*$ the NB transition from the ground to the first excited state ($S_0 \rightarrow S_1$) was studied using picosecond laser pulses, at which the transitions to the higher excited states (S_2 , S_3 , ...) are noticeably reduced. This is accompanied by discoloration of the solution of the NB sulfate in ethanol. An experimental study of the vibronic coupling in the $S_0 \rightarrow S_1$ transition using femtosecond laser pulses was performed in Ref. [85].

Theoretical studies of the NB photoexcitation began with the early work of Blanchard [101], in which he calculated the atomic charges of the dye in the ground and excited states using the semiempirical MNDO method. A time-dependent wavepacket theory for dynamic absorption spectroscopy was used to analyze the evolution of the transient absorption spectrum of NB (without considering the solvent) following excitation with a 6 fs pulse in Ref. [102]. In Ref. [103], the energy of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition in the NB molecule was calculated using the CIS quantum-chemical method (also without accounting for the solvent). Theoretical calculations of the absorption maxima using the TD-DFT vertical transition model with an implicit considering of the aqueous environment (CPCM approach [104]) were carried out in Refs. [81,105]. In Ref. [106], the effect of the solvent and a thermal motion was considered explicitly through hybrid QM/MM calculations, and the low-frequency out-of-plane vibrations of the NB chromophore were estimated. However, in all the above-mentioned works, the calculated values of absorption maximum turned out to be significantly less than the experimental one for NB dilute solution in the aqueous solution $\lambda_{\max} = 634 \dots 636$ nm [26,27,29-31,78,79,80]. However, the vertical transition model itself is quite simplified, although it is widespread in the literature (see review [107]). It does not consider the vibronic coupling, and therefore does not allow theoretically reproducing the asymmetric form of the experimental absorption and emission spectra of organic molecules. At the same time, the shape of the spectrum reflects the pattern of the excited states of the molecule and the transitions between them [108].

METHODS

When a photon is absorbed, both the electronic and vibrational energy of the molecule of the dissolved substance in the solution changes, i.e. a vibronic transition occurs in it (Fig. 2). According to the Franck-Condon principle [109], the electronic transition from the ground state (GS) to the excited state (ES) occurs at constant coordinates of the nuclei of the solute molecule, as well as the nuclei of the nearest solvation shell (vertical transition E_{vert} in Fig. 2). In this case, the molecule is in excited nonequilibrium (Franck-Condon, FC) state. This non-equilibrium nuclear core leads to the activation of vibrational energy levels (green wave in Fig. 2). Since the latter obey the Boltzmann distribution, there are many transitions from different vibrational levels of the ground electronic state to different vibrational levels of the electronically excited state.

To calculate the vibronic one-photon absorption spectra, we used a generalized approach [110] implemented in the Gaussian16 software package [111]. This method is a time-dependent extension of time-independent vibronic spectroscopy, in which the intensity of a vibronic transition is calculated as

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

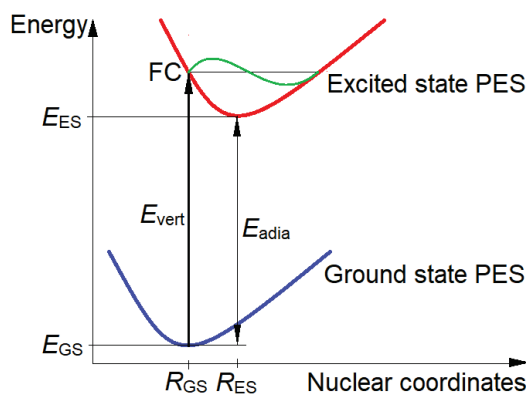


Figure 2. Energetic diagram of vibronic transition

where $\alpha = \frac{10\pi N_A}{3\epsilon_0 \ln(10)\hbar c}$, ω - frequency of the absorbed photon, the summation is performed over all m vibrational levels of the ground state and n vibrational levels of the excited state, ρ_m is the Boltzmann population of vibrational levels of the ground state, μ_{mn} is the transition dipole moment, δ is the Dirac distribution function.

The main problem in Eq. (1) is that the analytical expression for μ_{mn} remains unknown. Therefore, in practice, the Taylor series is used near the equilibrium geometry of the ground electronic state:

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

where \mathbf{Q} are mass-weighted normal coordinates. The zeroth-order term in Eq. (2) corresponds to the Franck-Condon approximation (strong, allowed transitions) [109], and the first-order correction to the Herzberg-Teller approach (weak, forbidden transitions) [112]. To calculate the vibronic spectra, we used the general Franck-Condon-Herzberg-Teller method [113].

Calculation of vibronic spectra requires a calculation of the overlap integrals, which depend on the normal vibrational modes of the ground and excited states. For integration, the Duschinsky linear transformation [114] is used to represent two corresponding sets of coordinates with each other:

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

where \mathbf{J} is the Duschinsky matrix, \mathbf{K} is the shift-vector. The expressions for \mathbf{J} and \mathbf{K} depend on the model of the electronic transition (adiabatic or vertical) and the level of approximation (whether the potential energy surfaces (PESs) of the ground and excited states are taken to be the same (see Fig. 2) or not).

The transition from a time-independent approach to a time-dependent theory is realized by replacing summation over states with integration over time. For this, the Dirac distribution function δ in Eq. (1) is replaced by expression $\delta = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\omega t} dt$. Ultimately, the absorption spectrum is calculated as the Fourier transform of the trace of the exponential operator:

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

where $\alpha' = \frac{\alpha}{Z}$, $Z = \prod_{i=1}^N \left[2 \sinh \left(\frac{\hbar \omega_i}{2k_B T} \right) \right]^{-1}$ is the total Boltzmann population of vibrational levels of the ground state, $\omega_{\text{adia}} = \frac{E_{\text{adia}}}{\hbar}$, E_{adia} is the adiabatic energy (difference between the energies of the ground vibrational states of the ground and excited electronic states, see Fig. 2), $\chi(t)$ is the vibrational wave function. The temperature $T=298$ K was used. For the numerical integration of Eq. (4), 2^{18} steps and the $\Delta t = 2^{18} \times 10^{-17} = 2.62 \times 10^{-12}$ s time interval were used. For broadening the Gaussians with half-width on half maximum HWHM=600 cm^{-1} were chosen so that the calculated spectra corresponded best to the experimental one.

The spectra were calculated using the adiabatic Hessian model, in which both the ground and excited states are considered on the same ground, and the harmonic PESs are calculated near their equilibrium geometry (R_{GS} and R_{ES} , respectively, in Fig. 2). The first derivatives of the electronic moments of the transition along the coordinates, $\frac{\partial \mu_{mn}}{\partial Q_i}$, were calculated numerically. Force constant matrices were calculated from analytical gradients.

We used the IEFPCM approach [115] which includes an external iteration procedure whereby the Gaussian16 computes the energy in solution by making the solvent reaction field self-consistent with the solute electrostatic potential (the latter being generated from the computed electron density) [116]. The Pople's 6-31++G(d,p) basis set was used. It provides acceptable accuracy with moderate resource consumption [117]. Although some authors [118] argue that diffuse functions should be used at transition energies above 5 eV (less than 250 nm), authors of TD-DFT benchmarks [108,117,119] consider their use mandatory.

It is known that the results of TD-DFT calculations of the excited electronic states of organic molecules are largely determined by the functional used [108,117,119-122]. In the case of significant intramolecular charge transfer, it is recommended to use long-range corrected functionals [123-126], e.g. CAM-B3LYP, LC- ω HPBE, and ω B97XD.

The original spatial structure of the NB molecule was taken from the PubChem database (CID 16939). The aminodiethyl group had an *anti* conformation. The visualization of the computational structures, electron densities, and electrostatic potentials was carried out using the Gaussview software [127].

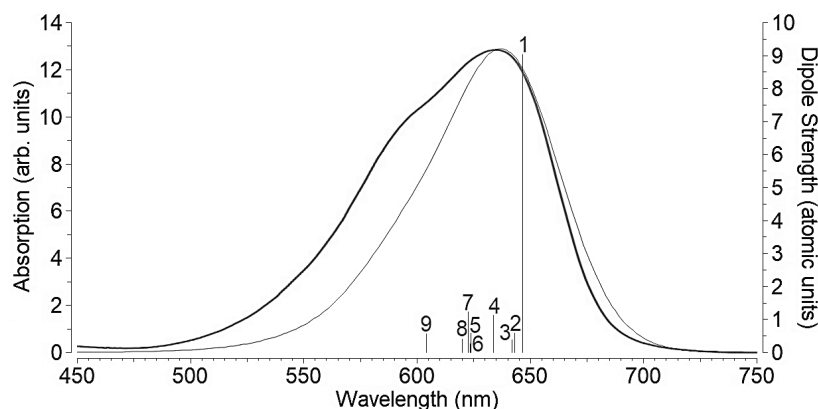


Figure 3. The calculated vibronic absorption spectrum of NB in aqueous solution (thin line) and the corresponding experimental spectrum (2 μ M) adapted with permission from Ref. [87] (thick line). Copyright 2001 American Chemical Society. The vertical lines are the dipole strength of the vibronic transitions from Table 2

RESULTS AND DISCUSSION

We analyzed the singlet-singlet transition $S_0 \rightarrow S_1$ (HOMO \rightarrow LUMO), which determines the absorption of NB in the visible region. The calculated energies of electronic and vibronic transitions largely depend on the fraction X of the exact Hartree-Fock exchange in the functional used. This feature was analyzed in detail in Refs. [121,122]. Therefore, pure functionals with $X=0$ cannot correctly reproduce the TD-DFT spectra. The vibronic absorption spectrum obtained using the O3LYP [128] functional ($X=12\%$) with $\lambda_{\text{vibron}}=637$ nm is in best agreement with the experiment on the position of the maximum $\lambda_{\text{max}} \approx 635$ nm (Table 1) and overall shape (Fig. 3). A good result ($\lambda_{\text{vibron}}=630$ nm) was also shown by the τ HCTHhyb functional ($X=15\%$). Note that the spectrum of a dilute NB solution lacks a short-wavelength shoulder, unlike other oxazine dyes, but asymmetry occurs (the short-wavelength slope is gentler than the long-wavelength one). As can be seen from Fig. 3, this asymmetry is due to vibronic transitions. In addition, one can notice a short-wavelength hump in the experimental spectrum, which has not been reproduced theoretically. Most likely, it is of dimeric origin, since the propensity for NB aggregation is very high [27-32].

O3LYP is an improved version of the most popular B3LYP functional. At the same time, the functionals with long-range correction (CAM-B3LYP, LC- ω HPBE, and ω B97XD) gave λ_{vibron} values that are significantly lower than the experimental λ_{max} value. Table 1 shows that the λ_{vibron} values exceed the vertical transition wavelengths λ_{vert} by ~ 90 nm. As mentioned in the Introduction, the model of vertical transitions cannot correctly reproduce the experimental spectrum, although a direct comparison of the calculated λ_{vert} and the experimental maximum λ_{max} is widespread in the literature (see Refs. [81,105] for NB). Nevertheless, the comparison between λ_{vibron} and λ_{max} is correct [119]. In the above-mentioned work [105], based on the analysis of the calculated energies of vertical transitions in a series of 10 oxazine dyes, the authors concluded that the CPCM model gives underestimated values of λ_{vert} compared to λ_{max} . They overcame this problem by using the SMD model [129] instead of the CPCM. In this work, this regularity takes place in the case of the of them that ensured the achievement of the experimental λ_{max} value.

The choice of the basis set has a much smaller influence on the calculated vibronic spectrum compared to the functional. In the present study, the differences between the values of λ_{vibron} for different basis sets were insignificant

Table 1. The calculated values of the wavelengths and energies of the vertical transitions and the maxima of the vibronic absorption spectra for NB in aqueous solution (6-31++G(d,p) basis set). For functionals with long-range correction, X for small and large distances are indicated

Functional ($X\%$)	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)
O3LYP (12)	542	2.29	637	1.95
τ HCTHhyb (15)	538	2.30	630	1.97
B3LYP (20)	527	2.35	601	2.06
X3LYP (22)	523	2.37	604	2.05
APFD (23)	518	2.39	604	2.05
PBE0 (25)	514	2.41	601	2.06
M06 (27)	519	2.39	599	2.07
SOGGA11X (40)	492	2.52	573	2.16
BMK (42)	490	2.53	541	2.29
M052X (56)	489	2.54	571	2.17
CAM-B3LYP (11-65)	489	2.54	559	2.22
LC- ω HPBE (0-100)	467	2.66	551	2.25
ω B97XD (22-100)	489	2.54	560	2.21

(Table 2). Therefore, further analysis of the NB photoexcitation in an aqueous solution will be performed using the O3LYP/6-31++G(d,p)/IEFPCM theory level.

Comparing the calculated IR spectra of NB in the ground and excited states (Fig. 4), one can see that photoexcitation significantly changes the intensities and the frequencies of the vibrations. The NB cation contains 44 atoms, respectively, the total number of vibrational normal modes is $N=3 \times 44 - 6 = 126$. The intense vibronic transition #7 ($0_0 \rightarrow 34^1$) with $\nu = 597 \text{ cm}^{-1}$ is in good agreement with the experimentally observed vibronic mode at $\nu = 590 \text{ cm}^{-1}$, corresponding to deformations of the rings of the NB chromophore [85,86,89,91,96].

According to our calculations, the two next electronic transitions ($S_0 \rightarrow S_2$ and $S_0 \rightarrow S_3$) in the visible region of the spectrum have a very low oscillator strength f (Table 4), and therefore do not make a significant contribution to the absorption spectrum. When calculating the vibronic spectrum of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition, the sum of the Franck-Condon factors was 99.69%. Thus, the contribution of the Herzberg-Teller correction in Eq. (2) turned out to be negligible.

Table 2. The calculated values of the wavelengths and energies of the vertical transitions and the maxima of the vibronic absorption spectra for NB in aqueous solution with the O3LYP functional and different Pople's basis sets

Basis set	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)
6-31G(d,p)	542	2.29	636	1.95
6-31++G(d,p)	552	2.25	637	1.95
6-311++G(d,p)	551	2.25	637	1.95
6-311++G(3df,3pd)	548	2.26	637	1.95

Table 3. Calculated parameters of vibronic transitions during NB excitation in an aqueous solution

# (i)	Transition	λ (nm)	ΔE (eV)	ν (cm^{-1})	I	p (a.u.)	Definition of vibrations
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	646	1.92	0	76970	9.04	-
2	$0_0 \rightarrow 5^1$	643	1.93	84.9	4929	0.576	Bending vibrations of the chromophore in its plane
3	$0_0 \rightarrow 7^1$	642	1.93	113	3245	0.378	Bending vibrations of the chromophore perpendicular to its plane
4	$0_0 \rightarrow 17^1$	634	1.96	312	9889	1.14	Compression-stretching of all four chromophore rings
5	$0_0 \rightarrow 32^1$	624	1.99	563	5117	0.580	
6	$0_0 \rightarrow 33^1$	623	1.99	573	2263	0.256	
7	$0_0 \rightarrow 34^1$	622	1.99	597	10880	1.23	
8	$0_0 \rightarrow 38^1$	620	2.00	665	3574	0.402	Vibrations of valence bonds and angles of the aminodiethyl group
9	$0_0 \rightarrow 64^1$	604	2.05	1083	5055	0.555	

λ is the wavelength, E is the transition energy, ν is the vibration frequency, I is the line intensity, and p is the dipole strength

Table 4. Calculated parameters of ground and excited electronic states and transitions between them in the visible region of the spectrum for NB in an aqueous solution

Electronic states	E_{eq}^* (eV)	Electronic transition	λ_{adia} (nm)	E_{adia} (eV)	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)	f	Involved transitions
S_0 (GS)	-27570.60									
S_1 (ES ₁)	-27568.59	$S_0 \rightarrow S_1$	617	2.01	542	2.29	637	1.95	0.859	HOMO \rightarrow LUMO
S_2 (ES ₂)	-27567.97	$S_0 \rightarrow S_2$	471	2.63	435	2.85	533	2.33	0.0508	(HOMO-1) \rightarrow LUMO
S_3 (ES ₃)	-27567.53	$S_0 \rightarrow S_3$	404	3.07	371	3.34	471	2.63	0.0033	(HOMO-2) \rightarrow LUMO

*equilibrium energy (PES minima, see Fig. 2)

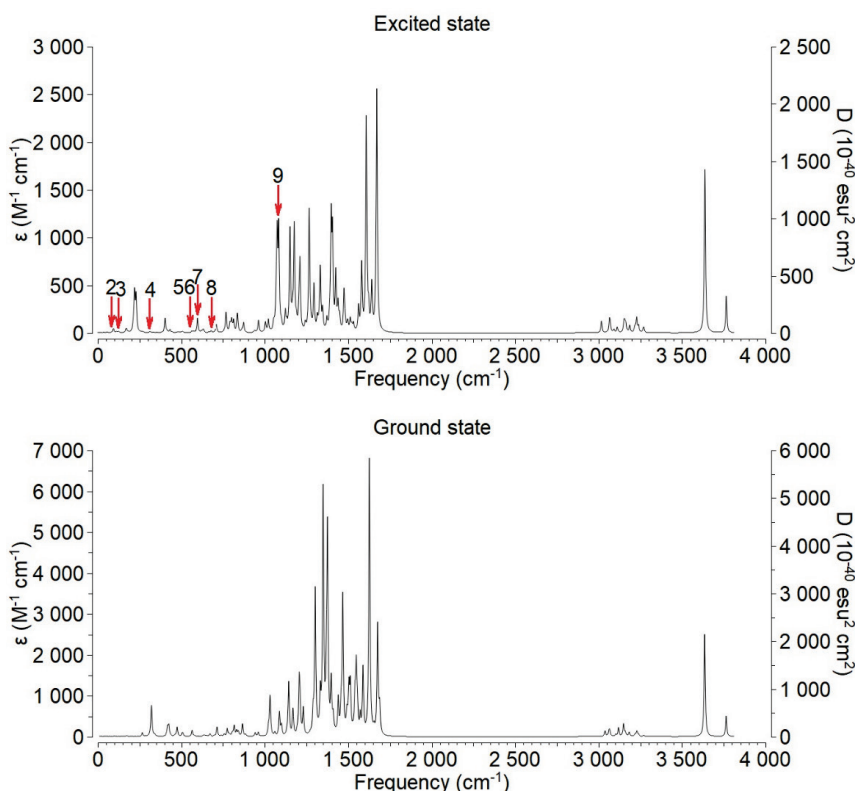


Figure 4. Calculated IR spectra of ground and first excited states of NB in aqueous solution. The peaks of the IR spectrum of the excited state, corresponding to the vibration frequencies involved in vibronic transitions (see Table 1), are shown by red arrows

The NB cation contains 168 electrons and, accordingly, 84 occupied molecular orbitals (MOs). The visualization of the frontier MOs involved in the considered electronic transition $S_0 \rightarrow S_1$ is shown in Fig. 5. Their configurations are close to the results from Refs. [103,105,106] calculated at the levels of the theory B3LYP/6-311++G(d,p), B3LYP/6-31G(d), and MS-CASPT2/ANO-LVDZP, respectively.

According to calculations, the dipole moment μ of the dye molecule almost does not change upon photoexcitation: $\mu_{GS} \approx \mu_{FC} \approx \mu_{ES} \approx 6$ D (Table 5) which contradicts the positive solvatochromism of NB. Therefore, it can be expected that the solvatochromism of NB is determined not by the dipole-dipole interaction with the solvent, but by site-specific contacts (hydrogen bonds) with it (see below). The μ values calculated by us are in satisfactory agreement with the values obtained in Refs. [26] ($\mu_{GS}=5.08$ D), [78] ($\mu_{GS}=2.25$ D, $\mu_{ES}=4.29$ D (Lippert-Mataga); $\mu_{GS}=1.11$ D, $\mu_{ES}=4.02$ D (Bakshiev); $\mu_{GS}=1.65$ D, $\mu_{ES}=6.19$ D (Kawski-Chamma-Viallet)), [83] ($\Delta\mu = \mu_{ES} - \mu_{GS} = 2.9 \pm 1.5$ D), [94] ($\mu_{GS}=3.27$ D), [105] ($\mu_{GS}=4.94$ D), but much less than the values calculated in Ref. [106] ($\mu_{GS}=20.7$ D, $\mu_{FC}=18.2$ D). Note that in Ref. [105] the value of the transition dipole moment $M=4.98$ D was obtained for NB at CPCM/B3LYP/6-311++G(d,p) theory level.

To understand the photoinduced charge redistribution in the NB molecule, we analyzed its Merz-Kollman [130] charges of heavy atoms in the ground and excited states. Upon photoexcitation, the shift of the electron density at immobile nuclei (transition to the Franck-Condon state) occurs mainly from the C10 atom to the N5 atom. Therefore, the μ_x component decreases even changing sign and μ_y component increases in absolute value, and, in general, the dipole moment μ of the molecule grows very slightly (see Table 4). The relaxation of NB to an equilibrium excited state by adjusting the coordinates of the nuclei to the excited configuration of the electron shells leads to an increase in the electron density on the C19 atom and its decrease on the C3 and C22 atoms. In turn, this causes a further decrease of μ_x , an increase

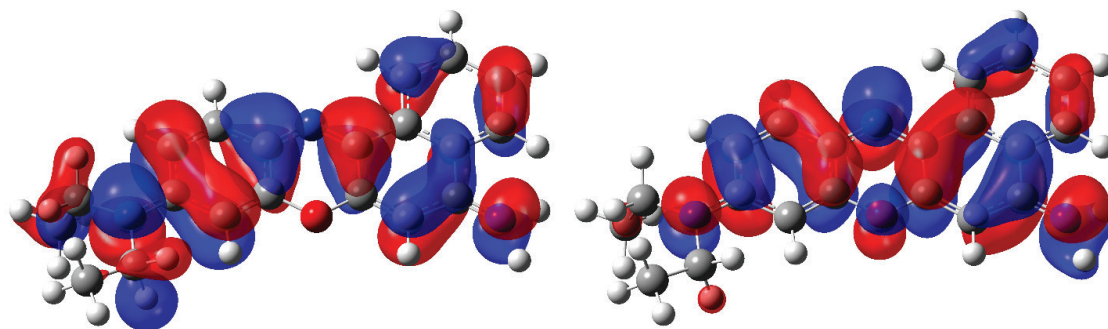


Figure 5. Frontier MOs, the transition between which corresponds to the main absorption peak in the visible region: HOMO (left) and LUMO (right). Positive lobes are shown in red and negative lobes in blue

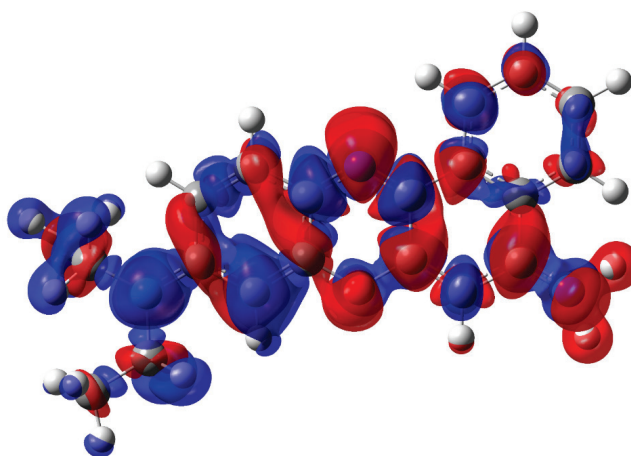


Figure 6. The electron density difference between Franck-Condon and ground states of NB cation. Regions of positive values are shown in red and negative values in blue

of the μ_y modulus, and an insignificant decrease in the total dipole moment μ of the cation. It should be noted that the redistribution of the electron density during the GS→FC vertical transition is much more significant than during the FC→ES relaxation (see Fig. 2).

Visualization of the difference in electron density (Fig. 6) shows that its photoinduced redistribution is complex and covers both the entire dye chromophore and side groups.

As you know, water is capable of forming strong hydrogen bonds with molecules of a solute. They are site-specific interactions that are considered in continuum models averaged only. To assess the effect of these hydrogen bonds on the photoexcitation of the NB molecule, we calculated the vibronic absorption spectrum for the "NB+4H₂O" hydrated complex (Fig. 7). All simulation parameters remained the same as in the calculations of the single cation NB described above.

Table 5. Calculated moments of NB cation in aqueous solution

Dipole moment (D)	Ground state (S ₀)	Excited state (S ₁)		Ground to excited state transition dipole moment (D)	
		Franck-Condon (FC)	Equilibrium (ES)		
μ_x	2.02	-1.62	-1.28	M_x	13.5
μ_y	-5.70	-5.94	-6.02	M_y	-2.53
μ_z	0.326	0.341	0.0665	M_z	0.401
μ	6.06	6.17	6.16	M	13.8

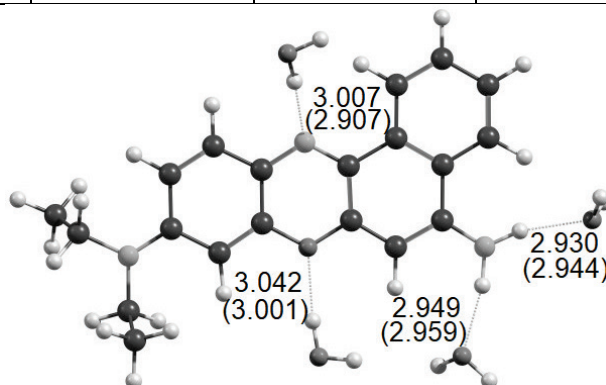


Figure 7. Calculated structure of the NB hydration complex with four water molecules. Strong hydrogen bonds are shown with a dotted line. Their lengths in Å (distances between heavy atoms) are given for the ground and equilibrium excited (in parentheses) states. A water molecule bound to the endocyclic nitrogen atom N5 is in front of the chromophore plane due to steric hindrances from the H9 and H15 atoms

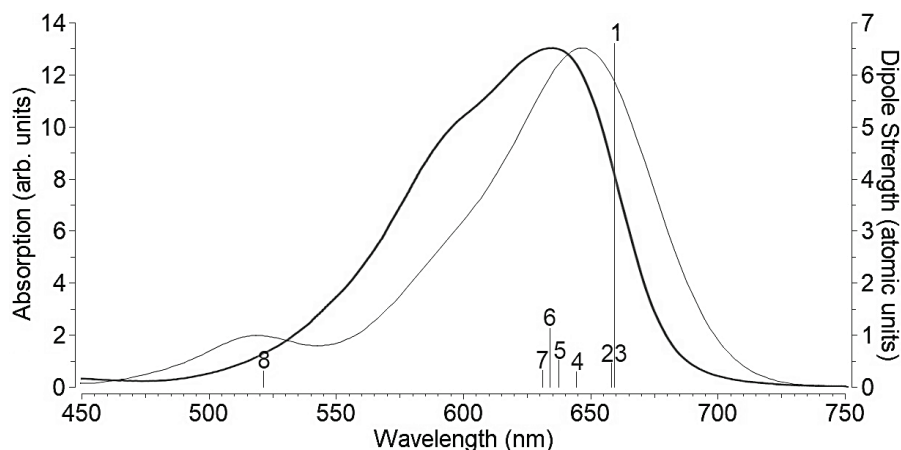


Figure 8. The calculated vibronic absorption spectrum of the "NB+4H₂O" system (thin line) and the experimental spectrum (2 μM NB in water) from Ref. [87] (thick line)

According to our calculations, two hydrogen bonds of NB chromophore with water in the excited state are stronger than in the ground state, which is manifested in their shortening. On the contrary, two bonds of the side amino group of the dye with water molecules are weakened by photoexcitation (see Fig. 7). The phenomenon of strengthening and weakening of hydrogen bonds with a solvent upon photoexcitation of various organic molecules was first discovered by Zhao and Han (see, for example, Ref. [131]). The vibronic absorption spectrum of the "NB+4H₂O" system, has the worst shape compared to a single NB cation. In this case, a small short-wavelength vibronic peak at ≈520 nm appears in the calculated spectrum, which is not observed in the experiment (Fig. 8). Besides, its absorption maximum is at $\lambda_{\text{vibron}}=647$ nm, the spectrum is redshifted by ≈10 nm. The absorption intensity has not changed (cf. Figs. 3 and 8).

Note that this pattern took place when calculating the energies of vertical transitions of proflavine in water [132]. Its explanation can be given as follows. Since the interaction with water molecules for NB in the excited state is stronger than in the ground state, the PES of the excited state drops lower than for a completely implicit specification of the aqueous environment (see Fig. 2). The convergence of the PESs of the ground and excited states leads to a decrease in E_{adia} and E_{vert} values, and, as a consequence, to an increase in λ_{vibron} .

It is of interest to analyze the effect of strong hydrogen bonds with water on the electronic and vibrational states of the dye. We note the changes in the vibronic transitions (cf. Figs. 4 and 9). Their number has decreased from 9 to 8, and the transitions themselves have changed significantly (cf. Tables 1 and S2). IR spectra (Fig. S6) and Duschinsky matrix (Fig. S7), respectively, also changed; in particular, the normal vibration modes of water molecules have been added. However, the configurations of the frontier orbitals (Fig. S8), electron density difference (Fig. 9), and electrostatic potential (Fig. S9) difference of the "NB+4H₂O" complex practically coincide with those for a single NB cation. It is interesting to note that out of four water molecules strongly bound to the OX4 cation, only one strongly polarizes upon excitation of the latter (bound to the N5 endocyclic nitrogen atom, see Fig. 9). As mentioned above, the electron density on this atom increases the most. This leads to a noticeable redistribution of the charge on the water molecule located nearby. This feature can also be seen on the corresponding electrostatic potential maps (Fig. S9 in Supplementary Material).

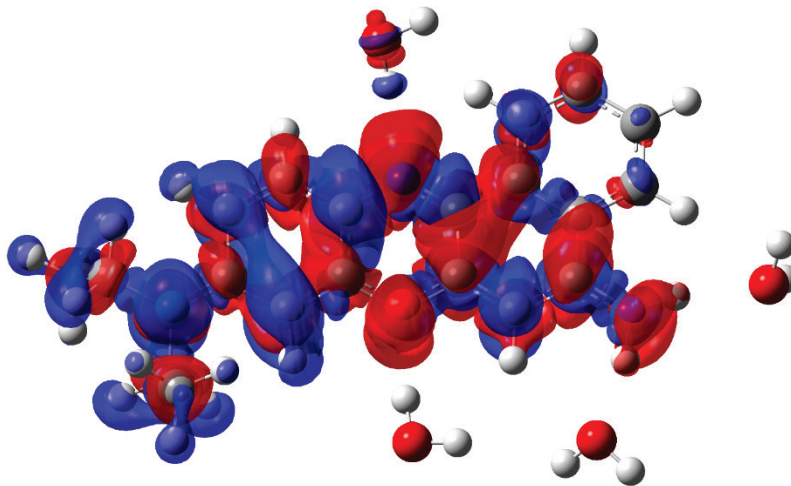


Figure 9. The electron density difference between Franck-Condon and ground states of the "NB+4H₂O" system

CONCLUSIONS

Of the 13 hybrid functionals used in this work to calculate the vibronic absorption spectrum of the NB dye in an aqueous solution, the best agreement with the experiment ($\lambda_{\text{max}}=635$ nm) in the position of the main maximum was given by O3LYP ($\lambda_{\text{vibron}}=637$ nm) with 6-31++G(d,p) basis set and IEFPCM solvent model. Vibronic coupling plays an important role in dye excitation. Thus, λ_{vibron} exceeds λ_{vert} by ~ 90 nm. The same shape is observed for vibronic spectra obtained using other functionals. Differences are observed in the position of the spectrum on the wavelength axis. Photoexcitation leads to changes in the vibrations, both in their frequencies and intensities. The dipole moment of the dye molecule in the ground state turned out to be almost the same as in the excited state. This result contradicts positive solvatochromism NB and means the important role of site-specific interactions (hydrogen bonds) in the solvatochromic behavior of the dye. Considering site-specific interactions in the form of an explicit assignment of four water molecules that form strong hydrogen bonds with the dye cation led to a redshift of the entire spectrum by ≈ 10 nm. At the same time, the shape of the spectrum worsened. A strengthening of two hydrogen bonds upon NB excitation was found, which explains the observed bathochromic effect from the nearest hydration shell of the dye.

References:

1. Jose M.J., Burgess K. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron*, 2006, vol. 62, pp. 11021-11037.
2. Martinez V., Henary M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. *Chem. Eur. J.*, 2016, vol. 22, pp. 1-20.
3. Mohlau R., Uhlmann K. Zur kenntinss der chinazin- und oxazinfarbstoffe. *Ann. Chem.*, 1896, vol. 289, pp. 90-130.
4. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
5. Krihak M., Murtagh M., Shahriari M. A Spectroscopic Study of the Effects of Various Solvents and Sol-Gel Hosts on the Chemical and Photochemical Properties of Thionin and Nile Blue A. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, vol. 10, pp. 153-163.
6. Kobayashi T., Takagi Y., Kandori H., Kemnitz K., Yoshihara K. Femtosecond intermolecular electron transfer in diffusionless, weakly polar systems: nile blue in aniline and N,N-dimethylaniline. *Chem. Phys. Lett.*, 1991, vol. 180, pp. 416-422.
7. Woislowski S. The Spectrophotometric Determination of Ionization Constants of Basic Dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, vol. 75, pp. 5201-5203.
8. Davis M.M., Helzer H.B. Titrimetric and Equilibrium Studies Using Indicators Related to Nile Blue A. *Anal. Chem.*, 1966, vol. 38, pp. 451-461.
9. Ma J., Ding C., Zhou J., Tian Y. 2D ratiometric fluorescent pH sensor for tracking of cells proliferation and metabolism. *Biosensors Bioelectronics*, 2015, vol. 70, pp. 202-208.
10. Lin C.-W., Shulok J.R., Kirley S.D., Cincotta L., Foley J.W. Lysosomal Localization and Mechanism of Uptake of Nile Blue Photosensitizers in Tumor Cells. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, pp. 2710-2719.
11. Mitra R.K., Sinha S.S., Maiti S., Pal S.K. Sequence Dependent Ultrafast Electron Transfer of Nile Blue in Oligonucleotides. *J. Fluoresc.*, 2009, vol. 19, pp. 353-361.
12. Huang C.Z., Li Y.F., Zhang D.J., Ao X.P., Spectrophotometric study on the supramolecular interactions of nile blue sulphate with nucleic acids. *Talanta*, 1999, vol. 49, pp. 495-503.
13. Chen Q.-Y., Li D.-H., Yang H.-H., Zhu Q.-Z., Xu J.-G., Zhao Y. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile Blue, with DNA and its application to nucleic acids assay. *Analyst*, 1999, vol. 124, pp. 901-906.
14. Huang C.Z., Li Y.F., Hu X.L. Three-dimensional spectra of the long-range assembly of Nile Blue sulfate on the molecular surface of DNA and determination of DNA by light-scattering. *Anal. Chim. Acta*, 1999, vol. 395, pp. 187-197.
15. Yang Y.-I., Hong H.-Y., Lee I.-S., Bai D.-G., Yoo G.-S., Choi J.-K. Detection of DNA Using a Visible Dye, Nile Blue, in Electrophoresed Gels. *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 280, pp. 322-324.
16. Alipour E., Allaf F.N., Mahmoudi-Badiki T. Investigation of specific interactions between Nile blue and single type oligonucleotides and its application in electrochemical detection of hepatitis C3a virus. *J. Solid State Electrochem.*, 2016, vol. 20, pp. 183-192.
17. Mindroiu M., Zgarian R.G., Kajzar F., Rau I., De Oliveira H.C.L., Pawlicka A., Tihan G.T. DNA-based membranes for potential applications. *Ionics*, 2015, vol. 21, pp. 1381-1390.
18. Sagara T., Igarashi S., Sato H., Niki K. Voltammetric application of electromodulated electroreflection absorption spectroscopy: electroreflectance voltammetry as an in situ spectroelectrochemical technique. *Langmuir*, 1991, vol. 7, pp. 1005-1012.
19. Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 1996, vol. 25, pp. 351-359.
20. Van Staveren H.J., Speelman O.C., Witjes M.J., Cincotta L., Star W.M. Fluorescence imaging and spectroscopy of ethyl nile blue a in animal models of (pre)malignancies. *Photochem. Photobiol.*, 2001, vol. 73, pp. 32-38.
21. Lin C.-W., Shulok J.R., Wong Y.-K., Schanbacher C.F., Cincotta L., Foley J.W. Photosensitization, Uptake, and Retention of Phenoxazine Nile Blue Derivatives in Human Bladder Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, pp. 1109-1116.
22. Vecchio D., Bhayana B., Huang L., Carrasco E., Evans C.L., Hamblin M.R. Structure-function relationships of Nile blue (EtNBS) derivatives as antimicrobial photosensitizers. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, vol. 75, pp. 479-491.

23. Hirakawa K., Ota K., Hirayama J., Oikawa S., Kawanishi S. Nile Blue Can Photosensitize DNA Damage through Electron Transfer. *Chem. Res. Toxicol.*, 2014, vol. 27, pp. 649-655.
24. Gattuso H., Besancenot V., Grandemange S., Marazzi M., Monari A. From non-covalent binding to irreversible DNA lesions: nile blue and nile red as photosensitizing agents. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 28480.
25. Huang M., He S., Liu W., Yao Y., Miao S. Spectral Inspections on Molecular Configurations of Nile Blue A Adsorbed on the Elementary Clay Sheets. *J. Phys. Chem. B*, 2015, vol. 119, pp. 13302-13308.
26. Gilani A.G., Moghadam M., Hosseini S.E., Zakerhamidi M.S. A comparative study on the aggregate formation of two oxazine dyes in aqueous and aqueous urea solutions. *Spectrochim. Acta A*, 2011, vol. 83, pp. 100-105.
27. Niazi A., Yazdanipour A., Ghasemi J., Kubista M. Spectrophotometric and thermodynamic study on the dimerization equilibrium of ionic dyes in water by chemometrics method. *Spectrochim. Acta A*, 2006, vol. 65, pp. 73-78.
28. Gofar M.K., Moradi K., Kor N.M. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. *Eur. J. Exp. Biol.*, 2014, vol. 4, pp. 72-81.
29. Antonov L., Gergov G., Petrov V., Kubista M., Nygren J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta*, 1999, vol. 49, pp. 99-106.
30. Chakraborty A., Adhikari R., Saha S.K. Molecular interaction of oxazine dyes in aqueous solution: Temperature dependent molecular disposition of the aggregates. *J. Mol. Liquids*, 2011, vol. 164, pp. 250-256.
31. Ghanadzadeh Gilani A., Shokri S. Spectral and aggregative properties of two oxazine dyes in aqueous solutions containing structure-breaking and multifunctional additives. *J. Mol. Liquids*, 2014, vol. 193, pp. 194-203.
32. Hazafy D., Salvia M.-V., Mills A., Hutchings M.G., Evstigneev M.P., Parkinson J.A. NMR analysis of Nile Blue (C. I. Basic Blue 12) and Thionine (C. I. 52000) in solution. *Dyes Pigments*, 2011, vol. 88, pp. 315-325.
33. Nasr A., Hotchandani S. Excited-State Behavior of Nile Blue H-Aggregates Bound to SiO₂ and SnO₂ Colloids. *Chem. Mater.*, 2000, vol. 12, pp. 1529-1535.
34. Mishra S.S., Subuddhi U. Spectroscopic investigation of interaction of Nile Blue A, a potent photosensitizer, with bile salts in aqueous medium. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014, vol. 141, pp. 67-75.
35. Chubinidze K., Partsvania B., Sulaberidze T., Khuskivadze A., Davitashvili E., Koshoridze N. Luminescence enhancement in nanocomposite consisting of polyvinyl alcohol incorporated gold nanoparticles and Nile blue 690 perchlorate. *Appl. Optics*, 2014, vol. 53, pp. 7177-7181.
36. Fan J., Dong H., Hu M., Wang J., Zhang H., Zhu H., Sun W., Peng X. Fluorescence imaging lysosomal changes during cell division and apoptosis observed using Nile Blue based near-infrared emission. *Chem. Commun.*, 2014, vol. 50, pp. 882-884.
37. Lee S.H., Suh J.K., Li M. Determination of Bovine Serum Albumin by Its Enhancement Effect of Nile Blue Fluorescence. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, vol. 24, pp. 45-48.
38. Kuramitz H., Piruska A., Halsall H.B., Seliskar C.J., Heineman W.R. Simultaneous Multiselective Spectroelectrochemical Sensing of the Interaction between Protein and Its Ligand Using the Redox Dye Nile Blue as a Label. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, pp. 9642-9648.
39. Mitra R.K., Sinha S.S., Pal S.K. Interactions of Nile Blue with Micelles, Reverse Micelles and a Genomic DNA. *J. Fluoresc.*, 2008, vol. 18, pp. 423-432.
40. Das K., Jain B., Patel H.S. Nile Blue in Triton-X 100/benzene-hexane reverse micelles: a fluorescence spectroscopic study. *Spectrochim. Acta A*, 2004, vol. 60, pp. 2059-2064.
41. Dong J., Li Y., Zhang M., Li Z., Yan T., Qian W. Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection of alkaline phosphatase. *Anal. Methods*, 2014, vol. 6, pp. 9168-9172.
42. Wilson A.J., Willets K.A. Unforeseen distance-dependent SERS spectroelectrochemistry from surface-tethered Nile Blue: the role of molecular orientation. *Analyst.*, 2016, vol. 141, pp. 5144-5151.
43. Reigue A., Auguie B., Etchegoina P.G., Le Ru E.C. CW measurements of resonance Raman profiles, line-widths, and cross-sections of fluorescent dyes: application to Nile Blue A in water and ethanol. *J. Raman Spectrosc.*, 2013, vol. 44, pp. 573-581.
44. Esmaceli B., Heng L.Y., Ling T.L. Nile Blue chromoionophore-doped kappa-carrageenan for a novel reflectometric urea biosensor. *Sensors Actuators B*, 2015, vol. 221, pp. 969-977.
45. Madsen J., Canton I., Warren N.J., Themistou E., Blanazs A., Ustbas B., Tian X., Pearson R., Battaglia G., Lewis A.L., Armes S.P. Nile Blue-Based Nanosized pH Sensors for Simultaneous Far-Red and Near-Infrared Live Bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, pp. 14863-14870.
46. Gao Y.-S., Zhu X.-F., Xu J.-K., Lu L.-M., Wang W.-M., Yang T.-T., Xing H.-K., Yu Y.-F. Label-free electrochemical immunosensor based on Nile blue A-reduced graphene oxide nanocomposites for carcinoembryonic antigen detection. *Anal. Biochem.*, 2016, vol. 500, pp. 80-87.
47. Jin H., Zhao C., Gui R., Gao X., Wang Z. Reduced graphene oxide/nile blue/gold nanoparticles complex-modified glassy carbon electrode used as a sensitive and label-free aptasensor for ratiometric electrochemical sensing of dopamine. *Anal. Chim. Acta*, 2018, vol. 1025, pp. 154-162.
48. Duan R., Li C., Liu S., Liu Z., Li Y., Zhu J., Hu X. A selective fluorescence quenching method for the determination of trace hypochlorite in water samples with nile blue A. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2015, vol. 50, pp. 43-48.
49. Chen Q., Cheng Z., Du L., Zhu P., Tan K. A sensitive three-signal assay for the determination of PFOS based on the interaction with Nile blue A. *Anal. Methods*, 2018, vol. 10, pp. 3052-3058.

50. Lee M.H., Lee S.W., Kim S.H., Kang C., Kim J.S. Nanomolar Hg(II) Detection Using Nile Blue Chemodosimeter in Biological Media. *Org. Lett.*, 2009, vol. 11, pp. 2101-2104.
51. Li Z., Wang J., Xu Q. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Scandium with Molybdate, Nile Blue and Poly(vinyl alcohol). *Anal. Sci.*, 1996, vol. 12, pp. 259-262.
52. Hu M., Yin J., Li Y., Zhao X. Development of a Nile-Blue Based Chemodosimeter for Hg²⁺ in Aqueous Solution and its Application in Biological Imaging. *J. Fluoresc.*, 2015, vol. 25, pp. 403-408.
53. Gao H.-W., Ye Q.-S., Liu W.-G. Langmuir Aggregation of Nile Blue and Safranin T on Sodium Dodecylbenzenesulfonate Surface and Its Application to Quantitative Determination of Anionic Detergent. *Anal. Sci.*, 2002, vol. 18, pp. 455-459.
54. Basting A., Ouw D., Schafer F.P. The phenoxazones: A new class of laser dyes. *Optics Commun.*, 1976, vol. 18, pp. 260-262.
55. Siami A., Sabzi R.E., Rasouli F., Kheiri F. Nile Blue and Nickel Organometallic Dyes Applied in Dye-sensitized Solar Cells. *Port. Electrochim. Acta*, 2015, vol. 33, pp. 23-33.
56. Bancroft J.D., Cook H.C. *Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994.
57. Betscheider A., Jose J. Nile blue A for staining Escherichia coli in flow cytometer experiments. *Anal. Biochem.*, 2009, vol. 384, pp. 194-196.
58. Frick A.A., Busetti F., Cross A., Lewis S.W. Aqueous Nile Blue: A Simple, Versatile and Safe Reagent for the Detection of Latent Fingermarks. *Chem. Commun.*, 2014, vol. 50, pp. 3341-3343.
59. Shrivastava R., Jain B., Das K. Spectroscopic investigations on the binding of Methylene Blue and Nile Blue to negatively charged gold nanorods. *J. Mol. Struct.*, 2012, vol. 1020, pp. 56-62.
60. Wilson A.J., Molina N.Y., Willets K.A. Modification of the Electrochemical Properties of Nile Blue through Covalent Attachment to Gold as Revealed by Electrochemistry and SERS. *J. Phys. Chem. C*, 2016, vol. 120, pp. 21091-21098.
61. Marowsky A., Gierulski A., Dick B. Double-resonant second harmonic generation from surface coverages of Nile Blue A. *Optics Commun.*, 1985, vol. 52, pp. 339-342.
62. Craighead H.G., Glass A.M. Optical absorption of small metal particles with adsorbed dye coats. *Optics Lett.*, 1981, vol. 6, pp. 248-250.
63. Baigar E., Gilch P., Zinth W., Stockl M., Harter P., von Feilitzsch T., Michel-Beyerle M.E. Ultrafast intramolecular electron transfer from a ferrocene donor moiety to a nile blue acceptor. *Chem. Phys. Lett.*, 2002, vol. 352, pp. 176-184.
64. Shervedani R.K., Amini S.A. Preparation of graphene/nile blue nanocomposite: Application for oxygen reduction reaction and biosensing. *Electrochim. Acta*, 2015, vol. 173, pp. 354-363.
65. Peng J.-J., Liu S.-P., Wang L., He Y.-Q. Studying the interaction between CdTe quantum dots and Nile blue by absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra. *Spectrochim. Acta A*, 2010, vol. 75, pp. 1571-1576.
66. Shen Y., Liu S., Kong L., Tan X., He Y., Yang J. Detection of DNA using an "off-on" switch of a regenerating biosensor based on an electron transfer mechanism from glutathione-capped CdTe quantum dots to nile blue. *Analyst*, 2014, vol. 139, pp. 5858-5867.
67. Al-Maliki A. Energy transfer studies in binary laser dye mixtures in organically modified silicates. *Eur. Phys. J. D.*, 2014, vol. 68, p. 236.
68. Jose J., Ueno Y., Burgess K. Water-Soluble Nile Blue Derivatives: Syntheses and Photophysical Properties. *Chem. Eur. J.*, 2009, vol. 15, pp. 418-423.
69. Liu X., Fan C., Sun R., Ge J.-F. Nile-red and Nile-blue-based near-infrared fluorescent probes for in-cellulo imaging of hydrogen sulfide. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, vol. 406, pp. 7059-7070.
70. Raju B.R., Naik S., Coutinho P.J.G., Goncalves M.S.T. Novel Nile Blue derivatives as fluorescent probes for DNA. *Dyes Pigments*, 2013, vol. 99, pp. 220-227.
71. Ho N.-H., Weissleder R., Tung C.-H. Development of water-soluble far-red fluorogenic dyes for enzyme sensing. *Tetrahedron*, 2006, vol. 62, pp. 578-585.
72. Raju B.R., Sampaio D.M.F., Silva M.M., Coutinho P.J.G., Goncalves M.S.T. Ultrasound promoted synthesis of Nile Blue derivatives. *Ultrasonics Sonochem.*, 2014, vol. 21, pp. 360-366.
73. Basu S., Panigrahi S., Praharaaj S., Ghosh S.K., Pande S., Jana S., Pal A., Pal T. Solvent Effect on the Electronic Spectra of Azine Dyes under Alkaline Condition. *J. Phys. Chem. A*, 2007, vol. 111, pp. 578-583.
74. Grofcsik A., Kubinyi M., Jones W. Intermolecular photoinduced proton transfer in nile blue and oxazine 720. *Chem. Phys. Lett.*, 1996, vol. 250, pp. 261-265.
75. Douhal A. Photophysics of Nile Blue A in Proton-Accepting and Electron-Donating Solvents. *J. Phys. Chem.*, 1994, vol. 98, pp. 13131-13137.
76. Kandori A., Kemnitz K., Yoshihara K. Subpicosecond transient absorption study of intermolecular electron transfer between solute and electron-donating solvents. *J. Phys. Chem.*, 1992, vol. 96, pp. 8042-8048.
77. Lakowicz J.R., Zelent B., Kusba J., Gryczynski I. Distance-dependent quenching of Nile Blue fluorescence by N,N-diethylaniline observed by frequency-domain fluorometry. *J. Fluoresc.*, 1996, vol. 6, pp. 187-194.
78. Gilani A.G., Hosseini S.E., Moghadam M., Alizadeh E. Excited state electric dipole moment of nile blue and brilliant cresyl blue: A comparative study. *Spectrochim. Acta A*, 2012, vol. 89, pp. 231-237.

79. Tajalli A., Gilani A.G., Zakerhamidi M.S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. *Dyes Pigments*, 2008, vol. 78, pp. 15-24.
80. Ghanadzadeh A., Tajalli H., Zirack P., Shirdel J. On the photo-physical behavior and electro-optical effect of oxazine dyes in anisotropic host. *Spectrochim. Acta A*, 2004, vol. 60, pp. 2925-2932.
81. Wang X.-L., Sun R., Zhu W.-J., Sha X.-L., Ge J.-F. Reversible Absorption and Emission Responses of Nile Blue and Azure A Derivatives in Extreme Acidic and Basic Conditions. *J. Fluoresc.*, 2017, vol. 27, pp. 819-827.
82. Stockett M.H., Houmoller J., Nielsen S.B. Nile blue shows its true colors in gas-phase absorption and luminescence ion spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 2016, vol. 145, p. 104303.
83. Beuerman E., Makarov N.S., Drobizhev M., Rebane A. Justification of two-level approximation for description of two-photon absorption in Oxazine dyes. *Proc. SPIE*, 2010, vol. 7599, p. 75990X.
84. Blau W., Dankesreiter W., Penzkofer A. Saturable absorption of dyes excited to the long-wavelength region of the S0-S1 absorption band. *Chem. Phys.*, 1984, vol. 85, pp. 473-479.
85. Fragnito H.L., Bigot J.-Y., Becker P.C., Shank C.V. Evolution of the vibronic absorption spectrum in a molecule following impulsive excitation with a 6 fs optical pulse. *Chem. Phys. Lett.*, 1989, vol. 160, pp. 101-104.
86. Pollard W.T., Fragnito H.L., Bigot J.-Y., Shank C.V., Mathies R.A. Quantum-mechanical theory for 6 fs dynamic absorption spectroscopy and its application to nile blue. *Chem. Phys. Lett.*, 1990, vol. 168, pp. 239-245.
87. Steinhurst D.A., Owrutsky J.C. Second Harmonic Generation from Oxazine Dyes at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. B*, 2001, vol. 105, pp. 3062-3072.
88. Sens R., Drexhage K.H. Fluorescence quantum yield of oxazine and carbazine laser dyes. *J. Luminesc.*, 1981, vol. 24-25, pp. 709-712.
89. Zhang Y., Hartmann S.R. Fluorescence-line-narrowing spectroscopy of nile blue in glass and polymer at 5 K: Determination of a single-site line shape function. *J. Chem. Phys.*, 1996, vol. 104, pp. 4371-4379.
90. Grofcsik A., Jones W.J. Stimulated emission cross-sections in fluorescent dye solutions: gain spectra and excited-state lifetimes of Nile blue A and oxazine 720. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1992, vol. 88, pp. 1101-1106.
91. Moshary F., Arend M., Friedberg R., Hartmann S.R. Ultrafast relaxation and modulation in the oxazine dye nile blue. *Phys. Rev. A*, 1992, vol. 46, pp. 33-36.
92. Weiner A.M., Ippen E.P. Femtosecond excited state relaxation of dye molecules in solution. *Chem. Phys. Lett.*, 1985, vol. 114, pp. 456-460.
93. Taylor A.J., Erskine D.J., Tang C.L. Femtosecond vibrational relaxation of large organic molecules. *Chem. Phys. Lett.*, 1984, vol. 103, pp. 430-435.
94. Kubinyi M., Grofcsik A., Papai I., Jones W.J. Rotational reorientation dynamics of nile blue A and oxazine 720 in protic solvents. *Chem. Phys.*, 2003, vol. 286, pp. 81-96.
95. Lawless M.K., Mathies R.A. Excited-state structure and electronic dephasing time of Nile blue from absolute resonance Raman intensities. *J. Chem. Phys.*, 1992, vol. 96, pp. 8037-8045.
96. Egorova D., Gelin M.F., Domcke W. Analysis of vibrational coherences in homodyne and two-dimensional heterodyne photon-echo spectra of Nile Blue. *Chem. Phys.*, 2007, vol. 341, pp. 113-122.
97. Prall B.S., Parkinson D.Y., Fleming G.R. Probing correlated spectral motion: Two-color photon echo study of Nile blue. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 123, p. 054515.
98. Nagasawa Y., Seike K., Muromoto T., Okada T. Two-Dimensional Analysis of Integrated Three-Pulse Photon Echo Signals of Nile Blue Doped in PMMA. *J. Phys. Chem. A*, 2003, vol. 107, pp. 2431-2441.
99. Brixner T., Mancal T., Stiopkin I.V., Fleming G.R. Phase-stabilized two-dimensional electronic spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 2004, vol. 121, pp. 4221-4236.
100. Ali Q.M., Palanisamy P.K. Z-Scan Determination of the Third-Order Optical Nonlinearity of Organic Dye Nile Blue Chloride. *Modern Phys. Lett. B*, 2006, vol. 20, pp. 623-632.
101. Blanchard G.J. An MNDO calculational study of selected oxazine, thiazine and oxazone dyes. *Chem. Phys.*, 1989, vol. 138, pp. 365-375.
102. Pollard W.T., Fragnito H.L., Bigot J.-Y., Shank C.V., Mathies R.A. Quantum-mechanical theory for 6 fs dynamic absorption spectroscopy and its application to nile blue. *Chem Phys Lett*, 1990, vol. 168, pp. 239-245.
103. Grofcsik A., Kubinyi M., Ruzsinszky A., Veszpremi T., Jones W.J. Quantum chemical studies on excited state intermolecular proton transfer of oxazine dyes. *J. Mol. Structure*, 2000, vol. 555, pp. 15-19.
104. Cossi M., Rega N., Scalmani G., Barone V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comp. Chem.*, 2003, vol. 24, pp. 669-681.
105. Fleming S., Mills A., Tuttle T. Predicting the UV-vis spectra of oxazine dyes. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, vol. 7, pp. 432-441.
106. Marazzi M., Gattuso H., Monari A. Nile blue and Nile red optical properties predicted by TD-DFT and CASPT2 methods: static and dynamic solvent effects. *Theor. Chem. Acc.*, 2016, vol. 135, p. 57.
107. Adamo C., Jacquemin D. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, vol. 42, pp. 845-856.
108. Charaf-Eddin A., Planchat A., Mennucci B., Adamo C., Jacquemin D. Choosing a Functional for Computing Absorption and Fluorescence Band Shapes with TD-DFT. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 2749-2760.
109. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.

110. 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.
111. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. *Gaussian 16*. Revision C.01, Inc., Wallingford CT, 2016.
112. Herzberg G., Teller E. Schwingungsstruktur der Elektronenübergänge bei mehratomigen Molekülen. *Z. Phys. Chem., Abt. B*, 1933, vol. 21, pp. 410-446.
113. Santoro F., Lami A., Improta R., Bloino J., Barone V. Effective method for the computation of optical spectra of large molecules at finite temperature including the Duschinsky and Herzberg-Teller effect: The Qx band of porphyrin as a case study. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, p. 224311.
114. Duschinsky F. The importance of the electron spectrum in multi atomic molecules. Concerning the Franck-Condon principle. *Acta Physicochim. URSS*, 1937, vol. 7, p. 551.
115. Scalmani G., Frisch M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.*, 2010, vol. 132, p. 114110.
116. Improta R., Scalmani G., Frisch M.J., Barone V. Toward effective and reliable fluorescence energies in solution by a new State Specific Polarizable Continuum Model Time Dependent Density Functional Theory Approach. *J. Chem. Phys.*, 2007, vol. 127, p. 074504.
117. Jacquemin D., Bremond E., Planchat A., Ciofini I., Adamo C. TD-DFT vibronic couplings in anthraquinones: from basis set and functional benchmarks to applications for industrial dyes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, vol. 7, pp. 1882-1892.
118. Barboza C.A., Vazquez P.A.M., Carey D.M.-L., Arratia-Perez R. A TD-DFT Basis Set and Density Functional Assessment for the Calculation of Electronic Excitation Energies of Fluorene. *Int. J. Quant. Chem.*, 2012, vol. 112, pp. 3434-3438.
119. Jacquemin D., Bremond E., Ciofini I., Adamo C. Impact of Vibronic Couplings on Perceived Colors: Two Anthraquinones as a Working Example. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, vol. 3, pp. 468-471.
120. Lopez G.V., Chang C.-H., Johnson P.M., Hall G.E., Sears T.J., Markiewicz B., Milan M., Teslja A. What Is the Best DFT Functional for Vibronic Calculations? A Comparison of the Calculated Vibronic Structure of the S1-S0 Transition of Phenylacetylene with Cavity Ringdown Band Intensities. *J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 116, pp. 6750-6758.
121. 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.
122. 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.
123. Tawada Y., Tsuneda T., Yanagisawa S., Yanai T., Hirao K. A long-range-corrected time-dependent density functional theory. *J. Chem. Phys.*, 2004, vol. 120, pp. 8425-8433.
124. Rostov I.V., Kobayashi R., Amos R.D. Comparing long-range corrected functionals in the cis-trans isomerisation of the retinal chromophore. *Mol. Phys.*, 2012, vol. 110, pp. 2329-2336.
125. Dreuw A., Weisman J.L., Head-Gordon M. Long-range charge-transfer excited states in time-dependent density functional theory require non-local exchange. *J. Chem. Phys.*, 2003, vol. 119, pp. 2943-2946.
126. Chiba M., Tsuneda T., Hirao K. Long-range corrected time-dependent density functional study on fluorescence of 4,4'-dimethylaminobenzonitrile. *J. Chem. Phys.*, 2007, vol. 126, p. 034504.
127. Dennington R., Keith T.A., Millam J.M. *GaussView*, Version 6.1, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2016.
128. Cohen A.J., Handy N.C. Dynamic correlation. *Mol. Phys.*, 2001, vol. 99, pp. 607-615.
129. Marenich A.V., Cramer C.J., Truhlar D.G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 6378-6396.
130. Singh U.C., Kollman P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules, *J. Comput. Chem.*, 1984, vol. 5, pp. 129-145.
131. Zhao G.J., Han K.L. Effects of hydrogen bonding on tuning photochemistry: Concerted hydrogen-bond strengthening and weakening. *ChemPhysChem*, 2008, vol. 9, pp. 1842-1846.
132. Qin Z., Lib X., Zhou M. A Theoretical Study on Hydrogen-Bonded Complex of Proflavine Cation and Water: The Site-dependent Feature of Hydrogen Bond Strengthening and Weakening. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2014, vol. 61, pp. 1199-1204.

ОПСИНЫ ГРЕБНЕВИКА *MNEMIOPSIS LEIDYI* И СЕТЬ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Сергеева Е.В.¹, Фадеева М.В.¹, Хавронюк И.С.¹, Мамонтов А.А.¹, Ершов А.Б.²,
Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Севастопольский государственный университет,
ул. Университетская 33, г. Севастополь, 299053, РФ

² Севастопольский морской Аквариум-музей, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: kuznet61@gmail.com
Поступила в редакцию 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0506

Аннотация. Представители типа *Stenophora* являются древней и обособленной ветвью эволюционного древа развития органического мира, обитают большей частью в эпипелагиали морей и демонстрируют удивительные механизмы приспособления к окружающей среде. С развитием техники секвенирования ДНК появилась возможность исследовать биологические объекты не только экспериментально, но и теоретически. С помощью методов биоинформатики изучали опсины гребневика *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865. Проведена дополнительная аннотация опсинов 1, 2 и 3, AFK83788.1, AFK83789.1 и AFK83790.1, соответственно. Построены их 3D-модели и определена локализация ретиналя внутри молекул белков. Исследовано белковое окружение опсинов, охарактеризованы соседи-протеины первого и второго уровня. Показано, что структура сети белок-белковых взаимодействий напоминает перцептрон, а, следовательно, может выполнять функцию распознавания паттернов поступающих извне сигналов. Выявлена многозадачность проводящих путей от эндоцитоза до Wnt-сигнализации, что указывает на участие опсинов гребневиков в широком спектре генетических и физиологических процессов.

Ключевые слова: *Stenophora*, опсины, сигнальная трансдукция.

ВВЕДЕНИЕ

Гребневики – одни из самых древних существ. Их возраст более 500 миллионов лет [1]. Серьёзное изучение гребневиков началось после расшифровки генома *Mnemiopsis leidyi* [2], когда стало понятно, что нервная система этого гребневика эволюционировала несколько раз и имеет принципиально иную структуру, чем у других животных на Земле [3]. Считается, что личинки *M. leidyi* предпочитают темноту [4], однако реакция взрослых животных на свет не столь однозначна [5]. В наших экспериментах взрослые особи *M. leidyi* демонстрировали вялую реакцию на белый и монохроматические источники света [6], что ставит вопрос о молекулярных механизмах световосприятия у этого вида.

Световые рецепторы мнемииопсиса принадлежат к широко распространённому семейству GPCR-белков (G-protein-coupled receptors), которые содержат 7 трансмембранных спиралей и передают внеклеточные сигналы посредством взаимодействия с белками, связывающими гуаниновые нуклеотиды [7,8]. Известные в настоящее время члены семейства включают родопсин-подобные GPCR (класс А, GPCRA), секретиноподобные GPCR (класс В, GPCRB), семейство рецепторов глутамата (класс С, GPCRC), рецепторы феромонов спаривания грибов (класс D, GPCRD), рецепторы cAMP (класс Е, GPCRE) и др. [9-13].

GPCR-протеины являются мишенями для лекарств и поэтому представляют значительный практический интерес. У человека обнаружено примерно 400 GPCR-рецепторов [14]. Большинство рецепторов идентифицированы на основе последовательностей ДНК, а не природы лиганда, который они связывают [15]. Следуя этим тенденциям, мы использовали методы биоинформатики для расшифровки механизмов примитивного зрения у гребневика *M. leidyi*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислотные последовательности опсинов гребневика *M. leidyi* найдены в базе данных NCBI – National Center for Biotechnology Information с помощью программы BLASTp [16].

Пространственные модели белков строили на Phyge2-сервере методом сравнения гомологичных аминокислотных последовательностей с известными пространственными структурами протеинов. Оценивали достоверность и степень покрытия исследуемых последовательностей [17].

Полученные 3D-модели опсинов и координаты атомов ретиналя загружали на SwissDock-сервер. Оценивали величину ΔG (ккал/моль) как разность свободной энергии Гиббса конечного состояния (в составе комплекса) и начального состояния (в свободном виде) [18].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [19].

Анализ доменной структуры белков осуществляли на Pfam 35.0 сервере [20], интерактивность протеинов анализировали как описано в [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В геноме *M. leidy* аннотированы три опсина: опсин 1 (MleiOpsin1, ML13055a, AFK83788.1) длиной 345 аа и массой 38,97 кДа, опсин 2 (MleiOpsin2, ML12047a, AFK83789.1) длиной 399 аа и массой 43,96 кДа, а также опсин 3 (MleiOpsin3, ML215412a, AFK83790.1) длиной 404 аа и массой 45,97 кДа. Сравнение этих светочувствительных белков с опсинами трихоплакса [22] позволило предположить, что опсины гребневика *M. leidy* могут обеспечивать чувствительность к синему свету, что согласуется с [23].

Светочувствительные рецепторы – трансмембранные белки-опсины *M. leidy* были подвергнуты дальнейшей аннотации. Для этого мы создали пространственные модели опсинов гребневика *M. leidy* (рис. 1), оценили качество моделей (табл. 1), а также определили положение ретиналя в 3D-моделях опсинов (рис. 2) и провели анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *M. leidy* (табл. 2), что позволяет уверенно отнести их к классу белков-опсинов и использовать для дальнейших исследований белок-белковых взаимодействий.

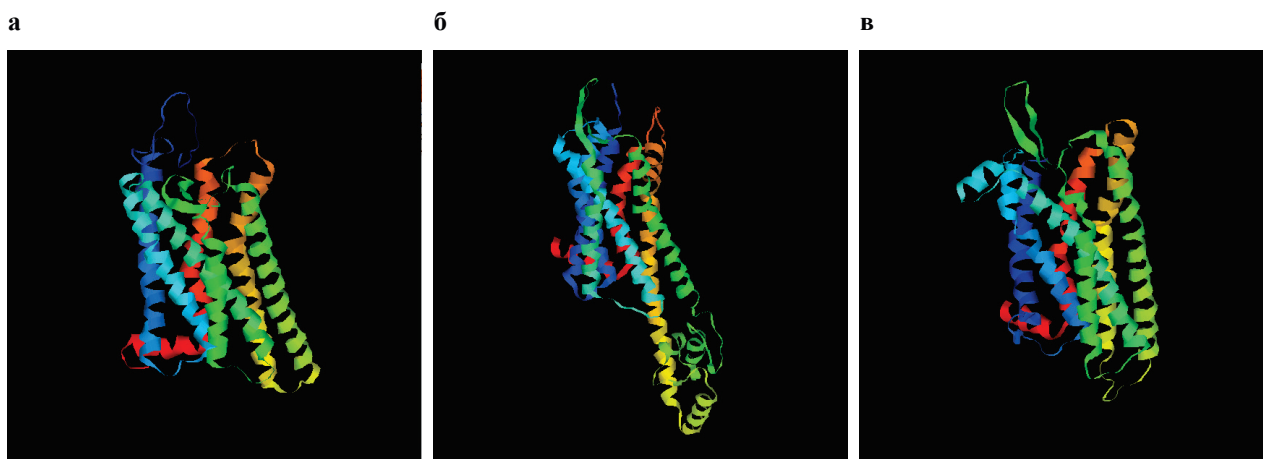


Рисунок 1. Пространственные модели опсинов гребневика *M. leidy*, а) опсин 1 – AFK83788.1, б) опсин 2 – AFK83789.1, в) опсин 3 – AFK83790.1, где верхняя сторона модели соответствует внешней части опсина, направленной во внеклеточное пространство, а нижняя сторона модели обозначает часть белка, обращённую в цитоплазму. Вся структура служит для проведения сигнала через мембрану внутрь клетки. То, что интегральные белки-опсины встроены в мембрану не показано



Рисунок 2. Положение ретиналя в пространственных моделях опсинов гребневика *M. leidy*, а) опсин 1 – AFK83788.1, б) опсин 2 – AFK83789.1, в) опсин 3 – AFK83790.1

Таблица 1. Оценка качества 3D-моделей опсинов гребневика *M. Leidy*

Опсин	Идентификатор	Длина, аа	Масса, кДа	Доверительность модели, %	Покрытие, %	Полнота модели
1	AFK83788.1	345	38,97	100	91	полная
2	AFK83789.1	399	43,96	100	94	полная
3	AFK83790.1	404	45,97	100	73	полная

Таблица 2. Анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *M. leidy*

Опсин	Идентификатор	Цвет	Связывание ретиналя			
			снаружи канала		внутри канала	
			число областей	-ΔG, ккал/моль	число областей	-ΔG, ккал/моль
1	AFK83788.1	*	3	7,24	1	8,02
2	AFK83789.1	синий	4	7,71	1	6,76
3	AFK83790.1	*	4	7,94	1	8,20

Примечание: * – чувствительный к синему свету по [22]

Отметим, что у опсина 2 был обнаружен массивный цитоплазматический домен с ярко выраженной α -спиралью, которая может выполнять роль лиганда в связывании с рецепторной частью нижележащих протеинов (рис. 16, 26).

Поиск ближайших соседей выявил одинаковый паттерн для опсинов 1 и 2 (AFK83788.1 и AFK83789.1), а также значительно большее число протеин-протеиновых взаимодействий в сети, чем можно ожидать от случайного набора белков, взятых из генома. Число узлов составило 7, число рёбер – 18, а коэффициент кластеризации – 0,886. Такое обогащение указывает на то, что белки функционально связаны друг с другом (рис. 3).

Анализ биологических функций протеинов показал (Рис. 3а), что все ближайшие соседи светочувствительных опсинов *M. leidy*, такие как ML047926a, ML20303a, ML13931a, ML04921a, ML20918a и ML46823a (обозначены красным цветом) выполняют трансдукцию сигнала с силой утверждения 1,22, из них протеины ML20303a, ML13931a, ML04921a и ML20918a (голубой) осуществляют внутриклеточную передачу сигналов с ратификацией 1,37.

Протеины ML13055a, ML13931a, ML04921a, ML20918a и ML46823a (рис. 3б, зелёный) связывают γ -субъединицу G-белка с силой утверждения 2,84, белки ML13931a, ML04921a и ML20918a (голубой) образуют GTP-азный комплекс и участвуют в процессе биосинтеза cAMP с оценкой 2,84, помимо этого протеины ML13931a и ML04921a (красный) обладают протеинкиназной активностью с величиной утверждения 2,96.

Белки ML13055a и ML46823a (Рис. 3в, красный) принадлежат к G-протеин связанным рецепторам с силой утверждения 2,14, а белки ML13931a и ML04921a (голубой) входят с ратификацией 1,95 в сигнальный путь Wnt – один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез и дифференцировку клеток [24,25].

Белок ML047926a принадлежит к семейству близкородственных белков аррестинов, которые регулируют функцию β -адренорецепторов, связываясь с их фосфорилированными формами, и нарушают способность активировать G-белки; могут также взаимодействовать с фосфорилированными красными/зелёными опсинами [26] или фосрестинами I и II дрозофилы, которые подвергаются светоиндуцированному фосфорилированию и, возможно, играют роль в передаче световых сигналов [27-29].

На следующем шаге исследования были рассмотрены графы соседей второго порядка (соседи соседей) с числом узлов равным 17, числом рёбер – 48 и коэффициентом средней локальной кластеризации равным 0,491 (рис. 4). Структуры сетей для опсинов 1 и 2 идентичны (данные не приводятся), за исключением вершины графа, соответствующей белку-опсину (рис. 4а, красный). Следует заметить, что структура графа напоминает перцептрон [30] с опсинами на входе, выполняющими роль сенсоров света (ML13055a-PA), промежуточным

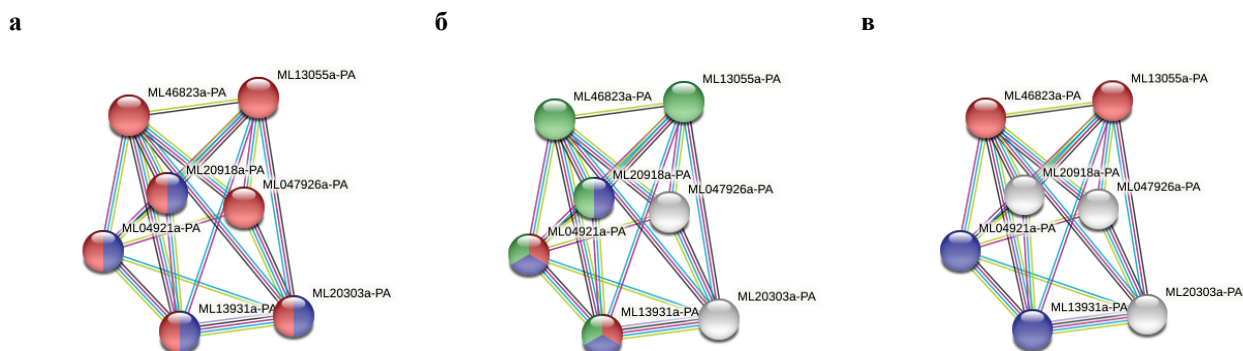
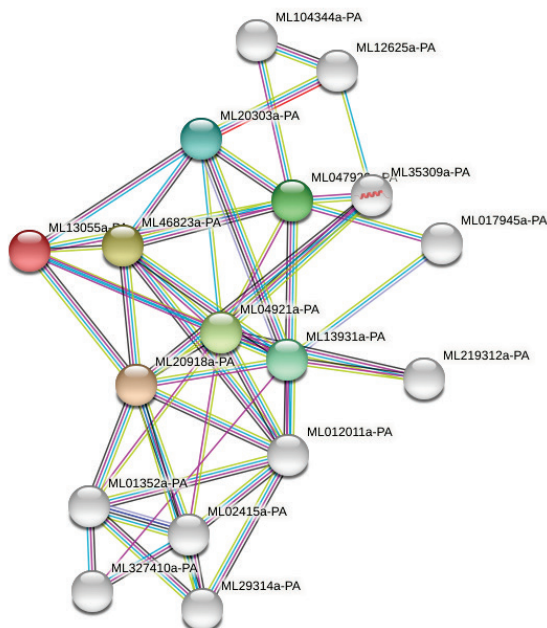


Рисунок 3. Графы ближайших соседей опсина 1 (AFK83788.1, ML13055a) из *M. leidy* и функции протеинов в узлах, а) онтология генов и биологические процессы, б) локальная сетевая кластеризация, в) KEGG-пути, объяснения в тексте

а



б

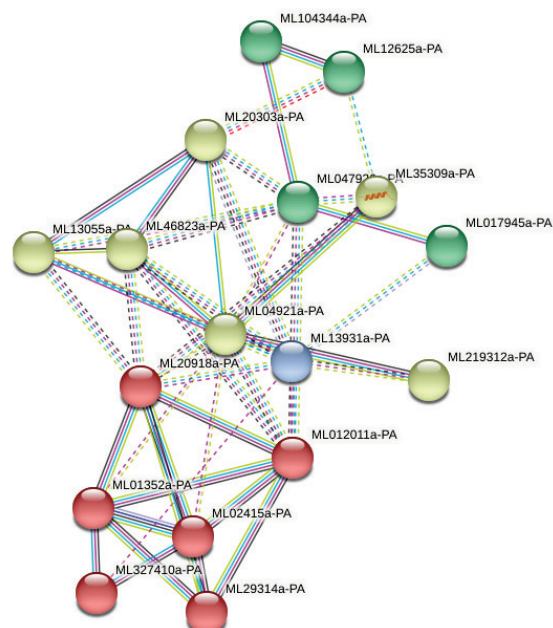


Рисунок 4. Графы взаимодействия компонентов световой трансдукции для опсина 1 (AFK83788.1, ML13055a) из *M. leidy*, а) перцептрон с одним промежуточным слоем, где красный цвет узла обозначает световые сенсоры-опсины, зелёный – G-белковые трансдукторы, серый – молекулярные актуаторы, проводящие сигнал в ядро и другие компартменты клетки, б) кластеризация, где цвета узлов означают отдельные кластеры

уровнем из 6 белков трансдукторов (ML20303a, ML047926a, ML46823a, ML04921a, ML13931a и ML20918a) и 10 белками-актуаторами на выходе (ML104344a, ML12625a, ML35309a, ML017945a, ML219312a, ML012011a, ML02415a, ML29314a, ML327410a и ML01352a).

Применение марковского алгоритма кластеризации (MCL, Markov Clustering Algorithm), основанного на случайном блуждании в графе, с использованием параметра инфляции 3 позволило выделить 4 кластера в графе второго порядка (рис. 4б), а именно:

- кластер №1, состоящий из 6 протеинов (ML012011a, ML01352a, ML02415a, ML20918a, ML29314a и ML327410a, обозначены красным), где ML29314a является сАМР-синтетазой с величиной предсказания 3,25, ML012011a с силой предсказания 2,73 участвует в G-протеин опосредованной передаче сигналов с использованием сАМР и аденилатциклазы, ML20918a задействован в обоих процессах, а в дополнение к этим 3 белкам, во внутриклеточной сигнальной трансдукции принимает участие ещё и протеин ML02415a с предсказанием 1,44;
- кластер №2, также состоящий из 6 протеинов (ML04921a, ML13055a, ML20303a, ML219312a, ML35309a и ML46823a, светло-зелёный), 3 из которых (ML13055a, ML46823a и ML219312a) с силой утверждения 1,51 представляют сигнальный путь рецептора, связанного с G-протеинами;
- кластер №3, состоящий из 4 протеинов (ML017945a, ML047926a, ML104344a и ML12625a, тёмно-зелёный), 3 из которых (ML047926a, ML104344a и ML12625a) задействованы в эндоцитозе с величиной предсказания 2,18, а 2 из них (ML104344a и ML047926a) с силой предсказания 2,56 участвуют в рецептор-опосредованном эндоцитозе; а также
- кластер №4, состоящий из 1 протеина с неизвестной функцией (ML13931a, голубой).

Далее, на основе литературных и экспериментальных данных были восстановлены 3D-структуры G-белков – вторичных посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах у *M. leidy* (рис. 5). Выступающие в качестве «хвоста» α -спирали позволяют этим белкам взаимодействовать друг с другом с образованием высокомолекулярного регуляторного комплекса.

Из молекулярных актуаторов, которые осуществляют клеточный ответ, был подробно исследован белок общего компонента системы световой трансдукции vGb – visual G beta (AFK83794.1, ML02234a), тетрамер которого собирается за счёт выступающей из диска мономера α -спирали и обладает биологической активностью (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты дополняют существующее представление о восприятии света у гребневикулов [23,31]. Показано, что опсины *M. leidy* по своей структуре напоминают известные светочувствительные рецепторы животных, состоящие из 7 трансмембранных α -спиралей, образующие пору в мембране клетки, внутри которой



Рисунок 5. Ленточные модели сигнальных субъединиц G-белкового трансдуцирующего комплекса из *M. leidy*, а) гуанин-нуклеотид-связывающая субъединица $G_{i\alpha-1}$ (AGB13744.1), б) $G_{i\alpha}$ -субъединица (AFK83796.1, ML02234a), в) $G_{s\alpha}$ -субъединица (AGB13741.1, ML012011a)

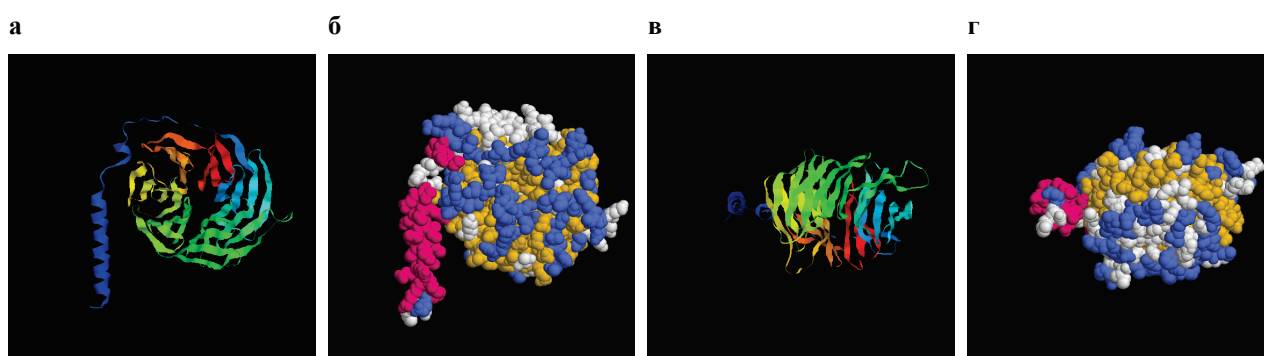


Рисунок 6. Модель общего компонента системы световой трансдукции vGb – visual G beta (AFK83794.1, ML02234a) из *M. leidy*, а, б – вид сверху, в, г – вид сбоку, а, в – ленточное представление структуры и направления аминокислотной последовательности в виде цветового спектра, б, г – представление с выделенными цветом внутренними структурами белка AFK83794.1 из *M. leidy*

располагается молекула ретиналя (рис. 1, 2). Отличительной особенностью опсина 2 из *M. leidy* является наличие цитоплазматического домена, который может выполнять дополнительные функции в проведении и регуляции сигналов внутрь клетки.

Следует отметить, что в проведённых нами ранее экспериментах [6] *M. leidy* реагировал на синевioletовый свет лазера с длиной волны 405 нм и мощностью 5 мВ, когда непосредственно облучали аборальный орган свежевывловленной особи. Животное втягивало освещённую часть тела или стремилось развернуться на 90-180° в любую из сторон, будь то вправо, влево, вверх или вниз. В большей части опытов *M. leidy* выполнял такое вращение относительно одной точки, то есть не смещал свой «центр массы», что указывает скорее на положительный фотокинезис, чем на отрицательный фототаксис. Стоит отметить, что реакция на облучение следовала с задержкой в 2-5 с. При этом, облучение красным светом не приводило к каким-либо заметным реакциям со стороны животного, что возможно, связано с отсутствием у гребневика *M. leidy* опсинов, чувствительных к данной длине волны.

При использовании более мощных лазеров, после начала облучения аборального органа, у ранее неподвижного животного почти сразу интенсифицировалось биение ресничек, гребневик поджимал аборальную часть своего тела, закрывал ротовое отверстие и слегка деформировался, что приводило к случайным поворотам тела и смещению в случайном направлении. В результате последовательности таких событий, гребневик через некоторое время покидал узкую зону освещения лазерного луча. Мы измеряли длину временного интервала от начала подачи светового луча на аборальный орган гребневика, до выхода животного из зоны света в темноту. Оказалось, что в целом, мнемипсисы размером 4-5 см покидают зону освещения интенсивного синего луча и уходят в темноту в среднем за 20 с, что более чем в 6 раз быстрее, чем при облучении красным лучом [32].

Поиск ближайших (рис. 3) и удалённых (рис. 4) соседей опсинов в сети протеин-протеиновых взаимодействий у *M. leidy* выявил структуру белковой сети, удивительно напоминающую молекулярный перцептрон [30], способный к обучению и распознаванию паттернов входных сигналов [33], первым слоем которого являются G-протеины, как например, белок AGB13741.1 (ML012011a) пространственная реконструкция которого напоминает типичные G-белки с выступающей α -спиралью (рис. 5в). Часть из них обладала аденилатциклазной активностью, вовлекая в процесс регуляции сАМР. Помимо этого, мы обнаружили в сети трансдукции белки-партнёры, способные осуществлять эндоцитоз.

Напомним, что у животных многие сигнальные каскады используют семиспиральные трансмембранные рецепторы, подобные опсинам мнемииописа, связанные с гетеротримерными G-белками (G α - β - γ) для преобразования внеклеточных сигналов во внутриклеточные ответы [34,35]. При обмене нуклеотидов, катализируемом активированными рецепторами, гетеротримеры диссоциируют на GTP-связанные G- α -субъединицы и G- β - γ -димеры, каждый из которых может модулировать многие нижележащие эффекторы [36,37]. Для доказательства общности механизмов трансдукции, мы реконструировали одну субъединицу общего компонента системы световой трансдукции vGb (AFK83794.1) у *M. leidy* (рис. 6), которая имеет архитектуру сходную с соответствующими белковыми молекулами других животных [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вскрытая в этой работе сеть сигнальных каскадов у *M. leidy*, запускаемых опсинами, демонстрирует полифункциональность проводимых сигналов, часть из которых, возможно, участвует в регуляции эмбриогенеза и в дифференцировке клеток, как например, Wnt-сигнальный путь [39], другие задействованы в клеточном эндоцитозе. Данное обстоятельство указывает на узость представлений о световосприятии и функциональной роли опсинов у гребневигов, подобно высшим животным. Молекулярные данные указывают на существенную роль опсинов в регуляции медленных морфогенетических процессов помимо участия в быстрых физиологических реакциях.

Авторы благодарят Пономареву А.А. за инициализацию работы на опсинах гребневигов, Булкова В.А. и Чусова Т.Д. за помощь в работе экспедиции 2021 года, Маиукову О.В., Аннинского Б.Е. и Силакова М.И. за обсуждение рукописи. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ тема № 0828-2018-0002 и проекта «Трихоплакс для бионики II» программы Сириус.Лето: начни свой проект. Сезон 2021/2022 № 100220210118094093.

Список литературы / References:

1. Li Y., Shen X.X., Evans B., Dunn C.W., Rokas A. Rooting the Animal Tree of Life. *Mol Biol Evol.*, 2021, vol. 38, no. 10, pp. 4322-4333.
2. Ryan J.F., Pang K., Schnitzler C.E. et al. NISC Comparative Sequencing Program. The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidy* and its implications for cell type evolution. *Science*, 2013, vol. 342, no. 6164, p. 1242592.
3. Moroz L.L. Multiple Origins of Neurons from Secretory Cells. *Front Cell Dev Biol.*, 2021, vol. 9, p. 669087.
4. Баяндина Ю.С. Реакция личинок *Mnemiopsis leidy* на изменение освещённости. *Морской биологический журнал*, 2020, т. 5, № 2, с. 105-108. [Bayandina Yu.S. Reaction of *Mnemiopsis leidy* larvae to changes in illumination. *Marine Biological Journal*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 105-108. (In Russ.)]
5. Baiandina Iu.S., Kirin M.P., Krivenko O.V. Black Sea *Mnemiopsis leidy* (Ctenophora) adult locomotion and light-induced behavior in laboratory experiments. *Journal of Sea Research*, 2022, vol. 180, art. no. 102152, 7 p.
6. Хавронюк И.С., Булков В.А., Мамонтов А.А., Чусов Т.Д., Кузнецов А.В. Студенческая экспедиция по изучению сенсорных систем морских обитателей в естественных условиях: воздействие лазеров на гребневигов. Севастополь, август 2021а.
7. Casey P.J., Gilman A.G. G protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem.*, 1988, vol. 263, no. 6, pp. 2577-2580.
8. Birnbaumer L. G proteins in signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1990, vol. 30, pp. 675-705.
9. Attwood T.K., Findlay J.B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.*, 1994, vol. 7, no. 2, pp. 195-203.
10. Foord S.M., Bonner T.I., Neubig R.R., Rosser E.M., Pin J.P., Davenport A.P., Spedding M., Harmar A.J. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev.*, 2005, vol. 57, no. 2, pp. 279-288.
11. Bjarnadottir T.K., Gloriam D.E., Hellstrand S.H., Kristiansson H., Fredriksson R., Schioth H.B. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 2006, vol. 88, no. 3, pp. 263-273.
12. Harmar A.J., Hills R.A., Rosser E.M. et al. IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, pp. 680-685.
13. Munk C., Isberg V., Mordalski S., Harpsøe K., Rataj K., Hauser A.S., Kolb P., Bojarski A.J., Vriend G., Gloriam D.E. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. *Br J Pharmacol.*, 2016, vol. 173, no. 14, pp. 2195-2207.
14. Vassilatis D.K., Hohmann J.G., Zeng H. et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, no. 8, pp. 4903-4908.
15. Laschet C., Dupuis N., Hanson J. The G protein-coupled receptors deorphanization landscape. *Biochem Pharmacol.*, 2018, vol. 153, pp. 62-74.
16. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403-410.
17. 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.

18. Bitencourt-Ferreira G., de Azevedo W.F. Jr. Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol.*, 2019, vol. 2053, pp. 189-202.
19. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, p. 374.
20. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.*, 2021 vol. 49, no. D1, pp. D412-D419.
21. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.*, 2021, vol. 49, no. D1, pp. D605-D612.
22. Хавронюк И.С., Мамонтов А.А., Булков В.А., Воронин Д.П., Кузнецов А.В. Присваивание функций опсинам 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., Bulkov 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, p. 686-694. (In Russ.)]
23. Schnitzler C.E., Pang K., Powers M.L. et al. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes. *BMC Biol.*, 2012, vol. 10, p. 107.
24. Wang J., Sinha T., Wynshaw-Boris A. Wnt signaling in mammalian development: lessons from mouse genetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2012, vol. 4, no. 5, p. a007963.
25. Garabedian M.V., Good M.C. OptoLRP6 Illuminates Wnt Signaling in Early Embryo Development. *J. Mol. Biol.*, 2021, vol. 433, no. 18, p. 167053.
26. Craft C.M., Whitmore D.H. The arrestin superfamily: cone arrestins are a fourth family. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 362, no. 2, pp. 247-255.
27. Yamada T., Takeuchi Y., Komori N., Kobayashi H., Sakai Y., Hotta Y., Matsumoto H. A 49-kilodalton phosphoprotein in the *Drosophila* photoreceptor is an arrestin homolog. *Science*, 1990, vol. 248, no. 4954, pp. 483-486.
28. Attramadal H., Arriza J.L., Aoki C., Dawson T.M., Codina J., Kwatra M.M., Snyder S.H., Caron M.G., Lefkowitz R.J. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem.*, 1992, vol. 267, no. 25, pp. 17882-17890.
29. Raming K., Freitag J., Krieger J., Breer H. Arrestin-subtypes in insect antennae. *Cell Signal*, 1993, vol. 5, no. 1, pp. 69-80.
30. Scheres B., van der Putten W.H. The plant perceptron connects environment to development. *Nature*, 2017, vol. 543, no. 7645, pp. 337-345.
31. Feuda R., Hamilton S.C., McNerney J.O., Pisani D. Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, vol. 109, no. 46, pp. 18868-18872.
32. Мамонтов А.А. *Воздействие монохроматических источников света на примитивных многоклеточных животных: трихоплаксов, гребневиков и медуз*. Выпускная квалификационная работа. СевГУ, 2022. [Mamontov A.A. *The impact of monochromatic light sources on primitive metazoans: trichoplax, ctenophores and jellyfish*. Final qualifying work. SevGU, 2022. (In Russ.)]
33. Timsit Y., Gregoire S.P. Towards the Idea of Molecular Brains. *Int J Mol Sci.*, 2021, vol. 22, no. 21, p. 11868.
34. Birnbaumer L., Yatani A., VanDongen A.M., Graf R., Codina J., Okabe K., Mattera R., Brown A.M. G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Br J Clin Pharmacol.*, 1990, vol. 30, suppl. 1, pp. 13S-22S.
35. Clapham D.E., Neer E.J. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1997 vol. 37, pp. 167-203.
36. Milligan G., Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.*, 2006, vol. 147, suppl 1, pp. S46-55.
37. Syrovatkina V., Alegre K.O., Dey R., Huang X.Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol.*, 2016, vol. 428, no. 19, pp. 3850-3868.
38. Sondek J., Bohm A., Lambright D.G., Hamm H.E., Sigler P.B. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature*, 1996, vol. 379, no. 6563, pp. 369-374.
39. Routledge D., Scholpp S. Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development*, 2019, vol. 146, no. 10, p. dev176073.

OPSINS OF THE CTENOPHORE MNEMIOPSIS LEIDYI AND A NETWORK OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

Sergeeva E.V.¹, Fadeeva M.V.¹, Khavronyuk I.S.¹, Mamontov A.A.¹, Ershov A.B.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² Sevastopol Marine Aquarium-Museum, Institute of Biology of the South Seas named after A.O. Kovalevsky RAS

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

Received 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0506

Abstract. Ctenophora are ancient and separate branch of evolutionary tree of the organic world development. They inhabit mostly *epipelagic seas* and demonstrate amazing mechanisms of adaptation to the environment. It is now possible with the potential technique of DNA sequencing to study biological objects not only experimentally but also theoretically. We studied opsins of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865 using bioinformatics methods. Additional annotation of opsins 1, 2, and 3, AFK83788.1, AFK83789.1, and AFK83790.1, respectively, was performed. Their 3D models were constructed and the localization of retinal within the protein molecules was determined. The protein environment of opsins was studied, and the first- and second-level protein neighbors were characterized. The structure of the protein-protein interaction network was shown to resemble a perceptron and, therefore, to perform the function of recognizing the patterns of the signals coming from outside. The multitasking of signaling pathways from endocytosis to Wnt signaling has been revealed, indicating the involvement of Ctenophora opsins in a wide range of genetic and physiological processes.

Key words: *Ctenophora*, *opsins*, *signal transduction*.

ДИМЕРИЗАЦИЯ ФТАЛОЦИАНИНА АЛЮМИНИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ И ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДАХ

Клименко И.В.¹, Астахова Т.Ю.¹, Тимохина Е.Н.¹, Лобанов А.В.^{1,2,3}

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ, e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

³ Московский педагогический государственный университет, Институт биологии и химии

ул. Малая Пироговская, 1/1, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0507

Аннотация. Фталоцианин алюминия (AlClФц) – фотоактивное макрогетероциклическое соединение, которое, в мономерной форме, используется как фотосенсибилизатор (Фс) в фотодинамической терапии и диагностике. В работе изучены его физико-химические свойства в органической (N,N-диметилформамид, ДМФА) и водно-органической (ДМФА-вода) средах. Показано, что гидрофобные свойства AlClФц препятствуют его широкому применению в различных фармакологических композициях из-за его склонности к агрегации в водных растворах, что приводит к образованию нефлуоресцирующих агрегатов и снижению его фотодинамической активности. С помощью квантово-химических расчетов методом функционала электронной плотности (DFT) были определены геометрия и электронная структура AlClФц в мономерном и димеризованном (H- и J-агрегаты) состояниях. Приведены различные типы ориентации при димеризации молекул AlClФц: «спина к спине», «голова к голове», «голова к спине», а также смешанно-ориентированные типы. Доказано, что как в ДМФА, так и в ДМФА-вода средах предпочтительной ориентацией является «спина к спине» при сохранении в димере мономерной геометрии составляющих молекул. Показано, что в водно-органическом растворителе молекула AlClФц легко гидратируется с образованием координационной связи между атомом Al молекулы AlClФц и атомом O молекулы воды. Длина связи составляет 2,23 Å, а энергия гидратации -16,84 ккал/моль. Гидратирование способствует образованию димеров, в которых две молекулы воды играют роль «мостиков» между двумя молекулами AlClФц. В таком димере каждая молекула воды имеет две связи: одну координационную связь между своим атомом O и атомом Al одной из молекул AlClФц и одну водородную связь между своим атомом H и атомом N другой молекулы AlClФц. На основе полученных расчетных данных димеры AlClФц в среде ДМФА были отнесены к H-агрегатам, в среде ДМФА-вода – J-агрегатам, соответственно.

Ключевые слова: фталоцианин алюминия, физико-химические свойства, оптическое поглощение, квантово-химические расчеты, агрегация.

Фталоцианины относятся к тетрапиррольным макрогетероциклическим соединениям и представляют собой группу важных органических красителей, относящуюся к тетраазобензопорфиринам и используемую во многих областях знаний, например в нелинейной оптике, в различных электронных устройствах, в виде газовых сенсоров, оптических фильтров, фото- и электрокатализаторов химических реакций, а также в биомедицинских приложениях, например, в качестве фотосенсибилизаторов (Фс, природные или искусственно синтезированные вещества, способные к фотосенсибилизации биологических тканей) в фотодинамической терапии (ФДТ), которая в последнее десятилетие стала одним из важнейших средств лечения онкологических и других видов заболеваний. Механизм ее действия основан на способности Фс избирательно накапливаться в целевых тканях-мишенях и генерировать синглетный кислород или кислородсодержащие свободные радикалы при локальном воздействии излучения определенной длины волны, соответствующей максимальному поглощению Фс [1]. Молекула фталоцианина (Фц) представляет собой структуру, состоящую из четырех бензопиррольных фрагментов, связанных через –N= мостики. Фц металлов (MeФц) содержат тетракоординированный центральный ион металла, который может быть одним из, по крайней мере, 66 различных элементов периодической системы. Вариативность заместителей в макроцикле, а также металла-комплексобразователя в молекуле Фц, позволяет направленно изменять свойства системы. В случае трехвалентного центрального иона Al³⁺ его избыточные валентные электроны могут быть использованы для образования химической связи с внеплоскостными атомами, например, Cl.

Принципиально важным при разработке препаратов для ФДТ является отсутствие агрегации Фс в растворах, которая, в свою очередь, приводит к падению квантового выхода генерации синглетного кислорода. В случае нахождения молекулы Фц в мономерной форме процесс самотушения возбужденных триплетных состояний отсутствует, что приводит к эффективному переносу триплетной энергии на молекулу кислорода и запуску механизма фотодинамического действия. Однако, известно, что широкое применение Фц в фармакологической практике ограничивается их малой растворимостью в большинстве органических и водно-органических растворителей, в том числе физрастворах, а также склонностью к ассоциации с образованием агрегатов различного типа.

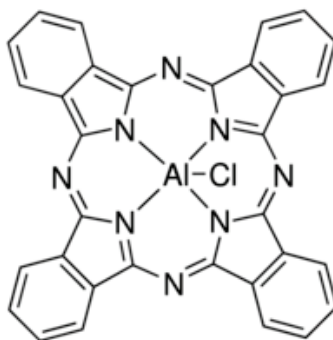


Рисунок 1. Структурная формула фталоцианина алюминия $AlClPc$

Наличие агрегатов в растворе обычно определяют спектрофотометрическими методами, например, оптическим поглощением и флуоресценцией. Процесс агрегации приводит к снижению интенсивности поглощения мономера, тушению флуоресценции, значительному снижению скорости образования реактивных форм кислорода, а также к другим изменениям, например, сдвигу максимумов поглощения и появлению полос, характерных для агрегатов фталоцианина. H-агрегаты $MePc$, образуемые во многих системах, не фотоактивны, в отличие от J-агрегатов, которые образуются гораздо реже и могут быть фотоактивными.

Металлокомплекс фталоцианин алюминия (рис. 1, $AlClPc$) – фотосенсибилизатор II поколения, обладающий в мономерной форме высокой фотоактивностью и фотостабильностью, большим коэффициентом поглощения в области 650–680 нм («терапевтическое окно») и высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Однако гидрофобные свойства $AlClPc$ препятствуют его широкому применению в различных фармакологических композициях из-за его склонности к агрегации в водных растворах, что приводит к образованию нефлуоресцирующих агрегатов и снижению его фотодинамической активности [2]. При разработке способов контроля над агрегационным состоянием $AlClPc$ необходимо понимание механизмов межхромомформного взаимодействия, приводящего к самотушению возбужденных состояний в агрегатах. В связи с этим, были проведены экспериментальные исследования оптического поглощения $AlClPc$ в растворе N, N - диметилформамида (ДМФА) и ДМФА-вода при разных концентрациях воды в растворе, а также квантово-механическим методом функционала электронной плотности (DFT) были определены геометрия и электронная структура $AlClPc$ в мономерном и димеризованном (H- и J-агрегаты) состояниях в средах ДМФА и ДМФА-вода.

Квантово-химические расчеты были выполнены с помощью программного пакета ORCA 4.2.1 [3]. Оптимизация структур проводилась в газовой фазе, т.к. было показано [4], что в пакете ORCA именно газовая фаза дает наиболее близкие к экспериментальным значения геометрических параметров для Pc . Все исследованные структуры были оптимизированы методом DFT на основе функционала PBE [5] с использованием базисного набора def2-SVP [6] в газовой фазе ($\epsilon = 1$) с эмпирической поправкой Grimme D3BJ [7]. Нахождение минимума подтверждалось отсутствием отрицательных частот в колебательном спектре. Для расчета спектров UV-Vis был использован уровень теории PBE0 [8] с использованием базисного набора def2-TZVP [6]. Учет растворителя производился в приближении континуальной модели для поляризуемой сплошной среды CPCM [9]. Электронные спектры адсорбции UV-Vis были рассчитаны по теории TD-DFT [10] (без приближения Тамма-Данкова) в адиабатическом приближении, т.е. рассматривались вертикальные электронные переходы при фиксированной геометрии основного состояния. Учитывались только синглет-синглетные электронные переходы, разрешенные правилами отбора.

Для проведения спектрофотометрических исследований базовый раствор $AlClPc$ с концентрацией $1,18 \cdot 10^{-3}$ моль/л готовили путем растворения сухой навески $AlClPc$ (0,015 г) в 20 мл ДМФА. Раствор хранили в темноте при +4 °C и при необходимости разбавляли перед проведением эксперимента до концентрации $C_{AlClPc} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Экспериментальные исследования оптического поглощения систем проводили при титровании раствора $AlClPc$ в ДМФА раствором ДМФА-вода ($C_{DMFA} = 4,6$ об. %). Для регистрации электронных спектров поглощения использовали прибор UV-Vis-спектрофотометр TU-1901 фирмы “Beijing Purkinje General Instrument Co, Ltd”. Анализ плохо разрешенных спектров поглощения проводили на основе разложения их на гауссовы составляющие.

Теоретические расчеты показали, что при димеризации (агрегации) мономерных молекул $AlClPc$ благодаря наличию хлора возможны три разных ориентации составляющих молекул $AlClPc$ (рис. 2): «спина к спине», «спина к голове», «голова к голове», а также смешанно-ориентированные типы. Оказалось, что как в ДМФА, так и в системе ДМФА-вода энергетически выгодной является ориентация «спина к спине». При этом молекулы $AlClPc$ сохраняют мономерную геометрию.

Однако существует принципиальное различие между димерами в ДМФА и ДМФА-вода средах, что связано с особой ролью молекул воды, которые могут выступать в роли связующих «мостиков» между двумя молекулами $AlClPc$. На рисунке 3 показаны структуры димеров в ДМФА (а) и ДМФА-вода (б) средах, полученные в результате квантово-химических расчетов.

В среде ДМФА (рис. 3а) молекулы сдвинуты относительно друг друга так, что атом алюминия одной молекулы располагается над одним из атомов азота другой молекулы, в результате чего образуется «скользящая»

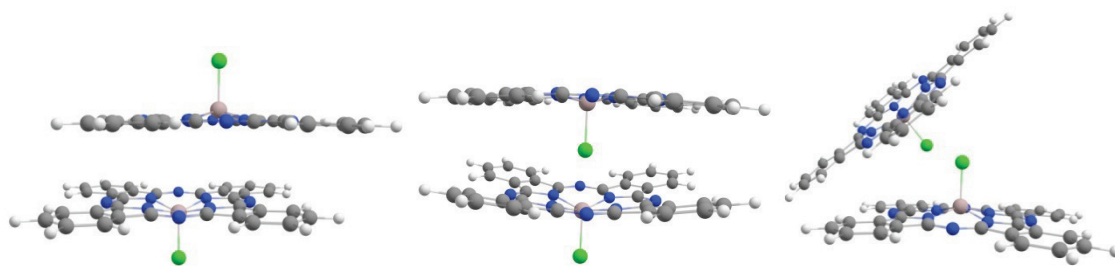


Рисунок 2. Возможные ориентации молекул АlСlФц в димере: «спина к спине» (а), «спина к голове» (б), «голова к голове» (в)



Рисунок 3. Димер АlСlФц в средах ДМФА (а) и ДМФА-вода (б)

кофациальная агрегационная форма с перекрыванием π -орбиталей ароматических макроциклов и обеспечивается стабильность димера благодаря межмолекулярной координации атома азота одной молекулы АlСlФц и положительно заряженного алюминия другой молекулы АlСlФц. Угол сдвига молекул составляет 5° , что позволяет отнести димеры в ДМФА к Н-агрегатам [11]. Расстояние между молекулами составляет $\sim 3,70 \text{ \AA}$. В водно-органическом растворителе молекула АlСlФц легко гидратируется с образованием координационной связи между атомом Аl молекулы АlСlФц и атомом О молекулы воды. Длина связи составляет $2,23 \text{ \AA}$, а энергия гидратации $-16,84 \text{ ккал/моль}$. Гидратирование способствует образованию димеров, в которых две молекулы воды играют роль «мостиков» между двумя молекулами АlСlФц (рис. 3б). В таком димере каждая молекула воды имеет две связи: одну координационную связь между своим атомом О и атомом Аl одной из молекул АlСlФц и одну водородную связь между своим атомом Н и атомом N другой молекулы АlСlФц. Расстояние между молекулами составляет $\sim 3,15 \text{ \AA}$. Угол сдвига молекул составляет 62° , что позволяет отнести димеры в среде ДМФА-вода к J-агрегатам [11].

На рисунке 4 представлены экспериментально полученные спектры оптического поглощения АlСlФц в средах ДМФА (кривая 1) и ДМФА-вода (кривая 2). Красная область видимого спектра ($600\text{--}800 \text{ нм}$) АlСlФц в ДМФА (рис. 4, кривая 1.) характеризуется наличием интенсивной Q-полосы с максимумом поглощения $\lambda_Q = 672 \text{ нм}$ и плечом при $\sim 640 \text{ нм}$, характерной для всех Фц, приписываемой к $a_{1u}(\pi) \rightarrow (\pi^*)$ переходу и ответственной за цвет соединения, а также ее колебательного спутника низкой интенсивности с максимумом поглощения при $\sim 607 \text{ нм}$. В ближнем ультрафиолете (рис. 4, кривая 1.) имеется характерная для всех МеФц B-полоса (Soret), с максимумом при $\sim 349 \text{ нм}$, приписываемая к $a_{2u}(\pi) \rightarrow (\pi^*)$ переходу. В случае системы АlСlФц-ДМФА-Н₂O (рис. 4, кривая 2) наблюдаются значительное уширение линий спектра, резкое уменьшение интенсивности Q-полосы и сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область. Максимум поглощения $\lambda_Q = 672 \text{ нм}$ в спектре оптического поглощения АlСlФц приписывают мономерной форме красителя, а наличие плеча в коротковолновой области спектра при $\sim 640 \text{ нм}$ (рис. 4, кривая 1) свидетельствует о присутствии Н-агрегатов АlСlФц в растворе ДМФА. На основании данных (рис. 4, кривая 1), свидетельствующих об отсутствии поглощения в области $710\text{--}850 \text{ нм}$, можно констатировать отсутствие J-агрегатов АlСlФц в растворе ДМФА. Изменения в спектре поглощения АlСlФц в среде ДМФА-вода связаны с агрегационным поведением АlСlФц, а именно, с резким уменьшением количества мономеров АlСlФц, значительным увеличением количества Н-агрегатов и появлением J-агрегатов.

Теоретические расчеты спектров поглощения АlСlФц для мономера и обоих димеров (Н- и J-агрегаты) в геометрии основного состояния для сред ДМФА и ДМФА-вода в различных соотношениях хорошо совпадают с полученными экспериментальными данными. Оказалось, что ни положение максимумов поглощения (длины волн переходов) мономера и димеров (Н- и J-агрегаты), ни силы осцилляторов практически не зависят от растворителя. Это означает, что и мономер, и димеры имеют свои индивидуальные спектры поглощения вне зависимости от соотношения воды и ДМФА в растворе. Изменение вида экспериментального спектра при добавлении воды в растворитель связано с изменением соотношения мономер/димеры в водно-органической среде. Расчеты также показали, что спектр мономера содержит две выраженных полосы, одна из которых соответствует Q-полосе экспериментального спектра и связана с переходом из основного состояния в первое возбужденное состояние $S_0 \rightarrow S_1$, т.е. с переходом НОМО \rightarrow LUMO, вторая – B-полосе экспериментального спектра поглощения. В расчетных спектрах димеров происходит сдвиг Q-полосы при сохранении положения максимумов поглощения: для Н-агрегатов – в сторону коротких длин волн, а для J-агрегатов – в красную область.

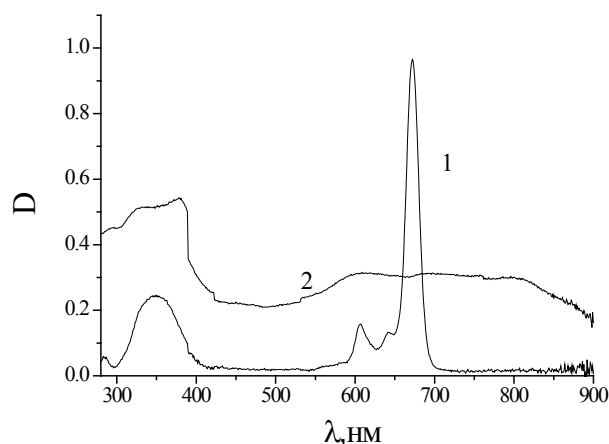


Рисунок 4. Спектр оптического поглощения АlСlФц в средах ДМФА (1) и ДМФА - вода (2)

Полученные в результате проведенных исследований данные позволяют создать предпосылки для научного прогнозирования и контроля на молекулярном уровне межхромоформных взаимодействий фталоцианинов в органических и водно-органических средах.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ИБХФ РАН (№ гос. регистрации 01201253304) и в рамках Программы фундаментальных научных исследований РФ (Госзадание FFZE-2022-0009, ФИЦ ХФ РАН). Расчеты выполнены с использованием вычислительных ресурсов МСЦ РАН.

Список литературы / References:

1. Клименко И.В., Лобанов А.В. Биосовместимые супрамолекулярные системы на основе хлорина еб: получение, физико-химические свойства. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 4, с. 546. [Klimenko I.V., Lobanov A.V. Biocompatible supramolecular systems based on chlorin eб: preparation, physicochemical properties. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, p. 546. (In Russ.)]
2. Klimenko I.V., Trusova E.A., Shchegolikhin A.N., Lobanov A.V., Jurina L.V. Surface modification of graphene sheets with aluminum phthalocyanine complex. *Fullerenes, Nanotubes and carbon nanostructures*, 2022, vol. 30, no. 1, doi: 10.1080/1536383X.2021.1976754.
3. Nees F., Wennmohs F., Becker U., Riplinger C. The ORCA quantum chemistry program package. *Journal of Chemical Physics*, 2020, vol. 152, p. 224108, doi: 10.1063/5.0004608.
4. Martynov A.G., Mack J., May A.K., Nyokong T., Gorbunova Yu.G., Tsivadze A.Yu. Methodological survey of simplified TD-DFT methods for fast and accurate interpretation of UV-Vis-NIR spectra of phthalocyanines. *ACS Omega*, 2019, vol.4, no. 4, p. 7265, doi: 10.1021/acsomega.8b03500.
5. Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M., Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 1996, vol. 77, p. 3865, doi: 10.1103/PhysRevLett.77.3865.
6. Weigend F., Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2005, vol. 7, p. 3297, doi: 10.1039/B508541A.
7. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H., A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *Journal of Chemical Physics*, 2010, vol. 132, p. 154104, doi: 10.1063/1.3382344.
8. Ernzerhof M., Scuseria G.E. Assessment of the Perdew-Burke-Ernzerhof exchange-correlation functional. *Journal of Chemical Physics*, 1999, vol. 110, p. 5029, doi: 10.1063/1.478401.
9. Barone V., Cossi M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *Journal Physical Chemistry A*, 1998, vol. 102, p. 1995, doi: 10.1021/jp9716997.
10. Adamo C., Jacquemin D. Te calculations of excited-state properties with time-dependent density functional theory. *Chemical Society Reviews*, 2013, vol. 42, p. 845, doi: 10.1039/c2cs35394f.
11. Kasha M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Journal of Radiation Research*, 1963, vol. 20, p. 55, doi: 10.2307/3571331.

DIMERIZATION OF ALUMINUM PHTHALOCYANINE CHLORIDE IN ORGANIC AND AQUA-ORGANIC MEDIUM

Klimenko I.V.¹, Astakhova T.Yu.¹, Timokhina E.N.¹, Lobanov A.V.^{1,2,3}.¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia³ Moscow Pedagogical State University, Institute of Biology and Chemistry
Malaya Pirogovskaya str. 1/1, Moscow, 119991, Russia

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0507

Abstract. Aluminum phthalocyanine chloride (AlClPc) is a photoactive macroheterocyclic compound, which, in its monomeric form, is used as a photosensitizer (PS) in photodynamic therapy and diagnostics. In this paper, its physicochemical properties were studied in organic (N, N-dimethylformamide, DMF) and aqua-organic (DMF-aqua) media. It has been shown that the hydrophobic properties of AlClPc prevent its widespread use in various pharmacological compositions due to its tendency to aggregate in aqueous solutions, which leads to the formation of non-fluorescent aggregates and a decrease in its photodynamic activity. The geometry and electronic structure of AlClPc in the monomeric and dimerized (H- and J-aggregates) states were studied using quantum-chemical calculations with the help of the electron density functional theory (DFT) method. Different types of orientation during the dimerization of AlClPc molecules are presented: "back to back", "head to head", "head to back", as well as mixed-oriented types. It has been proven that both in DMF and DMF-aqua media, the preferred orientation is "back to back", without sacrificing the monomeric geometry of the constituent molecules in the dimer. It is shown that in an aqueous organic solvent the AlClPc molecule is easily hydrated with the formation of a coordination bond between the Al atom of the AlClPc molecule and the O atom of the aqua molecule. The bond length is 2.23 Å, and the hydration energy is 16.84 kcal/mol. Hydration promotes the formation of dimers, in which two aqua molecules play the role of "bridges" between two AlClPc molecules. In such dimer, each aqua molecule has two bonds: one coordination bond between its O atom and the Al atom of one of the AlClPc molecules and one hydrogen bond between its H atom and the N atom of another AlClPc molecule. Based on the calculated data obtained, the AlClPc dimers in the DMF medium were assigned to H-aggregates, and in the DMF-water medium, to J-aggregates, respectively

Key words: aluminum phthalocyanine chloride, physico-chemical properties, optical absorption, quantum-chemical calculations, aggregation.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛАСТЕРОВ ДНК-DPS ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА

Терешкина К.Б.¹, Лойко Н.Г.², Терешкин Э.В.¹, Коваленко В.В.¹, Генералова А.А.¹, Крупянский Ю.Ф.¹

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 199991, РФ; e-mail: ksenia.tereshkina@chph.ras.ru,

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2, г. Москва, 117312, РФ
Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0508

Аннотация. Образование комплексов и кристаллов бактериальной нуклеоидной ДНК внутри клеток бактерий в ответ на неблагоприятные внешние воздействия представляет большой интерес как в биофизике и структурной биологии, так и в различных областях промышленности. Основную роль в конденсации и кристаллизации ДНК у бактерий в стрессовых условиях (голодание, температурный, окислительный и другие виды стресса) играют ДНК-связывающие белки DPS. В данной работе методом классической молекулярной динамики в полноатомном приближении исследуется динамическое поведение и структура комплексов белка DPS бактерии *Escherichia coli* в растворе с короткоцепочечной ДНК (25 пар нуклеотидов), при изменении концентрации фенольного липида 4-гексилрезорцина, являющегося химическим аналогом индукторов анабиоза бактерий. Изучается влияние изменения концентрации 4-гексилрезорцина от 0 до 50, 100 и 500 молекул на комплекс ДНК-DPS. Методом поиска линейной энергии взаимодействия получены данные о свободных энергиях связывания ДНК с белком без и в присутствии 4-гексилрезорцина. Показано, что большие концентрации 4-гексилрезорцина способствуют образованию комплексов ДНК с DPS. Для выявления особенностей динамического поведения ДНК и белка был проведён анализ главных компонент. Получены пространственные и энергетические характеристики комплексов.

Ключевые слова: DPS, стабилизация ДНК, 4-гексилрезорцин, *Escherichia coli*, молекулярная динамика.

В настоящее время приобретает всё большую актуальность проблема бактериальной устойчивости к антибиотикам, дезинфектантам, антисептикам и пр. Одним из способов защиты от стресса у бактерий является внутриклеточное связывание и кристаллизация ДНК с ферритиноподобными ДНК-связывающими белками DPS (DNA-binding protein from starved cells). Белки DPS представляют собой шарообразные гомододекамеры с полостью внутри (трететраэдрическая точечная группа симметрии T, 23-й класс по международной классификации). Каждая субъединица белка DPS *Escherichia coli* имеет экспонированный наружу свободный N-конец, богатый остатками лизина, с помощью которого происходит связывание ДНК [1]. При переходе бактериальной колонии в стационарную фазу роста, в 30 раз увеличивается синтез белка DPS и его последующая кристаллизация с образованием со-кристаллов с бактериальной хромосомой.

Также в стационарной фазе роста клеточной колонии резко увеличивается синтез аутоиндукторов анабиоза, производных алкилрезорцинов [2]. Одним из наиболее близким химическим аналогом этого типа соединений является 4-гексилрезорцин [3], воздействие которого на бактериальные клетки имеет концентрационный эффект от увеличения выживаемости клеток до их гибели [4].

Ранее было показано, что резорцины (5-метилрезорцин, 4-гексилрезорцин) способны мигрировать через клеточные мембраны, при этом предпочтительным путём является непосредственно бислой, а не каналы пориновых белков [4]. Внутри клетки эти соединения могут образовывать комплексы с белками [5-7].

Кристаллическая структура DPS *E. coli* была впервые расшифрована в 1998 году методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.6 Å [8]. Было показано, что белок DPS формирует шарообразные гомододекамеры с полостью внутри, похожие на ферритин. Расположение субъединиц таково, что белок относится к точечной группе симметрии T (23 по международной классификации).

В работе методами молекулярной динамики проведено моделирование систем DPS-ДНК с разным содержанием 4-гексилрезорцина (4-г.р.). Исследована система, состоящая из додекамера DPS, короткоцепочечной ДНК, молекул 4-г.р. в разной концентрации, ионов и воды (см. табл. 1). Двучепочечная ДНК в В-форме (5'- GTACATATGATGGGGTGATGGATA-3', 25 пар нуклеотидов) в начальный момент времени располагалась у поверхности DPS, чтобы исследовать воздействия 4-г.р. на пресформированные комплексы и проследить формирование комплексов за время расчёта.

Для расчёта динамики использовано полноатомное силовое поле AMBER99-PARMBS1, дополненное параметрами 4-г.р., полученными из квантово-химических расчётов и параметризованными для данного силового поля [4]. Расчёты динамики систем проведены методом классической молекулярной динамики в комплексе программ Gromacs 5.1. Мы использовали разработанный ранее протокол, включающий минимизацию энергии методом наискорейшего спуска и двуступенчатую релаксацию при постоянном объёме и давлении в

Таблица 1. Состав систем при расчётах комплексов DPS с ДНК и 4-гексилрезорцином (включая контрольные системы)

Обозначение системы	Число молекул				Число ионов		
	DPS	ДНК	4-г.р.	Вода, SPC/E	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺
0	1	1	-	143457	480	424	20
50	1	1	50	142858	480	424	20
100	1	1	100	142292	480	424	20
500	1	1	500	137691	480	424	20
ДНК	-	1	-	56242	48	-	-

течение 200 пс, после которых осуществлялся расчёт динамики. Температура 313 К поддерживалась стохастическим (ланжевенским) термостатом с постоянной трения $0,5 \text{ пс}^{-1}$. Давление 1 атм. поддерживалось с помощью баростата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Электростатические взаимодействия на больших расстояниях рассчитывались методом суммирования по Эвальду (PME). Радиусы обрезания для всех типов взаимодействия брались равными 1,5 нм. Список соседей поддерживался с помощью схемы отсечки Верле и обновлялся каждые 10 фс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Шаг интегрирования был выбран 2 фс. Длина траекторий составляла 100 нс и определялась выходом на плато графиков функций расстояний и энергий DPS-ДНК и DPS-4-г.р., то есть соответствовала распределению молекул 4-г.р. внутри расчётной ячейке и формированию комплексов DPS-ДНК в начальной конфигурации.

После получения траекторий, находились пространственные и энергетические характеристики систем. Потенциальная энергия взаимодействия молекул рассчитывалась как сумма электростатического и ван-дер-ваальсового вкладов. На основании расчётов системы ДНК в растворе (нижняя строка в табл. 1) и ДНК в комплексах с DPS при разной концентрации 4-г.р., производился поиск свободной энергии связывания методом линейной энергии взаимодействия:

$$\Delta G_{\text{лин.}} = \beta(\langle U_{DNA-\text{окр.}}^Q \rangle_{\text{белок}} - \langle U_{DNA-\text{окр.}}^Q \rangle_{\text{вода}}) + \alpha(\langle U_{DNA-\text{окр.}}^{LJ} \rangle_{\text{белок}} - \langle U_{DNA-\text{окр.}}^{LJ} \rangle_{\text{вода}}).$$

Здесь $\Delta G_{\text{лин.}}$ – свободная энергия, найденная методом расчёта линейной энергии взаимодействия, индекс DNA-окр. соответствует энергии взаимодействия ДНК с окружением. Верхние индексы Q и LJ обозначают соответствующие члены функции полной потенциальной энергии (потенциалы Кулона и Леннарда-Джонса); $\alpha = 0,18$ и $\beta = 0,33$ – эмпирические постоянные, подбираемые для каждого лиганда отдельно [9]. Нижние индексы «вода» и «белок» соответствуют расчётам ДНК в растворе и в комплексе с белком, соответственно.

Перед нахождением динамических характеристик ДНК и DPS проводился анализ главных компонент [10]. Из общей траектории с помощью утилиты `trjconv` выделялись траектории движения ДНК, каждой из субъединиц белка и отдельно 1-20 и 21-167 аминокислотных остатков каждой из субъединиц. При этом молекула или часть молекулы центрировалась в ячейке, чтобы избежать смещения её части в соседнюю ячейку из-за расчёта при периодических граничных условиях. Далее для уменьшения числа степеней свободы, рассматривались не все атомы белка и ДНК (что затруднено из-за необходимости использования большого объёма оперативной памяти и временных затрат), а С атомы белка и атомы фосфора ДНК. Строилась ковариационная матрица размером $3N \times 3N$, в которой каждый из элементов находился на основании одной из координат (x, y или z) каждого из N рассматриваемых атомов:

$$C_{ij} = \langle M_{ii}^{1/2}(x_i - \langle x_i \rangle) M_{jj}^{1/2}(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle.$$

Здесь M_{ii} – единичная матрица; i, j – одна из атомных координат.

Матрица C диагонализировалась с помощью матрицы ортонормированного преобразования R, с выделением собственных векторов и собственных значений:

$$R^T C R = \text{diag}\{\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N}\},$$

где столбцы матрицы R являются собственными векторами; $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_{3N}$ – собственные значения. Собственное значение λ_i представляет собой среднеквадратичное колебание главного компонента $p_i(t)$.

Траектории проецировались на собственные векторы с получением главных компонент:

$$\mathbf{p}(t) = R^T M^{1/2}(\mathbf{x}(t) - \langle \mathbf{x} \rangle).$$

На рисунке 1 приведены полученные в результате расчётов структуры кластеров ДНК-DPS. Без добавления 4-г.р. (рис. 1, слева) ДНК удерживается у белка с помощью N-концевых участков (показаны зелёным цветом). При малых концентрациях 4-г.р. (показан фиолетовым), молекулы этого соединения равномерно распределяются

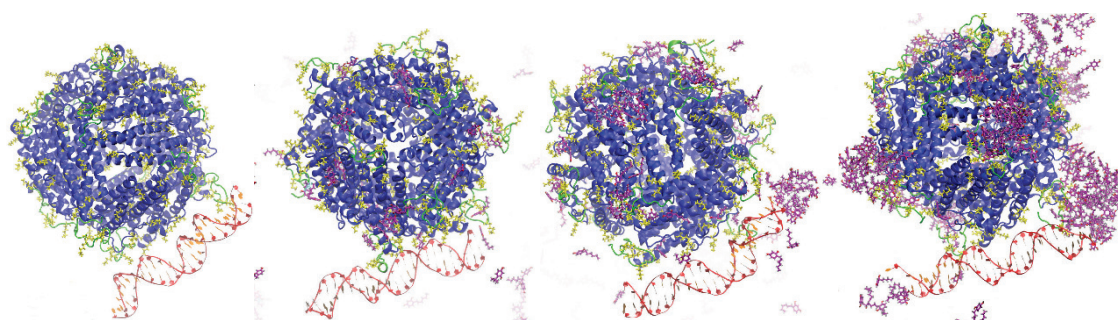


Рисунок 1. Структура комплексов ДНК (25 п.н.) с додекамером DPS *E. coli* без 4-г.р. и при добавлении 50, 100, 500 молекул 4-г.р. (слева направо). Синим показаны молекулы DPS (зелёным выделены подвижные N-концевые участки, жёлтым – остатки лизина); красным – ДНК, фиолетовым – молекулы 4-г.р.

на поверхности белка, связываясь с N-концами и остовом, но практически не затрагивая ДНК. Дальнейшее увеличение концентрации 4-г.р. приводит к образованию мицеллоподобных комплексов 4-г.р., которые адсорбируются на поверхности белка и связывают ДНК.

Для определения участия каждой из субъединиц белка в процессе связывания ДНК были рассчитаны значения потенциальной энергии взаимодействия субъединиц с ДНК и 4-г.р., усреднённые за последние 10 нс траектории. На рисунке 2 показаны графики потенциальной энергии взаимодействия субъединиц (мономеров DPS в составе гомододекамера) с ДНК и 4-г.р. (рис. 2а), а также радиусы гирации субъединиц и их частей (рис. 2б).

На врезке (рис. 2а) находится схема расположения субъединиц с соответствующими порядковыми номерами внутри додекамера DPS. Видно, что без добавления 4-г.р связывание ДНК в разной степени обеспечивается двумя субъединицами (6 и 11 субъединицы на рис. 2а, чёрная кривая). При концентрациях 4-г.р. 50 и 100 ДНК немного смещается относительно додекамера, однако основными центрами связывания также оказываются обе эти субъединицы. Наблюдается обратная корреляция потенциальной энергии связывания и

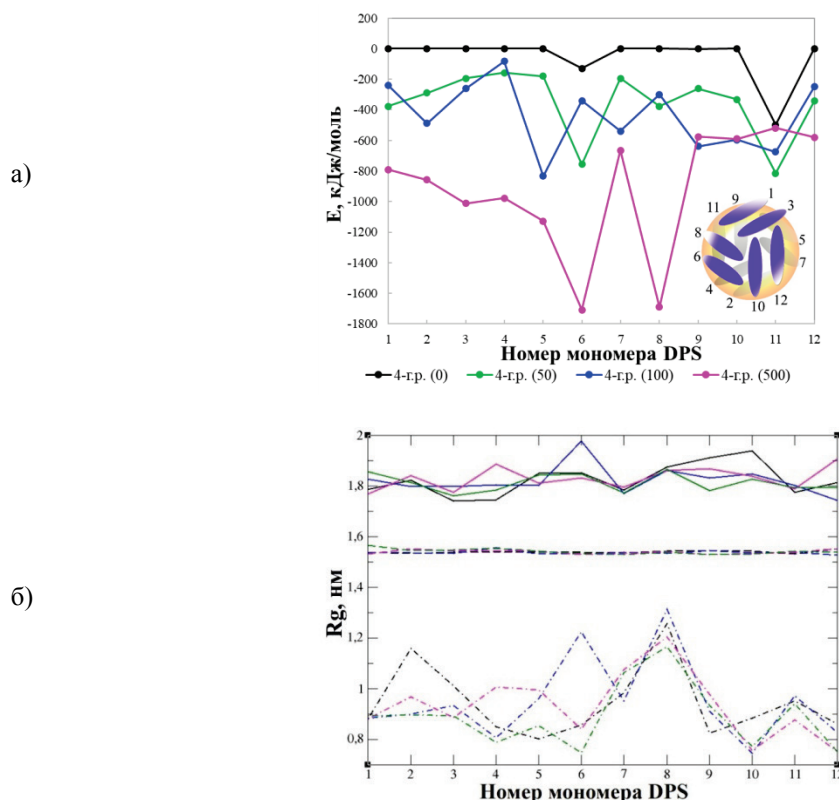


Рисунок 2. а – суммарная потенциальная энергия взаимодействия субъединиц додекамера DPS с ДНК и 4-г.р. На врезке: схематичное изображение гомододекамера DPS, жёлтая окружность соответствует форме молекулы додекамера DPS, синие эллипсы показывают расположение субъединиц, цифрами обозначены порядковые номера субъединиц, используемые на графиках. б – Значения радиусов гирации субъединиц додекамера DPS (сплошные линии), остова (26-167 аминокислотные остатки, штриховые линии) и N-концевых участков (1-25 аминокислотные остатки, штрихпунктирные линии). Приведены усреднённые данные по участку отфильтрованной PCA траектории от 90 до 100 нс для C-атомов. Чёрный цвет соответствует расчёту без 4-г.р., зелёный – добавлено 50 молекул 4-г.р., синий – 100 молекул, фиолетовый – 500 молекул

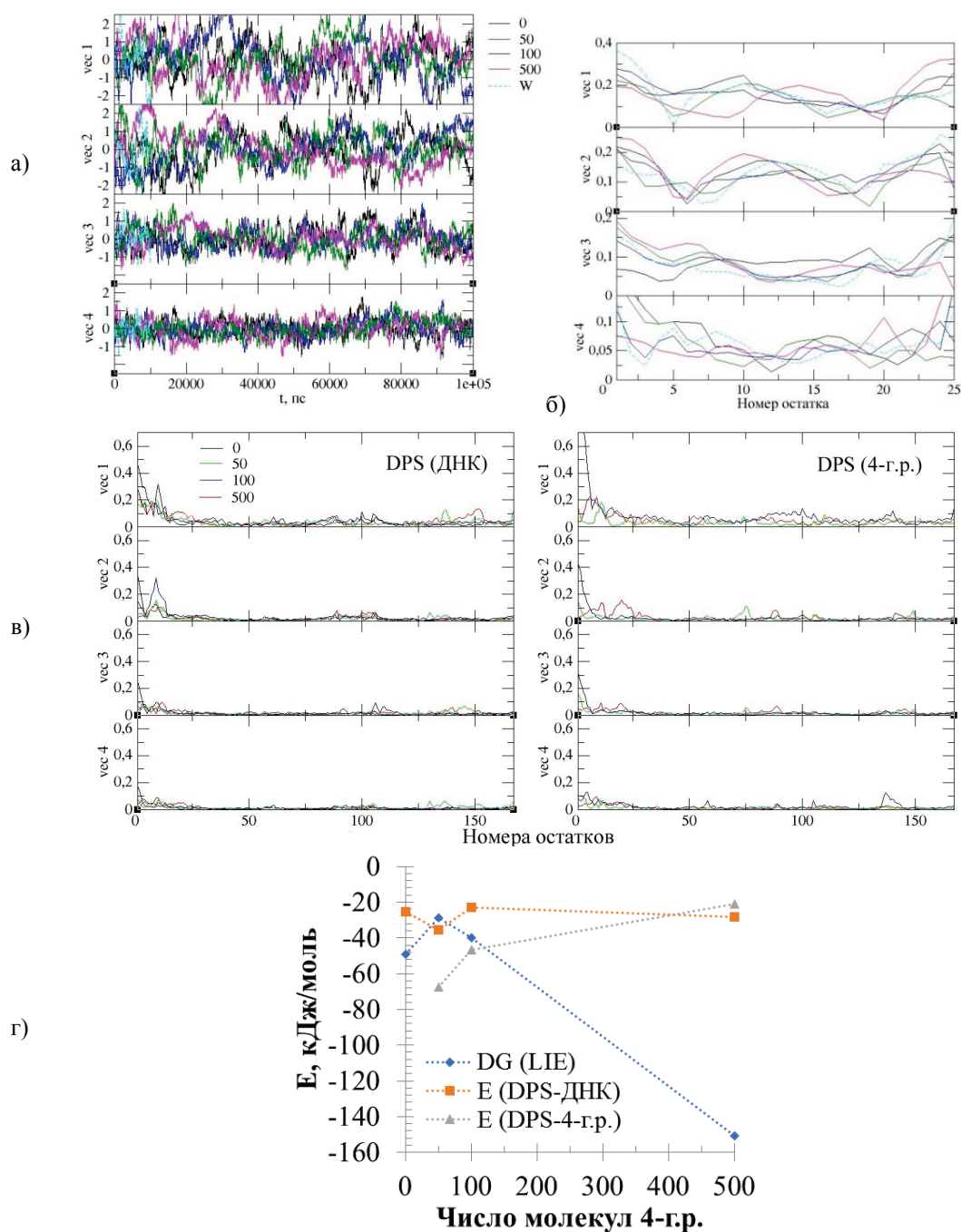


Рисунок 3. а – проекция траекторий движения ДНК на первые четыре собственных вектора (числовые подписи кривых указывают количество молекул 4-г.р. в системе, W – расчёт ДНК в растворе без белка и 4-г.р.); б – среднеквадратичные флуктуации ДНК относительно 1-4 собственных векторов (подписи см. выше); в – среднеквадратичные флуктуации субъединиц DPS относительно 1-4 собственных векторов для субъединиц, связавших ДНК (слева) и с наибольшим количеством адсорбированных молекул 4-г.р. (справа); г – свободная энергия, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия (синие ромбы), потенциальная энергия взаимодействия DPS с ДНК (на одну пару оснований, оранжевые квадраты), потенциальная энергия взаимодействия DPS с 4-г.р. (на одну молекулу 4-г.р., серые треугольники)

радиуса гирации субъединицы. При этом изменение радиуса гирации субъединицы (рис. 2б, сплошные линии) обеспечивается колебаниями N-концевых участков (рис. 2б, штрихпунктирные линии), в то время как остов молекулы сохраняет свою форму (рис. 2б, штриховые линии) вне зависимости от концентрации 4-г.р. Общий радиус гирации остова додекамера DPS остаётся примерно постоянным. Он достигает максимума при малых концентрациях 4-г.р. (50 молекул) за счёт связывания одиночных молекул с поверхностью белка, что увеличивает подвижность N-концов.

Было обнаружено, что за наиболее масштабные коллективные колебания отвечают первые четыре главных компоненты, смещения относительно которых рассматривались при анализе результатов и построении отфильтрованных траекторий движения частей систем. Исследование смещений от времени при проекции

траекторий движения ДНК на собственные вектора (рис. 3а) показывает, что колебания молекулы ДНК не зависят от концентрации 4-г.р. (кривые 0, 50, 100, 500) и практически совпадают с колебаниями свободной ДНК в растворе (кривая W, 0-10000 пс).

Рассмотрение среднеквадратичных флуктуаций остатков молекулы ДНК (рис. 3б) также не показывает существенных различий в динамике ДНК в растворе, у поверхности белка и при добавлении 4-г.р. Наиболее подвижными во всех случаях оказываются концевые и средние участки ДНК. Субъединицы DPS, напротив, испытывают изменение в динамике под влиянием ДНК и 4-г.р. На рисунке 3в (слева) показаны графики среднеквадратичные флуктуации субъединиц для первых четырех собственных векторов. При связывании ДНК подвижность флуктуации остатков снижаются, однако N-концы полностью не теряют своей подвижности. В присутствии 500 молекул 4-г.р., повышается подвижность остова субъединицы в районе Lys148. Связывание 4-г.р. может приводить как к значительному уменьшению флуктуаций N-концевых остатков (кривые 50 и 500), так и существенному возрастанию флуктуаций (кривая 100). При этом заметно, что 4-г.р. оказывает влияние на весь остов молекулы. Флуктуации значительной части остова становятся заметно выше при 100 молекулах 4-г.р. в расчётной ячейке. Потенциальная энергия взаимодействия ДНК-DPS остаётся практически постоянной без 4-г.р. и в его присутствии, однако происходит перераспределение вкладов электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Это приводит к тому, что свободная энергия связывания ДНК, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия (LIE) изменяется от $\Delta G = -49$ кДж/моль при отсутствии 4-г.р., несколько увеличивается (оставаясь отрицательной) и затем снижается до $\Delta G = -150$ кДж/моль при 500 молекулах (рис. 3г). Потенциальная энергия взаимодействия одной молекулы 4-г.р. с DPS максимальна по модулю при наименьшем содержании 4-г.р. в ячейке. Увеличение количества молекул 4-г.р. с 50 до 100 в 1,5 раза уменьшает (по модулю) потенциальную энергию взаимодействия одной молекулы 4-г.р. с белком. Это свидетельствует о том, что молекулы 4-г.р. предпочтительнее образуют мицеллоподобные структуры, а не равномерно распределяют по поверхности DPS.

Таким образом, 4-г.р. с одной стороны способствует образованию комплексов ДНК-DPS, с другой стороны, его высокие концентрации приводят к образованию сверхстабильных комплексов с ДНК. Это может препятствовать последующему освобождению ДНК от белка DPS, невозможности считывания информации ДНК и приводить к гибели клетки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема FFZE-2022-0011, № 122040400089-6 и 122040800164-6). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦЦ РАН), проект СНРП2.

Список литературы / References:

1. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Loiko N.G., Krupyanskii Y.F. Structure of DPS protein complexes with DNA. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 5, pp. 769-777, doi: 10.1134/s199079311905021x.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. *Механизмы выживания бактерий*. М.: Медицина, 2005, 367 с. [Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El-Registan G.I. *Survival mechanisms of bacteria*. M.: Medicine, 2005, 367 p. (In Russ.)]
3. Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G., et al. The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 9, p. e0239147, doi: 10.1371/journal.pone.0239147.
4. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F. Migration of 4-Hexylresorcine Through *Escherichia coli* Cell Membranes. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2021, vol. 15, no. 6, pp. 1026-1035, doi: 10.1134/S1990793121060099.
5. Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф. Миграция орцинола через модельные мембраны *Escherichia coli*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 4, с. 619-622. [Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyansky Yu.F. Migration of orcinol through model membranes of *Escherichia coli*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 619-622. (In Russ.)]
6. Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Каплун А.П., Сорокин В.В., Борзенков И.А., Николаев Ю.А., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. Влияние гексилрезорцина, химического аналога микробных аутоиндукторов анабиоза, на стабильность мембранных структур. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2009, т. 45, № 2, с. 181-187. [Loiko N.G., Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Kaplun A.P., Sorokin V.V., Borzenkov I.A., Nikolaev Yu.A., Kaprelyants A.S., El-Registan G.I. Influence of hexylresorcin, a chemical analogue of microbial auto-inducers of suspended animation, on the stability of membrane structures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 181-187. (In Russ.)]
7. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г., Абдулнасыров Э.Г., Коротина О.А., Степанов С.А., Захарова Н.И., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Рубин А.Б. Влияние химических шаперонов на свойства лизоцима и белка реакционного центра бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 1, с. 13-30. [Krupyansky Yu.F., Knox P.P., Loiko N.G., Abdunasyrov E.G., Korotina O.A., Stepanov S.A., Zakharova N.I., Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I., Rubin A.B. Influence of chemical chaperones on the properties of lysozyme and protein of the reaction center of bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophysics*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 13-30. (In Russ.)]

8. Grant R., Filman D., Finkel S. et al. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 1998, vol. 5, pp. 294-303, doi: 10.1038/nsb0498-294.
9. Aqvist J., Marelus J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Combinatorial chem. & high throughput screening*, 2001, vol. 4, no. 8, pp. 613-626, doi: 10.2174/1386207013330661.
10. Amadei A., Linssen A.B., Berendsen H.J. Essential dynamics of proteins. *Proteins*, 1993, vol. 17, no. 4, pp. 412-425, doi: 10.1002/prot.340170408.

STRUCTURAL PECULIARITIES OF DNA-DPS CLUSTERS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 4-HEXYLRESORCINOL

Tereshkina K.B.¹, Loiko N.G.², Tereshkin E.V.¹, Kovalenko V.V.¹, Generalova A.A.¹, Krupyanskiy Y.F.¹

¹N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
ul. Kosygina, 4, Moscow, 199991, Russia; e-mail: ksenia.tereshkina@chph.ras.ru,

²Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences
60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 2, Moscow, 117312, Russia

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0508

Abstract. The formation of complexes and crystals of bacterial nucleoid DNA inside bacterial cells in response to adverse external influences is of great interest both in biophysics and structural biology, and in various fields of industry. The main role in the condensation and crystallization of DNA in bacteria under stressful conditions (starvation, temperature, oxidative, and other types of stress) is played by DNA-binding proteins DPS. In this work, the dynamic behavior and structure of *Escherichia coli* DPS protein complexes in solution with short-chain DNA (25 base pairs) are studied using classical molecular dynamics in the all-atom approximation with a change in the concentration of the phenolic lipid 4-hexylresorcinol, which is a chemical analog of bacterial anabiosis inducers. The effect of changing the concentration of 4-hexylresorcinol from 0 to 50, 100 and 500 molecules on the DNA-DPS complex is being studied. By searching for the linear interaction energy, data were obtained on the free energies of DNA-protein binding without and in the presence of 4-hexylresorcinol. It has been shown that high concentrations of 4-hexylresorcinol promote the formation of DNA complexes with DPS. To identify the features of the dynamic behavior of DNA and protein, the principal component analysis was carried out. The spatial and energy characteristics of the complexes was obtained.

Key words: DPS, DNA stabilization, 4-hexylresorcinol, *Escherichia coli*, molecular dynamics.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ДИПЕПТИДА КАРНОЗИНА МЕТОДОМ DFT

Демухамедова С.Д.

Институт физических проблем, Бакинский государственный университет
ул. З. Халилова, 23, AZ 1148, г. Баку, Азербайджан; e-mail: svetlanabest@mail.ru
Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0509

Аннотация. В работе квантовохимическим методом в рамках теории функционала электронной плотности DFT с гибридным трехпараметрическим функционалом B3LYP исследовано пространственное и электронное строение природного дипептида карнозина в таутомерной форме N³H его имидазольного кольца в газовой и в водной средах. Для расчета использовался достаточно надежный и экономичный по времени расчет расширенный базисный набор с учетом поляризационных и диффузных функций 6-31+G (d, p). Все вычисления выполнены с использованием пакета прикладных компьютерных программ Gaussian 09. Для визуализации полученных результатов использована программа GaussView 6.0.16. Получены геометрические параметры, значения электронной энергии, энергии HOMO и LUMO орбиталей и энергетический зазор между ними, дескрипторы реакционной способности, значения дипольных моментов, величины парциальных зарядов на атомах и теоретические ИК спектры для газовой и водной сред. Расчеты показывают, что предложенная модель молекулы образует стабильную структуру. Стабилизация полученной структуры обеспечена за счет образования нековалентных взаимодействий в дипептиде. Карты молекулярного электростатического потенциала MEP построены для определения потенциальных сайтов связывания. Для исследования переноса заряда и внутримолекулярных взаимодействий, определяющих стабильность молекулы, был проведен анализ орбиталей естественных связей (NBO). Проанализированы структурные перестройки и изменения различных параметров в зависимости от диэлектрической проницаемости среды.

Ключевые слова: карнозин, структура, дескрипторы реактивности, NBO анализ, ИК спектры.

Природный дипептид карнозин (β -аланил-L-гистидин), его производные-анзерин, гомокарнозин, а также их комплексы с переходными металлами являлись объектами наших исследований на протяжении последних лет. Интерес к этим молекулам связан с широким спектром их функциональной активности, связанный, прежде всего, с антиоксидантными свойствами карнозина и его производных. Было установлено, что карнозин защищает клетки и ткани организма от окисления активными формами кислорода и азота [1,2], что обеспечивают его успешное применение при лечении различных воспалительных процессов, протекающих на фоне повреждения клеточных мембран [1,3-5]. Особенно высокие концентрации карнозина обнаружены в скелетных и сердечной мышцах и мозге [6], в почках, коже и слизистой желудка [7,8], и играет решающую роль для сохранения оптимальной структуры и биологических функций этих органов.

За последнее десятилетие выявлено много новых свойств карнозина, пригодных для терапевтического применения, расширены доказательства его положительной роли в замедлении процессов старения. Карнозин успешно применяется в качестве терапевтического средства для лечения пациентов после острого ишемического инсульта [9], защищает сердечные миоциты от перекисного окисления липидов [10], препятствует образованию нейродегенеративных патологических субстанций, разрушающих мозг при болезнях Паркинсона и Альцгеймера [11-13]. В обзоре [14] сообщается о результатах исследований, касающихся роли карнозина при острой почечной недостаточности. Особенно большое внимание уделяется карнозину, как нетоксичному препарату в борьбе с диабетом, защищает организм от осложнений диабета на почки [15,16], сосуды и сетчатку глаз [17], помогающий предотвратить атеросклероз [18] и стеатоз печени [19]. Благодаря своей способности связывать протоны карнозин противодействует процессу старения организма [20]. В работе [21] обсуждаются возможные механизмы антивозрастной активности карнозина, а в обзоре [22] приводятся некоторые доказательства клинических и фундаментальных исследований использования карнозина в качестве лекарственной терапии для возрастных заболеваний человека. Карнозин успешно применяется для профилактики и лечения старческого слабоумия [23]. Изучая влияние карнозина на теломеры ДНК культивируемых фибробластных клеток легких плода человека [24], в присутствии карнозина наблюдалось снижение скорости укорочения теломер и уменьшение повреждений в них, что говорит о важном вкладе карнозина в эффект продления жизни. В настоящее время имеются сведения об использовании карнозина в терапии онкологических заболеваний и нарушений иммунной системы. Карнозин может снижать гликозилирование, пролиферацию и миграцию клеток [25]. В работе [26] обсуждается возможное применение карнозина в качестве противоопухолевого терапевтического средства для лечения злокачественных опухолей головного мозга таких, как глиобластома. Карнозин ингибирует метастазирование клеток [27-29]. Последние исследования показали, что карнозин ингибирует пролиферацию клеток рака желудка человека [30,31] и может снижать жизнеспособность и пролиферацию клеток колоректального рака человека [32,33]. Карнозин и анзерин за счет усиления метаболизма и функций моноцитов, макрофагов и других клеток иммунной системы могут способствовать иммунологической защите человека от инфекций, вызываемых бактериями, грибами, паразитами

и вирусами, включая коронавирус [34]. Препараты, созданные на основе карнозина и его аналогов являются натуральными, нетоксичными и при длительном применении не накапливаются в тканях. Это подтверждает необходимость дальнейшего исследования карнозина, его аналогов и комплексов на их основе с целью получения новых высокоэффективных натуральных препаратов.

Наша работа посвящена молекулярному моделированию карнозина и его аналогов методами квантовой химии. Молекулярное моделирование является важным инструментом, помогающим понять физико-химические свойства соединений и фундаментальные концепции взаимосвязи структура-активность, имеющие большое значение в современной химии, биохимии, молекулярной биологии, биофизике, медицине и фармакологии. Современные вычислительные методы компьютерного моделирования позволяют решать задачи, недоступные экспериментальным методам исследования и широко используются в исследовании биологических молекул и поиске новых лекарств на их основе. Квантово-химические расчеты являются источником новых молекулярных дескрипторов, которые, в принципе, могут выражать все геометрические и электронные свойства молекул и их взаимодействие. Значимость таких расчетов приобретает все большую популярность в различных областях научных исследований.

В более ранних наших работах нами были изучены пространственные и электронные структуры карнозина в двух таутомерных формах N^1H и N^3H его имидазольного кольца и различных их комплексов с атомами цинка, меди и кобальта [35-40] полуэмпирическим методом квантовой химии PM3 в газовой фазе, используя программный комплекс NucleonChem. В работе [41] изучено конформационное состояние дипептида карнозина в цвиттерионной форме для обоих его таутомерных форм. В литературе есть работы, посвященные исследованию структуры карнозина методами теории функционала плотности [42,43]. В данной работе проведено исследование пространственной и электронной структуры нейтральной молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H , наблюдающаяся у карнозина в чистом виде [44], в газовой фазе и в наиболее естественной для функционирования пептидных молекул водной среде. Все расчеты выполнены квантово-химическим методом теории функционала электронной плотности DFT. В работе использовали трехпараметрический гибридный функционал B3LYP, хорошо зарекомендовавший себя при исследованиях биологических молекул и расширенный базисный набор 6-31+G(d,p) с учетом поляризационных функций для всех атомов и диффузных функций для неводородных атомов. Все вычисления проводились с использованием программы Gaussian 09 [45] и программы визуализатора GaussView 6.0.16 [46].

Молекула карнозина состоит из β -аланильного остатка (N_{13} , C_{21} , C_{11} , C_{10}), пептидной группы $C_{10}O_{16}-N_9H_{23}$, карбоксильной группы $C_6O_{14}O_{15}H_{30}$ и группы имидазольного кольца – пятичленного цикла с двумя атомами азота (N_1 , N_3) и тремя атомами углерода (C_2 , C_4 , C_5). На рисунке 1 представлены оптимизированные структуры молекулы карнозина с таутомерной формой N^3H его имидазольного кольца, полученные для газовой (слева) и водной (справа) сред.

На основе проведенного квантовохимического расчета методом DFT/B3LYP /6-31+G(d,p) получены геометрические, энергетические и электронные параметры молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H в газовой и водной среде. Полученная структура является глобальным минимумом на поверхности потенциальной энергии, что подтверждается отсутствием мнимых частот при решении колебательной задачи.

В таблицах 1 и 2 приведены оптимизированные геометрические параметры – длины связей молекулы (табл. 1), валентные и двугранные углы (табл. 2) и для сравнения экспериментальные данные [47].

Значения длин связей в основном соответствуют стандартным значениям. Все связи $NH=1,01$ Å, связь $OH=0,97$ Å, все связи $CH\sim 1,08$ в кольце и $1,09$ в цепи, кроме связи $C_{12}H_{27}$, которая удлиняется до $1,1$ Å. Водная среда практически не оказывает влияние на значения длин связей, наибольшие изменения $\sim 0,01$ Å. Отклонения с экспериментальными значениями наблюдаются для длин связей основной цепи β -аланина N_9C_{10} , $C_{10}C_{11}$ и $C_{11}C_{12}$. Различия в длинах связей CO в карбоксильной группе, связи C_3N_3 в имидазольном кольце и связи $C_{11}N_{12}$ вблизи аминной группы связаны с цвиттерионной формой карнозина в работе [47].



Рисунок 1. Оптимизированные модели молекулы карнозина N^3H в газовой (слева) и водной (справа) средах

По результатам наших расчетов, молекула находится в вытянутой конформации, почти все торсионные углы основной цепи карнозина $C_6C_7N_9C_{10}$, $C_7N_9C_{10}C_{11}$, $N_9C_{10}C_{11}C_{12}$ и $C_{10}C_{11}C_{12}N_{13}$ близки к транс расположению (табл. 2), что соответствует экспериментальным данным [47]. Однако угол $C_5C_6C_7N_9$ находится в гош-конформации, а угол $C_4C_5C_6C_7 \sim 120^\circ$, благодаря которым имидазольное кольцо выводится из плоскости развернутой конфигурации. Водная среда наибольшее влияние оказывает на уменьшение на 16° торсионного угла $N_9C_{10}C_{11}C_{12}$, приближая его к экспериментальному значению. Двугранные углы $C_6C_7C_8O_{15}$ и $C_6C_7C_8O_{14}$ соответственно уменьшается и увеличивается на 8° , угол $C_{11}C_{12}N_{13}H_{28}$ увеличивается на 5° . Практически все валентные углы полученной конфигурации молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H соответствуют экспериментальным данным [47]. Только валентный угол $C_6C_7N_9$ больше на $3,5^\circ$. Небольшие расхождения с экспериментом в значениях валентных углов карбоксильной группы - угол $C_7C_8O_{15}$ меньше на 5° , а угол $C_7C_8O_{14}$ больше на $6,7^\circ$ связаны с рассмотрением в работе [47] молекулы карнозина в цвиттерионной форме. Остальные изменения в значениях валентных углов не превышают 1° .

Взаимодействие водородов с атомами кислорода и азотов приводят к образованию нековалентных внутримолекулярных взаимодействий несвязанных атомов. В таблице 3 приводятся некоторые взаимодействия, которые можно отнести к слабым водородным связям для исследуемой молекулы.

Таблица 1. Длины связей оптимизированной молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H

Атом	Газовая фаза	Водная среда	Эксп.	Атом	Газовая фаза	Водная среда	Эксп.
N1C2	1,31529	1,32211	1,325	C11C12	1,53036	1,53311	1,490
C2N3	1,36639	1,36062	1,331	C12N13	1,46843	1,47055	1,475
N3C4	1,38228	1,37848	1,377	C2H17	1,08106	1,08073	
C4C5	1,37676	1,37687	1,356	N3H18	1,00907	1,01080	
N1C5	1,38071	1,38453	1,383	C4H19	1,07961	1,07923	
C5C6	1,49893	1,49928	1,487	C6H20	1,09477	1,09508	
C6C7	1,54878	1,55068	1,539	C6H21	1,09770	1,09548	
C7C8	1,53076	1,52969	1,535	C7H22	1,09338	1,09298	
C8O14	1,21199	1,21774	1,250	N9H23	1,00945	1,01085	
C8O15	1,35452	1,34355	1,256	C11H24	1,09854	1,09580	
O15H30	0,97252	0,97398		C11H25	1,09752	1,09719	
C7N9	1,44805	1,43310	1,454	C12H26	1,09278	1,09343	
N9C10	1,36910	1,35860	1,334	C12H27	1,10207	1,10159	
C10C11	1,53424	1,52007	1,499	N13H28	1,01586	1,01731	
C10O16	1,22816	1,23910	1,233	N13H29	1,01711	1,01833	

Таблица 2. Валентные и двугранные углы молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H

	Газ. среда	Водн. среда	Эксп.		Газ. среда	Водн. среда	Эксп.
Валентные углы							
N1C5C6	121,15113	121,66279	121,9	C7N9C10	122,07256	122,29235	123,1
C4C5C6	128,85372	128,49398	128,6	N9C10C11	115,46373	116,21661	115,7
C5C6C7	112,92033	112,81517	114,1	N9C10H16	121,82788	121,52213	122,9
C6C7N9	111,22292	111,02598	107,7	O14C8O15	122,679337	123,14562	124,5
C6C7C8	108,87289	109,32456	110,6	C10C11C12	112,38395	112,35745	113,2
C7C8O14	123,42817	122,85199	116,7	C11C12N13	110,02626	110,10243	111,0
C7C8O15	113,84256	113,96218	118,9	C12N13H28	110,82903	109,82577	
C8O15H30	106,50862	108,26435		C12N13H29	111,31502	110,23477	
N1C2N3	111,52795	111,40724	112,1	C4C5N1	109,99121	109,84159	109,5
C2N3C4	107,14653	107,52459	107,2	C5N1C2	105,88811	105,68071	105,0
N3C4C5	105,44597	105,54572	106,2	C8C7N9	114,07376	113,77119	110,4
				O16C10C11	122,67653	122,24913	121,4
Двугранные углы							
C4C5C6C7	121,77971	118,35026		C7N9C10C11	-178,56532	-176,94908	174,8
C5C6C7C8	171,29295	170,6309		C7N9C10O16	-0,56682	1,81103	
C6C7C8O15	106,88309	98,98073		N9C10C11C12	-150,13323	-133,76480	130,5
C6C7C8O14	-70,60609	-78,77764		C10C11C12N13	-174,40139	-175,60792	-178,7
C5C6C7N9	-62,17990	-63,04052		C11C12N13H28	169,25250	174,70378	
C6C7N9C10	158,89258	161,30787	141,4	C11C12N13H29	-71,65186	-68,69514	

В таблице 4 приводятся полученные нами в результате оптимизации методом DFT/B3LYP/6-31+G(d,p) заряды Малликена на атомах молекулы карнозина в таутомерной форме N³H в газовой и водной средах. Заряды Малликена, как известно, не отражают реальное распределение электрического заряда между атомами и довольно чувствительны к выбору базисного набора. Однако они удобны для качественной оценки распределения зарядов и определения электрофильных и нуклеофильных центров возможных атак.

В газовой фазе у атомов азота самый большой отрицательный заряд наблюдается на атоме азота N₁₃ амина (-0,612 ед.заряда). В имидазольном кольце на атоме аминогруппы N₃ наблюдается более сильный отрицательный заряд (-0,324), на атомах N₁ имидазольного кольца (-0,234) и атоме азота N₉ пептидной связи (-0,245) заряды близки. На атомах кислорода более отрицательным является кислород пептидной группы O₁₆ (-0,486), в карбоксильной группе на атомах O₁₄ (-0,412) и O₁₅ (-0,419) заряды одинаковые. Отрицательные значения зарядов наблюдаются на атомах углерода основной цепи молекулы C₆ (-2,205), C₇ (-0,165), C₁₁ (-0,165) и C₁₂ (-0,292). Самый большой отрицательный заряд на атоме C₆, а самый большой положительный заряд на атоме углерода имидазольного кольца C₅ (0,490), которые соединены валентной связью. Наибольший положительный заряд локализуется на атомах водорода карбоксильной группы H₃₀ (0,382), водороде H₁₈ (0,309) имидазольного кольца, водороде пептидной связи H₂₃ (0,294), и водородах H₂₈ и H₂₉ аминогруппы (0,287 и 0,271 ед. заряда соответственно). Водная среда способствует увеличению электроотрицательности атомов азота и кислорода и уменьшает отрицательный заряд на всех атомах углерода, кроме атомов C₇ и C₆. Больше всего увеличивается отрицательный заряд на атоме азота N₁ имидазольного кольца (на 0,125 ед. заряда) и атоме кислорода O₁₆ пептидной связи (на 0,099 ед. заряда). Водная среда в основном незначительно увеличивает положительный заряд на атомах водорода, наибольшие изменения наблюдаются на атомах H₁₈ (на 0,038 ед. заряда) и H₂₁ и H₂₃ (~0,03 ед. заряда).

В таблице 5 приведены основные энергетические и электронные характеристики молекулы карнозина, полученные в результате проведенного исследования. Это значения полной энергии, дипольного момента молекулы, поляризуемости и энергии пограничных молекулярных орбиталей – HOMO (высшая занятая молекулярная орбиталь) и LUMO (низшая вакантная молекулярная орбиталь). По данным нашего расчета полная электронная энергия для молекулы карнозина в водной среде по сравнению с газовой средой понижается всего на 0,837 эВ.

Анализ граничных молекулярных орбиталей, ввиду их наибольшей доступности соответственно для электрофилов и нуклеофилов, позволяет изучить химические свойства молекул. По знаку энергии нижней вакантной молекулярной орбитали (LUMO) молекулы можно определить к каким реагентам -электрофильным или нуклеофильным она относится. Если энергия LUMO орбитали положительна, то молекула относится к нуклеофилам, если отрицательна – к электрофилам. По результатам нашего расчета молекула карнозина условно

Таблица 3. Нековалентные взаимодействия молекулы карнозина N³H

DH...A		DH	H...A	D...A	∠DHA
C7H22 N1	Газовая фаза	1,09338	2,78643	3,10283	96,29275
	Водная среда	1,09298	2,82098	3,13889	96,51880
C7H22 O16	Газовая фаза	1,09338	2,54635	2,79176	91,17897
	Водная среда	1,09298	2,58229	2,78641	88,99749
C6H20 O14	Газовая фаза	1,09477	2,73046	3,07787	97,87747
	Водная среда	1,09508	2,82346	3,14860	96,89637
C12H26 O16	Газовая фаза	1,09278	2,61716	2,87408	92,17069
	Водная среда	1,09343	2,69097	2,95603	92,93430

Таблица 4. Заряды Малликена на атомах молекулы карнозина N³H

атом	Газовая фаза	Водная фаза	атом	Газовая фаза	Водная фаза
1 N	-0,233600	-0,358658	16 O	-0,486318	-0,585116
2 C	0,336935	0,335240	17 H	0,140038	0,162882
3 N	-0,323742	-0,307931	18 H	0,308639	0,346963
4 C	0,059319	0,075421	19 H	0,143434	0,173401
5 C	0,490062	0,503831	20 H	0,197361	0,187580
6 C	-1,104567	-1,119636	21 H	0,142446	0,175493
7 C	-0,164879	-0,214832	22 H	0,221015	0,197274
8 C	0,312038	0,314951	23 H	0,293865	0,331031
9 N	-0,245424	-0,230483	24 H	0,120529	0,149990
10 C	0,217057	0,245242	25 H	0,189474	0,186588
11 C	-0,119776	-0,085834	26 H	0,169109	0,159610
12 C	-0,292317	-0,229304	27 H	0,132280	0,141792
13 N	-0,611857	-0,673997	28 H	0,286990	0,306772
14 O	-0,412400	-0,472178	29 H	0,271430	0,297682
15 O	-0,419067	-0,421209	30 H	0,381926	0,407434

относится к электрофилам. Энергетический зазор между орбиталями основного (НОМО) и возбужденного (LUMO) состояний дает информацию о стабильности структуры. Чем меньше энергетическая щель, тем более высокой химической и биологической активностью обладает исследуемое соединение. Наши расчеты показывают, что биологическая активность карнозина увеличивается в водной среде, энергетический зазор НОМО-LUMO уменьшается на 0,273 эВ.

Математически из значений энергий пограничных орбиталей можно получить глобальные дескрипторы, дающие всестороннюю химическую информацию о молекулярной структуре, коррелирующую с конкретными свойствами молекул и оказывающуюся полезной при решении различных фармакологических, химических и токсикологических задач. Согласно теореме Купманса [48] первая энергия ионизации равна отрицательному значению НОМО орбитали: $I = -E_{\text{НОМО}}$. А сродство к электрону определяется как отрицательное значение LUMO орбитали: $A = -E_{\text{LUMO}}$. На основе этих величин можно вычислить такие важные индексы для предсказания активности молекулы, как электроотрицательность $\chi = (I+A)/2$, химический потенциал $\mu = -(I+A)/2$, химическая твердость $\eta = (I-A)/2$ и мягкость $S = 1/2\eta$. Индекс электрофильности $\omega = \mu^2/2\eta$ указывает на способность молекулы принимать электроны от реагента, обратная ей величина – индекс нуклеофильности $\nu = 1/\omega$. Важным глобальным дескриптором является максимальный перенос заряда $\Delta N = -\mu/\eta$, который может принять электрофильная система.

Наши расчеты показывают (табл. 5), что в водной среде потенциал ионизации карнозина уменьшается на 0,106 эВ, а сродство к электрону увеличивается на 0,167 эВ. В водной среде химический потенциал становится на 0,030 эВ более отрицательным, энергетическая щель уменьшается на 0,273 эВ, твердость уменьшается на 0,137 эВ, что свидетельствует о увеличении реакционной способности карнозина в водной среде. Уменьшение химического потенциала и твердости говорит об увеличении электрофильных свойств у карнозина в водной среде. Карнозин становится мягче на 0,015 эВ, электроотрицательность и электрофильность увеличиваются на 0,030 эВ и 0,129 эВ соответственно, а следовательно, на 0,030 эВ уменьшается его нуклеофильность. Такие изменения вполне характерны для среды растворителя, в которой увеличивается способность молекул принимать электроны (ΔN для карнозина в водной среде увеличивается на 0,063 эВ). Поляризуемость характеризует деформацию электронной плотности, для карнозина в водной среде она увеличивается на 1173,518 эВ, что свидетельствует об увеличении его химической активности. Дипольный момент – важный параметр, характеризующий электронное поведение молекулы. В водной среде дипольный момент карнозина увеличивается практически на 4 Дебая, что свидетельствует о сильном взаимодействии и готовности к комплексообразованию.

С помощью программ молекулярного моделирования можно получить удобную для анализа наглядную трехмерную визуализацию электронных свойств исследуемых соединений. На рис. 2 показаны НОМО – LUMO орбитали и их разность для молекулы карнозина в таутомерной форме N³H для газовой и водной среды, рассчитанные на том же уровне теории. Можно увидеть те области молекулярных орбиталей, где между ними произошли электронные переходы. Красный цвет на рисунке указывает на присутствие электронов (отрицательный заряд), а зеленый – на отсутствие электронов (положительный заряд). Из рисунка видно, что НОМО карнозина в газовой фазе располагается на связях имидазольного кольца гистидинового фрагмента молекулы карнозина, на аминной группе β -аланинового фрагмента и связи C₁₁-C₁₂, в незначительном количестве на связях C₁₀-C₁₁ и C₆-H₂₀ и атоме азота N₉. При переходе на LUMO орбиталь полностью освобождается аминная группа, электронная плотность сосредоточена над атомами водорода H₁₉, H₁₈ имидазольного кольца и водородом пептидной связи H₂₃. Небольшая электронная плотность локализуется на атомах O₁₅, N₉, N₁₁ и на связи N₁-C₅

Таблица 5. Энергетические и электронные характеристики молекулы карнозина

Параметры	Газовая фаза	Водная среда
Электронная энергия	-21664,325300	-21665,162758
НОМО	-6,649377	-6,543253
LUMO	-0,437287	-0,604365
Энергетическая щель ΔE	6,212090	5,938888
Потенциал ионизации (I)	6,649378	6,543253
Сродство к электрону (A)	0,437287	0,604365
Электроотрицательность (χ)	3,543332	3,573809
Химический потенциал (μ)	-3,543332	-3,573809
Твердость (η)	3,106045	2,969444
Мягкость (S)	0,321953	0,336763
Индекс электрофильности (ω)	2,021092	2,150590
Нуклеофильность (ν)	0,494782	0,464989
Максимальный перенос заряда (ΔN)	1,140786	1,203528
Поляризуемость (α)	3924,134026	5097,652085
Дипольный момент (Debye)	7,577461	11,570292

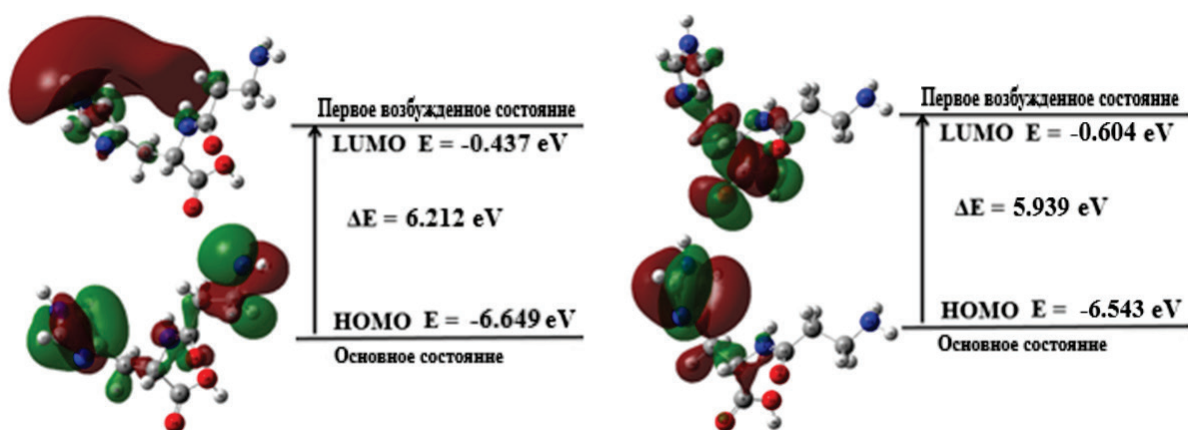


Рисунок 2. НОМО – LUMO орбитали и их разность для молекулы карнозина таутомерной формы NH₃ для газовой фазы (слева) и водной среды (справа)

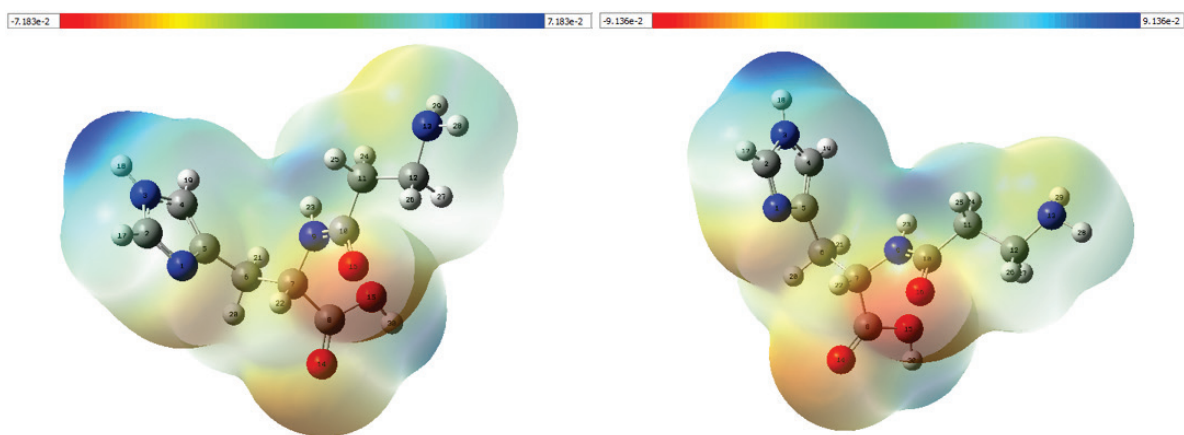


Рисунок 3. МЭР молекулы карнозина таутомерной формы N³H для газовой (слева) и водной (справа) сред

имидазольного кольца, атомы имидазольного кольца N₁, C₂ и C₄ объединены электронной плотностью внутри кольца. В водной среде НОМО в основном локализована на связях имидазольного кольца C₆-C₇ и C₆-H₂₀ и в небольшом количестве на атомах азота и кислорода пептидной и карбоксильной групп O₁₆, N₉, O₁₄ и связи C₇-C₈. β-аланиновый остаток абсолютно свободный. LUMO орбиталь в водной среде почти полностью освобождает имидазольное кольцо и переходит в основном на карбоксильную группу и примыкающие к ней с одной стороны атомы пептидной группы O₁₆, C₁₀, N₉ и с другой стороны связи C₇-C₈, C₇-H₂₂, C₆-H₂₀, C₆-C₅. На имидазольном кольце небольшая электронная плотность наблюдается на атомах N₁, C₂ и C₄.

Наиболее информативным дескриптором считается молекулярный электростатический потенциал (МЭП). Поверхности молекулярного электростатического потенциала (МЭР) визуализируют трехмерное распределение заряда внутри молекулы. Анализ МЭР позволяет предсказать химическую реакционную способность молекулы и определить места присоединения реагентов при комплексобразовании. МЭП представляет собой график зависимости электростатического потенциала, нанесенного на поверхность с постоянной электронной плотностью. Красный и желтый цвета - области с низким потенциалом, характеризуются обилием электронов, подвержены электрофильной атаке. Синий цвет - область с высоким потенциалом, относительным отсутствием электронов, это область нуклеофильной атаки. На рисунке 3 показаны карты МЭП молекулы карнозина в таутомерной форме N³H, рассчитанные методом DFT/B3LYP/6-31G в газовой и водной средах. Они имеют аналогичный вид. Как видим, наиболее активными реактивными центрами карнозина являются атомы кислорода карбоксильной и пептидной групп, также могут быть подвержены электрофильной атаке (желтый цвет) атомы азота N₁ имидазольного кольца и N₁₃ аминной группы. Ярко выраженный синий цвет располагается над атомом водорода H₁₈ имидазольного кольца.

Для подробного изучения внутримолекулярных взаимодействий и получения информации о делокализации электронной плотности и переносе заряда между взаимодействующими атомами, мы используем метод NBO [49]. В анализе орбиталей естественных связей (NBO) исходный базисный набор атомных орбиталей преобразуется в естественные орбитали связи, соответствующие химической картине Льюиса. Для каждого донора NBO (i) и акцептора NBO (j) оценивается энергия, стабилизирующая донорно-акцепторное взаимодействие E(2), связанное с делокализацией электронной плотности между занятыми и незанятыми NBO. Чем больше значение энергии стабилизации E(2), тем интенсивнее взаимодействие между донорами и

акцепторами электронов и тем больше степень сопряжения всей системы. В таблице 6 приведены выбранные взаимодействия доноров и акцепторов (энергия $E(2)$ которых превышает 20 ккал/моль), заселенности их орбиталей электронами ED (в ед.электрона), энергии гиперсопряженных взаимодействий $E(2)$ (в ккал/моль), а также разность энергий (в а.у.) донорной (i) и акцепторной (j) NBO орбиталей $E(j)-E(i)$ и элементы матрицы Фока (в а.у.) между i-й и j-й NBO-орбиталями $F(i,j)$ для молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H в газовой и водной средах.

Как видим, самое сильное взаимодействие связано с делокализацией электронной плотности имидазольного кольца с переносом заряда с разрыхляющей π^* орбитали связи N_1-C_2 на разрыхляющую π^* орбиталь связи C_4-C_5 : $\pi^*_{N_1-C_2} \rightarrow \pi^*_{C_4-C_5}$ с энергией стабилизации 76,65 ккал/моль для газовой и 53,48 ккал/моль для водной среды. Достаточно сильные энергии стабилизации наблюдаются при донорно-акцепторном взаимодействии и переносе заряда с не поделенных пар кислорода и азотов на разрыхляющие π^* и σ^* орбитали ближайших связей (табл. 6)

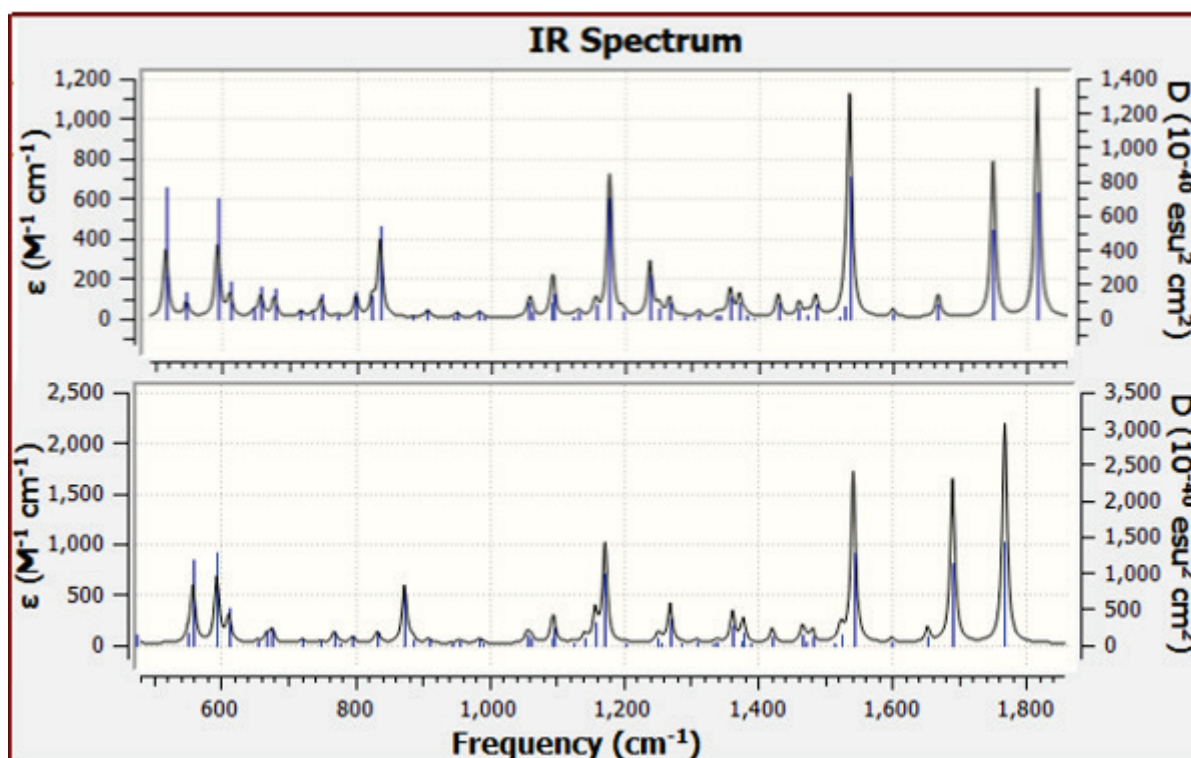


Рисунок 4. Теоретические ИК- спектры нейтральной молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H для газовой (сверху) и водной (снизу) сред, полученные методом DFT/6-31+G(d,p)

Таблица 6. Выбранные энергии возмущения второго порядка матрицы Фока и заселенности молекулы карнозина в водной (первая строчка) и газовой (каждая вторая строчка) средах

Donor (i)	Type	ED (i)	Acceptor (j)	Type	ED (j)	$E(2)$	$E(j)-E(i)$	$F(i,j)$
O 15	n (2)	1.80567	C 8 - O 14	π^*	0,21521	45,83	0,36	0,115
		1.81971			0,20418	44,73	0,36	0,113
O 14	n (2)	1.85802	C 8 - O 15	σ^*	0,09474	32,57	0,63	0,130
		1.84590			0,10228	34,29	0,61	0,130
O16	n (2)	1.88181	N 9 - C 10	σ^*	0,06777	23,66	0,74	0,119
		1.86886			0,07342	25,65	0,71	0,122
N 3	n (1)	1.55822	N 1 - C 2	π^*	0,39189	51,89	0,27	0,106
		1.58356			0,36891	46,62	0,28	0,103
N 3	n (1)	1.55822	C 4 - C 5	π^*	0,31376	31,28	0,30	0,089
		1.58356			0,31606	29,33	0,30	0,086
N 9	n (1)	1.68456	C 10 - O 16	π^*	0,25386	38,45	0,37	0,108
		1.71515			0,24473	42,48	0,34	0,109
N 1 - C 2	π^*	0.39189	C 4 - C 5	π^*	0,31376	53,48	0,03	0,059
		0.36891			0,31606	76,65	0,02	0,061
C 10 - O16	π^*	0.25386	C 10 - O 16	σ^*	0,07692	28,46	0,34	0,217
		0.24473			0,04883	13,97	0,44	0,182
N 1 - C 2	π	1.87365	C 4 - C 5	π^*	0,31376	21,37	0,34	0,079
		1.86702			0,31606	22,33	0,27	0,060

с энергиями стабилизации порядка 50±40 ккал/моль. В газовой фазе по сравнению с водной средой энергия стабилизации неподеленной пары атома азота N₉ с разрыхляющей π* орбиталью связи C₁₀-O₁₆ увеличивается на 4,04 ккал/моль, а неподеленной пары n₍₁₎ азота N₃ с разрыхляющими π* орбиталями связей N₁-C₂ и C₄-C₅ уменьшается соответственно на 5,26 и 1,62 ккал/моль. В водной среде на 14,49 ккал/моль сильнее взаимодействие разрыхляющих π* и σ* орбиталей связи C₁₀-O₁₆: π*_{C10-O16}→σ*_{C10-O16}.

На рисунке 4 приведена область “отпечатков пальцев”, полученная для газовой (сверху) и водной (снизу) сред молекулы карнозина в таутомерной форме N³H. Видим, что водная среда оказывает влияние на сдвиги полос при 1750-1800 см⁻¹ в более низкочастотную область примерно на 40-50 см⁻¹ и полосы 840 см⁻¹ на 30 см⁻¹ в более высокочастотную область спектра.

Полученные в работе результаты, в частности, исследование реакционной способности карнозина, могут быть полезными при моделировании возможных комплексов карнозина с различными реагентами и белками в процессе поиска новых лекарственных препаратов на основе комплексов карнозина.

Список литературы / References:

1. Болдырев А.А. Проблемы и перспективы исследования биологической роли карнозина. *Биохимия*, 2000, т. 65, № 7, с. 884-890. [Boldyrev A.A., Problems and prospects of research of the biological role of carnosine. *Biokhimiya*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 884-890. (In Russ.)]
2. Hipkiss A.R. Chapter 3: Carnosine and Its Possible Roles in Nutrition and Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2009, vol. 57, pp. 87-154, doi: 10.1016/S1043-4526(09)57003-9.
3. Gallant S., Kukley M., Stvolinsky S., Bulygina E., Boldyrev A. Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, pp. 85-99, doi: 10.1620/tjem.191.85.
4. Prokopieva V.D., Yarygina E.G., Bokhan N.A. and Ivanova S.A.: Use of carnosine for oxidative stress reduction in different pathologies. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, no. 29390872016, doi: 10.1155/2016/2939087.
5. Caruso G., Fresta C.G., Musso N. et al. Carnosine prevents Aβ-induced oxidative stress and inflammation in microglial cells: A key role of TGF-β1. *Cells*, 2019, vol. 8, p. 64, doi: 10.3390/cells8010064.
6. Болдырев А.А. *Карнозин*. М.: Изд-во МГУ, 1998, 320 с. [Boldyrev A.A. *Carnosine*. Moscow: Publishing house of the Moscow State University, 1998, 320 p. (In Russ.)]
7. Quinn P.J., Boldyrev A.A., Formazyuk V.E. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med.*, 1992, vol. 13, pp. 379-444, doi: 10.1016/0098-2997(92)90006-1.
8. Bonfanti L., Peretto P., De Marchis S., Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog. Neurobiol.*, 1999, vol. 59, pp. 333-353, doi: 10.1016/S0301-0082(99)00010-6.
9. Jain S., Kim E.S., Kim D., Burrows D., De Felice M., Kim M., Baek S.H., Ali A., Redgrave J., Doeppner T.R. et al. Comparative cerebroprotective potential of d- and l-carnosine following ischemic stroke in mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 9, pp. 3053-3065, doi: 10.3390/ijms21093053.
10. Zhao J., Posa D.K., Kumar V., Hoetker D., Kumar A., Ganesan S., Riggs D.W., Bhatnagar A., Wempe M.F., Baba S.P. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids*, 2019, vol. 51, no. 1, pp. 123-138, doi: 10.1007/s00726-018-2676-6.
11. Zhao J., Shi L., Zhang L.-R. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. *Exp. Ther. Med.*, 2017, vol. 14 no. 1, pp. 664-670, doi: 10.3892/etm.2017.4571.
12. Calon F., Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2007, vol. 77, no. 5-6, pp. 287-293, doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.019.
13. Bermudez M.L., Seroogy K.B., Genter M.B. Evaluation of carnosine intervention in the Thy1-aSyn mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2019, vol. 411, pp. 270-278, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.026.
14. Kilis-Pstrusinska K. Carnosine, carnosinase and kidney diseases. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, vol. 66, pp. 215-221, doi: 10.5604/17322693.991600.
15. Riedl E., Pfister F., Braunagel M., Brinkkötter P., Sternik P., Deinzer M., Bakker S.J., Henning R.H., van den Born J., Krämer B.K., Navis G., Hammes H.P., Yard B., Koeppel H. Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell Physiol Biochem.*, 2011, vol. 28, no. 2, pp. 279-288, doi: 10.1159/000331740.
16. Peters V., Zschocke J., Schmitt C.P. Carnosinase, diabetes mellitus and the potential relevance of carnosinase deficiency. *J Inherit Metab Dis.*, 2018, vol. 41, no. 1, pp. 39-47, doi: 10.1007/s10545-017-0099-2.
17. Pfister F., Riedl E., Wang Q., vom Hagen F., Deinzer M., Harmsen M.C., Molema G., Yard B., Feng Y., Hammes H.P. Oral carnosine supplementation prevents vascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem.*, 2011, vol. 28, no. 1, pp. 125-136, doi: 10.1159/000331721.
18. Rashid I., van Reyk D.M., Davies M.J. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro. *FEBS Lett.*, 2007, vol. 581, no. 5, pp. 1067-1070, doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.082.
19. Mong M.C., Chao C.Y., Yin M.C. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *Eur J Pharmacol.*, 2011, vol. 653, no. 1-3, pp. 82-88, doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.001.
20. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.*, 2013, vol. 93, pp. 1803-1845, doi: 10.1152/physrev.00039.2012.
21. Hipkiss A.R., Baye E., de Courten B. Carnosine and the processes of ageing. *Maturitas*, 2016, vol. 93, pp. 28-33, doi: 10.1016/j.maturitas.2016.06.002.

22. Cararo J.H., Streck E.L., Schuck P.F., da C. Ferreira G. Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders. *Aging and Disease*, 2015, vol. 6, no. 5, pp. 369-379, doi: 10.14336/AD.2015.0616.
23. Kawahara M., Tanaka K.-I., Kato-Negishi M. Zinc, Carnosine, and Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 147-167, doi: 10.3390/nu10020147.
24. Shao L., Li Q., Tan Z. L-Carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, vol. 324, no. 2, pp. 931-936, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.136.
25. Hipkiss A.R. and Gaunitz F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids*, 2014, vol. 46, no. 2, pp. 327-337, doi: 10.1007/s00726-013-1627-5.
26. Gaunitz F., Hipkiss A.R. Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids*, 2012, vol. 43, no. 1, pp. 135-142, doi: 10.1007/s00726-012-1271-5.
27. Chuang C.-H., Hu M.-L. L-Carnosine Inhibits Metastasis of SK-Hep-1 Cells by Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Induction of an Antimetastatic Gene, nm23-H1. *Nutr Cancer*, 2008, vol. 60, no. 4, pp. 526-533, doi: 10.1080/01635580801911787.
28. Hsieh S.-L., Hsieh S., Lai P.-Y., Wang J.-J., Li C.-C., Wu C.-C. Carnosine suppresses human colorectal cell migration and intravasation by regulating EMT and MMP expression. *Am J Chin Med*, 2019, vol. 47, no. 2, pp. 477-494, doi: 10.1142/s0192415x19500241.
29. Wu C.-C., Lai P.-Y., Hsieh S., Cheng C.-C., Hsieh S.-L. Suppression of carnosine on adhesion and extravasation of human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.*, 2019, vol. 39, no. 11, pp. 6135-6144, doi: 10.21873/anticancer.13821.
30. Shen Y., Yang J., Li J., Shi X., Ouyang L., Tian Y., Lu J. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 8, e104632, doi: 10.1371/journal.pone.0104632.
31. Zhang Z., Miao L., Wu X., Liu G., Peng Y., Xin X., Jiao B., Kong X. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric carcinoma cells by retarding Akt/mTOR/p70S6K signaling. *J. Cancer.*, 2014, vol. 5, pp. 382-389, doi: 10.7150/jca.8024.
32. Lee J., Park J.R., Lee H., Jang S., Ryu S.M., Kim H., Kim D., Jang A., Yang S.R. L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- κ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 2018, vol. 54, pp. 505-512, doi: 10.1007/s11626-018-0264-4.
33. Shu-Ling Hsieh, Jia-Huei Li, Cheng-Di Dong, Chiu-Wen Chen, Chih-Chung Wu. Carnosine suppresses human colorectal cancer cell proliferation by inducing necroptosis and autophagy and reducing angiogenesis. *Oncol Lett.*, 2022, vol. 23, no. 2, p. 44, doi: 10.3892/ol.2021.13162.
34. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*, 2020, doi: 10.1007/s00726-020-02823-6.
35. Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Godjajev N.M. Spatial and electronic structure of monomeric and dimeric complexes of carnosine with zinc. *J. Struct. Chem.*, 2010, vol. 51, no. 5, pp. 824-832, doi: 10.1007/s10947-010-0127-7.
36. Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Gajiyev Z.I. Quantum chemistry investigation of the carnosine polymer complex with zinc. *Fizika*, 2010, vol. 16, no. 2, pp. 597-600.
37. Демухамедова С.Д., Алиева И.Н., Гаджиев З.И., Годжаев Н.М. Ab initio исследование структуры и колебательного спектра молекулы карнозина. *Journal of Qafqaz University*, 2009, № 27, с. 15-25. [Demukhamedova S.D., Alieva I.N. Hadjiev Z.I., Godjajev N.M. Ab initio study of the structure and vibrational spectrum of the carnosine molecule. *Journal of Qafqaz University*, 2009, no. 27, pp. 15-25. (In Russ.)]
38. Демухамедова С.Д. Пространственная структура димерных комплексов карнозина с медью. *Journal of Qafqaz University*, 2010, № 29, с. 37-47. [Demukhamedova S.D. Spatial structure of dimeric complexes of carnosine with copper. *Journal of Qafqaz University*, 2010, no. 29, pp. 37-47. (In Russ.)]
39. Демухамедова С.Д., Алиева И.Н., Годжаев Н.М. Квантово-химический анализ заселенностей координационных связей в димерных комплексах карнозина с атомами меди и воды. *Известия НАНА, физика и астрономия*, 2011, № 2, с. 65-77. [Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Godjajev N.M. Quantum-chemical analysis of the populations of coordination bonds in dimeric complexes of carnosine with copper and water atoms. *Transactions of ANAS, physics-astronomy*, 2011, no. 2, pp. 65-77. (In Russ.)]
40. Демухамедова С.Д. Квантовохимическое исследование комплексов двух таутомерных форм карнозина с кобальтом. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 4, с. 505-513. [Demukhamedova S.D. Quantum-chemical study of complexes of two tautomeric forms of carnosine with cobalt. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 505-513. (In Russ.)]
41. Akverdieva G.A., Alieva I.N., Hajiyev Z.I., Demukhamedova S.D. Spatial structure of N¹H and N³H tautomers of carnosine in zwitterion form. *AJP Fizika*, 2021, vol. 27, no. 2, pp. 29-37.
42. Diez R.P., Baran E.J. A density functional study of some physical properties of carnosine (N-b-alanyl-L-histidine). *J Mol Struct (Theochem)*, 2003, vol. 621, pp. 245-251, doi: 10.1016/S0166-1280(02)00587-0.
43. Tyunina E.Y., Mezhevoi I.N., Dunaeva V.V. Thermodynamic properties of crystalline L-carnosine and its aqueous solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2020, vol. 150, 106206, doi: 10.1016/j.jct.2020.
44. Baran E.J. Metal complexes of carnosine. *Biochemistry*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 789-797.
45. Frisch M.J. et al. Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
46. Dennington R., Keith T., Millam J. Gauss View, Version 6.0.16. Shawnee, Kansas: Semichem Inc., Shawnee Mission, 2016.

47. Itoh H., Yamane T., Ashida T. Carnosine (β -Alanyl-L-histidine). *Acta Cryst.*, 1977, vol. B33, pp. 2959-2961, doi: 10.1107/S0567740877009972.
48. Koopmans T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*, 1934, vol.1, no. 1-6, pp. 104-113, doi: 10.1016/s0031-8914(34)90011-2.
49. Weinhold F., Landis C.R. Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective. *Cambridge University Press*, 2005.

THEORETICAL QUANTUM-CHEMICAL SIMULATION OF THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF CARNOSINE DIPEPTIDE BY THE DFT METHOD

Demukhamedova S.D.

Institute for Physical Problems, Baku State University,
Z. Khalilov str., 23, AZ 1148, Baku, Azerbaijan; e-mail: svetlanabest@mail.ru
Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0509

Abstract. The spatial and electronic structure of the natural carnosine dipeptide in the N3H tautomeric form of its imidazole ring in gas and water environment was studied by the quantum-chemical method in the framework of the electron density functional theory (DFT) with the three-parameter B3LYP hybrid functional. The sufficiently reliable and time-saving extended basis set, taking into account the polarization and diffuse functions 6-31+G (d, p) was used for calculations. All calculations were carried out using the Gaussian 09 software package. GaussView 6.0.16 was used to visualize the obtained results. Geometrical parameters, values of electronic energy, energies of HOMO and LUMO orbitals and the energy gap between them, reactivity descriptors, values of dipole moments, partial charges on atoms, and theoretical IR spectra for gaseous and aqueous media are obtained. Calculations show that the proposed model of the molecule forms a stable structure. The resulting structure is stabilized due to non-covalent interactions in the dipeptide. Molecular electrostatic potential maps (MEP) are constructed to identify potential binding sites. To study the charge transfer and intramolecular interactions that determine the stability of the molecule, an analysis of natural bond orbitals (NBOs) was carried out. Structural rearrangements and changes in various parameters depending on the dielectric constant of the medium are analyzed.

Key words: carnosine, structure, reactivity descriptors, NBO analysis, IR spectra.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ POLY(rA) И POLY(rU) И С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ ПОЛИНУКЛЕОТИДОМ POLY(rA)-POLY(rU)

Антонян А.П., Мовсесян З.О., Парсаданян М.А., Вардевнян П.О.

Ереванский государственный университет

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

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0510

Аннотация. Исследовано взаимодействие красителя-интеркалятора метиленового синего (МС) с одноцепочечными (оц-) poly(rA), poly(rU) и двухцепочечным poly(rA)-poly(rU) полинуклеотидами методами абсорбционной спектроскопии, при различных концентрационных соотношениях лиганд/фосфат (концентрация оц-полинуклеотидов по фосфатному остатку). Обнаружено, что в полосе поглощения метиленового синего, в интервале изменения длины волны $500 \leq \lambda \leq 750$ нм спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rA) резко уменьшаются, по сравнению со спектром МС, по мере возрастания концентрации полинуклеотида в растворе. Также обнаружено, что спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) уменьшаются умеренно, при увеличении концентрации этого полинуклеотида в растворе. На спектрах комплексов МС-оц-poly(rU) образуется псевдоизобестическая точка, в то время как на спектрах комплексов МС-оц-poly(rA) такая точка не образуется. Псевдоизобестическая точка образуется и на спектрах комплексов МС-poly(rA)-poly(rU). Также обнаружено, что спектры поглощения комплексов МС с оц-poly(rA) и poly(rA)-poly(rU) сдвигаются в сторону длинных волн на ~5-7 нм, в то время как сдвиг спектров поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) составляет всего ~2 нм. Изменения спектров поглощения комплексов МС с указанными полинуклеотидами, указывают на то, что МС проявляет высокую специфичность к poly(rA), по сравнению с poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). Полученные данные также указывают на то, что МС с poly(rA) и poly(rA)-poly(rU) связывается интеркаляционным и электростатическим, а с оц-poly(rU) – в основном электростатическим механизмами.

Ключевые слова: Метиленовый синий, полуинтеркаляционный механизм, poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU) электростатическое связывание, спектры поглощения.

Сложные структурные формы РНК играют ключевую роль в осуществлении некоторых клеточных процессов: синтез белков, сплайсинг и-РНК, регуляция транскрипции, выживание клетки. РНК имеет структурную гибкость и является важным объектом в области медицинских и химико-биологических исследований [1-3]. Учитывая, что в клетке РНК находится в различных структурных, в том числе, двухцепочечном (дц-) состояниях, весьма важным могут стать исследования по взаимодействию различных лигандов с дц-РНК, в качестве модели которой служит poly(rA)-poly(rU). Тем не менее, poly(rA)-poly(rU), хотя и является хорошей моделью дц-РНК, может перейти в трехцепочечную структуру [1-3]. С другой стороны, особое биологическое значение имеет одноцепочечная (оц-) poly(rA) в функционировании информационной (и-РНК), а также в процессах экспрессии генов [4-7]. С этой точки зрения важными являются и исследования по взаимодействию специфических к нуклеиновым кислотам (НК) лигандов с различными оц-полинуклеотидами. Эти исследования приобретают особую важность и в том аспекте, что практически все и-РНК в эукариотических клетках содержат poly(A) хвосты в 3' концах, которые играют важную роль для созревания и стабилизации и-РНК, а также для инициации трансляции и синтеза альтернативных форм белковых молекул [7,8]. Очевидно, что различные лиганды, проявляющие определенное сродство к этим хвостам, могут ингибировать функционирование и-РНК и нарушать синтез белка в клетке.

Среди таких лигандов широкое прикладное значение приобретает метиленовый синий (МС) – фенотиазиновый катионный ароматический краситель-интеркалятор, который обладает множеством действий на клетку и организм. МС широко используется в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической инактивации РНК-вирусов (ВИЧ, вирус гепатита В и вирус гепатита С) в плазме [9-12]. Однако, наиболее важным можно считать то, что МС проявляет терапевтические свойства к вирусам семейства коронавирусов. Недавние исследования выявили, что МС может также применяться для лечения нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера (AD), из-за его предполагаемого ингибирующего действия на агрегацию тау-белка [13-18].

Исходя из вышеприведенного, целью данной работы явилось выяснение особенностей связывания МС с оц-poly(rA), оц-poly(rU) и с poly(rA)-poly(rU) на основании спектров поглощения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы сверхчистые синтетические полинуклеоты poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), МС (Sigma (США)), бидистиллированная вода, NaCl, Na-цитрат, Na₂EDTA (содержание в рабочих растворах составляла 10⁻⁵ М). Концентрации использованных препаратов определялись спектрофотометрически,

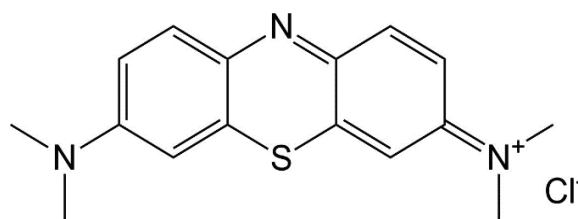


Рисунок 1. Химическая структура метиленового синего

на основании следующих коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{665}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для МС [19], $\epsilon_{257}=10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA), $\epsilon_{260}=9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rU) [20], $\epsilon_{260}=7140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA)-poly(rU). Все эксперименты проводились в 0,5 ssc (1ssc содержит 0,15 М NaCl, 0,015 М Na₃-цитрат), ионная сила – ~0,1 М, pH≈7,0.

Спектры поглощения образцов, спектрофотометрические титрование раствора МС с растворами poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU) были получены с помощью спектрофотометра UV-VIS spectrophotometer Perkin Elmer Lambda 365 (США). Все экспериментальные данные по спектрофотометрическому титрованию, а также спектры поглощения обработаны программой Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 (а-в) приведены спектры поглощения МС и его комплексов с оц- poly(rU)+оц-poly(rA) (а), оц- poly(rA)+оц-poly(rU) (б), poly(rA)-poly(rU) (в). Из рисунка 1 а видно, что спектры поглощения МС при добавлении в раствор оц-poly(rU) начинают уменьшаться, с небольшим батохромным сдвигом (~2 нм). При этом, на спектрах поглощения образуется изобестическая точка (ИТ), которая, однако не является истиной (псевдоизобестическая точка), как в случае БЭ (см. [21]). Отметим, что при спектрофотометрическом титровании растворов МС растворами полинуклеотидов, разбавление составляло не более, чем 5 %, что намного меньше, чем уменьшение интенсивности поглощения. Следовательно, гипохромный и батохромный эффекты являются результатом взаимодействия МС с оц-poly(rU), вследствие чего молекулы МС переходят в связанное состояние с меньшей степенью свободы. Тем не менее, небольшие изменения спектров поглощения комплексов МС-оц-poly(rU), по сравнению со спектром лиганда, указывают на то, что оптические свойства связанных и свободных молекул МС достаточно близки друг другу. Исходя из того, что эти свойства обусловлены хромофорной группой лиганда (рис. 2), мы полагаем, что МС с оц-poly(rU) связывается в основном электростатическим механизмом, в результате чего и центральная, хромофорная часть молекулы, состоящая из группы ароматических колец, находится в несвязанном состоянии.

Необходимо отметить, то спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) схожи с аналогичными спектрами комплексов МС-poly(rA)-poly(rU), на которых также образуется псевдоизобестическая точка [21]. Тем не менее, поскольку основной способ связывания МС с poly(rA)-poly(rU) является полуинтеркаляция, а электростатический механизм – минорным, то мы полагаем, что и с оц-poly(rU) МС может образовать полуинтеркаляционные комплексы, однако они не вносят значительный вклад в изменении спектров поглощения. Этот вывод подтверждается тем, что добавление раствора оц-poly(rA) приводит к резкому уменьшению поглощения образовавшихся комплексов, (рис. 1а, кривые 10-17). При этом, уменьшение поглощения комплексов по мере увеличения концентрации оц-poly(rA) в растворе указывает на предпочтительное связывание МС с этим полинуклеотидом. Этот эффект может быть результатом того, что poly(A) в растворе имеет достаточно упорядоченную структуру с высокой степенью стекинга между соседними азотистыми основаниями (см. [7]), что, в свою очередь, обуславливает встраивание ароматических групп лиганда в пространство между этими основаниями. Этот тип связывания соответствует полуинтеркаляции, которая характеризуется высокой гипохромностью и большим батохромным сдвигом.

На рисунке 2 (б) приведены спектры поглощения МС (кривая 1), его комплексов с оц-poly(rA) (кривые 2-13) и МС+оц-poly(rA)+оц-poly(rU) (кривые 14-18). Из приведенного рисунка видно, что спектры поглощения комплексов резко уменьшены относительно спектра поглощения МС и также сдвинуты в сторону длинных волн. Этот эффект подтверждает вывод о полуинтеркаляционном связывании МС с оц-poly(rA). При этом, на спектрах поглощения изобестическая или псевдоизобестическая точки не образуются, что указывает на то, что молекулы лиганда находятся только в одном спектроскопически описываемом состоянии, а именно связанном. При этом, в этом состоянии молекулы МС имеют иные оптические характеристики, чем в свободном, следовательно, мы полагаем, что именно хромофорная часть молекул лиганда находится во взаимодействии с мономерными звеньями полинуклеотида. Наиболее выгодным является гидрофобное перемещение этих групп из полярной водной среды в намного менее полярную среду, а именно, в пространство между соседними адениловыми остатками оц-poly(rA). При этом, однако, нельзя исключить электростатическое взаимодействие положительно заряженных молекул МС с отрицательными фосфатными группами полинуклеотида. Однако, вклад этого способа связывания в поглощении образовавшихся комплексов незначительный. На основании полученных данных мы заключаем, что преобладающим способом связывания МС с оц-poly(rA) является полуинтеркаляция,

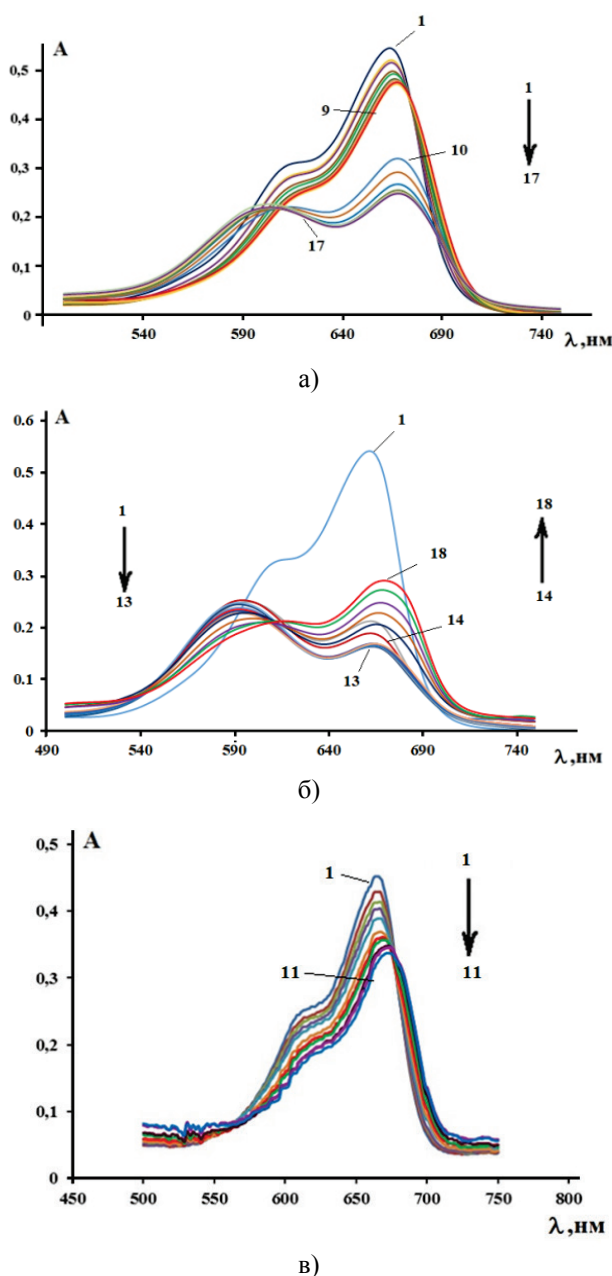


Рисунок 2. Спектры поглощения МС (кривые 1) и его комплексов с оц- poly(rU)+оц-poly(rA) (а), оц-poly(rA)+оц-poly(rU) (б), poly(rA)-poly(rU) (в) (спектры комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) получены в [21]). Концентрационное соотношение – г-лиганд/фосфат =1/20)

с оц-poly(rU) – электростатический механизм. Другое важное заключение то, что МС проявляет ярко выраженное сродство к оц-poly(rA).

Из рисунка 2 в видно, что спектры поглощения комплексов МС с poly(rA)-poly(rU) монотонно уменьшаются, по мере увеличения концентрации дц-полинуклеотида и сдвигаются в сторону более длинных волн на 5-6 нм. При этом, как уже было отмечено, на этих спектрах образуется псевдоизобестическая точка. Этот факт указывает на то, что молекулы МС в растворе находятся в спектроскопически близких, но различающихся двух состояниях – свободном и связанном. МС является интеркалятором, однако при ионных силах раствора $\geq 0,02$ М с дц-НК связывается полуинтеркаляционным способом (см. [22]). Очевидно, что и с poly(rA)-poly(rU) этот лиганд образует полуинтеркаляционные комплексы, при этом, являясь катионным лигандом, связывается с дц-полинуклеотидом электростатически. Проявление обоих способов и обуславливает характер изменений спектров поглощения этих комплексов. Отметим, что спектры поглощения комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) по форме различаются от аналогичных спектров комплексов МС-оц-poly(rA) и имеют некоторую схожесть со спектрами комплексов МС-оц-poly(rU). По всей вероятности, это обусловлено структурными особенностями указанных гомополинуклеотидов.

Таким образом, полученные данные выявляют, что МС, являясь интеркалятором, проявляет ярко выраженное сродство к оц-poly(rA) и достаточно низкое сродство к оц-poly(rU). При этом, с полиадениловой кислотой этот лиганд связывается полуинтеркаляционным способом, с полиуридиловой – электростатическим.

С этой точки зрения мы полагаем, что с poly(rA)-poly(rU) МС связывается как полуинтеркаляционным, так и электростатическим механизмами одновременно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке РА в рамках научного проекта № 21Т-1F063.

Список литературы / References:

1. Kankia B.I. Mn^{2+} -induced triplex formation of an equimolar mixture of poly(rA) and poly(rU). *Nucl. Acids Res.*, 2003, vol. 31, no. 17, doi: 10.1093/nar/gkg698.
2. Andrushchenko V., Blagoi Yu., van de Sande J.H., Wieser H. Poly(rA)•Poly(rU) with Ni^{2+} Ions at Different Temperatures: Infrared Absorption and Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2002, vol. 19, no. 5, doi: 10.1080/07391102.2002.10506792.
3. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A. Study of the influence of the ionic strength on complex-formation of ethidium bromide with poly(rA)-poly(rU). *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2020, vol. 38, no. 8, doi: 10.1080/07391102.2019.1630006.
4. Dower K., Kuperwasser N., Merrikk H., Rosbash M. A synthetic A tail rescues yeast nuclear accumulation of a ribozyme-terminated transcript. *RNA*, 2004, vol. 10, doi: 10.1261/rna.7166704.
5. Svitkin Y.V., Sonenberg N. An efficient system for cap- and poly(A)- dependent translation in vitro. *Meth. Mol. Biol.*, 2004, vol. 257, doi: 10.1385/1-59259-750-5:155.
6. Alvarez E., Castello A., Menendez-Arias L., Carrasco L. HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J.*, 2006, vol. 396, doi: 10.1042/BJ20060108.
7. Pradhan A.B., Haque L., Das S. Binding of Phenazinium Dye Safranin T to Polyriboadenylic Acid: Spectroscopic and Thermodynamic Study. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 2, doi: 10.1371/journal.pone.0087992.
8. Tian B., Hu J., Zhang H., Lutz C.S. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, 201–212. DOI: 10.1093/nar/gki158
9. Bojadzic D., Alcazar O., Buchwald P. Methylene Blue Inhibits the SARS-CoV-2 Spike–ACE2 Protein-Protein Interaction—a Mechanism that can Contribute to its Antiviral Activity Against COVID-19. *Front. Pharmacol.*, 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.600372.
10. Bistas E., Sanghavi D. *Methylene blue*. (Treasure Island, FL: StatPearls), 2020.
11. Dicko A., Roh M.E., Diawara H., Mahamar A., Soumare H.M., Lanke K. et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of Plasmodium falciparum transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 6, doi: 10.1016/s1473-3099(18)30044-6.
12. Cagno V., Medaglia C., Cerny A., Cerny T., Tapparel C., Cerny E. Methylene blue has a potent antiviral activity against SARS-CoV-2 in the absence of UV-activation in vitro, 2020.
13. Gendrot M., Andreani J., Duflo I., Boxberger M., Bideau M.L., Mosnier J., Jardot P., Fonta I., Rolland C., Bogreau H., Hutter S., La Scola B., Pradines B. Methylene blue inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2020, vol. 56, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106202.
14. Vardhana S.A., Wolchok J.D. The many faces of the anti-COVID immune response. *J. Exp. Med.*, 2020, vol. 217, no. 6, doi: 10.1084/jem.20200678.
15. Di Cosimo S., Malfettone A., Perez-Garcia J.M., Llombart-Cussac A., Miceli R., Curigliano G., Cortes J. Immune checkpoint inhibitors: a physiologydriven approach to the treatment of coronavirus disease 2019. *Eur. J. Canc.*, 2020, vol. 135, doi: 10.1016/j.ejca.2020.05.026.
16. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation.*, 2020, vol. 142, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.
17. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘cytokine storm’ in COVID-19. *J. Infect.*, 2020, vol. 80, no. 6, doi: 10.1016/j.jinf. 2020.03.037.
18. Acharya V.V., Chaudhuri (Chattopadhyay) P. Modalities of Protein Denaturation and Nature of Denaturants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2021, vol. 69, no. 2, doi: 10.47583/ijpsrr.2021.v69i02.002.
19. Nedu M.-E., Tertis M., Cristea C., Georgescu A.V. Comparative Study Regarding the Properties of Methylene Blue and Proflavine and Their Optimal Concentrations for In Vitro and In Vivo Applications. *Diagnostics*, 2020, vol. 10, doi: 10.3390/diagnostics10040223.
20. Sani N.D.Md., Ariffin E.Y., Sheryn W., Shamsuddin M.A., Heng L.Y., Latip J., Hasbullah S.A., Hassan N.I. An Electrochemical DNA Biosensor for Carcinogenicity of Anticancer Compounds Based on Competition between Methylene Blue and Oligonucleotides. *Sensors*, 2019, vol. 19, doi: 10.3390/s19235111.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2018, vol. 36, no. 14, doi: 10.1080/07391102.2017.1402708.
22. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. Joint interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, 2016, vol. 34, no. 7, doi: 10.1080/07391 102.2015.1079557.

INTERACTION OF METHYLENE BLUE WITH SINGLE-STRANDED POLYNUCLEOTIDES POLY(rA) AND POLY(rU) AND WITH DOUBLE STRANDED POLYNUCLEOTIDE POLY(rA)-POLY(rU)**Antonyan A.P., Movsesyan Z.O., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O.**

Yerevan State University

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

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0510

Abstract. Interaction of dye-intercalator methylene blue (MB) with single-stranded (ss-) polynucleotides poly(rA), poly(rU) and double-stranded poly(rA)-poly(rU) has been studied by the method of absorption spectroscopy at various concentration ratios ligand/phosphate (concentration of ss-polynucleotides by phosphate residue). It was revealed that in the absorption layer of methylene blue, in the wavelength change interval $500 \leq \lambda \leq 750$ nm, the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rA) decrease more sharply, as compared to MB spectrum, along with polynucleotide concentration enhancement in the solution. It was also revealed that the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) decrease moderately at the increase of this polynucleotide concentration in the solution. In the spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) a pseudo-isosbestic point is formed, while in the spectra of the complexes MB-ss-poly(rA) there is no such point. The pseudo-isosbestic point is formed also in the spectra of the complexes MB-poly(rA)-poly(rU). It was also revealed that the absorption spectra of the complexes of MB with ss-poly(rA) and poly(rA)-poly(rU) are shifted to the longer wavelengths by ~5-7 nm, while the shift in the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) composes almost ~2 nm. The absorption spectra changes of the complexes of MB with the mentioned polynucleotides indicate that MB shows higher specificity to poly(rA), as compared to poly(rU) and poly(rA)-poly(rU). The obtained data also indicate that MB binds to poly(rA) and poly(rA)-poly(rU) by intercalation and electrostatic modes, and with ss-poly(rU) – mainly by electrostatic mechanism.

Key words: *Methylene blue, semi-intercalation mechanism, poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), electrostatic binding, absorption spectra.*

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ НОЕCHST 33258 С БСА

Антонян А.П., Карапетян А.Г., Петросян Н.Г., Варdevanyan П.О.

Ереванский государственный университет

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

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0511

Аннотация. Проведено исследование по взаимодействию ДНК-специфического соединения Hoechst 33258 с бычьим сывороточным альбумином крови (БСА) методами абсорбционной, дифференциальной и флуоресцентной спектроскопий. На основании спектров поглощения и флуоресценции комплексов этого лиганда с БСА, в широком интервале изменения γ (γ =лиганд/альбумин), построены кривые зависимости относительных изменений максимумов поглощения (A/A_0) и флуоресценции (F/F_0) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы. В результате образования комплексов кривая зависимости A/A_0 монотонно уменьшается с увеличением концентрации протеина. Выявлено, что кривая зависимости F/F_0 не прямолинейная и состоит из двух участков: при низких концентрациях белка эта кривая линейно уменьшается, и проходя через точку минимума, при относительно больших концентрациях белка начинает линейно расти. Выявлено, что дифференциальные спектры комплексов Н33258-БСА характеризуются гипо- или гиперхромным эффектами и гипсохромным сдвигом: при низких концентрациях белка имеет место гипсохромный эффект, при более высоких концентрациях белка (начиная с определенных соотношений лиганд/альбумин $\sim 1:1$), дифференциальные спектры претерпевают гипсохромный сдвиг с гиперхромным эффектом. Полученные данные выявляют, что Hoechst 33258, являясь ДНК-специфическим лигандом, прочно связывается с альбумином.

Ключевые слова: Hoechst 33258, бычий сывороточный альбумин, комплексообразование, спектры, спектроскопические методы.

Транспортировка биологически активных веществ в организме к мишеням в настоящее время является одной из актуальных задач молекулярной биофизики. С этой точки зрения, исследование процессов с участием альбуминов сывороточной крови приобретает не только их фундаментальное, но и прикладное значение, связанное с необходимостью определения факторов, влияющих на структуру и функции белков и на биологическую активность как макромолекул, так и лигандов [1-7].

Среди ДНК-специфических лигандов большой интерес представляют вещества семейства Hoechst (в числе которых, Hoechst 33258 (рис. 1)). Эти вещества широко используются в качестве *in vivo* флуоресцентных красителей ДНК, связываются в малом желобке ДНК в АТ-богатых участках, при этом, интенсивность флуоресценции резко возрастает [8-13].

Hoechst 33258 (Н33258) является потенциально противоопухолевым лекарственным препаратом, применяется в качестве радиопротектора [8-13].

Целью данной работы явилось исследование особенностей связывания Н33258 с БСА спектроскопическими методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), Hoechst 33258 (Н33258) ("Sigma", USA), физиологический раствор, бидистиллированная вода. Концентрации белка и Hoechst 33258 определялись спектрофотометрически, с использованием следующих коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{280}=43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для БСА, $\epsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для Н33258.

Спектры флуоресценции Н33258 и его комплексов с альбумином и ДНК получены на спектрофлуориметре F96Pro Fluorescence Spectrophotometer (КНР). Возбуждение растворов комплексов проводилось при 343нм, спектры флуоресценции регистрировались в интервале $350 \leq \lambda \leq 700$ нм. Спектры поглощения и дифференциальные спектры Н33258, БСА и Н33258-БСА комплексов получены с помощью спектрофотометра Perkin Elmer UV-VIS Lambda 365 (США), в интервале изменения длины волны 300-400 нм. Максимум поглощения Н33258 соответствовал длине волны 343 нм. Для получения дифференциальных спектров поглощения растворы Н33258-БСА комплексов были измерены против растворов Н33258 и БСА, при

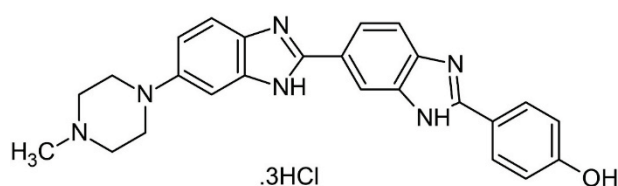


Рисунок 1. Химическая структура Hoechst 33258

одинаковых концентрациях указанных лигандов в обоих растворах. Во всех экспериментальных измерениях приведено концентрационное соотношение γ , где γ - лиганд/белок соотношение, которое изменялось в интервале $0 \leq \gamma \leq 5,0$.

Данные спектроскопических титрований, все спектры и полученные на их основании кривые зависимостей обработаны программой Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по взаимодействию Н33258 с БСА проводились методами абсорбционной, дифференциальной и флуоресцентной спектроскопии. При спектроскопических исследованиях растворы лиганда с постоянной концентрацией титровались раствором альбумина и на основании соответствующих спектров (которые не приведены) получены их относительные изменения в зависимости от концентрации белка. На рисунке 2 приведена кривая зависимости относительного изменения максимумов поглощения (A/A_0) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы. Эта кривая уменьшается с увеличением концентрации протеина, что указывает на то, что лиганд связывается с альбумином и, по мере возрастания концентрации последнего, все больше молекул Н33258 переходят в связанное состояние. В результате этого концентрация свободных молекул лиганда в растворе уменьшается, что и приводит к уменьшению поглощения лиганда. Отметим, что при титровании учтено разбавление, влияние которого незначительное и им можно пренебречь.

Получены также дифференциальные спектры поглощения комплексов Н33258-БСА (спектры не приводятся), однако на их основании нельзя построить их относительное изменение в силу того, что dA_0 имеет нулевое значение. Поэтому на рисунке 2 приведены кривые зависимости максимумов дифференциальных спектров от концентрации белка. Необходимо отметить, что на дифференциальных спектрах поглощения комплексов Н33258-БСА образуются отрицательная полоса в интервале изменения длины волны $350 \leq \lambda \leq 450$ нм, и положительная полоса в интервале $300 \leq \lambda \leq 350$ нм. При этом, отрицательная полоса характеризуется гипо-, гиперхромным эффектом. Фактически, дифференциальные спектры комплексов характеризуются тем, что помимо гипо- или гиперхромного эффекта, также претерпевают гипсохромный сдвиг: при низких концентрациях белка имеет место гипохромный эффект, а при более высоких концентрациях белка (начиная с определенных соотношений лиганд/альбумин $\sim 1:1$), дифференциальные спектры претерпевают гипсохромный сдвиг с гиперхромным эффектом [14]. Дифференциальные спектры по сути являются не абсолютным, а относительным поглощением лиганда, поэтому, кривые зависимости их отрицательных и положительных пиков от концентрации, полученные в работе [14], приводятся для наглядности на рис. 3. Из приведенного рисунка видно, что кривая 1, соответствующая положительным пикам (коротковолновые пики в результате гиперхромного эффекта на дифференциальных кривых), возрастает с увеличением концентрации альбумина. Кривая 2 (соответствует отрицательным пикам на дифференциальных спектрах) уменьшается [14]. На основании указанных особенностей изменений дифференциальных спектров мы полагаем, что Н33258 с альбумином связывается по крайней мере двумя способами: изменения при относительно длинных волнах являются результатом образования водородных связей с аминокислотными остатками α -спиралей белка, что приводит к уменьшению параллельных диполь-дипольных взаимодействий между пептидными группами. Второй способ соответствует гидрофобному взаимодействию, поэтому и имеет место гипсохромный сдвиг (результат изменения полярности микроокружения молекул лиганда), и гиперхромный эффект. Этот факт подтверждается на основании флуоресцентных исследований [15]. На флуоресцентных спектрах комплексов Н33258-БСА также наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции при длине волны свечения лиганда (около 500 нм), при низких концентрациях белка, и гипсохромный сдвиг с увеличением интенсивности флуоресценции при более коротких длинах волн (около 470 нм).

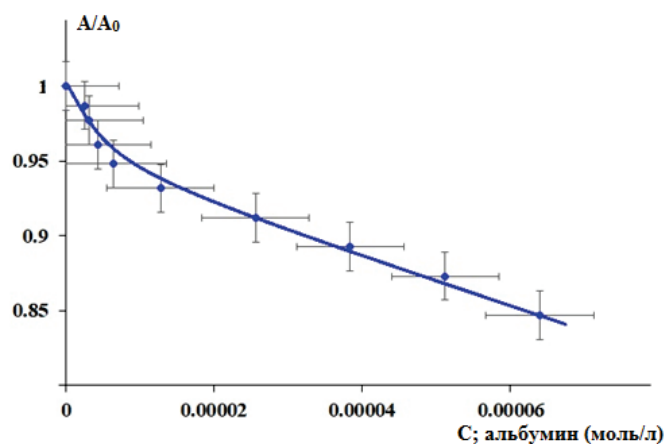


Рисунок 2. Кривая зависимости относительного изменения максимумов поглощения (A/A_0) комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы

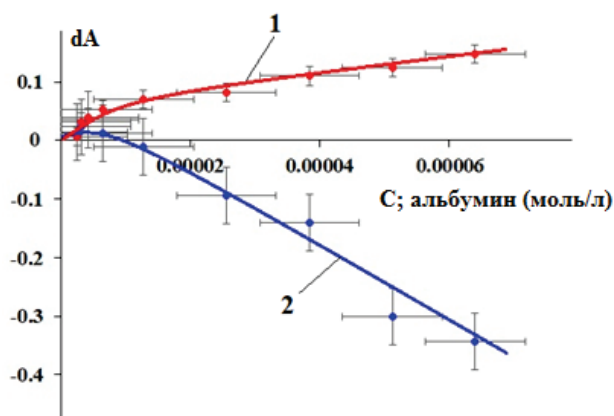


Рисунок 3. Кривая зависимости максимумов дифференциальных спектров комплексов Н33258-БСА от концентрации белка [13]

На основании максимумов спектров флуоресценции комплексов Н33258-БСА построена кривая зависимости F/F_0 от концентрации белка, которая приведена на рисунке 4. Как видно из рисунка, эта кривая не прямолинейная и состоит из двух участков: при низких концентрациях белка эта кривая фактически линейно уменьшается, а при относительно больших концентрациях белка начинает линейно расти. Примечательно, что минимум на этой кривой соответствует концентрационному соотношению белок/лиганд ≈ 1 .

Эти особенности указывают на то, что флуоресценция Н33258 при комплексообразовании с альбумином тушится молекулами белка по мере увеличения концентрации биомолекулы вплоть до соотношения 1:1. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации альбумина – $1,0 < \text{белок/лиганд} \leq 5,0$, спектры флуоресценции сдвигаются в коротковолновую область и возрастают в максимумах. Этот эффект указывает на то, что при взаимодействии с Н33258 конформация альбумина претерпевает определенные изменения: по всей вероятности, уже при достаточно низких концентрациях Н33258 вызывает конформационные перестройки в пространственной структуре белка таким образом, что для его молекул доступными становятся более гидрофобные участки протеина. Очевидно, что этот эффект может иметь место вследствие потери α -спиральности белка в результате чего его гидрофобные участки могут вступать в нежелательные контакты с водой, поэтому, за счет связывания с Н33258 эти участки могут эффективно экранироваться от воды [16]. В свою очередь, гидрофобные бензимидазольные группы также могут экранироваться от воды, что и приводит к увеличению флуоресценции.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что этот лиганд образует прочные комплексы с сывороточным альбумином. Примечательно, что этот лиганд образует комплексы с альбумином посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий, которые выявляются с помощью методов дифференциальной и флуоресцентной спектроскопии. В результате образования водородных связей между молекулами Н33258 и аминокислотными остатками α -спиралей белка происходит частичное разворачивание его структуры [13], а в результате гидрофобных взаимодействий имеет место возрастание интенсивности флуоресценции Н33258-альбумин комплексов. Одновременное проявление этих взаимодействий приводит к разрушению структуры белка и к потере стабильности третичной структуры [14].

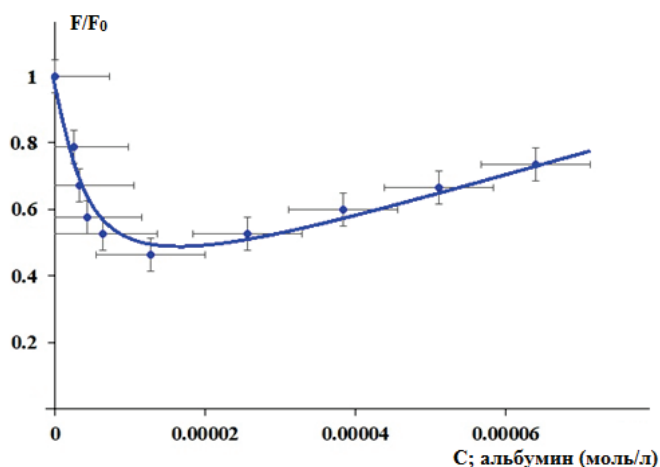


Рисунок 4. Кривая зависимости F/F_0 комплексов Н33258-БСА от концентрации макромолекулы

Полученные данные выявляют, что сывороточный альбумин может связывать и ДНК-специфические лиганды, что может иметь важное значение для переноса или аккумуляции этих веществ. Эти данные также важны для понимания молекулярных основ биологического действия различных соединений на организм и могут лечь в основу скрининга и дизайна для более эффективных лекарственных препаратов.

Список литературы / References:

1. Suryawanshi V.D., Walekar L.S., Gore A.H., Anbhule P.V., Kolekar G.B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, vol. 6, no. 1, doi: 10.1016/j.jpba.2015.07.001.
2. Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J., Shaikh S.M.T., Jadegoud Y., Ijare O.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, vol. 41, doi: 10.1016/j.jpba.2005.11.037.
3. Zhu X., Sun J., Hu Y. Determination of protein by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 596, doi: 10.1016/j.aca.2007.06.008.
4. Suryawanshi V.D., Anbhule P.V., Gore A.H., Patil S., Kolekar G. Spectroscopic Investigation on the Interaction of Pyrimidine Derivative, 2-Amino-6-hydroxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-pyrimidine-5-carbonitrile with Human Serum Albumin: Mechanistic and Conformational Study. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2012, vol. 51, doi: 10.1021/ie202005c.
5. He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, doi: 10.1038/358209a0.
6. Mote U.S., Bhattar S.L., Patil S.R., Kolekar G.B. Interaction between felodipine and bovine serum albumin: Fluorescence quenching study. *Luminescence*, 2010, vol. 25, doi: 10.1002/bio.1130.
7. Wang Y.Q., Zhang H.M., Zhang G.C., Tao W.H., Fei Z.H., Liu Z.T. Spectroscopic studies on the interaction between silicotungstic acid and bovine serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, vol. 43, doi: 10.1016/j.jpba.2007.01.001.
8. Anbazhagan V., Renganathan R. Study on the binding of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J. Lumin.*, 2008, vol. 128, doi: 10.1016/j.jlumin.2008.02.004.
9. Holmgaard List N., Knoops J., Rubio-Magnieto J., Ide J., Beljonne D., Norman P., Surin M., Linares M. Origin of DNA-induced circular dichroism in a minor-groove binder. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, vol. 139, doi: 10.1021/jacs.7b05994.
10. Bucevicius J., Lukinavicius G., Gerasimaite R. The use of Hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors*, 2018, vol. 6, no. 18, doi: 10.3390/chemosensors6020018.
11. Zhang X.X., Brantley Sh.L., Corcelli S.A., Tokmakoff A. DNA minor-groove binder Hoechst 33258 destabilizes base-pairing adjacent to its binding site. *Comm. Biol.*, 2020, vol. 3, doi: 10.1038/s42003-020-01241-4.
12. Angelbello A.J., Chen J.L., Childs-Disney J.L., Zhang P., Wang Z.F., Disney M.D. Using genome sequence to enable the design of medicines and chemical probes. *Chem. Rev.*, 2018, vol. 118, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00504.
13. Ojha H., Murari Bh.M., Anand Sn., Hassan M.I., Ahmad F., Chaudhury N.K. Interaction of DNA Minor Groove Binder Hoechst 33258 with Bovine Serum Albumin. *Chem. Pharm. Bull.*, 2009, vol. 57, no. 5, doi: 10.1248/cpb.57.481.
14. Антонян А.П., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Сравнительное исследование спектральных характеристик комплексов Hoechst 33258 и МС с БСА. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2021, т. 88, № 6. [Antonyan A.P., Petrosyan N.R., Vardevanyan P.O. Comparative study of spectral characteristics of Hoechst 33258 and MS complexes with BSA. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2021, vol. 88, no. 6, doi: 10.47612/0514-7506-2021-88-6-942-947. (In Russ.)]
15. Антонян А.П., Парсаданян М.А., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Флуоресцентные характеристики комплексов Hoechst 33258 с сывороточным альбумином и ДНК. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2022, т. 89, № 4. [Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Petrosyan N.R., Vardevanyan P.O. Fluorescent characteristics of Hoechst 33258 complexes with serum albumin and DNA. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2022, vol. 89, no. 4. (In Russ.)]
16. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition.* Maryland: University of Maryland, School of Medicine Baltimore, 2006.

SPECTRAL CHARACTERISTICS OF THE COMPLEXES OF HOECHST33258 WITH BSA

Antonyan A.P., Karapetyan A.G., Petrosyan N.G., Vardevanyan P.O.

Yerevan State University

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

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0511

Abstract. Study on the interaction of DNA-specific compound Hoechst 33258 with bovine serum albumin (BSA) has been carried out, using the methods of absorption, differential and fluorescence spectroscopies. On the basis of the absorption and fluorescence spectra of the complexes of this ligand with BSA, in wide interval of the change of r (r =ligand/albumin), the dependence curves of the relative changes of the absorption (A/A_0) and fluorescence (F/F_0) maxima of the complexes H33258-BSA on the macromolecule concentration, were constructed. The dependence curve of A/A_0 monotonously decreases along with protein concentration increasing due to the formation of the complexes. It was revealed that the dependence curve of F/F_0 is not linear and is consisted of two regions: at low concentrations of the protein this curve decreases linearly, and passing through the minimum point, at relatively high concentrations of the protein starts linearly increasing. It was also shown that the differential spectra of the complexes H33258-BSA are characterized by hypo- and hyperchromic effects and hypsochromic shift: at low concentrations of the protein a hypochromic effect occurs, at higher concentrations of the protein (beginning from the certain ratios ligand/albumin $\sim 1:1$), the differential spectra are hypsochromically shifted with hyperchromic effect. The obtained data find out that Hoechst 33258, being DNA-specific ligand, tightly binds to albumin.

Key words: Hoechst 33258, bovine serum albumin, complex-formation, spectra, spectroscopic methods.

BENZOATE GROUP ATTACHMENT TO TEMPO PROVIDES ENHANCED DISCRIMINATION OF LIPOSOMES FABRICATED USING HUMAN LUNG NORMAL AND CARCINOMA CELLS

Gasymov O.K.¹, Bakhishova M.J.¹, Gasanova R.B.¹, Aslanov R.B.¹, Melikova L.A.^{1,2}, Aliyev J.A.²

¹Institute of Biophysics of Azerbaijan National Academy of Sciences
117 Z. Khalilov, Baku, AZ1171, Azerbaijan; e-mail: ogassymo@g.ucla.edu; oktaygasimov@gmail.com

²National Center of Oncology, Azerbaijan Republic Ministry of Health
H. Zardabi, 79B, Baku, AZ1012, Azerbaijan

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0512

Abstract. It is widely accepted that the lipid compositions of the plasma membranes of healthy and cancer cells significantly differ from each other. During the cancer progression, cancer cells change the lipid constituent of the membranes resulting in the loss of lipid asymmetry between the membrane leaflets. Consequently, physicochemical properties of the cell membranes are also changed in response to altered lipid organization. Partitioning of the spin probe 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) into the membranes of the cells has broadly been applied to characterize membrane properties of various cells in health and disease conditions. In this work, we used liposomes fabricated using lipids extracted from normal and carcinoma cells. This system permits the determination of the properties of the healthy and cancer cell membranes provided exclusively by its lipid components. Application of TEMPO-benzoate, in which the benzoate group is attached to the TEMPO, indicates significantly enhanced discrimination of liposomes between cancer and normal cells. Partitioning experiments with TEMPO-benzoate revealed relatively enhanced incorporation efficiency for liposomes of cancer cells. On the contrary, TEMPO incorporation efficiency in the same liposomes of cancer cells was not much different compared to healthy cells. Data indicate that TEMPO-benzoate as a probe is more suitable than TEMPO to discriminate cancer cells from healthy cells. Free energy gain observed for TEMPO-benzoate resulted mainly from the hydrophobic effect of the benzoate group.

Key words: *Electron paramagnetic resonance, TEMPO, TEMPO-benzoate, partitioning, lung carcinoma, cell membrane lipid composition.*

INTRODUCTION

During the disease progression cancer cells obtain new capabilities. Because cancer cell development and transformation is a multi-step process, a solid tumor mass shows cell heterogeneity at both phenotypic and functional levels [1,2]. Functional reprogramming of the cancer cells provides new features, such as evading apoptosis, sustained growth signals, insensitivity to anti-growth signals, tissue invasion and metastasis, uncontrolled replicative potential and sustained angiogenesis. These features are common for all types of human tumors [3].

The mortality of cancer patients is mainly related to metastatic progression. Cancer cell mesenchymal transition is a critical step for the development of metastasis. Metastatic progression of the cells manifested by loss of cell polarity, cell-to-cell adhesion, etc. [3,4]. The significant changes observed in the cancer cell membranes play a direct role in conferring new capabilities. The various lipids, mainly composed of assorted phospholipids, sphingolipids, glycolipids, cholesterol, etc. arranged asymmetrically in the healthy cells. As a result, the outer leaflets of healthy cells are more negatively charged compared to that of inner leaflets [5-7]. Phospholipid transportation proteins, such as flippases, floppases and scramblases, play a pivotal role in maintaining the asymmetry the healthy cells. However, cancer cells show significant loss of asymmetry that manifested in decreased negatively charged phospholipid head group in the outer leaflet. Therefore, the zeta potential of cancer cells is decreased compared to that of healthy cells [8].

The membrane proteins play a major role in signaling pathways that regulate the metabolism of both cancer and healthy cells [4,9-12]. The membranes, such as those of cancer and healthy cells, composed of dissimilar lipids are adopted to modulate functions of particular cell types [5,13,14]. The cell membrane permeability is an important parameter to characterize healthy and cancer cells.

As indicated above, the lipid compositions of the membranes of healthy and cancer cells significantly differ from each other [15-17]. The lipids in the membrane are arranged non-uniformly and described with domain structures that have distinct properties in both cell types [18-21]. The membrane proteins, as well as lipid compositions, may play a critical role in assembling these domains [16,17,22].

In this study, taking a reductionist approach, we have evaluated if differences in lipid compositions of the membranes of healthy and cancer cells are enough to discriminate between both cell types. For this reason, we have studied the permeability properties of the liposomes produced from the lipids extracted from the healthy and cancer cells of human lung tissue.

The spin probe 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) has widely been applied to investigate membrane permeability properties of various cell types in health and diseased conditions. Particular properties of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectra of TEMPO in aqueous (hydrophilic) and membrane (hydrophobic) environments

allow easy detection of the spin probes located in these environments. TEMPO-benzoate, along with TEMPO, was also tested to evaluate its partition properties in healthy and cancer cells. The experiments were performed at various temperatures to examine the temperature sensitivity of the lipid extracted from both cell types. Data indicate relatively more enhanced incorporation of TEMPO-benzoate into the liposomes of cancer cells compared to that of TEMPO. Unlike TEMPO-benzoate, TEMPO partitioning constants in the liposomes were similar to healthy and cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

2.1. Human lung tissue collection

Since experiments were performed with liposomes, formalin-fixed lung tissues were adequate for providing reliable data for analysis. Human lung tissues were collected and used in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and approved by the review board of the Azerbaijan National Center of Oncology. The cancer diagnosis was provided by a histopathology report. Here we report, as an example, a case of a 30-year-old female who did not receive chemo- or radiation therapy before the surgery. The pathology findings on the surgical lung tissue were consistent with a XBT-0-3:8070/3, (squamous cell carcinoma) lung cancer. Cancer grade was classified as G2 (intermediate grade/moderately differentiated). The separation of lung tissue into cancer and normal (also referred to as healthy) parts was provided by the pathologist.

2.2. Preparation of epithelial cell suspension from lung tissue

The lung tissue was washed thoroughly with PBS buffer to remove blood. Afterward, the tissue was cut into small pieces. To remove formalin fixation, the sample was incubated in PBS buffer for 2 hours. During this procedure, the buffer was refreshed every 15 minutes. Then, the samples were homogenized in PBS buffer using a glass homogenizer. The homogenized lung tissues were washed three times with PBS solution and then centrifuged (Eppendorf 5418) to remove the cell debris.

2.3. Extraction of lipids and preparation of liposomes from healthy and cancer cells

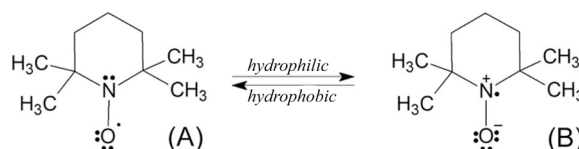
The epithelial cell suspensions obtained from healthy and cancer tissues of the lung were used to extract the lipids. Total lipid extraction was performed using a widely accepted three-component system (water, chloroform and methanol) [23]. The liposomes from the lipids extracted from healthy and cancer cell suspensions were produced using the probe-tip sonication method [24].

2.4. EPR spectroscopy

EPR measurements were performed using a Bruker ELEXSYS E580 spectrometer at X-band frequency with a variable temperature accessory. The liposomes fabricated from the lipids extracted from lung carcinoma and normal cells were incubated with TEMPO or TEMPO-benzoate for 30 min and then were placed into Pyrex capillary tubes with an I.D. of 0.6 mm. The following instrumental parameters were chosen for recording the EPR spectra. Scan width: 100 Gauss, sweep time: 40 s, modulation amplitude: 1 Gauss, modulation frequency: 100 kHz, microwave power: 0.47 mW, time constant: 0.1 s. The samples were kept for 5 minutes at each temperature to make sure that the temperatures of the samples matched the set temperatures.

2.5. Partitioning of TEMPO and TEMPO-benzoate in the liposomes constructed using the lipids extracted from human lung normal and carcinoma cells

TEMPO and TEMPO-benzoate contain the same nitroxide group that shows a well-known EPR spectrum with three-component resulting from nitrogen hyperfine interactions. The hyperfine splitting constants in EPR spectra of TEMPO and its derivatives depend on the polarity of the solvent. As it will be shown below the hyperfine splitting constant of nitroxide is larger in a hydrophilic environment compared to that in a hydrophobic one. TEMPO derivatives dissolved in the system that contains two phases with distinct polarities, such as liposomes and aqueous environments, will be distributed in these phases according to accessibility and polarity. Obtained EPR spectra, which are composed of the partitioning of TEMPO derivatives, show resolved components at the high magnetic field. The following consideration explains the features of EPR spectra observed in the partitioning experiments. The values for isotropic hyperfine coupling constants (A_{iso}) and g factors of the nitroxide spin probe are slightly different in hydrophobic (liposome) and aqueous environments which can be explained by differences in spin densities of two canonical structures of TEMPO [25].



The aqueous solution trend to stabilize the structure (B) in which unpaired electron density is localized on N-atom. In contrast, the structure (A), in which unpaired electron density is localized on the oxygen atom, is preferentially stabilized in a hydrophobic environment. Therefore, the nitrogen hyperfine coupling constant is lower in a hydrophobic environment compared to that in a hydrophilic environment [25].

The EPR spectra of TEMPO and TEMPO-benzoate incubated in the solutions of liposomes fabricated from the lipids extracted from lung carcinoma and healthy cells were analyzed using the LabVIEW program developed by Christian Altenbach (<https://sites.google.com/site/altenbach/>) employing the spectral simulation code written in FORTRAN [26]. Two-component analysis was adequate to describe the EPR spectra of both TEMPO and TEMPO-

benzoate incubated in various liposome systems. The resolved components of EPR spectra were used to calculate a partition coefficient (K) according to the following formula:

$$K = I_{lip}/(I_{lip} + I_{aq}). \quad (1)$$

I_{lip} and I_{aq} are double integrals of EPR components of TEMPO or TEMPO-benzoate localized in liposome and aqueous environments, respectively. The same liposome (by mass of lipids) and spin probes (TEMPO or TEMPO-benzoate) concentration were used for direct comparison of the partition coefficients [27]. In partition experiments, the concentrations of TEMPO or TEMPO-benzoate were 150 μ M.

For quantitative characterization of thermodynamic parameters of liposomes constructed using the lipids extracted from lung carcinoma and healthy cells, the free energy required to transfer a TEMPO or TEMPO-benzoate from an aqueous to a liposome environment was calculated using the values of the equilibrium constants, i.e. partition coefficients, determined at various temperatures

$$\text{Log}K = -\Delta G/RT. \quad (2)$$

Similarly, the rotational correlation times of TEMPO or TEMPO-benzoate determined at various temperatures were used to determine the activation energies for rotational motions in the lipid fraction of the liposomes fabricated from healthy and cancer cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of cancer at the earliest stage is most important for successful cancer treatment. Today various screening methods exist to reduce mortality or prevent various types of cancer, such as colon cancer, breast cancer, etc. However, such of screening method is not yet available for wide-range application for lung cancer, one of the deadliest diseases. Recent developments utilizing artificial intelligence applied to the FTIR spectra of human blood plasma samples for the classification of lung cancer patients are encouraging [28,29]. Evaluating of distinct properties of the healthy and cancer cell may provide the information for selected drug delivery, i.e., incorporation into the membranes.

Lipid constituents play a significant role in conferring specific properties to cell membranes, such as permeability, membrane dynamics, etc. It is well documented that the lipid composition of healthy and cancer cells significantly varies from each other [15–17]. Liposome model systems used in this study allow us to determine the properties of the healthy and cancer cell membranes provided exclusively by its lipid components. The distinct features of the liposomes composed of the lipids from the healthy and cancer cells may provide very important information for drug delivery applications. Comparison of the results obtained from the applications of TEMPO and TEMPO-benzoate permits the evaluation of the contribution of a benzoate group in partitioning the lipid phases composed of different components. Below, we provide TEMPO and TEMPO-benzoate partitioning experiments into the liposomes constructed from healthy and cancer cells at the temperature of 295K – 317K interval.

EPR spectra of TEMPO resulted from partitioning in liposomes using the lipids extracted from human lung normal (healthy) cells at pH 7.3 are shown in Figure 1.

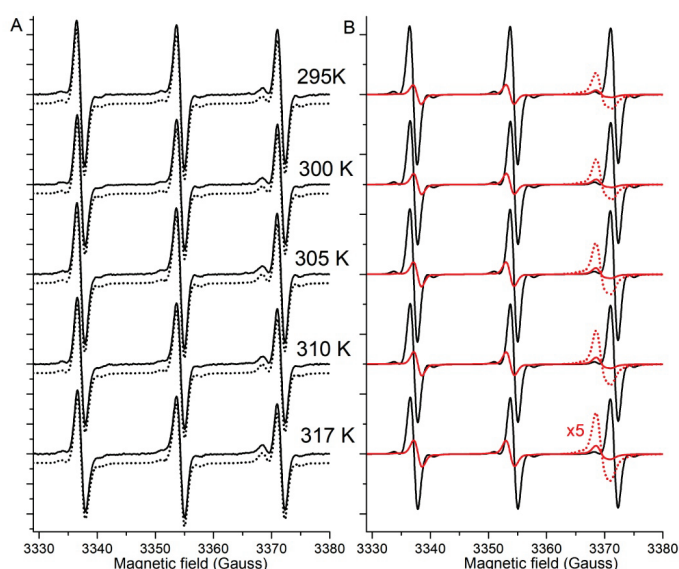


Figure 1. EPR spectra of TEMPO resulted from partitioning in the liposomes fabricated using the lipids extracted from human lung normal (healthy) cells at pH 7.3. (A) EPR spectra of TEMPO were recorded at various temperature values as indicated on the graph. Dotted lines are simulated spectra obtained from the fitting to a two-component model. For better visualization, simulated spectra were shifted vertically. (B) EPR spectra of resolved components. Black and red lines indicate EPR spectra of TEMPO localized in hydrophilic (aqueous) and lipophilic (liposome) environments, respectively. The amplitudes of high field components of EPR spectra of TEMPO in a liposome environment were increased 5-fold (dotted red lines) for better judgments

As can be seen from Figure 1A (vertically shifted dotted lines), two components are enough for adequate characterization of the spectra. The small fractions of TEMPO molecules are localized in the lipid fraction of the liposome system (Fig. 1B, red lines). TEMPO partitioning into the lipid fraction of the liposome is increased at higher temperatures. TEMPO partitioning experiment in liposomes constructed from the lipids extracted from cancer cells of human lung tissue shows similar results (Fig. 2).

Partitioning of TEMPO into the liposomes constructed from the cancer cell lipids is almost identical to that of healthy cells (Fig. 1, Fig. 2). The parameters recovered from the fitting procedures are shown in Tables 1 and 2.

The A_{iso} values for TEMPO in the lipid and aqueous environments in the liposomes fabricated from the lipids of cancer and healthy cells show identical values, 34.5 ± 0.1 and 31.4 ± 0.1 , respectively. The identical A_{iso} values for TEMPO in lipid fractions of liposomes from cancer and healthy cells indicate that TEMPO molecules in both cases are localized in regions with similar hydrophobicities. The Arrhenius plots reveal that free energies required to transfer a TEMPO from an aqueous to the liposomes of cancer and healthy cells are very close, 7.7 ± 0.6 kcal/mol and 6.6 ± 0.6 kcal/mol, respectively (Fig. 3). Thus, TEMPO does not discriminate between the liposomes fabricated from cancer and healthy cells.

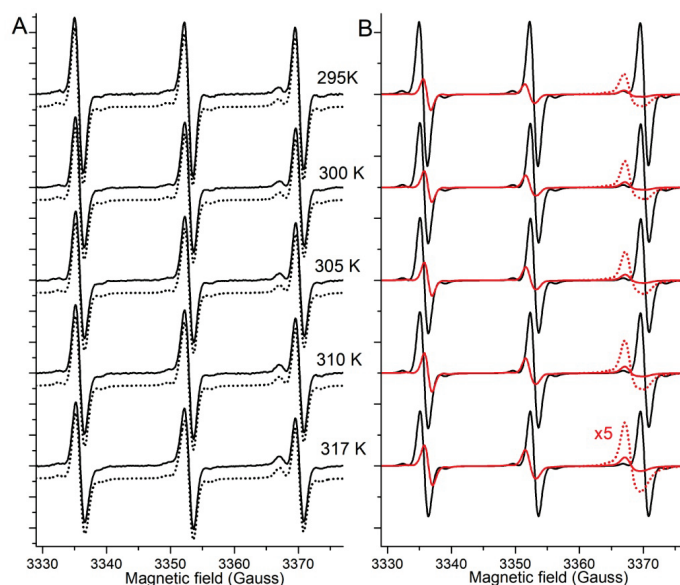


Figure 2. EPR spectra of TEMPO resulted from partitioning in liposomes using the lipids extracted from human lung carcinoma cells at pH 7.3. (A) and (B) are the same as in Figure 1, but obtained from the lipid extracted from lung carcinoma cells

Table 1. Parameters obtained from the EPR studies on the liposomes, lipids of which were extracted from healthy and cancer cells of the human lung

Sample		$2A_{iso}$ (Gauss) (aqueous)	$2A_{iso}$ (Gauss) (liposome)	ΔG_K (kcal/mol)
Liposome (Healthy), pH 7.3	TEMPO	34.5 ± 0.1	31.4 ± 0.1	6.6 ± 0.6
Liposome (Cancer), pH 7.3	TEMPO	34.5 ± 0.1	31.4 ± 0.1	7.7 ± 0.6
Liposome (Healthy), pH 7.3	TEMPO-benzoate	33.7 ± 0.2	31.4 ± 0.1	2.9 ± 0.7
Liposome (Cancer), pH 7.3	TEMPO-benzoate	33.7 ± 0.1	30.8 ± 0.1	4.5 ± 0.7

Table 2. Rotational correlation times for TEMPO-benzoate located in lipid fractions of the liposomes. The liposomes were fabricated using the lipids extracted from healthy and cancer cells of the human lung

Temperature (K)	τ (ps)	
	Cancer, Component B	Healthy, Component B
295	466.8	278.8
300	312.5	223.0
305	291.5	202.0
310	244.0	108.3
317	181.8	45.8

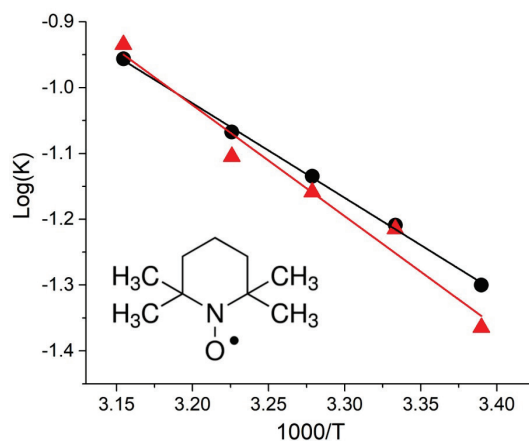


Figure 3. Arrhenius plots for the TEMPO partitioning coefficients obtained for the liposomes constructed using the lipids extracted from the healthy (black circles) and carcinoma (red circles) cells of the human lung tissue. Experiments were conducted at pH 7.3

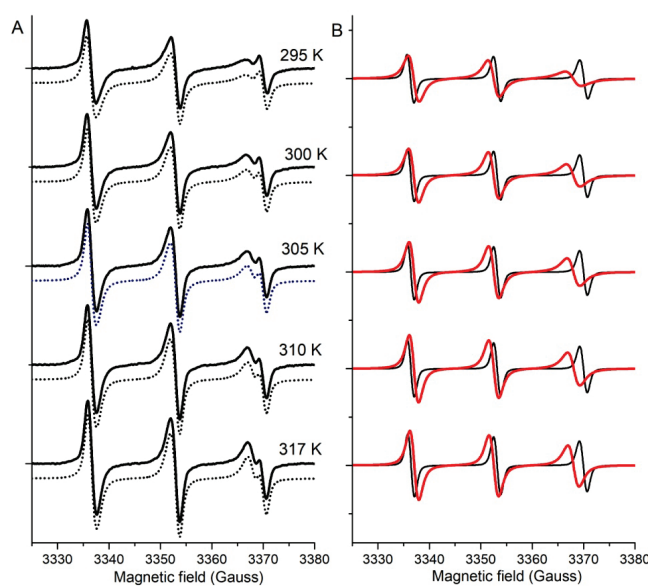


Figure 4. EPR spectra of TEMPO-benzoate resulted from partitioning into the liposomes fabricated using the lipids extracted from human lung normal (healthy) cells at pH 7.3. (A) EPR spectra of TEMPO-benzoate were recorded at various temperature values as indicated on the graph. Dotted lines are simulated spectra obtained from a two-component model. For better visualization, simulated spectra are shifted vertically. (B) EPR spectra of resolved components. Black and red lines indicate EPR spectra of TEMPO-benzoate localized in hydrophilic (aqueous) and lipophilic (liposome) environments, respectively

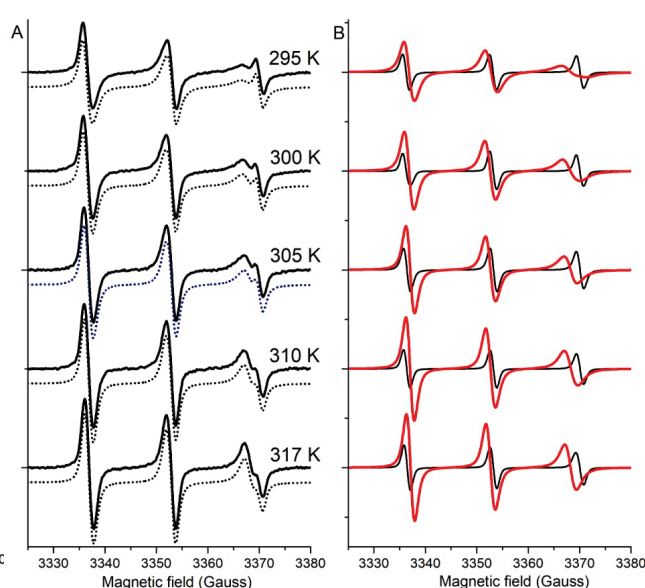


Figure 5. EPR spectra of TEMPO-benzoate resulted from partitioning in liposomes using the lipids extracted from human lung carcinoma cells at pH 7.3. (A) and (B) are the same as in Figure 4, but obtained from the lipid extracted from lung carcinoma cells

The same liposomes were also tested with TEMPO-benzoate, in which the benzoate group is attached to TEMPO. The EPR spectra of TEMPO-benzoate incubated in human lung healthy and cancer cell suspensions at pH 7.3 are shown in Figures 4 and 5, respectively. As in the case of TEMPO, a model with two components sufficiently characterize the EPR spectra of TEMPO-benzoate at various temperatures (Fig. 4A, dotted lines and 4B).

Significantly enhanced partition for TEMPO-benzoate compared to that of TEMPO is evident (Fig. 1 and 4). Partitioning of TEMPO-benzoate into liposomes from healthy cells is increased at higher temperatures. In contrast to TEMPO, TEMPO-benzoate demonstrates much higher partitioning into liposomes of cancer cells compared to that of healthy cells (Fig. 4 and 5). The parameters recovered from the fitting procedures indicated that A_{iso} value for TEMPO-benzoate in liposomes from cancer cells decreased from 31.4 ± 0.1 to the value of 30.8 ± 0.1 . The decreased value of A_{iso} for the liposomes of cancer cells can be attributed to lipid rafts that are more hydrophobic compared to the phospholipid parts. At higher temperatures, relatively higher partitioning of TEMPO-benzoate to the liposomes of cancer cells is evident (Fig. 6).

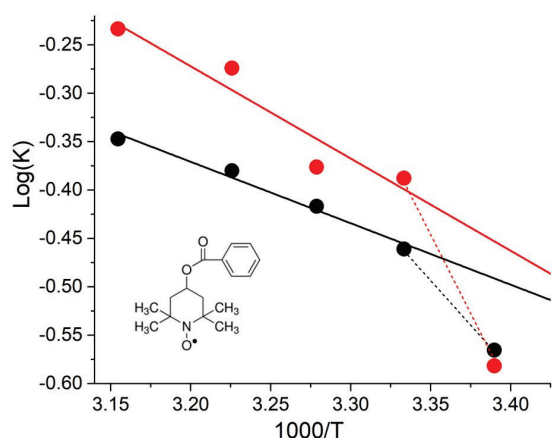


Figure 6. Arrhenius plots the TEMPO-benzoate partitioning coefficients obtained for the liposomes constructed using the lipids extracted from the healthy (black circles) and carcinoma (red circles) cells of the human lung tissue

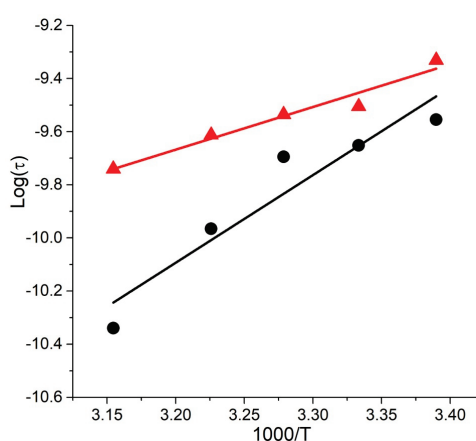


Figure 7. Arrhenius plots for rotational correlation times of the TEMPO-benzoate in the liposomes constructed using the lipids extracted from the healthy (black circles) and carcinoma (red circles) cells of the human lung tissue

The Arrhenius plots for partitioning values of TEMPO-benzoate indicate significant differences in energies required to transfer TEMPO-benzoate from aqueous to liposome environments for cancer and healthy cells. The energy transfer values of TEMPO-benzoate are 2.9 ± 0.7 kcal/mol and 4.5 ± 0.7 kcal/mol for liposomes of healthy and cancer cells, respectively. The rotational correlation times of TEMPO-benzoate and their temperature dependence are appreciably different for cancer and healthy cells (Fig. 7, Table 2). Activation energies for the rotational motion in liposomes of cancer and healthy cells are 7.4 ± 0.9 kcal/mol and 15.1 ± 2.8 kcal/mol, respectively. Free energy difference values for TEMPO and TEMPO-benzoate transfer to the same system are revealing. ΔG (TEMPO/TEMPO-benzoate) for the liposomes from healthy and cancer cells are 3.7 kcal/mol and 3.2 kcal/mol, respectively. Free energy gain from the transfer of the $-CH_2$ group from an aqueous to a hydrophobic environment is about 0.6 kcal/mol [30]. The free energy gain from the benzoate group can be approximated as 6 of $-CH_2$ groups, i.e. 3.6 kcal/mol. This value is very close to the ΔG (TEMPO/TEMPO-benzoate) values obtained by the experiments. Thus, free energy gain obtained for TEMPO-benzoate partitioning for both liposomes from healthy and cancer cells can be explained primarily by the hydrophobic effect.

CONCLUSIONS

A comparison of TEMPO and TEMPO-benzoate partitioning into the liposomes fabricated from the lipids using the healthy and cancer cells of the human lung reveals important differences in their properties. In contrast to TEMPO, the use of TEMPO-benzoate allows the discrimination of liposomes between fabricated from cancer and healthy cells. The temperature-dependent partitioning coefficients for TEMPO-benzoate and energies required to transfer TEMPO-benzoate from aqueous to lipid phase are adequate parameters for cell discrimination. Data indicate that not TEMPO but TEMPO-benzoate is a good probe to characterize and/or discriminate between cancer and healthy cell systems. Free energy gain observed for TEMPO-benzoate mainly resulted from the hydrophobic effect of the benzoate group.

This work was supported by the Science Development Foundation under the President of the Republic of Azerbaijan-Grant № EIF-MQM-ETS-2020-1(35)-08/07/3-M-07.

References:

1. Meacham C.E., Morrison S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 2013, vol. 501, no. 7467, pp. 328-337.
2. Singh A.K., Arya R.K., Maheshwari S., Singh A., Meena S., Pandey P., Dormond O., Datta D. Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: Updates in concept, controversies and clinical relevance. *Int. J. Cancer*, 2015, vol. 136, no. 9, pp. 1991-2000.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000, vol. 100, no 1, pp. 57-70.
4. Rakoff-Nahoum S. Why cancer and inflammation? *Yale J. Biol. Med.*, 2006, vol. 79, no, 3-4, pp. 123-130.
5. Casares D., Escriba P. V., Rossello C.A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 9, p. 2167.
6. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longsworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.*, 2020, vol. 16, no. 6, pp. 644-652.
7. Stieger B., Steiger J., Locher K.P. Membrane lipids and transporter function. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, 2021, vol. 1867, no. 5, p. 166079.
8. Gasanova R.B., Melikova L.A., Gasymov O.K., Aliyev J.A. Zeta potentials of healthy and cancer cells of human lung : implication to cancer therapy. *Mod. Achiev. Azerbaijan Med.*, 2020, no. 4, pp. 112-117.

9. Zulueta Diaz Y. de las M., Arnspang E.C. Special Issue: Dynamics and Nano-Organization in Plasma Membranes. *Membranes (Basel)*, 2021, vol. 11, no. 11, p. 828.
10. van Deventer S., Arp A.B., van Spruiel A.B. Dynamic Plasma Membrane Organization: A Complex Symphony. *Trends Cell Biol.*, 2021, vol. 31, no. 2, pp. 119-129.
11. Raghunathan K., Kenworthy A.K. Dynamic pattern generation in cell membranes: Current insights into membrane organization. *Biochim. Biophys. Acta*, 2018, vol. 1860, no. 10, pp. 2018-2031.
12. Sackmann E., Tanaka M. Critical role of lipid membranes in polarization and migration of cells: a biophysical view. *Biophys. Rev.*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 123-138.
13. Stieger B., Steiger J., Locher K.P. Membrane lipids and transporter function. *Biochim. Biophys. Acta*, 2021, vol. 1867, no. 5, p. 166079.
14. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.*, 2020, vol. 16, no. 6, pp. 644-652.
15. Hristova K., Selsted M.E., White S.H. Critical Role of Lipid Composition in Membrane Permeabilization by Rabbit Neutrophil Defensins. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 39, pp. 24224-24233.
16. Zalba S., ten Hagen T.L.M. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.*, 2017, vol. 52, pp. 48-57.
17. Szlaska W., Zendran I., Zalesinska A., Tarek M., Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2020, vol. 52, no. 5, pp. 321-342.
18. Karnovsky M.J., Kleinfeld A.M., Hoover R.L., Klausner R.D. The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.*, 1982, vol. 94, no. 1, pp. 1-6.
19. Owen D.M., Gaus K. Imaging lipid domains in cell membranes: The advent of super-resolution fluorescence microscopy. *Front. Plant Sci.*, 2013, vol. 4, no. DEC, pp. 1-9.
20. Ursell T.S., Klug W.S., Phillips R. Morphology and interaction between lipid domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, vol. 106, no. 32, pp. 13301-13306.
21. Feigenson G.W. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1788, no. 1, pp. 47-52.
22. Preta G. New Insights Into Targeting Membrane Lipids for Cancer Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, vol. 8, no. September, pp. 1-10.
23. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, no. 8, pp. 911-917.
24. Rieth M.D., Lozano A. Preparation of DPPC liposomes using probe-tip sonication: Investigating intrinsic factors affecting temperature phase transitions. *Biochem. Biophys. Reports*, 2020, vol. 22, no. April, p. 100764.
25. Griffith O.H., Dehlinger P.J., Van S.P. Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (Evidence for water penetration in biological membranes). *J. Membr. Biol.*, 1974, vol. 15, no. 1, pp. 159-192.
26. Budil D.E., Sanghyuk L., Saxena S., Freed J.H. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified levenberg-marquardt algorithm. *J. Magn. Reson., Ser. A.*, 1996, vol. 120, no. 2, pp. 155-189.
27. Wu S.H. wei, McConnell H.M. Phase Separations in Phospholipid Membranes. *Biochemistry*, 1975, vol. 14, no. 4, pp. 847-854.
28. Gasymov O.K., Aydemirova A.H., Melikova L.A., Aliyev J.A. Artificial intelligence to classify human lung carcinoma using blood plasma ftir spectra. *Appl. Comput. Math.*, 2021, vol. 20, no. 2, pp. 277-289.
29. Yang X., Ou Q., Qian K., Yang J., Bai Z., Yang W., Shi Y., Liu G. Diagnosis of Lung Cancer by ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Front. Oncol.*, 2021, vol. 11, no. September, pp. 1-7.
30. Tanford C. *Hydrophobic Effect: Formation of micelles and biological membranes*. New York, N.Y.: Wiley-Interscience, 1980, 233 p.

STRUCTURE OF SILK FIBROIN NANOPARTICLES: CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC PATCHES

Mammedzade A.M., Mammadova Ay.J., Gasymov O.K.

Institute of Biophysics of Azerbaijan National Academy of Sciences

Z. Khalilov, 117, Baku, AZ1171, Azerbaijan; e-mail: ogassymo@g.ucla.edu; oktaygasimov@gmail.com

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0513

Abstract. Nanoparticles are extensively used in various areas of industry. Among different nanoparticles, protein nanoparticles complexed with a wide range of drugs have a great potential for biomedical applications. Silk fibroin exhibits good biocompatibility properties and, therefore, is a good raw material for a wide variety of applications. In this study, structure and hydrophobic patch formation were studied in nanoparticles fabricated from silk fibroin. Far-UV circular dichroism spectroscopy and birefringence observed in a polarized microscope with Congo red staining indicate that fibroin nanoparticles are composed of small amyloid domains. Steady-state and time-resolved fluorescence of ANS revealed two hydrophobic patch formations. Decay-associated spectra of ANS bound to these patches show two species with lifetimes of about 4.2 ns and 14.8 ns. Dissociation constants for ANS complex formation for these patches are $8.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ and $5.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$, respectively. Acrylamide fluorescence quenching shows that solvent accessibility to native Trp residues is significantly decreased during fibroin nanoparticle formation. Data indicate that nanoparticles fabricated from fibroin are a good candidate for drug delivery applications.

Key words: protein nanoparticles, steady-state and time-resolved fluorescence, ANS fluorescence, hydrophobic patches.

INTRODUCTION

Protein nanoparticles (pNP) are widely used for drug delivery in the treatment of various diseases. By controlling the parameters, such as size, properties of hydrophobic patches, etc., pNPs can be tuned for drug delivery to specific organs. Among various nanoparticle systems, pNPs have several benefits for drug delivery applications. Many properties of pNP, such as the possibility of size control, biocompatibility, low toxicity, ease of surface modification, etc., make them very attractive for medical applications [1]. Most of the drugs, particularly anticancer agents, are hydrophobic and rely on a special delivery system for disease treatments. Dose-limiting toxicity of many anticancer agents is significantly improved by using protein-formulated nanoparticle systems [2].

Generally, pNP formulation employs a desolvation process. It has been shown that the size of pNPs mainly depends on the amount of used desolvating agents. Heat treatment under the denaturing conditions influences the solubility of pNPs, but not the particle size or amount of functional amino groups [3].

Silk fibroin comprises up to 80% of *Bombyx mori* silkworm cocoons and is extensively used as a biomaterial with excellent properties, such as biocompatibility, high mechanical strength, controllable degradation, etc. [4]. Fibroin consists of two polypeptide chains, a heavy (~390 kDa) and light (~26 kDa), which are covalently linked by a disulfide bond. The heavy chain contains four regions, the crystalline (GAGAGS sequence motif), two semicrystalline (GAGAGY, GAGAGV and GAGAGVGY sequence motifs) and amorphous (contains bulky and aromatic side chains) [5]. Fibroin is composed of about 60% crystalline and 40% amorphous parts. Freshly dissolved aqueous solutions of fibroin adopt random coil conformation that shows the time-dependent conformational transition to beta-structure. This structural transition strongly depends on temperature and is accompanied by protein aggregation [6]. Spectroscopic studies indicate that fibroin aggregates have a beta-amyloid structure and are a good model to examine amyloid formation mechanisms [6].

Fibroin nano- and microparticles have been formulated as a drug delivery system for doxorubicin, a broadly used anti-cancer agent. The system was very effective against MCF-7 and SAOS-2 cell lines in the *in vitro* study [7]. Fibroin nanoparticles (sfNP) possess all features required for biomedical application and are a good candidate for *in vivo* application [7,8]. As mentioned above, a desolvation procedure is used for pNP production, during which significant conformational changes and drug binding site formation occur.

Hydrophobic cavity and/or patch formation have been relatively less studied in pNPs. To fill this gap, we have fabricated sfNP and using various spectroscopic techniques characterized their structure and hydrophobic cavities important for hydrophobic drug delivery. We show that sfNP is composed of small beta-amyloid structures and possesses at least two hydrophobic cavities with distinct characteristics.

MATERIAL AND METHODS

2.1. Silk fibroin purification

Fibroin was purified from silk cocoons of *Bombyx mori* following the conventional procedure described in [9]. Briefly, silk cocoons were cut into small pieces and then boiled in 0.02 M Na_2CO_3 for 30 min. The sericin was washed off with running water and dried in the air. Then, fibroin was dissolved in 9.5 LiBr solution incubating at 60°C for 4 hours

and then dialyzed (molecular weight cut-off 10 kDa) against deionized water for 2 days at 4°C. The concentration of fibroin solution was determined by UV absorbance, using $\epsilon_{275\text{nm}} = 1.064 \text{ cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ [10].

2.2. Preparation of fibroin nanoparticles.

Fibroin nanoparticles were fabricated by jetting the fibroin solution into acetone solution. At the end of the procedure concentration of acetone was above 70% [11]. Dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) measurements operating at $\lambda = 633 \text{ nm}$ were used to characterize the size of nanoparticles. After 2 times ultrasonication (20 kHz) procedures with an amplitude of 50% for 30 sec, the solution showed a single peak with a diameter of about 120 nm (data not shown).

2.3. Circular Dichroism spectroscopy

Far-UV CD spectra were recorded using a Chirascan V100 (Applied Photophysics, UK) circular dichroism spectrometer using a step size of 0.5 nm and bandwidth of 1 nm. The path length of the cell was 0.2 mm. To increase the signal/noise ratio, nine spectral scans were averaged. CD spectra were recorded in mdeg and converted to $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$. Secondary structure of sfNP was estimated from far-UV CD spectrum using the DICHROWEB server (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) [12,13]. The CDSSTR method [14,15], which showed the best fitting data, was used for the calculation of secondary structure content.

2.4. Congo red binding assay

Congo red (CR) staining experiments were performed to test beta-amyloid formation in fibroin nanoparticles. The dye was freshly prepared in deionized water and concentration was determined using $\epsilon_{490\text{nm}} = 3.3 \cdot 10^4$ [16]. Solution of fibroin nanoparticles was stained using a 20 μM concentration of CR. The solution was sandwiched between two microscope glass slides for a polarized microscope. The birefringence of CR bound to fibroin nanoparticles was measured through crossed polarizers.

2.5. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra and emission decay measurements were recorded using a spectrofluorometer FluoTime 300 (PicoQuant, Germany). For steady-state fluorescence spectra of native Trp residues, the excitation wavelength was chosen 295 nm to prevent contribution from Tyr residues. Nanopulsed LED with 296 nm was selected for the Trp emission decays. The emission decay data were analyzed by multiexponential decay law, using the software of the instrument.

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

Where $I(t)$ fluorescence intensity at different times and α_i and τ_i are the normalized preexponential factors and decay time constant, respectively. The intensity-averaged lifetime is $\tau^{av} = \sum f_i \tau_i$, where $f_i = \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_j \tau_j$.

Acrylamide quenching experiments of native Trp residues of fibroin in solution and NP forms were performed by both steady-state and time-resolved fluorescence. Quenching with steady-state fluorescence reflects both dynamic and static quenching and, therefore, is described by the following equation:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \quad (2)$$

F_0 and F represent steady-state fluorescence in the absence and presence of the quencher $[Q]$. K_D and K_S are dynamic and static quenching constants, respectively. However, only dynamic quenching is involved in quenching with fluorescence lifetimes and is described by

$$\frac{\tau_0}{\tau} = (1 + K_D [Q]) \quad (3)$$

To obtain K_D and K_S values both steady-state and time-resolved fluorescence quenching data were simultaneously fitted to the above-shown equations using Global analysis (OriginPro 16). The K_D was a global parameter. A bimolecular quenching rate constant was calculated as $k_q = K_D / \tau^{av}$. In contrast K_D , k_q does not depend on fluorescence lifetime and is an adequate parameter to measure solvent exposure of the chromophore.

ANS fluorescence was measured with an excitation wavelength of 375 nm. ANS emission decays were measured with a 375 nm nanopulsed laser. The software supplied with the instrument was used to analyze emission decays. ANS emission decays across the emission spectra with a 5 nm interval were used to build decay-associated spectra (DAS). For DAS, the set of ANS emission decay curves was subjected to Global analysis, where the lifetimes were global parameters.

2.6. ANS binding to fibroin nanoparticles: deconvolution of binding curve into fluorescence lifetime species.

An aqueous solution of sfNP (1.5 μM) was titrated with 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) and the steady-state fluorescence emission was measured at 490 nm. The concentration of ANS was determined using an extinction coefficient $\epsilon_{350\text{nm}} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. In the steady-state measurements, the λ_{ex} and bandwidth were 340 nm and 3.5 nm, respectively. A nanopulsed LED 340nm was used for time-resolved measurements. To deconvolve ANS binding curve into fluorescence lifetime species, the emission decay measurements were performed at each point of the titration. Deconvolution and determination of dissociation constants (K_d) were performed as described in ref. [17].

RESULTS AND DISCUSSION

Far-UV CD spectrum of a freshly prepared aqueous solution of fibroin shows a single negative peak around 195 nm, characteristic of random coil conformation. The spectrum of sfNP solution exhibits drastic changes that exhibit a negative couplet characterized by peaks at 222 nm and 205 nm (Fig. 1). The spectral form is characteristic of the beta-sheet structure. Secondary structure estimation from far-UV CD spectra using the method CDSSTR has yielded 47% beta-structure, 11% turns, and 39% random coil. The random coil to beta-structure transitions has been shown in the fibroin aggregation process [6]. CR staining assay was performed to reveal the nature of the protein aggregates. The green birefringence dots were observed in the sfNP solution with CR under a polarized microscope. This observation indicates that bound CR molecules are aligned along the fiber axis, characteristic of amyloid structures. Other protein aggregates

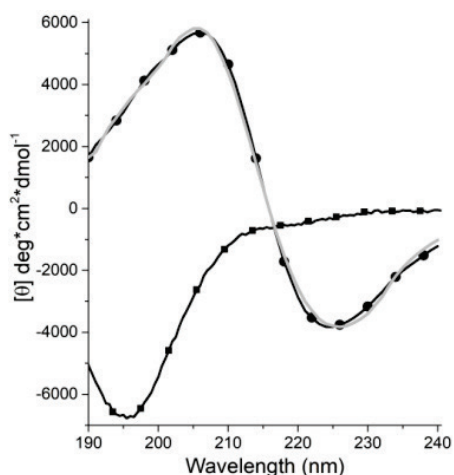


Figure 1. Far-UV CD spectra of SF solution in various states. Solid curves with square and circle symbols represent freshly prepared SF and SFNP solutions, respectively. The Gray solid curve is a calculated spectrum

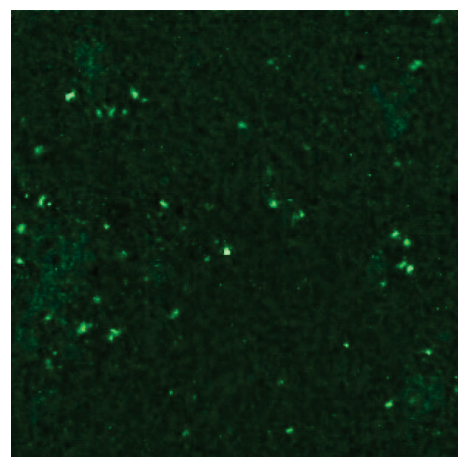


Figure 2. Birefringence image of sfNP-CR complexes

where bound CR molecules are oriented randomly do show the birefringence [18]. Therefore, data indicate that the sfNPs with an average size of about 120 nm are composed of small beta-amyloid domains.

Conformational transitions in fibroin during the sfNP formation were also evaluated with fluorescence spectroscopy. A freshly prepared aqueous solution of fibroin exhibits a fluorescence spectrum with λ_{max} of about 340 nm indicating that Trp residues are mostly localized at the surface of the protein [19]. A large blue shift from 340 nm to 324 nm is observed in the fluorescence spectrum of sfNP (Fig. 3). Consequently, during sfNP formation, Trp residues become deeply buried and are surrounded by hydrophobic sidechains [19,20]. The shoulder seen at about 360 nm is characteristic of amyloid aggregates. About 10 fold decrease in quantum yield observed in sfNP transition (from 0.056 to 0.005) indicates the location of a strong quencher group in the neighborhood of Trp residues. To verify this suggestion, acrylamide

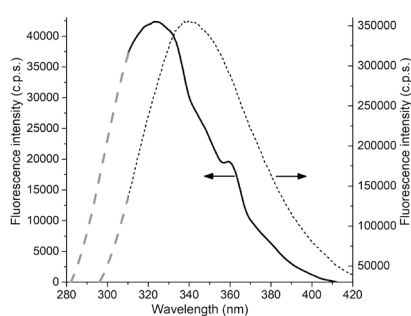


Figure 3. Trp emission spectra of SF in various states. Solid and dotted lines represent sfNP and freshly prepared SF solutions, respectively. Dashed lines were constructed from the best fit to log-normal function

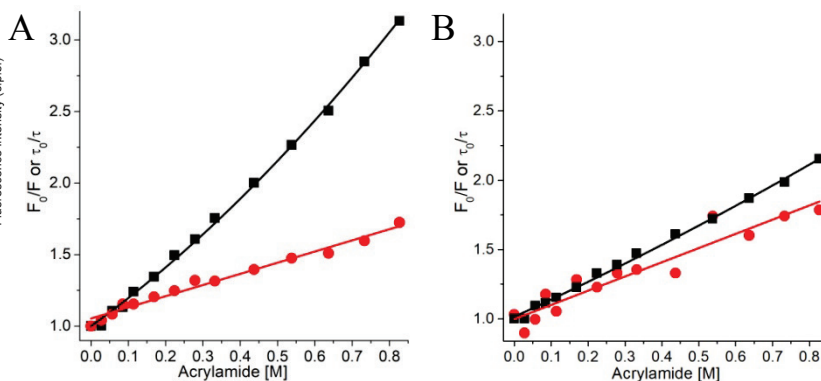


Figure 4. Steady-state and time-resolved fluorescence for acrylamide quenching of native Trp residues in SF in various states. (A) Freshly prepared SF solution. (B) fibroin solution in sfNP state. Black squares and red circles represent the quenching data from steady-state and time-resolved fluorescence, respectively

fluorescence quenching experiments were performed for fibroin in solution and NP states.

Steady-state and time-resolved fluorescence quenching by acrylamide are shown in Figure 4A. The quenching constants extracted from the global fitting (see Methods) are $K_d = 0.76 \pm 0.03 \text{ M}^{-1}$, $k_q = 0.17 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $K_s = 1.12 \pm 0.05 \text{ M}^{-1}$ for fibroin in solution. Both the upright curvature of F_0/F and its significant deviation from τ_0/τ are indicative of the significant contribution from static quenching. The acrylamide quenching parameters for the sfNP solution obtained from the fitting are $K_d = 1.03 \pm 0.08 \text{ M}^{-1}$, $K_s = 0.18 \pm 0.07 \text{ M}^{-1}$ and $k_q = 0.66 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. There is an increase in the dynamic quenching constant in sfNP compared to that of fibroin solution. Both values are consistent with small solvent exposure. For comparison, fully exposed Trp residues k_q value is about $6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In contrast, a more than 6-fold decrease is observed the static quenching in the sfNP state. Static quenching is also related to complex formation with the chromophore. Acrylamide has a very low affinity toward proteins. Therefore, significant static quenching observed at high concentrations is related to a number of acrylamide molecules vicinity of the chromophore at the moment of the excitation event. Data indicate that in sfNP formation, in contrast to fibroin solution, there is not enough space in the neighborhood Trp residues to accept the acrylamide molecules in contact distance. However, augmented dynamic quenching indicates increased mobility for some Trp residues in sfNP.

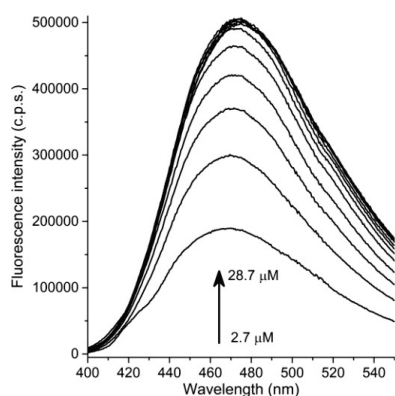


Figure 5. Fluorescence spectra of sfNP (1.5 μM) titrated with various concentrations of ANS

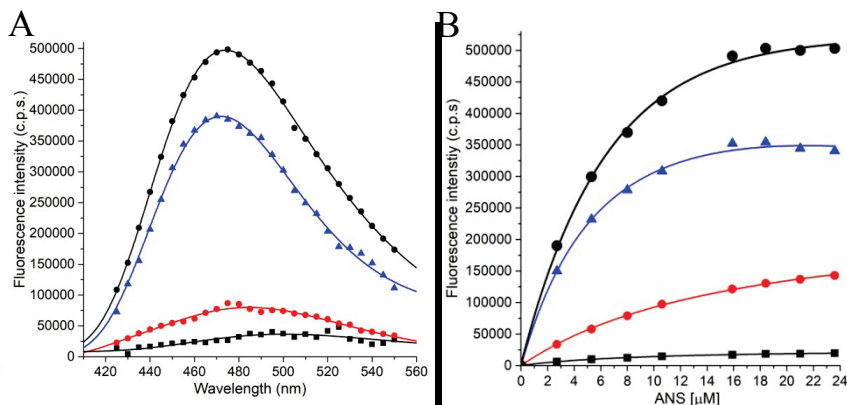


Figure 6. DAS spectra of sfNP-ANS complex and deconvolution of ANS binding curve into fluorescence lifetime species. (A) black circles- steady-state fluorescence spectra of sfNP(1.5 μM)-ANS(28.0 μM) complex; blue triangles, red circles and black squares are DAS spectrum of ANS for 14.8 ns, 4.2 ns and 0.8 ns species, respectively. (B) ANS to sfNP binding followed by fluorescence intensity. Black circles are data from steady-state fluorescence. Blue triangles, red circles and black squares are binding data for 14.8 ns, 4.2 ns and 0.8 ns species, respectively

ANS is a widely used chromophore to characterize hydrophobic patches and/or binding sites of proteins. ANS show very low fluorescence intensity with a lifetime of about 0.2 ns. A tremendous increase in fluorescence and lifetimes are observed upon binding to hydrophobic patches, the values of which depend on the dynamics of ANS and the hydrations of the sites [21,22].

The emission of ANS-SFNP complexes shows a maximum of about 474.0 nm indicative of a hydrophobic environment for ANS (Fig. 3). The emission of ANS-SFNP could be characterized by three-lifetime components 0.8 ns, 4.2 ns and 14.8 ns, each of which is characterized by individual DAS λ_{max} . To reveal the binding properties of these sites, a steady-state binding curve of ANS were deconvoluted into lifetime components (Fig. 4). The dissociation constants for ANS binding sites in SFNP were found to be $5.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $8.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ and $15.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ associated with 14.8 ns, 4.2 ns and 0.8 ns, respectively. Overall, data indicate that SFNP possesses binding sites that have distinct binding affinities, and hydrophobicity. Thus, SFNP has the potential for the delivery of drugs with various hydrophobicities.

References:

- Hong S., Choi D.W., Kim H.N., Park C.G., Lee W., Park H.H. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 2020, vol. 12, no. 7, pp. 1-28.
- Hawkins M.J., Soon-Shiong P., Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008., vol. 60, no. 8, pp. 876-885.
- Weber C., Coester C., Kreuter J., Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2000, vol. 194, no. 1, pp. 91-102.
- Shao Z., Vollrath F. Surprising strength of silkworm silk. *Nature*, 2002, vol. 418, no. 6899, p. 741.
- Suzuki Y., Yamazaki T., Aoki A., Shindo H., Asakura T. NMR study of the structures of repeated sequences, GAGXGA (X = S, Y, V), in bombyx mori liquid silk. *Biomacromolecules*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 104-112.
- Gasymov O.K., Mammedzade A.M., Bakhishova M.J., Guliyeva A.J., Ragona L., Molinari H. Sodium fusidate prevents protein aggregation of silk fibroin and offers new perspectives for human lens material disaggregation. *Biophys. Chem.*, 2021, vol. 279, p. 106680.
- Zare-Zardini H., Vojdani Nejad Yazdi S., Zandian A., Zare F., Miresmaeili S.M., Dehghan-Manshadi M., Fesahat F. Synthesis, characterization, and biological evaluation of doxorubicin containing silk fibroin micro- and nanoparticles. *J. Indian Chem. Soc., Elsevier Ltd*, 2021, vol. 98, no. 10, p. 100161.
- Giannelli M., Guerrini A., Ballestri M., Posati T., Aluigi A., Zamboni R., Sotgiu G. Bioactive Keratin and Fibroin Nanoparticles: An Overview of Their Preparation Strategies. *Nanomaterials*, 2022, vol. 12, no. 9.
- Rockwood D.N., Preda R.C., Yucel T., Wang X., Lovett M.L., Kaplan D.L. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat Protoc.*, 2011, vol. 6, no. 10, pp. 1612-1631.
- Ragona L., Gasymov O., Guliyeva A.J., Aslanov R.B., Zanzoni S., Botta C., Molinari H. Rhodamine binds to silk fibroin and inhibits its self-aggregation. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2018, vol. 1866, no. 5-6, pp. 661-667.
- Zhang Y.-Q. Preparation of Silk Fibroin Nanoparticles and Enzyme-Entrapped Silk Fibroin Nanoparticles. *Bio-Protocol*, 2018, vol. 8, no. 24, pp. 20-24.
- Whitmore L., Wallace B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. Web Server, pp. W668-W673.

13. Whitmore L., Wallace B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 2008, vol. 89, no. 5, pp. 392-400.
14. Compton L.A., Johnson W.C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, 1986, vol. 155, no. 1, pp. 155-167.
15. Manavalan P., Johnson W.C. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 167, no. 1, pp. 76-85.
16. Antimonova O.I., Grudinina N.A., Egorov V.V., Polyakov D.S., Il'in V.V., Shavlovskii M.M. Interaction of the dye Congo red with fibrils of lysozyme, beta2-microglobulin, and transthyretin. *Cell tissue biol.*, 2016, vol. 10, no. 6, pp. 468-475.
17. Gasymov O.K., Abduragimov A.R., Glasgow B.J. Evidence for internal and external binding sites on human tear lipocalin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, vol. 468, no. 1, pp. 15-21.
18. Howie A.J., Brewer D.B. Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron.*, 2009, vol. 40, no. 3, pp. 285-301.
19. Burstein E., Vedenkina N., Ivkova M. Tryptophan Residues in Protein Molecules. *Photochem. Photobiol.*, 1973, vol. 18, pp. 263-279.
20. Gasymov O.K., Abduragimov A.R., Yusifov T.N., Glasgow B.J. Site-Directed Tryptophan Fluorescence Reveals the Solution Structure of Tear Lipocalin: Evidence for Features That Confer Promiscuity in Ligand Binding. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, no. 49, pp. 14754-14762.
21. Gasymov O.K., Glasgow B.J. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, vol. 1774, no. 3, pp. 403-411.
22. Guliyeva A.J., Gasymov O.K. ANS fluorescence: Potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. *Biochem. Biophys. Reports*, 2020, vol. 24, no. August, p. 100843.

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Рыбинская Т.В., Портнягина О.Ю., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Ким Н.Ю.,
Чингизова Е.А., Менчинская Е.С., Глазунов В.П., Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 69002, РФ, e-mail: tati2099.k@gmail.com
Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0514

Аннотация. В работе рассматривается процесс образования и свойства амилоидоподобных агрегатов неспецифических поринов (OmpC и OmpF) наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* в кислой среде (pH 4,5) при повышенной температуре. Динамику формирования амилоидоподобных агрегатов поринов контролировали через две и четыре недели инкубации (при 42 °С) и через 3-5 ч (при 90 °С) с помощью окраски образцов амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т, анализа спектров кругового дихроизма в дальней УФ-области, ИК-спектроскопии и конфокальной микроскопии. Обнаружено, что в случае OmpC порина инкубация в мягких условиях (42 °С) приводит к обратимому накоплению α -спиральных участков в полипептидной цепи белка. В пространственной структуре OmpF порина в этих условиях существенных изменений не наблюдается, однако в жестких условиях (95 °С) происходит формирование амилоидоподобных агрегатов, которые отличаются повышенным содержанием структуры β -листа. С помощью ИК-спектроскопии показано, что конформационная перестройка в молекуле OmpF порина связана с изменением количества и качества элементов β -структуры. По данным конфокальной микроскопии агрегаты исследованных неспецифических поринов можно рассматривать как промежуточные продукты амилоидогенного пути – олигомеры. Согласно литературным данным эти олигомеры, предшествующие образованию зрелых фибрилл, обладают мембранолитическими и цитотоксическими свойствами. Для прогретых образцов исследованных поринов при реконструкции в бислойные липидные мембраны не было обнаружено ни порообразующей, ни мембранолитической активности. По отношению к клеткам нейробластомы мыши Neuro-2a CCL-131TM полученные после инкубации агрегаты OmpF и OmpC поринов обладали более высокой токсичностью по сравнению с исходными образцами белков.

Ключевые слова: порины грамотрицательных бактерий, олигомеры, амилоидные фибриллы, взаимодействие с тиофлавином Т, цитотоксическая активность.

В настоящее время известно, что в природе широко распространены так называемые внутренне неупорядоченные белки (Intrinsically disordered proteins, IDPs) и белки с внутренне неупорядоченными белковыми регионами (Intrinsically disordered protein regions, IDPRs), которые выполняют в живой клетке самые разнообразные функции [1]. При определенных условиях IDP/IDPRs способны образовывать амилоидоподобные структуры. Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты с упорядоченной пространственной структурой, называемой «кросс- β ». В природе IDPs/IDPRs широко распространены и осуществляют ряд основополагающих функций, в том числе в живой клетке. Например, внутренняя неупорядоченность является общей чертой многих белков, биологическое действие которых связано с передачей сигналов, регулированием и распознаванием. Репертуар амилоидов включает не только десятки патологических амилоидов млекопитающих, ассоциированных с целым рядом заболеваний, но и многочисленные микробные амилоиды. Различные виды патогенных бактерий используют белки в амилоидной форме для взаимодействия с эукариотическими организмами. До 2014 года в литературе встречались данные о механизмах и кинетике формирования амилоидов из водорастворимых глобулярных белков. В последние годы активно проводятся исследования пространственной организации и свойств амилоидов, сформированных из мембранных белков. В настоящей работе были исследованы динамика образования и некоторые биологические свойства амилоидоподобных агрегатов поринов OmpC (YpOmpC) и OmpF (YpOmpF) наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*.

Ранее в результате многолетних исследований структурных превращений поринов псевдотуберкулезного микроба под действием денатурирующих факторов, а также изучения их функциональных и биологических свойств был сделан однозначный вывод о том, что они обладают всеми характерными свойствами белков, содержащих в своей последовательности IDPRs, т.е. обладают конформационной пластичностью и мультифункциональностью. С помощью биоинформатических web ресурсов, таких как D²P² (<http://d2p2.pro/>) [2] и ODINPred (<https://stprotein.chem.au.dk/odinpred>) [3] был проведен анализ первичной структуры YpOmpF и YpOmpC поринов. Проанализировано количественное содержание амилоидогенных участков в аминокислотной последовательности рассматриваемых белков и с помощью их теоретических моделей определена локализация IDPRs [4]. Обнаружено, что значительное количество IDPRs находится в области наружных петель обоих поринов, напротив, β -тяжи, образующие β -баррель, таких участков не содержат, но существенно различаются по степени своей конформационной гибкости. Результаты исследования позволили классифицировать OmpF и OmpC порины псевдотуберкулезного микроба, как умеренно неупорядоченные белки.

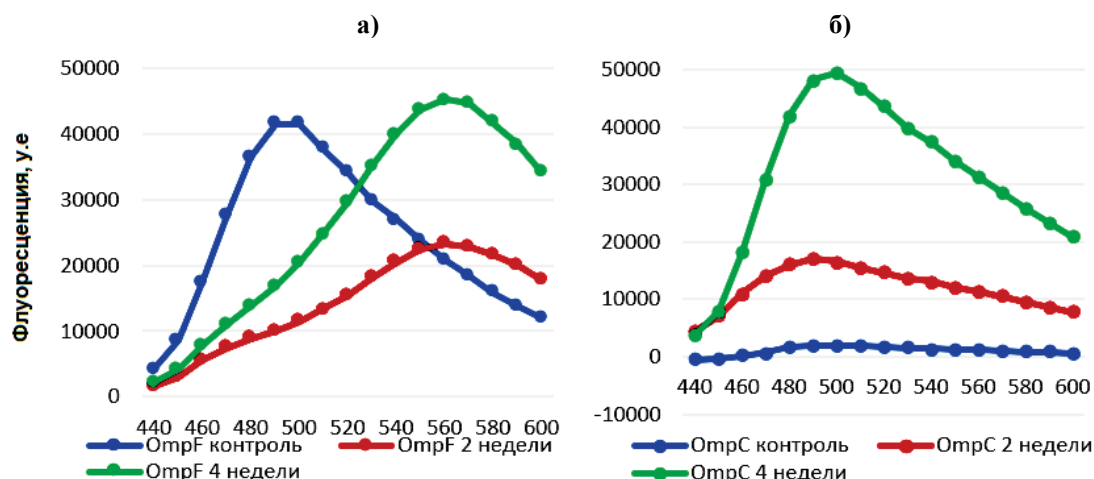


Рисунок 1. Взаимодействие неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* с флуоресцентным зондом тιοфлавином Т. Спектры флуоресценции тιοфлавина Т при связывании: с контрольными образцами белков и с белками, прогетыми в течение 2-х и 4-х недель при 42 °С в фосфатно-цитратном буфере (рН 4,5): YpOmpF (а) и YpOmpC (б)

В результате анализа литературных данных были выбраны условия, при которых амилоидоподобные структуры белков формируются с наибольшей вероятностью [5,6]. Мы инкубировали образцы YpOmpF и YpOmpC поринов в течение 14-28 дней при 42 °С и рН 4,5 и 5 ч при 95 °С рН 4,5.

Наиболее распространенным методом определения присутствия амилоидных фибрилл в образце белка является взаимодействие их со специфическим красителем, тιοфлавином Т (ThT). Встраивание красителя в фибриллы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения и возрастанием коэффициента молярной экстинкции. Однако существует вероятность получения ложноположительного результата, обусловленного связыванием красителя с аморфными агрегатами или бактериями [7]. Порины, взятые для эксперимента, находились в растворе 0,25% ДСН, поэтому перед проведением реакции с ThT прогеты образцы белков были переведены в буфер без детергента с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-4, 30 кДа (Merck Millipore, США). Удаление детергента было необходимо, поскольку экспериментальным путем было установлено, что присутствие ДСН даже в очень низких концентрациях (0,0075%), существенно сдвигало положение максимума флуоресценции свободного ThT в длинноволновую область.

Как видно из данных, приведенных на рисунке, через 14 дней инкубации при 42 °С в случае YpOmpF наряду со сдвигом максимума флуоресценции в длинноволновую область происходило снижение интенсивности флуоресценции комплекса порин/краситель. Через 28 дней сдвиг максимума флуоресценции до 560 нм сохранялся, кроме того наблюдалось увеличение, почти в 2 раза, интенсивности флуоресценции.

В случае YpOmpC через 14 дней интенсивность флуоресценции комплекса красителя с порином увеличивалась более чем в 8,6 раза, однако без сдвига положения максимума флуоресценции. Через 28 дней наблюдалась дальнейшее увеличение интенсивности флуоресценции с незначительным длинноволновым сдвигом положения максимума спектра флуоресценции (рис. 1).

Таблица 1. Содержание элементов регулярной вторичной структуры OmpC и OmpF поринов *Y. pseudotuberculosis* в фосфатно-цитратном буферном растворе (рН 4,5) после инкубации в течение 2-х и 4-х недель при 42 °С

№ п/п	Образец	α-спираль	β-структура
1.	OmpF контроль	22,1	21
2.	OmpF 2 недели	19,2	24,8
3.	OmpF 4 недели	19,3	24,2
4.	OmpC контроль	6,3	37,5
5.	OmpC 2 недели	18,9	24,5
6.	OmpC 4 недели	5,8	37,7

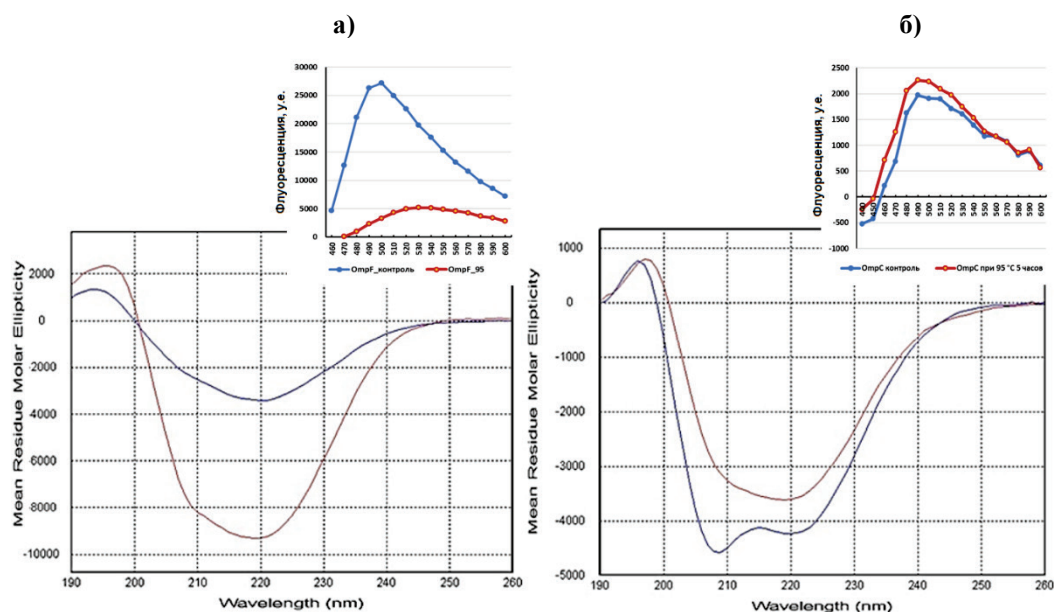


Рисунок 2. Спектры КД в пептидной области YpOmpF (а) и YpOmpC (б) поринов после прогрева в течение 5 ч при 95 °С и рН 4,5 (синяя линия). Красная линия - контроль. На врезке: взаимодействие YpOmpF и YpOmpC поринов, с флуоресцентным зондом тиофлавином Т: спектры флуоресценции тиофлавина Т при связывании: с контрольными образцами белков (синяя линия), с белками после прогрева в течение 5 ч при 95 °С и рН 4,5 (красная линия)

Важную роль в исследовании пространственной структуры белка играет метод кругового дихроизма (КД). В частности, этот метод используют для определения изменений во вторичной структуре белка, происходящих под действием температуры, рН среды или различных денатурантов. Как видно из данных таблицы 1, инкубация поринов в мягких условиях (42 °С) не привела к значительному увеличению относительного содержания β -структуры в молекуле белков даже к концу срока наблюдения. Заметные конформационные перестройки были характерны только в случае YpOmpC белка: через две недели наблюдалось существенное увеличение α -спиральных участков за счет уменьшения содержания структуры β -листа. В случае YpOmpF таких резких изменений в соотношении элементов регулярной вторичной структуры белка не наблюдалось. Предположительно, такой результат мог быть обусловлен конформацией исходного образца данного образца белка: он содержал более высокое содержание α -спирали по сравнению с OmpC.

Нагревание исходных образцов поринов при 95 °С в кислой среде в течение 5 привело к различным эффектам. Как показали результаты взаимодействия продуктов инкубации поринов в этих условиях с тиофлавином Т, в случае YpOmpF максимум флуоресценции сместился в длинноволновую область, но при этом существенно, в 9 раз, падала интенсивность излучения (рис. 2). В случае YpOmpC наблюдалась незначительное увеличение интенсивности излучения, но не происходило смещения максимума спектра (рис. 2). Оба эти изменения, согласно литературным данным, могут служить свидетельством изменений в пространственной структуре белков, характерных для амилоидоподобных структур.

Действительно, как видно из данных рисунка 2 и таблицы 2 в молекуле OmpF наблюдается увеличение содержания β -структуры почти в 2 раза и резкое уменьшение количества α -спиральных участков, в 3,5 раза. Что же касается OmpC, нагревание этого образца белка в кислых условиях при 95 °С привело к противоположным результатам (табл. 2, рис. 2). Наблюдалось уменьшение содержания β -структуры и увеличение более, чем в 2 раза, количества α -спирали. Следует заметить, что при всех условиях инкубации изменения на уровне вторичной структуры белков наблюдались только для элементов регулярной вторичной структуры, содержание β -изгибов и неупорядоченной структуры (random coil) практически не изменялось.

Инфракрасная спектроскопия традиционно используется для обнаружения наличия в молекуле белка вторичной кросс- β -структуры. С помощью ИК-спектроскопии показано, что молекулярная структура амилоидных фибрилл в целом отличается от β -слоев нативных белков [8]. Так, при исследовании белка литостатина (lithostathine, «белок панкреатических камней»), который собирается в неамилоидные фибриллы путем ассоциации субъединиц глобулярного белка [9]. Было установлено, что простая олигомеризация не приводит к существенным изменениям в области полосы амида I. Максимальное поглощение амилоидных фибрилл и нативных белков, имеющих конформацию β -слоев, наблюдается в пределах двух характерных, хотя и частично перекрывающихся спектральных областей. Диапазон амилоидных фибрилл простирается от 1611 cm^{-1} до 1630 cm^{-1} , в то время как нативные белки, включающие β -листы, дают пики амида I, кластеризующиеся между 1630 cm^{-1} и 1643 cm^{-1} . Кроме того, существуют также различия в форме полосы амида I, заключающиеся в том, что нативные белки с β -складчатой структурой имеют более широкие максимумы. Агрегация приводит к превращению пика около 1630 cm^{-1} в более узкий пик, сдвинутый в сторону меньших волновых чисел,

Таблица 2. Содержание элементов регулярной вторичной структуры YrOmpC и YrOmpF поринов в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) после инкубации в течение 5 ч при 95 °C

№ п/п	Образец	α -спираль	β -структура
1.	OmpF контроль	20,0	26,7
2.	OmpF 5 ч, при 95 °C	4,1	42,0
3.	OmpC контроль	6,3	37,5
4.	OmpC 5 ч, при 95 °C	15,6	30,9

до 1627 см^{-1} и увеличению абсорбции. Эти изменения указывают на увеличение числа β -тяжей, составляющих β -лист и/или образование более сильных (т.е. более коротких) Н-связей [10,11], что характерно для чрезвычайно стабильной структуры, такой как фибриллы.

Нами были получены ИК спектры двух образцов YrOmpF порина (исходного и после прогрева при 95 °C в течение 5 ч). Для съемки ИК-спектров образцы белков предварительно высушивали до постоянного веса при пониженном давлении (2Торр) при комнатной температуре (25 °C). ИК спектры исследуемых образцов поринов в КВг регистрировали на спектрофотометре с Фурье-преобразованием Vector 22 (Bruker, Германия). Анализ полученных спектров показал, что обработка белка в достаточно жестких условиях приводит к увеличению относительного содержания полосы при 1630 см^{-1} (рис. 3), что свидетельствует о конформационных перестройках в молекуле порина, связанных с изменением количества и качества элементов β -структуры.

Известно, что состояния, которые временно возникают на пути сворачивания белков, относятся к кинетическим промежуточным продуктам. Из-за этой преходящей природы их сложно анализировать. Самыми ранними кинетическими промежуточными продуктами амилоидогенного пути являются олигомерные структуры, которые возникают как метастабильные состояния, способные преобразовываться в более термодинамически благоприятные конформации. При использовании тиофлавина Т амилоидные структуры хорошо визуализируются уже при малом увеличении микроскопа. С помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия) нами были получены изображения белковых агрегатов, образующихся в процессе инкубации поринов при 42 и 95 °C в течение различных промежутков времени (рис. 4).

Как видно из данных рисунка 4, в исследуемых образцах поринов были обнаружены окрашиваемые тиофлавином Т структуры, однако, не совсем типичные для амилоидов. Они не имели общей формы и линейного вида, как у зрелых фибрилл или протофибрилл, не встречалась также морфология кольцевых агрегатов. Учитывая это, мы охарактеризовали полученные агрегаты как ранние промежуточные продукты амилоидогенного пути – олигомеры.

Одной из характеристик, общих для большинства амилоидных олигомеров, является способность разрушать мембраны, и это, как полагают, является причиной их токсичности. Более того, в недавних работах ряда исследователей было высказано предположение, что токсичность амилоидогенных белков связана не столько с нерастворимыми фибриллами, сколько с префибриллярными олигомерными интермедиатами, которые возникают на ранних стадиях формирования фибрилл [12-15]. С помощью техники бислойных липидных мембран (БЛМ) мы проанализировали способность олигомеров YrOmpF и YrOmpC поринов, полученных после инкубации при 42 и 95 °C, формировать функциональные каналы в модельной эукариотической мембране, которая состояла из смеси липидов (сфингомиелин/1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/холестерин) в молярном соотношении 1:1:1. Липиды растворяли в смеси n-гептан: хлороформ в объемном соотношении 9:1, концентрация смеси для формирования БЛМ составила 10 мг/мл. Полученная модельная мембрана в целом обладала пониженным уровнем стабильности и повышенной склонностью к деградации.

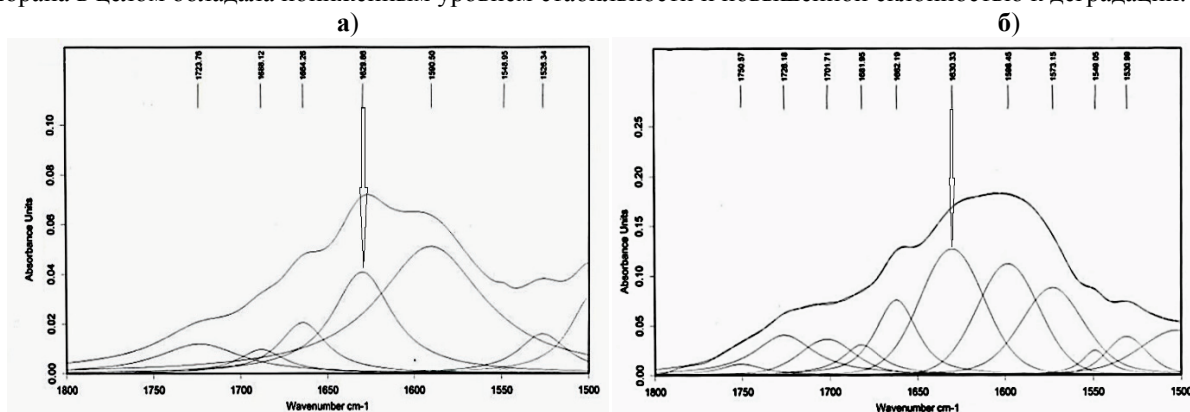


Рисунок 3. ИК-спектры (а) исходного YrOmpF порина и (б) после инкубации YrOmpF порина в течение 5 ч при 95 °C в фосфатно-цитратном буфере (pH 4,5)

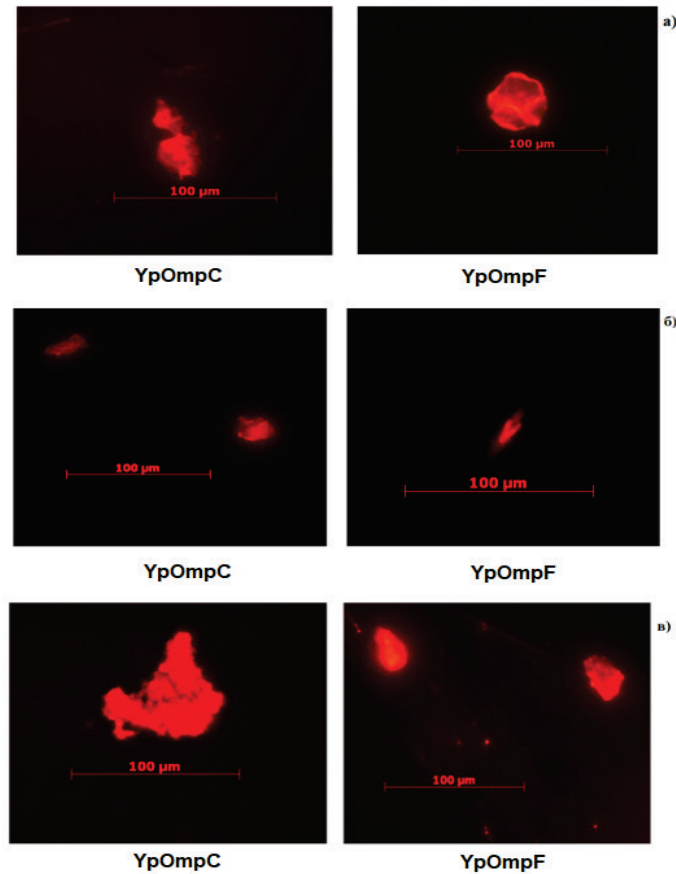


Рисунок 4. Флуоресцентное изображение YpOmpC и YpOmpF поринов окрашенных тиофлавиномТ после инкубации в течение: (а) 2-х недель при 42 °С; (б) 4-х недель при 42 °С и(в) 5 ч при 95 °С в фосфатно-цитратном буфере (рН 4,5). Изображения были получены с помощью микроскопа AXIOImager. A1 (Zeiss) объектив ECPlan-NEOFLUAR 40x/0,75

Контрольные образцы поринов (исходные YpOmpF и YpOmpC белки) в концентрации 80 нг/мл при добавлении в ячейку проявили порообразующую активность, характерную в целом для поринов граммотрицательных бактерий. При реконструкции в БЛМ прогретых образцов поринов не было обнаружено ни порообразующей, ни мембранолитической активности.

Известно, что различные полиморфы олигомеров могут различаться по своей биологической активности, что было продемонстрировано для разных образцов олигомеров из белка HupF-N [16]. В настоящее время

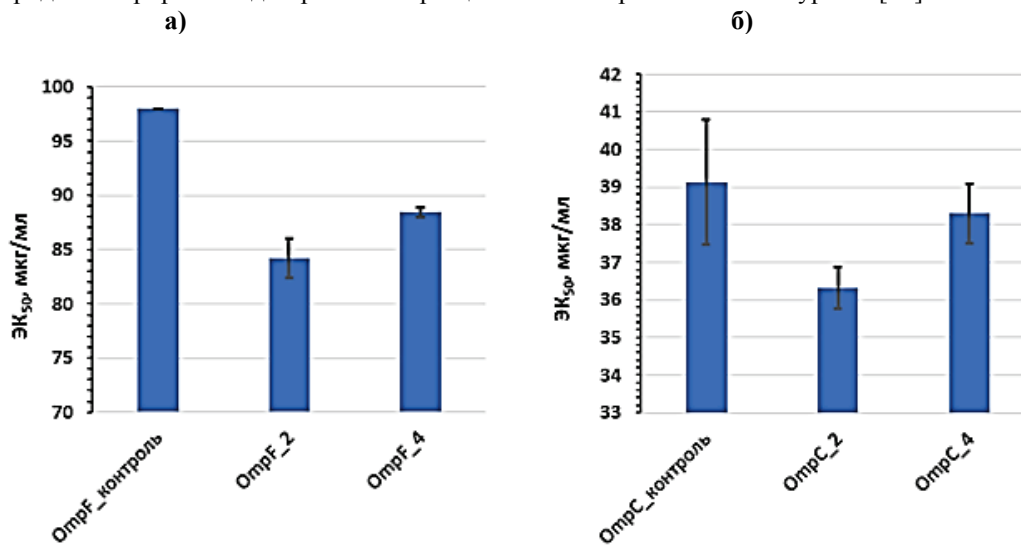


Рисунок 5. Цитотоксичность YpOmpF/YpOmpC поринов по отношению к культуре клеток млекопитающих (нейробластома мыши Neuro-2aCCL-131™ (ATCC)). Цитотоксическую активность поринов выражали через эффективную концентрацию (ЭК₅₀), при которой метаболическая активность клеток ингибируется на 50%. Долю мертвых клеток нормализовали в каждом случае относительно отрицательного контроля (ФСБ). Данные приведены как средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения

накопилось достаточно данных о том, что амилоидные фибриллы, сформированные из белков или пептидов, являются цитотоксическими для различных видов клеток. Так, протофибриллы и зрелые фибриллы лизоцима человека вызывают лизис и агрегацию эритроцитов [17]. Было отмечено также, что способность фибрилл лизоцима индуцировать гемолиз и агрегацию интактных эритроцитов возрастает по мере «старения» фибриллы. Мы исследовали цитотоксическую активность YpOmpF и YpOmpC поринов по отношению к культуре клеток неробластомы мыши Neuro-2aCCL-131TM (рис. 5). Основанием для выбора этой клеточной линии в качестве модели, послужили имеющиеся в литературе сведения о том, что OmpF порин *E. coli*, в эксперименте *in vivo*, вызывает нейродегенерацию клеток коры головного мозга мышей, действуя как амилоид [5].

Клетки нейробластомы инкубировали с различными концентрациями поринов в течение 24 ч. Полученные данные свидетельствуют о том, что в случае YpOmpF порина прогрев белка в течение 2-х (YpOmpF_2) и 4-х (YpOmpF_4) недель при 42 °C и pH 4,5 увеличивает его цитотоксическую активность: значения ЭК₅₀ для образцов YpOmpF_2 и YpOmpF_4 были существенно меньше, по сравнению таковыми для исходного белка (рис. 5). Цитотоксическая активность исходного образца OmpC порина по сравнению с YpOmpF была более чем в 2,5 раза выше. Для этого типа неспецифических поринов псевдотуберкулезного микроба достоверное уменьшение цитотоксической активности было отмечено только для OmpC_2. Таким образом, для обоих видов поринов наблюдалась общая тенденция изменения активности, что, возможно, свидетельствует о том, что через 2 недели инкубации в достаточно мягких условиях, неспецифические порины действительно формируют промежуточные олигомерные агрегаты, отличающиеся более высокой токсичностью по отношению к клеткам млекопитающих по сравнению с исходными образцами белков. Учитывая то, что прогретые YpOmpF и YpOmpC не проявляли функциональной активности в искусственной мембране, можно предположить, что реализация цитотоксической активности поринов в данном случае осуществляется по механизму, не связанному с нарушением целостности мембраны эукариотической клетки.

В результате проведенного исследования показано, что в процессе формирования амилоидоподобных агрегатов двумя близкородственными неспецифическими поринами (OmpF и OmpC) из НМУ *pseudotuberculosis* конформационные изменения в структуре этих белков происходят по-разному. Инкубация в кислой среде (pH 4,5) в мягких условиях при 42 °C в случае YpOmpC порина приводит к обратимому накоплению α -спиральных участков в полипептидной цепи белка. В пространственной структуре YpOmpF порина существенных изменений в этих условиях не наблюдается, однако инкубация OmpF порина в кислой среде при 95 °C приводит к формированию олигомеров, которые отличаются повышенным содержанием и изменением качества структуры β -листа. В исследованных условиях агрегаты OmpC порина в повышенном содержании β -структуры не были обнаружены. По данным конфокальной микроскопии полученные агрегаты исследованных неспецифических поринов не содержали фибриллярных структур. Тем не менее, поскольку продукты инкубации как YpOmpF, так и YpOmpC поринов взаимодействовали со специфическим красителем тирофлавином Т и обладали более высокой токсичностью по отношению к клеткам нейробластомы мыши по сравнению с исходными образцами белков, их можно рассматривать как промежуточные агрегаты амилоидогенного пути – олигомеры.

Список литературы / References:

1. Uversky V. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2013, vol. 1834, no. 5, pp. 932-951, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008.
2. Oates M.E., Romero P., Ishida T., Ghalwash M., Mizianty M.J., Xue B., Dosztanyi S., Uversky V.N., Obradovic Z., Kurgan L., Dunker A.K., Gough J. D2P2: Database of Disordered Protein Predictions. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. D1, pp. D508-D516, doi: 10.1093/nar/gks1226.
3. Dass R., Mulder F.A.A., Nielsen J.T. ODiNPred: comprehensive prediction of protein order and disorder. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, p. 14780, doi: 10.1038/s41598-020-71716-1.
4. Novikova O.D., Uversky V.N., Zelepuga E.A. Non-specific porins of Gram-negative bacteria as proteins containing intrinsically disordered regions with amyloidogenic potential. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2021, vol. 183, no. 3, doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.06.012.
5. Sahaya Rajan J.J., Chinnappan Santiago T., Singaravel R., Ignacimuthu S. Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid. *Biotechnol. Lett.*, 2016, vol. 38, doi: 10.1007/s10529-015-2025-8.
6. Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I. et al. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, doi: 10.3390/biom9110694.
7. Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 2004, vol. 34, no. 1, pp. 154-160, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.012.
8. Zandomenighi G., Krebs M.R.H., Mccammon M.G., Fändrich M. FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, 2004, vol. 13, doi: 10.1110/ps.041024904.
9. Laurine E., Gregoire C., Fändrich M., Engemann S., Marchal S., Thion L., Mohr M., Monsarrat B., Michel B., Dobson C.M. Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase K-resistant deposits in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, doi: 10.1074/jbc.M306767200.
10. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.-M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *In Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes; Springer: New York, NY, USA*, 1994, vol. 23, doi: 10.1007/978-1-4615-1863-1_10.

11. Dobson C.M. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, vol. 426, doi: 10.1038/nature02261.
12. Lashuel H.A., LaBrenz S.R., Woo L., Serpell L.C. Kelly J.W. Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science. *Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, doi: 10.1021/ja9937831.
13. Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condron, M.M., Axelman K., Forsell C., Stenh C., Luthman J., Teplow D. B., Younkin S. G., Naslund J., Lannfelt L. The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.*, 2001, vol. 4, doi: 10.1038/nn0901-887.
14. Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Massimo S. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 2002, vol. 416, doi: 10.1038/416507a.
15. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 2002, vol. 416, doi: 10.1038/416535a.
16. Campioni S., Mannini B., Zampagni M., Pensalfini A., Parrini C., Evangelisti E. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat. Chem. Biol.*, 2010, vol. 6, doi: 10.1038/nchembio.283.
17. Patel P., Parmar K., Patel D., Kumar S., Trivedi M., Das M. Inhibition of amyloid fibril formation of lysozyme by ascorbic acid and a probable mechanism of action. *Int. Journal Biol. Macromol.*, 2018, vol. 114, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.152.

STUDY ON THE AMYLOIDOGENIC POTENTIAL OF NON-SPECIFIC *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* PORINS

Rybinskaya T.V., Portnyagina O.Yu., Zelepuga E.A., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Chingizova E.A.,
Menchinskaya E.S., Glazunov V.P., Chistyulin D.K., Novikova O.D.

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
100-let Vladivostoku ave. 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: tati2099.k@gmail.com

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0514

Abstract. The paper considers the process of formation and properties of amyloid-like aggregates of outer membrane non-specific porins (OmpC and OmpF) of the gram-negative bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* in an acidic medium (pH 4.5) at elevated temperature. The dynamics of the formation of amyloid-like aggregates of porins was monitored after two and four weeks of incubation (at 42 °C) and after 3-5 hours (at 90 °C) by staining the samples with amyloid-specific dye thioflavin T, analyzing the spectra of circular dichroism in the far UV region, IR -spectroscopy and confocal microscopy. It was found that in the case of porin OmpC, incubation under mild conditions (42°C) leads to a reversible accumulation of α -helical regions in the protein polypeptide chain. No significant changes are observed in the spatial structure of OmpF porin under these conditions, however, under harsh conditions (95 °C) amyloid-like aggregates are formed, which are characterized by an increased content of the β -sheet structure. Using IR spectroscopy, it was shown that the conformational rearrangement in the molecule of OmpF porin is associated with a change in the quantity and quality of elements of the β -structure. According to confocal microscopy, the aggregates of the studied non-specific porins can be considered as intermediate products of the amyloidogenic pathway - oligomers. According to the literature data, these oligomers, which precede the formation of mature fibrils, have membranolytic and cytotoxic properties. For heated samples of the studied porins during reconstitution into bilayer lipid membranes, neither pore-forming nor membranolytic activity was detected. With respect to Neuro-2a CCL-131TM mouse neuroblastoma cells, the aggregates of OmpF and OmpC porins obtained after incubation had a higher toxicity compared to the initial protein samples.

Key words: porins of gram-negative bacteria, oligomers, amyloid fibrils, interaction with thioflavin T, cytotoxic activity.

ЭФФЕКТЫ КАРДИОТОКСИНОВ КОБРЫ НА ПАПИЛЛЯРНОЙ МЫШЦЕ И СЕРДЦЕ КРЫСЫ, ПЕРФУЗИРУЕМОМ ПО ЛАНГЕНДОРФУ, НЕ СВЯЗАНЫ С ВЫБРОСОМ АДРЕНАЛИНА

Аверин А.С.¹, Тюрин Ф.В.², Самодурова К.В.³, Старков В.Г.⁴, Андреева Т.В.⁴, Уткин Ю.Н.⁴

¹ Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: averinas82@gmail.com

² Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого
пр. Ленина, 125, г. Тула, 300026, РФ

³ Санкт-Петербургский государственный технологический институт
Московский пр., 26, г. Санкт-Петербург, 190013, РФ

⁴ 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 15.07.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0515

Аннотация. При исследовании действия кардиотоксинов кобры на миокардиальную ткань оценивалась как сократимость правого желудочка (папиллярная мышца), так и левого (изоволюмическая регистрация пульсового давления в левом желудочке при перфузии сердца по Лангендорфу). На папиллярной мышце оба токсина в концентрации 5 мкг/мл, вызывали краткосрочный рост силы сокращения до $200 \pm 25\%$ и $171 \pm 15\%$ для КТ-1 и КТ-2, соответственно, в точке максимума эффекта. При этом для КТ-1 и КТ-2 время достижения максимума сокращения (ВДМ) увеличивалось с 104 ± 2 до 111 ± 2 и с 96 ± 2 до 104 ± 5 мс, время расслабления до 50% (BP50%) с 64 ± 4 до 70 ± 6 и с 64 ± 6 до 69 ± 7 мс, время расслабления до 95% (BP95%) с 163 ± 10 до 190 ± 22 и с 148 ± 16 до 155 ± 20 мс, соответственно. Это существенно отличается от положительного инотропного эффекта β -адреномиметика изопротеренола ($170 \pm 31\%$) который вызывает ускорение ВДМ со 106 ± 5 до 89 ± 4 мс, BP50% с 58 ± 6 до 43 ± 4 мс и BP95% с 145 ± 15 до 90 ± 14 мс. При воздействии кардиотоксинов на целое сердце также наблюдался рост силы сокращения, который сменялся ее подавлением и контрактурой, в отличие изопротеренола, который вызывал устойчивый рост сократимости, сопряженный с увеличением частоты сердечных сокращений. Предварительная обработка папиллярных мышц β -блокатором пропранололом (10 мкМ), не препятствовала развитию эффектов кардиотоксинов, но полностью блокировала эффекты изопротеренола. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что временный рост сократимости при действии кардиотоксинов не связан с выбросом эндогенного адреналина, а скорее обусловлен изменениями кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах.

Ключевые слова: кардиотоксины, папиллярная мышца, перфузия сердца по Лангендорфу, положительный инотропный эффект.

Кардиотоксины яда кобр представляют собой группу трехпетельных токсинов, общим свойством которых является прямое взаимодействие с клеточной мембраной, ведущее к образованию ионной поры, деполяризации, кальциевой перегрузке и как следствие гибели клетки. Нами проведено исследование кардиотоксинов 1 (КТ-1) и 2 (КТ-2) яда кобры *Naja oxiana* и показано, что КТ-2 заметно превосходит по своей активности КТ-1 при воздействии на препараты папиллярной мышцы и кольца грудной аорты крысы [1], а также на сердце крысы, перфузируемое по Лангендорфу [2]. КТ-1 и КТ-2 подобно другим кардиотоксинам давали временное увеличение силы сокращения [3,4]. Следует отметить, что компоненты животных ядов могут приводить к положительному инотропному эффекту, однако механизмы опосредующие данный эффект могут быть различными, включая взаимодействие с рецепторами [5] и стимулирование выброса эндогенного норадреналина [6]. Также потенциально к положительному инотропному эффекту может приводить блокирование K_v белками семейства CRISP [7,8] и изменение Ca гомеостаза в результате прямого воздействия кардиотоксинов [1]. Поскольку из данных литературы известно что кардиотоксины вызывают изменение уровня внутриклеточного Ca [3] и в тоже время могут стимулировать выброс сигнальных молекул некоторыми типами клеток [9], целью данного исследования явилось установление наличия связи временного роста сократимости при воздействии кардиотоксинов с выбросом эндогенного адреналина в ткани миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили (в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, 1986, 86/609/ЕЕС) на сердцах крысы линии Vistar весом 200-250г. Животных анестезировали диэтиловым эфиром. Сердце быстро извлекалось из грудной клетки. Далее осуществлялось выделение папиллярных мышц, либо подключение сердца к стенду для проведения экспериментов с перфузией по Лангендорфу с гидростатическим давлением 70 мм. рт. ст.

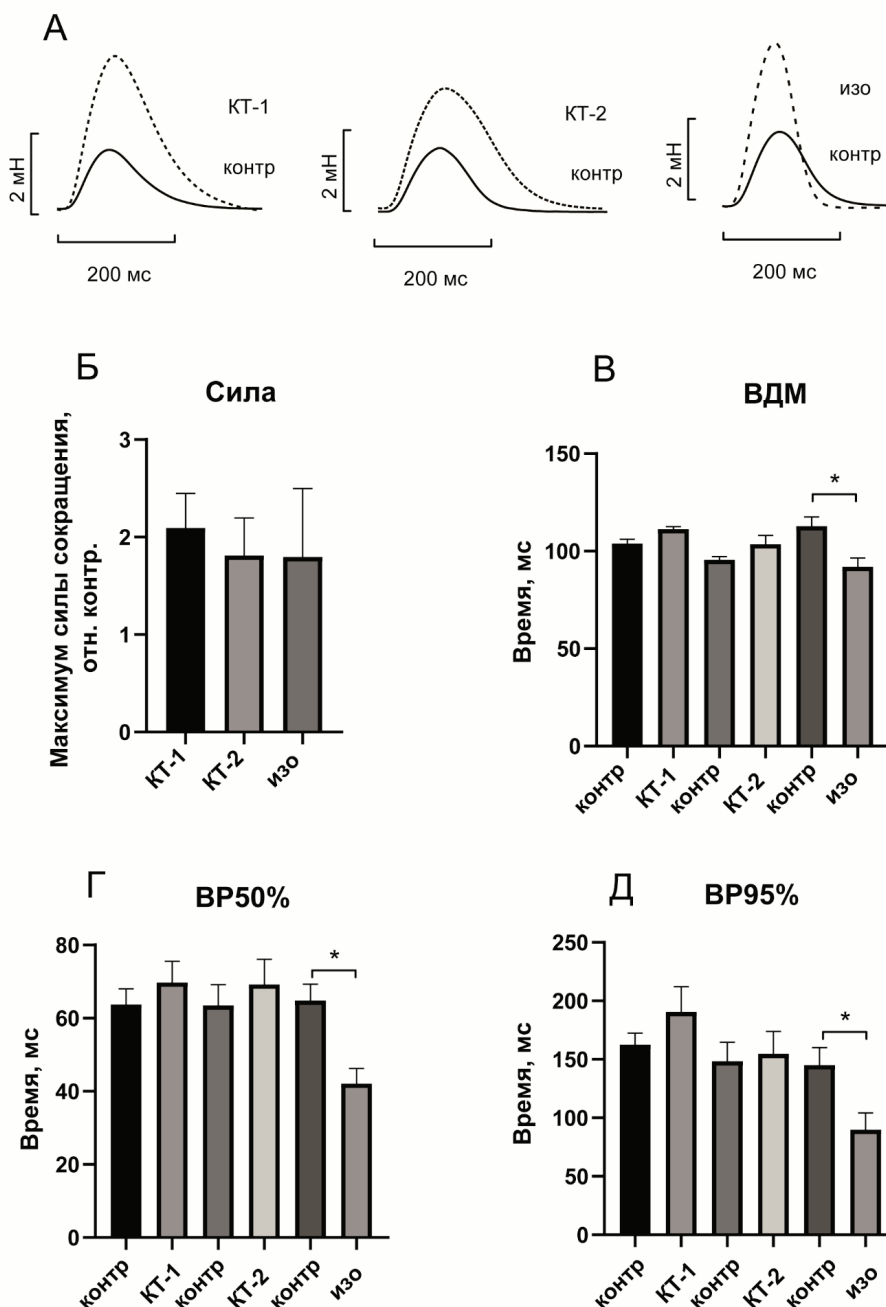


Рисунок 1. Влияние КТ-1, КТ-2 и изопротеренола на силу и временные характеристики сокращения папиллярной мышцы. А - примеры оригинальных записей сокращений в контроле (сплошная линия) и в точке максимального развития положительного инотропного эффекта (пунктирная линия). Б - максимальная величина роста силы сокращений относительно контроля. В, Г, Д - временные параметры сокращения, достоверными отличия были только группе экспериментов с изопротеренолом. Концентрация КТ-1 и КТ-2 - 5мкг/мл, изопротеренола - 1мкМ. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего (*-достоверное отличие от контроля $p < 0,05$)

Механическую активность папиллярных мышц регистрировали с помощью механотрона 6Х-2М. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами с напряжением 5 В, длительностью 5 мс, силой тока в 2 раза превышающую пороговую и частотой 0,3 Гц в течение 1 часа для стабилизации силы сокращения. Анализировалась сила сокращения, время достижения максимума сокращения (ВДМ), время расслабления до 50% (BP50%), время расслабления до 95% (BP95%).

Для измерения внутрижелудочкового давления в левый желудочек вставлялся небольшой латексный баллончик, соединенный катетером с датчиком давления PhysExp (Cardioprotect Ltd., Санкт-Петербург). Температура поддерживалась на уровне $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Использовался раствор Тироде следующего состава (мМ): 150 Na^+ ; $4,0 \text{ K}^+$; $1,8 \text{ Ca}^{2+}$; $1,0 \text{ Mg}^{2+}$; $12,0 \text{ HCO}_3^-$; $1,8 \text{ HPO}_4^-$; $148,4 \text{ Cl}^-$ и $11,0$ глюкозы (pH=7,4). Раствор аэрировали газовой смесью: O_2 (95%) + CO_2 (5%). Перед исследованием активности токсинов сердца проходили 30 минутный период стабилизации.

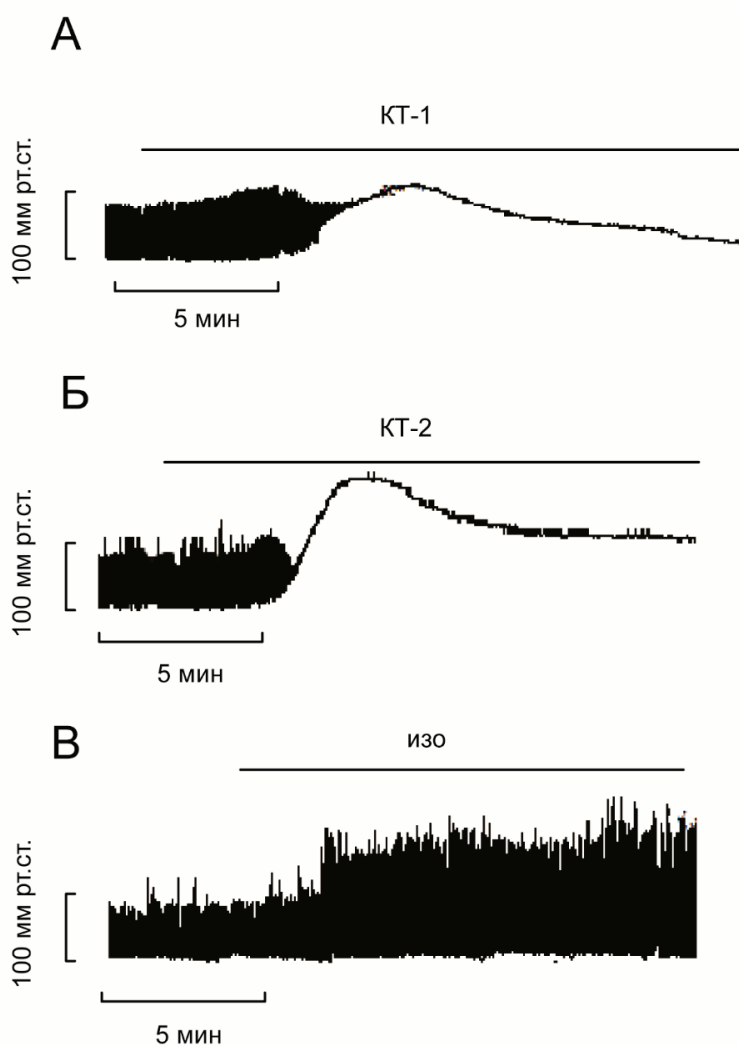


Рисунок 2. Влияние КТ-1, КТ-2 и изопротеренола на сократительную активность левого желудочка при ретроградной перфузии по Лангендорфу. Приведены примеры оригинальных записей эффектов КТ-1 (А), КТ-2 (Б) и изопротеренола (В). Концентрация КТ-1 и КТ-2 - 5мкг/мл, изопротеренола - 1мкМ

Кардиотоксины выделяли из яда кобры *Naja oxiana* как описано ранее [1]. Кардиотоксины либо изопротеренол добавляли в перфузионный раствор сразу после периода адаптации, либо после 30 минут предварительной обработки пропранололом.

Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро-Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента (по уровню значимости $p < 0,05$). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рисунка 1 при воздействии на папиллярную мышцу оба токсина в концентрации 5 мкг/мл, вызывали краткосрочный рост сократимости до $200 \pm 25\%$ и $171 \pm 15\%$ для КТ-1 и КТ-2 соответственно в точке максимума эффекта (рис. 1А, Б). β -адреносиметик изопротеренол в концентрации 1 мкМ оказывал схожий по величине эффект в $170 \pm 31\%$ (рис. 1А, Б). При этом для КТ-1 и КТ-2 время достижения максимума сокращения (ВДМ) увеличивалось с 104 ± 2 до 111 ± 2 и с 96 ± 2 до 104 ± 5 мс (рис. 1В), время расслабления до 50% (ВР50%) с 64 ± 4 до 70 ± 6 и с 64 ± 6 до 69 ± 7 мс (рис. 1Г); время расслабления до 95% (ВР95%) с 163 ± 10 до 190 ± 22 и с 148 ± 16 до 155 ± 20 мс (рис. 1Д), соответственно, что существенно отличается от эффекта изопротеренола, который вызывает ускорение ВДМ со 106 ± 5 до 89 ± 4 мс, ВР50% с 58 ± 6 до 43 ± 4 мс и ВР95% с 145 ± 15 до 90 ± 14 мс. Известно, что большую часть адренорецепторов в сердце составляет β подтип, активация которого ведет к положительному инотропному и хронотропному эффектам, а также к отрицательному луситропному эффекту [10]. Поскольку в нашей работе частота сокращений задается стимуляцией, то можно сопоставить эффекты по силе и временным параметрам сокращения. Отсутствие ускорения кинетики сокращения свидетельствует в пользу того, что в данном случае адренорецепторный путь не задействован. Альтернативной причиной роста сократимости может

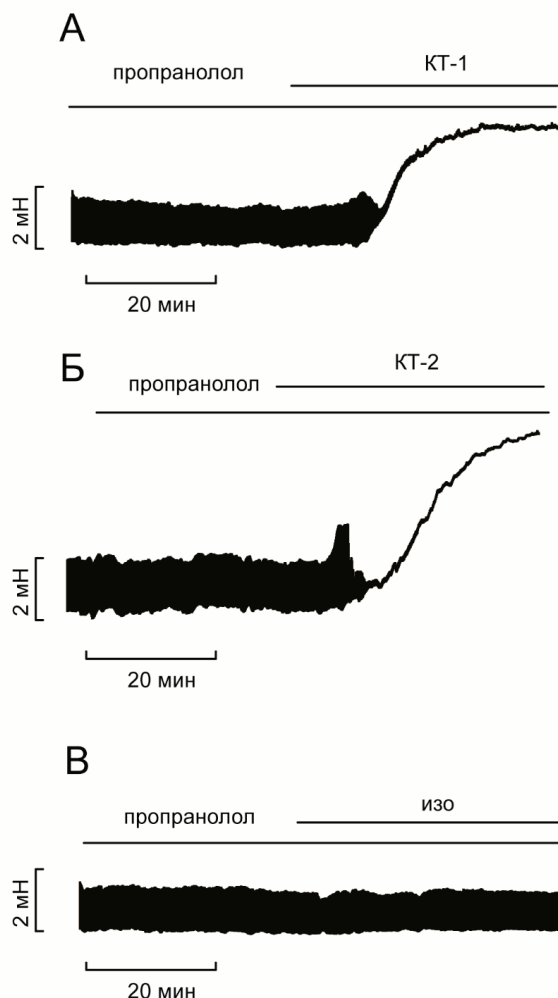


Рисунок 3. Влияние β -блокатора пропранолола на увеличение сократимости папиллярной мышцы правого желудочка, вызванное кардиотоксинами или изопроterenолом. В качестве примера приведены оригинальные записи эффектов КТ-1 (А), КТ-2 (Б) и изопроterenолом (В). Концентрация КТ-1 и КТ-2 – 5мкг/мл, изопроterenолом – 1мкМ, пропранолола – 10мкМ

служить увеличение внутриклеточного Na^+ [11,12]. Ранее было показано, что в этом случае рост силы сокращения сопровождается увеличением его длительности [13], и это вполне согласуется с полученными нами данными.

При воздействии КТ-1 (рис. 2А) и КТ-2 (рис. 2Б) на целое сердце также наблюдался рост пульсового давления, который сменялся его подавлением и контрактурой, в отличие изопроterenолом (рис. 2В), который вызывал устойчивый рост данного параметра, сопряженный с увеличением частоты сердечных сокращений. Следует также отметить, что положительный инотропный эффект КТ-1 и КТ-2 был значительно менее выражен, чем в экспериментах на папиллярной мышце (рис. 1Б). Данный факт может быть связан как с тканевой специфичностью действия кардиотоксинов [14,15], так и различными условиями эксперимента, так папиллярная мышца стимулировалась частотой 0.3 Гц, в то время как в опытах на целом сердце частота сердечных сокращений составляла более 3 Гц [2], а эффекты кардиотоксинов могут быть частотно зависимыми [16].

Для того чтобы получить дополнительные свидетельства того, что рост сократимости не связан с выбросом эндогенного адреналина мы провели эксперименты с предварительной обработкой папиллярных мышц неселективным β -блокатором пропранололом в концентрации 10 мкМ. Как видно из рисунка 3, предварительная обработка пропранололом не препятствовала развитию эффектов, вызванных кардиотоксинами, но полностью блокировала эффект изопроterenолом.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что временный рост сократимости не связан с выбросом эндогенного адреналина, а скорее обусловлен изменениями кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 21-14-00316.

Список литературы / References:

1. Averin A.S., Nenov M.N., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Effects of Cardiotoxins from *Naja oxiana* Cobra Venom on Rat Heart Muscle and Aorta: A Comparative Study of Toxin-Induced Contraction Mechanisms. *Toxins (Basel)*, 2022, vol. 14, doi: 10.3390/toxins14020088.

2. Averin A.S., Goltyaev M.V., Andreeva T.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. S- and P-type cobra venom cardiotoxins differ in their action on isolated rat heart. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2022, vol. 28, e20210110, doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0110.
3. Wang H.X., Lau S.Y., Huang S.J., Kwan C.Y., Wong T.M. Cobra venom cardiotoxin induces perturbations of cytosolic calcium homeostasis and hypercontracture in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, vol. 29, pp. 2759-2770, doi: 10.1006/jmcc.1997.0511.
4. Huang S.J., Kwan C.Y. Inhibition by multivalent cations of contraction induced by Chinese cobra venom cardiotoxin in guinea pig papillary muscle. *Life Sci.*, 1996, vol. 59, pp. PL55-60, doi: 10.1016/0024-3205(96)00305-0.
5. Burrell K.M., Molenaar P., Dawson P.J., Kaumann A.J. Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: Blockade with SB 209670. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, vol. 292, pp. 449-459.
6. Gomes H.L., Menezes T.N., Malacarne P.F., Roman-Campos D., Gondim A.N., Cruz J.S., Vassallo D.V., Figueiredo S.G. Cardiovascular effects of Sp-CTx, a cytolytic from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon*, 2016, vol. 118, pp. 141-148, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.05.002.
7. Osipov A.V., Levashov M.Y., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 328, pp. 177-182, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.154.
8. Tadokoro T., Modahl C.M., Maenaka K., Aoki-Shioi N. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) From Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in A Large and Underappreciated Superfamily. *Toxins (Basel)*, 2020, vol. 12, doi: 10.3390/toxins12030175.
9. Ho K.H., Kwan C.Y., Huang S.J., Bourreau J.P. Dual effect of cobra cardiotoxin on vascular smooth muscle and endothelium. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1998, vol. 19, pp. 197-202.
10. Matuskova L., Czippelova B., Turianikova Z., Svec D., Kolkova Z., Lasabova Z., Javorka M. Beta-adrenergic receptors gene polymorphisms are associated with cardiac contractility and blood pressure variability. *Physiol. Res.*, 2021, vol. 70, pp. S327-S337, doi: 10.33549/physiolres.934837.
11. Cohen C.J., Fozzard H.A., Sheu S.S. Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ. Res.*, 1982, vol. 50, pp. 651-662, doi: 10.1161/01.res.50.5.651.
12. Mubagwa K., Lin W., Sipido K., Bosteels S., Flameng W. Monensin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: Role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, vol. 29, pp. 977-989, doi: 10.1006/jmcc.1996.0342.
13. Flesch M., Erdmann E. Na⁺ channel activators as positive inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2001, vol. 15, pp. 379-386, doi: 10.1023/a:1013329203750.
14. Loots J.M., Meij H.S., Meyer B.J. Effects of *Naja nivea* venom on nerve, cardiac and skeletal muscle activity of the frog. *Br. J. Pharmacol.*, 1973, vol. 47, pp. 576-585, doi: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08188.x.
15. Harvey A.L., Marshall R.J., Karlsson E. Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. *Toxicon*, 1982, vol. 20, pp. 379-396, doi: 10.1016/0041-0101(82)90001-0.
16. Averin A.S., Astashev M.E., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Cardiotoxins from Cobra *Naja oxiana* Change the Force of Contraction and the Character of Rhythmoinotropic Phenomena in the Rat Myocardium. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2019, vol. 487, pp. 282-286, doi: 10.1134/S1607672919040094.

THE EFFECTS OF COBRA CARDIOTOXINS ON THE PAPILLARY MUSCLE AND LANGENDORF PERFUSED RAT HEART ARE NOT ASSOCIATED WITH ADRENALINE RELEASE.Averin A.S.¹, Tyurin F.V.², Samodurova K.V.³, Starkov V.G.⁴, Andreeva T.V.⁴, Utkin Yu.N.⁴¹Institute of Cell Biophysics FITC PNCBI RAS

3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia; e-mail: averinas82@gmail.com

²Tula State Pedagogical University named after L.N. Tolstoy

Lenin Ave., 125, Tula, 300026, Russia

³St. Petersburg State Technological Institute

Moskovsky Ave., 26, St. Petersburg, 190013, Russia

⁴Institute of Bioorganic Chemistry named after Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS

Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997, Russian

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0515

Abstract. In a study of the effects of cobra cardiotoxins on myocardial tissue, both right ventricular (papillary muscle) and left ventricular contractility (isovolumic recording of left ventricular pulse pressure during Langendorff perfusion of the heart) were assessed. In papillary muscle, both toxins, at a concentration of 5 µg/mL, caused short-term increases in contractility to 200±25% and 171±15% for CTX-1 and CTX-2, respectively, at the point of maximum effect. At the same time, for CTX-1 and CTX-2, the time to peak tension (TPT) increased from 104±2 to 111±2 and from 96±2 to 104±5 ms, the relaxation time to 50%(TR50%) from 64±4 to 70±6 and from 64±6 to 69±7 ms, and the relaxation time to 95%(TR95%) from 163±10 to 190±22 and from 148±16 to 155±20 ms, respectively. This significantly differs from the positive inotropic effect of the β-adrenomimetic isoproterenol (170±31%), which causes acceleration of TPT from 106±5 to 89±4 ms, TR50% from 58±6 to 43±4 ms, and TR95% from 145±15 to 90±14 ms. When the whole heart was exposed to cardiotoxins, an increase in contractility was also observed, followed by its suppression and contracture, in contrast to isoproterenol, which caused a steady increase in contractility coupled with an increase in heart rate. Pretreatment of papillary muscles with the β-blocker propranolol (10 µM) did not prevent the development of cardiotoxin effects, but completely blocked the effects of isoproterenol. Our data indicate that the temporary increase in contractility under the action of cardiotoxins is not associated with the release of endogenous adrenaline, but rather is caused by changes in calcium homeostasis in cardiomyocytes.

Key words: cardiotoxins, papillary muscle, Langendorff perfusion, positive inotropic effect.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К АГОНИСТУ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНДИФОСФАТУ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ.

Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Четвертак Е.В., Мальцев В.П.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: roseline.neolis@gmail.com
Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0516

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующее место среди причин смертности населения. Основные осложнения течения заболевания этой группы тесно связаны с изменением в работе системы гемостаза, в том числе её тромбоцитарного звена. Для предотвращения развития осложнений, связанных с нарушениями в работе системы гемостаза, применяется антитромбоцитарная терапия. В данной работе рассматривается поведение популяции тромбоцитов условно здоровых доноров до и после применения двух основных типов терапевтических агентов: ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. С использованием метода сканирующей проточной цитометрии производилось измерение индекса формы одиночных тромбоцитов с последующим построением распределений по данной характеристике для проб в нативном состоянии и после воздействия малого количества аденозиндифосфата - агониста активации. По изменению в распределениях индекса формы оценивается чувствительность тромбоцитов к агонисту активации до и после применения краткого курса терапии. По результату оценки пороговое значение начала изменения формы тромбоцитов и чувствительность при применении ацетилсалициловой кислоты увеличились, а при применении клопидогрела уменьшились. Продемонстрированный подход для оценки чувствительности может быть полезен как при оценке степени эффективности, применяемой антитромбоцитарной терапии, так и при диагностике наличия осложнений течения заболеваний сердечно-сосудистой системы со стороны тромбоцитарного звена системы гемостаза.

Ключевые слова: тромбоциты, сканирующая проточная цитометрия, антитромбоцитарная терапия, АДФ.

ВВЕДЕНИЕ

На текущий момент заболевания сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест в списке причин смертности по статистике ВОЗ, при этом доля смертей, приходящихся на данную причину, возрастает с каждым годом. Основные осложнения течения данных заболеваний связаны с изменениями в работе системы гемостаза. Эта система состоит из набора белков коагуляции, кофакторов и форменных элементов крови — тромбоцитов и системы фибринолиза, которая ответственна за рассасывание тромбов после заживления сосуда. При этом согласно общепринятой модели гемостаза, реакции коагуляции крови протекают преимущественно на поверхности активированного тромбоцита [1]. Также в последние годы было показано, что тромбоциты участвуют в развитии реакции воспаления и распространении метастаз в организме [2,3]. Именно поэтому важно контролировать функциональное состояние тромбоцитов, причём не только во время приёма терапевтических препаратов.

Основной особенностью тромбоцитов является способность к активации, то есть к переходу с состояния, в котором тромбоциты способны слипаться между собой (агрегировать) и образовывать тромб. Процесс активации характеризуется запуском каскада биохимических реакции, приводящих к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула и росту свободного Ca^{2+} внутри цитозоля [4]. Рост концентрации Ca^{2+} приводит к ряду изменений внутри тромбоцита, в том числе к изменению формы и появлению специфических рецепторов [5]. Используя информацию о состоянии тромбоцитов под воздействием агониста активации, можно оценить их функциональное состояние.

Самым широко используемым методом для исследования функционального состояния системы гемостаза, и тромбоцитов в том числе, является оптическая агрегометрия [6]. Метод основан на исследовании изменения сигнала светопропускания в процессе реакции агрегации. В качестве индукторов агрегации широко используют такие вещества, как тромбин, коллаген, аденозиндифосфат (АДФ), выступающих также и в роли агонистов активации. Однако данный метод оценивает воздействие агониста активации на систему гемостаза в целом, а не только на тромбоциты, что делает его менее чувствительным к малым функциональным изменениям. Другим методом исследования тромбоцитов является метод Култера, который позволяет получать информацию об объёме одиночных клеток [7]. Однако в процессе активации в основном изменяется форма тромбоцитов, а не их объём. Одним из методов, позволяющих определять форму тромбоцитов с высокой скоростью и точностью, является метод сканирующей проточной цитометрии [8]. Ранее была показана применимость данного метода для исследования различных форменных элементов крови [9–11], в том числе и тромбоцитов [12]. С использованием данного метода было показано, что даже нативная проба является более гетерогенной по форме, чем по объёму

[13], а также была продемонстрирована возможность исследования чувствительности тромбоцитов к АДФ для условно здоровых доноров [14]. Основной целью данной работы является определение влияния антитромбоцитарной терапии на чувствительность тромбоцитов к АДФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась венозная кровь двух условно здоровых доноров до и после назначения краткого курса антитромбоцитарной терапии. Процедура забора пробы проводилась в непосредственной близости от измерительного прибора, для исключения влияния процессов транспортировки. Для предотвращения коагуляции крови, забор пробы проводился с одновременным разбавлением физиологическим раствором более чем в 30 раз. Для выделения богатой тромбоцитами плазмы проводилась процедура седиментации в течении от 30 минут до 1 часа с последующим измерением пробы. Для определения воздействия малой дозы АДФ на пробу тромбоцитов непосредственно перед измерением проводилось смешивание богатой тромбоцитами плазмы с АДФ в итоговой концентрации 9×10^{-9} моль/л. В работе использовался АДФ фирмы «Технология–Стандарт», предназначенный для проведения агрегации тромбоцитов.

Для определения состояния тромбоцитов в пробе использовалась технология сканирующей проточной цитометрии [8,12]. В отличие от обычного варианта проточной цитометрии, сканирующая проточная цитометрия способна определять не только наличие или отсутствия флуоресцентных меток на поверхности клеток, но и форму исследуемых объектов. Принцип метода основан на регистрации сигнала светорассеяния в широком угловом диапазоне полярного угла (θ) от одиночных частиц, при этом по азимутальному углу происходит интегрирование сигнала. Итоговую зависимость интенсивности сигнала от угла θ называют индикатрисой светорассеяния. Как и классическая проточная цитометрия, сканирующая проточная цитометрия также позволяет набирать значительную статистику частиц одной пробы в сжатое время, что особенно важно для данной работы.

Для определения параметров измеренной частицы из зарегистрированного сигнала используется один из методов решения обратной задачи светорассеяния, так называемый метод баз данных [12]. Для этого, в рамках заданной оптической модели, заранее рассчитывается набор теоретических сигналов от частиц с известными параметрами и в дальнейшем экспериментальный сигнал сравнивается с данной базой. Параметры максимально подходящего теоретического сигнала по форме и интенсивности считаются параметрами искомой частицы. Для тромбоцитов в качестве оптической модели используется модель сплюснутого сфероида, параметризованная значениями диаметра сферы эквивалентного объёма d и индексов формы δ , характеризующего сплюснутость сфероида и связанного с значениями полуосей (a и b) соотношением $\delta = \frac{2ab}{a^2+b^2}$. Данная модель хорошо описывает как тромбоциты в нативном состоянии, так и в активированном. Также данная оптическая модель включает в себя информацию о показателе преломления и угле ориентации частицы в потоке, необходимую для расчёта сигнала светорассеяния.

В работе исследовалось воздействие двух типов антитромбоцитарной терапии, на основе ацетилсалициловой кислоты (аспирин) и клопидогрела. Данные препараты кардинально отличаются по механизмам воздействия на тромбоциты. Аспирин ингибирует синтез тромбоксана А, который также является агонистом активации, в тромбоците, а метаболит клопидогрела ингибирует связывание АДФ с одним из двух рецепторов тромбоцитов к данному агонисту активации, рецептором P_2Y_{12} , в основном отвечающим за усиление ответа на агонист активации, причём не только АДФ. Перед применением терапии проводилось измерение начального состояния тромбоцитов для каждого из доноров. После этого донору назначался один из препаратов краткими курсами в течении трех дней в профилактической дозе (75 мг), и проводилось повторное измерение распределения тромбоцитов по индексу формы.

Для оценки чувствительности тромбоцитов к агонисту активации АДФ использовалась ранее разработанная феноменологическая модель активации тромбоцитов [14]. Данная модель основана на рассмотрении поведения одиночного тромбоцита в процессе активации, а именно на описании изменения индекса формы δ одиночного тромбоцита, как функции от концентрации добавленного АДФ. В качестве начальной точки берётся индивидуальный начальный индекс формы δ_0 . Из теоретических работ известно, что перестройка периферического кольца микротрубочек, элемента цитоскелета, определяющего форму тромбоцита, происходит через метастабильное состояние формы [15], что свидетельствует о пороговом и скачкообразном характере данного процесса, который в свою очередь проявляется в скачкообразном изменении индекса формы. Значение скачка индекса формы, выраженного в безразмерных единицах, в модели обозначается как S_{\min} . Дальнейший рост индекса формы зависит от индивидуальной чувствительности S рассматриваемого тромбоцита к агонисту активации. В силу рассмотрения малых воздействий со стороны агониста активации (используется концентрация, сравнимая с уровнем АДФ в кровотоке) дальнейший рост индекса формы в зависимости от S и концентрации добавленного АДФ имеет линейный характер. Также в данной модели вводится предположение о наличии максимально возможного индекса формы δ_{\max} для каждого тромбоцита, после достижения которого изменение формы уже не происходит. Таким образом, постулируется следующая зависимость индекса δ отдельного тромбоцита от концентрации АДФ.

Формула зависимости индекса формы отдельного тромбоцита от концентрации АДФ:

$$\delta = \begin{cases} \delta_0 & \text{если } S \times [\text{АДФ}] < C_{\min} \\ \delta_0 + S \times [\text{АДФ}] & \text{если } C_{\min} < S \times [\text{АДФ}] < \delta_{\max} - \delta_0 \\ \delta_{\max} & \text{если } S \times [\text{АДФ}] > \delta_{\max} - \delta_0 \end{cases} \quad (1)$$

Подчеркнем, что в данной зависимости отображен итоговый результат воздействия АДФ на индекс формы δ каждого отдельного тромбоцита, обладающего параметрами $(\delta_0, S, \delta_{\max}, C_{\min})$, и не рассматривается вопрос о кинетике данного процесса для единичного тромбоцита. Такой подход, в частности, связан с тем, что сканирующий проточный цитометр измеряет каждую частицу однократно, в некоторый фиксированный момент времени (индивидуальный для каждой частицы), и не позволяет следить за динамикой изменения индекса формы δ отдельного тромбоцита.

Далее, данная модель может быть обобщена на популяцию тромбоцитов, которые имеют различный набор исходных параметров. Предполагается, что функции распределения по начальному и конечному состояниям (распределение по индексам δ_0 и δ_{\max}) принадлежат симметричным бета распределениям. Данный тип распределений является пиковым и описывается 4 параметрами: центр, ширина пика и две границы распределения. В случае симметричного распределения количество параметров уменьшается до 3 (задание одной из границ определяет другую границу). Ранее сумма трёх распределений данного типа была успешно использована при описании нативных распределений тромбоцитов по индексу формы [13]. Для начального состояния (распределение по δ_0) граница бета распределения слева совпадает с границей экспериментального распределения по индексу формы 0.1, так как тромбоцитов с меньшим индексом формы не существует. Тогда данное распределение задаётся двумя параметрами: центр пика (далее обозначается MPSI-MIN) и ширина пика (обозначается PSIDW-MIN). Для бета распределения по максимальному индексу формы δ_{\max} такое упрощение сделать невозможно, так как, хотя экспериментальное распределение ограничено справа 1 по построению оптической модели, достижение данного значения не означает достижения максимально активированного состояния с точки зрения молекулярных процессов, происходящих внутри тромбоцита. Поэтому распределение по максимально возможному индексу формы описывается тремя параметрами: центр пика (далее обозначается MPSI-MAX), ширина пика (обозначается PSIDW-MAX) и левой границей распределения по δ_{\max} (обозначается LT-MAX).

Пороговое значение C_{\min} выбрано одинаковым для всех тромбоцитов в пробе (отметим, что по построению модели диапазоны параметров выбраны так, что всегда выполняется условие $C_{\min} < \delta_{\max} - \delta_0$). Чувствительность тромбоцитов к агонисту активации S принадлежит логнормальному распределению (MPS-ADP - средний логарифм распределения и PSDW-ADP ширина распределения), так как данный параметр должен быть связан с содержанием Ca^{2+} внутри тромбоцита, концентрация которого внутри тромбоцита зависит от объёма, принадлежащего логнормальному распределению [16]. Таким образом, задав параметры распределений и концентрацию добавленного к пробе АДФ, можно теоретически рассчитать итоговое распределение по индексу формы после воздействия.

Тромбоциты обладают высокой чувствительностью к различным воздействиям, в том числе к механическому воздействию и изменению температуры [17,18]. С этой точки зрения, процедура забора пробы также изменяет распределение тромбоцитов по индексу формы, то есть приводит к частичной активации пробы даже при учёте минимизации любых преаналитических воздействий, поэтому необходимо учитывать данное

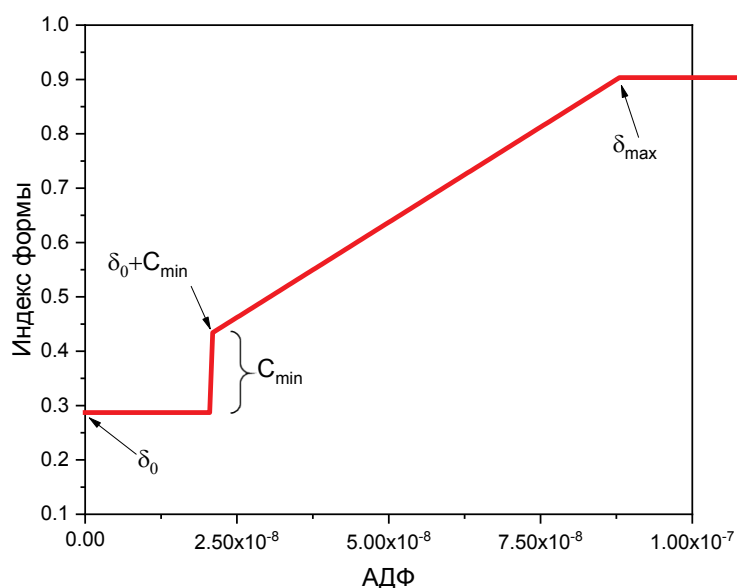


Рисунок 1. Схематичное представление изменения индекса формы от [АДФ] (Формула 1) для единичного тромбоцита

воздействие в модели. В данном случае такое воздействие учитывается, как введение эффективной концентрации АДФ (ADP_{eff}), добавление которой эквивалентно воздействию преаналитического этапа работы с пробой.

Модель изменения распределения по индексу формы под воздействием агониста активации может быть реализована в качестве модельной функции для метода глобальной оптимизации Direct [19]. Для определения параметров распределений по δ_0 , S и δ_{max} , а также C_{min} и ADP_{eff} в качестве экспериментальных данных для метода использовались одновременно два распределения тромбоцитов по индексу формы - в нативном состоянии (распределение, полученное после воздействия преаналитического этапа работы с пробой) и в активированном состоянии (распределение, полученное после воздействия определённой концентрации АДФ). Каждое из двух рассматриваемых распределений включает в себя не менее 5000 тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения чувствительности до и после применения терапии проводилась нелинейная регрессия полученных экспериментальных распределений по индексу формы модельной функцией (1), обобщённой на популяцию измеренных тромбоцитов. Поиск подходящих параметров для модельной функции проводился с использованием метода глобальной оптимизации Direct, позволяющего не только найти оптимальные параметры, но и оценить точность определения данных параметров. Результаты регрессии для рассмотренных вариантов терапии представлены на рисунке 2. В таблице 1 приведены параметры полученных кривых.

В первую очередь стоит отметить, что применение терапии не повлияло на параметры начального (MPSI-MIN, PSIDW-MIN) и конечного (MPSI-MAX, PSIDW-MAX, LT-MAX) состояний. Это показывает, что данные состояния определяются индивидуальными особенностями доноров, а не применением терапии. Применение аспирина приводит к незначительному повышению величины скачка C_{min} по индексу формы, необходимого для начала изменения морфологии тромбоцитов, однако при этом возросло среднее значение чувствительности (MPS-ADP) к АДФ. Исходя из того, что аспирин ингибирует синтез тромбоксана А, то применение аспирина теоретически должно было бы приводить к уменьшению чувствительности к АДФ и, как следствие, к уменьшению MPS-ADP. На текущий момент причины увеличения MPS-ADP остаются неясными и требуют других гипотез о механизмах влияния аспирина на активацию тромбоцитов.

Для пробы, измеренной после применения клопидогреля, наблюдается значительное снижение C_{min} и снижение параметра MPS-ADP. Известно, что АДФ присоединяется к рецепторам P_2Y_{12} и P_2Y_2 , и снижение MPS-ADP может быть связано с блокированием клопидогрелем рецептора P_2Y_{12} , который служил дополнительной мишенью и вызывал усиленный ответ на добавление АДФ в пробу. Также стоит отметить, что в обоих случаях (аспирин и клопидогрель) наблюдается однонаправленная динамика изменения параметров C_{min} и MPS-ADP, причины чего также остаются неясными.

Отдельно стоит отметить разброс значений по параметру ADP_{eff} . Несмотря на одинаковые стандартные процедуры забора и измерения проб (в том числе и время между забор и измерением), данный параметр варьируется почти в 4 раза, что показывает важность учёта влияния преаналитического этапа в анализе данных, особенно при работе с тромбоцитами.

Таблица 1. Решения задачи регрессии распределений тромбоцитов по индексу формы на рисунке 1. MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина начального распределения по индексу формы, MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX – среднее значение, ширина и левая граница распределение максимально возможного индекса формы, MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина распределения чувствительности тромбоцитов к АДФ, C_{min} пороговое значение начала изменения формы, а ADP_{eff} доза АДФ, эквивалентная по воздействию процедуре забора пробы

	До приёма аспирина	После приёма аспирина	До приёма клопидогреля	После приёма клопидогреля
MPSI-MIN	0.309 ± 0.012	0.26 ± 0.04	0.275 ± 0.005	0.278 ± 0.003
PSIDW-MIN	0.18	0.19	0.21	0.21
MPSI-MAX	0.990 ± 0.005	0.991 ± 0.005	0.995 ± 0.005	0.996 ± 0.005
PSIDW-MAX	0.21	0.25	0.19	0.25
LT-MAX	0.716 ± 0.018	0.54 ± 0.04	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.02
C_{min}	0.146 ± 0.012	0.16 ± 0.03	0.193 ± 0.011	0.165 ± 0.002
$ADP_{eff} \cdot 10^{-9} M$	9.97 ± 0.06	7 ± 1	10.6 ± 0.2	29.4 ± 1.5
MPS-ADP	16.382 ± 0.007	16.5733 ± 0.0002	16.366 ± 0.002	15.967 ± 0.016
PSDW-ADP	0.34	0.37	0.28	0.36

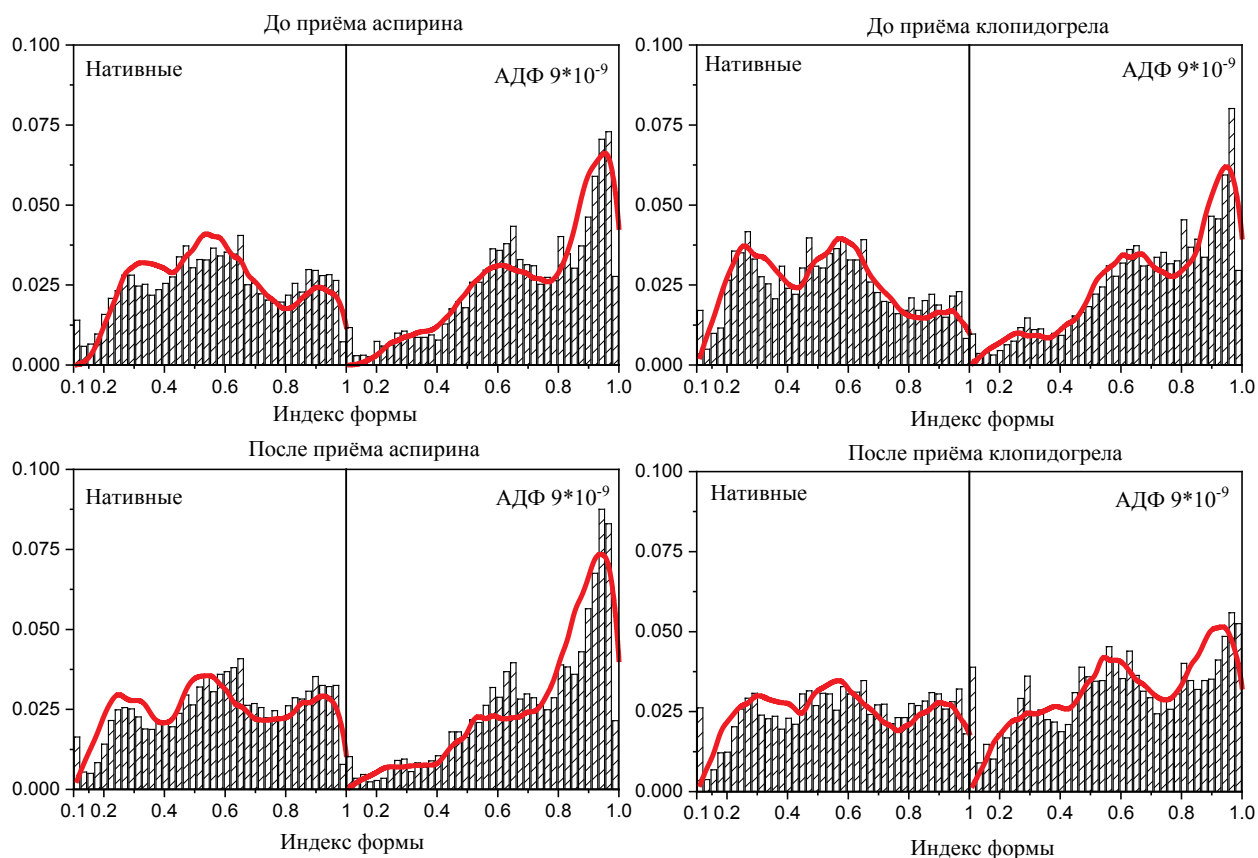


Рисунок 2. Распределения тромбоцитов по индексу формы в нативном состоянии и после воздействия агониста активации для проб до и после применения антитромбоцитарной терапии. Красной линией обозначено решение задачи регрессии. Параметры подобранных функции представлены в таблице 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведена оценка изменения чувствительности пробы тромбоцитов после применения антитромбоцитарной терапии с использованием метода сканирующей проточной цитометрии. В качестве терапии рассматривалось применение ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела для двух условно здоровых доноров. В рамках работы проводилось измерение распределений тромбоцитов по индексу формы (характеризует сплюснутость тромбоцита) в нативном состоянии и после воздействия АДФ до и после применения терапии. После этого для полученных распределений решалась задача нелинейной регрессии с использованием феноменологической модели активации тромбоцита, приведённой в работе, и дающей информацию в том числе о чувствительности тромбоцитов к агонисту активации. В результате работы было показано увеличение порога начала изменения формы S_{\min} и увеличение чувствительности к агонисту активации S при применении ацетилсалициловой кислоты и уменьшений данных параметров при применении клопидогрела. Однако результаты являются предварительными и в дальнейшем планируется увеличение группы условно-здоровых доноров, а также наблюдение за изменением исследуемых параметров, как для одного донора, так и за разбросом значений параметров внутри исследуемой группы. Также было показано четырёхкратное изменение параметра ADP_{eff} , показывающего качество подготовки и манипуляций с пробой перед измерениями, несмотря на одинаковую технику пробоподготовки, что ещё раз показывает важность учёта влияния преаналитического этапа при работе с тромбоцитами. В дальнейшем данный подход может быть применён для исследования влияния двойной антитромбоцитарной терапии на тромбоциты, а также для оценки резистентности к одному из препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме стипендии Президента Российской Федерации для аспирантов и молодых учёных.

Список литературы / References:

1. Hoffman M., Iii D.M.M. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost.*, 2001, vol. 85, no. 6, pp. 958-965, doi: 10.1055/s-0037-1615947.
2. Rondina M.T., Zimmerman G.A. 28 - The Role of Platelets in Inflammation *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press, 2019, pp. 505-522, doi: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00028-X.

3. Li Z., Riesenber B., Metelli A., Li A., Wu B.X. 30 - The Role of Platelets in Tumor Growth, Metastasis, and Immune Evasion. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press, 2019, pp. 547-561, doi: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00030-8.
4. Purvis J.E., Chatterjee M.S., Brass L.F., Diamond S.L. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 10, pp. 4069-4079, doi: 10.1182/blood-2008-05-157883.
5. Moskalensky A.E., Litvinenko A.L. The platelet shape change: biophysical basis and physiological consequences. *Platelets*, 2018, vol. 0, no. 0, pp. 1-6, doi: 10.1080/09537104.2018.1514109.
6. Lordkipanidze M., Harrison P. Platelet Function Tests. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update. *Cham: Springer International Publishing*, 2017, pp. 559-570, doi: 10.1007/978-3-319-47462-5.
7. Noris P., Zaninetti C. Platelet Counting and Measurement of Platelet Dimensions *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 571-587, doi: 10.1007/978-3-319-47462-5.
8. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis. *Review of Scientific Instruments*, 2000, vol. 71, no. 1, pp. 243-255, doi: 10.1063/1.1150190.
9. Chernova D.N., Konokhova A.I., Novikova O. I., Yurkin M.A., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Chylomicrons against light scattering: The battle for characterization. *Journal of Biophotonics*, 2018, vol. 11, no. 10, doi: 10.1002/jbio.201700381.
10. Gilev K.V., Yastrebova E.S., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Karmadonova, N.A., Chernyshev A.V., Lomivorotov V.V., Maltsev V.P. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer. *Cytometry Part A*, 2017, vol. 91, no. 9, pp. 867-873, doi: 10.1002/cyto.a.23141.
11. Strokotov D.I., Yurkin M.A., Gilev K.V., van Bockstaele D. R., Hoekstra A.G., Rubtsov N.B, Maltsev V.P. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? *J. Biomed. Opt.*, 2009, vol. 14, no. 6, doi: 10.1117/1.3275471.
12. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D, Maltsev V.P. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering. *Journal of biomedical optics*, 2013, vol. 18, no. 1. doi: 10.1117/1.JBO.18.1.017001.
13. Litvinenko A.L., Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev V.A., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets. *Cytometry*, 2016, vol. 89, no. 11, pp. 1010-1016, doi: 10.1002/cyto.a.23003.
14. Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Chernyshev a. V., Shilova A.N., Karpenko A.A., Maltsev V.P. Blood platelet quantification by light scattering: from morphology to activation. *Anal. Methods. The Royal Society of Chemistry*, 2021, vol. 13, no. 29, pp. 3233-3241, doi: 10.1039/D1AY00431J.
15. Dmitrieff S., Alsinia A., Mathura A., Nedelec J.N. Balance of microtubule stiffness and cortical tension determines the size of blood cells with marginal band across species *PNAS. National Academy of Sciences*, 2017, vol. 114, no. 17, pp. 4418-4423, doi: 10.1073/pnas.1618041114.
16. Sewell R., Ibbotson M., Phillips R., Carson P. High mean platelet volume after myocardial infarction: is it due to consumption of small platelets? 6458 *British medical journal (Clinical research ed.)*, 1984, vol. 289, no. 6458, pp. 1576-1578, doi: 10.1136/bmj.289.6458.1576.
17. Kroll M.H., Schafer A.I. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, vol. 88, no. 5, pp. 1525-1541, doi: 10.1182/blood.V74.4.1181.1181.
18. Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus*, 2010, vol. 8, no. 3, pp. s73-s81, doi: 10.2450/2010.012S.
19. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant. *Journal of Optimization Theory and Applications*, 1993, vol. 79, no. 1, pp. 157-181, doi: 10.1007/BF00941892.

EVALUATION OF THE HUMAN BLOOD PLATELETS SENSITIVITY TO AN ACTIVATION AGONIST ADENOSINE DIPHOSPHATE BY SCANNING FLOW CYTOMETRY UNDER CONDITIONS OF ANTIPLATELET THERAPY

Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Chetvertak E.V., Maltsev V.P.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion

Institutskaya str., 33, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: golovchenko.igor1991@gmail.com

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0516

Abstract. Cardiovascular diseases occupy a leading place among the causes of death in the population. The main complications of the disease in this group are closely related to changes in the functioning of the hemostasis system, including primary hemostasis. Antiplatelet therapy is used to prevent the development of complications associated with disorders in the hemostasis system. This paper examines the behavior of the platelet population of healthy donors before and after the use of two main types of drugs: acetylsalicylic acid and clopidogrel. Using the method of scanning flow cytometry, the shape index of single platelets was measured, followed by the construction of distributions according to this characteristic for native samples and after exposure to a small amount of an activation agonist. The sensitivity of platelets to the activation agonist is assessed by the change in distributions before and after the application of a short course of therapy. As a result of the assessment, the threshold value for the onset of changes in the shape of platelets and sensitivity increased with the use of acetylsalicylic acid, and decreased with the use of clopidogrel. The demonstrated approach for assessing sensitivity can be useful both in assessing the degree of effectiveness of antiplatelet therapy used and in diagnosing the presence of complications in the course of diseases of the cardiovascular system on the part of primary hemostasis.

Key words: *platelets, scanning flow cytometry, antiplatelet therapy, ADP.*

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕГОЧНОЙ СУРФАКТАНТНОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИИ КАПИЛЛЯРНЫХ ВОЛН (ЭКСПРЕСС МЕТОД)

Казаринов К.Д.¹, Малинин В.С.¹, Щелконогов В.А.^{1,2,3}, Чеканов А.В.^{1,2}

¹ФирЭ им. В.А. Котельникова РАН

пр. Введенского, 1, г. Фрязино, Московская обл., 141190, РФ; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава России

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

³МИРЭА – Российский технологический университет

пр. Вернадского, 86, г. Москва, 119571, РФ

Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0517

Аннотация. На основе использования новой конструкции генератора капиллярных волн предлагается метод исследования сурфактантной системы человека для диагностики больных, страдающих легочными заболеваниями, в том числе, после заражения COVID-19. Изучение сурфактантной системы легких (ССЛ) в здоровом организме и при патологии стоит в ряду важных задач современной пульманологии. Предлагаемый нами способ контроля конденсата выдыхаемого воздуха человека заключается в нанесении пробы конденсата на поверхность водного раствора, на которой создаются за счет явления электрострикции капиллярные волны, изменение амплитуды и фазы которых позволяет определить поверхностное натяжение жидкости и параметры сурфактантного слоя. Для этого нами была разработана конструкция и получен патент на изобретение измерителя параметров жидкости, содержащий кювету для жидкости, генератор, связанный с системой создания на поверхности жидкости капиллярных волн и системой регистрации характеристик колебаний жидкости. Совершенствование технологии процесса контроля ССЛ преследует решение задач сокращения времени измерения ССЛ и снижения стоимости метода.

Ключевые слова: метод генерации капиллярных волн, поверхностные свойства липидных монослоев, легочный сурфактант, поверхностное натяжение на границе двух сред, поверхностно активные вещества, длина волны и затухание поверхностных волн.

Дыхательная поверхность в легких млекопитающих стабилизируется легочным сурфактантом – мембранной системой, состоящей из множества липидов и специфических белков, основная функция которой – минимизировать поверхностное натяжение на границе раздела воздух-жидкость альвеол, оптимизируя механику дыхания, и предотвращение коллапса альвеол, особенно в конце выдоха. Механические свойства поверхностно-активного вещества могут быть серьезно нарушены различными агентами, что приводит к ингибированию поверхностно-активного вещества и, в конечном итоге, способствует развитию легочных заболеваний и патологий у новорожденных, детей и взрослых. Понимание уникальных механических и реологических свойств слоев сурфактанта имеет решающее значение для диагностики и лечения заболеваний легких, анализа вклада нарушения сурфактанта в патофизиологию, улучшения рецептур в заместительной сурфактантной терапии [1].

Изучение сурфактантной системы легких (ССЛ) в здоровом организме и при патологии стоит в ряду важных задач современной пульмонологии и поэтому методы изучения ССЛ непрерывно совершенствуются, что предполагает более широкие возможности для подробного изучения влияния патологии сурфактантной системы в легочных заболеваниях [2]. В наши дни этот вопрос приобретает особую актуальность в связи с необходимостью экспресс диагностики больных, пораженных коронавирусной инфекцией [3].

В подавляющем числе случаев коронавирусная инфекция не сопровождается характерными симптомами или приводит лишь к незначительным отклонениям показателей больного от нормы. По имеющимся данным, в некотором количестве случаев (не более 17%) заражение COVID-19 сопровождается пневмонией, что может привести к «острому респираторному дистресс-синдрому» (ОРДС) – основной причины смерти при коронавирусной инфекции [4]. Следует отметить, что ОРДС возникает не только при пневмонии, но также и в других случаях (при операциях на грудной клетке, сепсисе, ингаляционных поражениях, при синдроме реперфузии и т.д.). Было показано, что первичный дефицит легочного сурфактанта является основной причиной ОРДС [5]. В последние годы были приложены значительные усилия ученых для изучения моделей клеточных культур эпителиального барьера легких от простых монослоев до сложных трехмерных систем, использующих различные типы клеток.

Известен способ хроматографического определения качества сурфактанта, который осуществляется следующим образом. Исследуемый материал после пробоподготовки помещают в хроматограф с последующим определением спектра фосфолипидов сурфактанта, характеризующих функциональное состояние легких [6]. Несмотря на достоинства данного способа, следует отметить, что его недостатком является длительное время анализа – до 8 часов и использование дорогих хроматографов с дорогостоящими расходными материалами и энергетическими затратами.

Используется также метод [7], в котором для оценки состояния легочного сурфактанта методом отрыва кольца измеряют поверхностное натяжение конденсата выдыхаемого воздуха. Этот метод дает удовлетворительные результаты при измерении поверхностного натяжения монослоев на чистых водных поверхностях. Однако в случае присутствия на поверхности ПАВ (поверхностно-активных веществ) их применение затруднено необходимостью учитывать значение краевого угла смачивания, а также возможностью налипания пленок на измерительные поверхности, что в свою очередь неконтролируемо изменяет угол смачивания и существенно повышает погрешность измерения поверхностного натяжения жидкости.

Волновое движение жидкости традиционно применяется в изучении свойств различных веществ. Исследования физико-химических процессов в жидкостях с помощью ультразвука расширяют арсенал экспериментальных методов определения поверхностного натяжения. К концу 20 века метод капиллярных волн стал одним из основных при исследовании нерастворимых слоев на водной поверхности. Полученные в последние годы результаты позволяют говорить о новой быстро развивающейся области науки поверхностных явлений – физико-химии поверхностных волн.

Предлагаемый нами способ контроля конденсата выдыхаемого воздуха человека заключается в нанесении пробы конденсата на поверхность водного раствора, на которой создаются за счет явления электрострикции капиллярные волны, изменение амплитуды и фазы которых позволяет определить поверхностное натяжение жидкости и параметры сурфактантного слоя. Совершенствование технологии процесса контроля ССЛ преследует решение задач сокращения времени измерения ССЛ и снижения стоимости метода.

Ранее нами была разработана конструкция и получен патент на изобретение [8] измерителя параметров жидкости, содержащий кювету для жидкости, генератор, связанный с системой создания на поверхности жидкости капиллярных волн и системой регистрации характеристик колебаний жидкости. В предлагаемом устройстве используется генерация капиллярных акустических волн с помощью электрического поля. Электрическое поле, взаимодействуя с жидкостью, приводит к деформации ее свободной поверхности вследствие явления электрострикции. В качестве генератора капиллярных волн используется металлический цилиндр диаметром 2 мм, расположенный параллельно поверхности жидкости на расстоянии 1 мм. Между цилиндром и поверхностью жидкости в малом объеме создается сильное неоднородное электрическое поле. Жидкость как диэлектрик с диэлектрической проницаемостью существенно большей, чем у воздуха втягивается в область сильного поля, где энергия системы поле-жидкость уменьшается, т.е. жидкость притягивается к цилиндру. Этому противодействуют силы поверхностного натяжения и тяжести. Прикладывая переменное напряжение частотой 100 Гц (длительность генерации в одном кадре 256 мс) и амплитудой 2 кВ к цилиндрическому электроду, мы создаем колебательный процесс в жидкости и распространение капиллярных волн, изменение амплитуды которых регистрируется двумя оптическими датчиками, расположенными на расстоянии 20 и 40 мм от генератора. Отношение максимальных амплитуд, измеренных датчиками, определяет коэффициент затухания, а сдвиг фаз между сигналами – длину волны.

Измерение диэлектрических характеристик поверхности жидкостей с помощью данного устройства выполняется следующим образом. В прозрачную кювету (4), выполняющую роль рабочей емкости, заливают исследуемую жидкость (5) (рис. 1), на поверхность которой вводят контролируемое вещество, в данном случае, конденсат выдыхаемого воздуха легких человека. Прикладывая переменное напряжение частотой 100 Гц (длительность генерации в одном кадре 256 мс) и амплитудой 2 кВ к цилиндрическому электроду (1), создается колебательный процесс в жидкости и распространение капиллярных волн, изменение амплитуды которых регистрируется двумя оптическими датчиками (7,8), расположенными на расстоянии 20 и 40 мм от генератора.

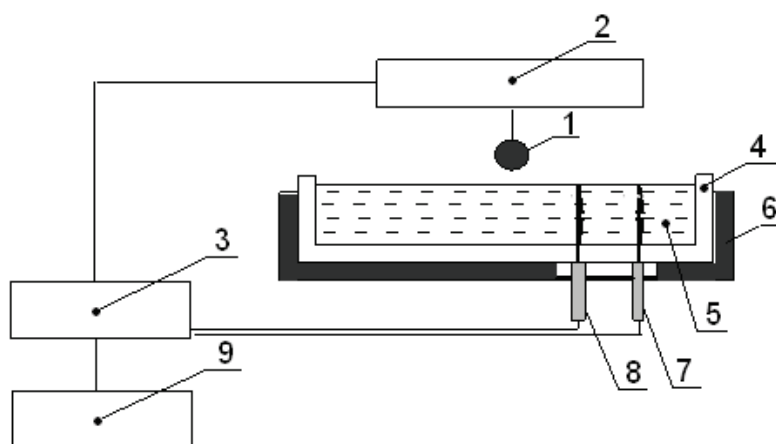


Рисунок 1. Измеритель параметров поверхности жидкости. 1 – цилиндрический электрод; 2 – усилитель электрического сигнала; 3 – ЦАП – цифроаналоговый преобразователь; 4 – прозрачная кювета; 5 – измеряемая жидкость; 6 – подставка для кюветы; 7, 8 – оптопары; 9 – компьютер

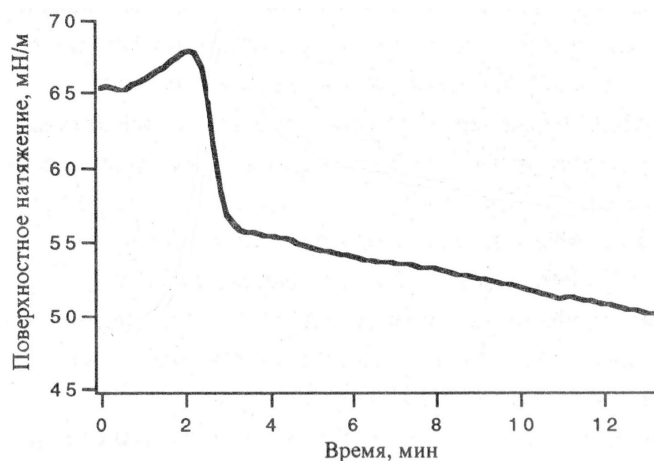


Рисунок 2. Изменение величины поверхностного натяжения сурфактанта от времени после добавления сурфактанта в измерительную ячейку

Измеряя отношение максимальных амплитуд капиллярных волн, измеренных датчиками и АЦП (3), определяют коэффициент затухания, а сдвиг фаз между сигналами – длину волны. Далее с помощью соотношений гидродинамики вычисляется поверхностное натяжение жидкости с исследуемым на его поверхности поверхностно активным веществом. Оценки были проведены в наших предыдущих работах. Описание распространения поверхностных волн заданной жидкости с помощью уравнения Навье-Стокса, позволило определить поверхностное натяжение, как функцию от частоты переменного электрического поля, волнового вектора и коэффициента затухания поверхностной волны. Приведены расчеты, учитывающие влияние липидных монослоев на распространение поверхностных волн. Показано, что наличие на поверхности жидкости липидной пленки меняет длину капиллярных волн и величину коэффициента затухания при заданной частоте электрического поля.

Таким образом, измеряют кинетику изменения поверхностных свойств жидкости при формировании монослоя сурфактантных фосфолипидов как показано на рисунке 2. При добавлении конденсата выдыхаемого воздуха в измерительную ячейку первоначально устанавливается уровень поверхностного натяжения около 65 мН/м связанный, с быстрым распределением части липидного материала сурфактанта на поверхности. Затем следует кратковременный небольшой рост и резкое снижение поверхностного натяжения на 3 минуте до 55 мН/м, которое затем продолжается с меньшей скоростью вплоть до 50 мН/м.

Предлагаемый способ позволяет использовать бесконтактную генерацию капиллярных акустических волн с помощью электрического поля, которое приводит к деформации ее свободной поверхности вследствие явления электрострикции и обеспечивает повышение чувствительности результатов измерений диэлектрических параметров контролируемой жидкости.

Таким образом, предложенный экспресс метод позволяет эффективно оценивать состояние сурфактантной системы легких человека в экстремальных ситуациях, например, во время операций или же на стадии диагностики заболевания.

Использование запатентованной конструкции генератора капиллярных волн позволило разработать экспресс метод определения качества сурфактанта человека для целей диагностики легких. Преимуществом метода является малое время измерения параметров сурфактанта и его низкая стоимость. Полученные результаты могут служить исходными данными для последующих экспериментов по применению электрострикционной генерации капиллярных волн в изучении поверхностных свойств липидных монослоев, в частности, в условиях различных физико химических воздействий.

Работа выполнялась в рамках госзадания ИПЭ им. В.А. Котельникова РАН, а также в соответствии с госзаказом Министерства здравоохранения РФ.

Список литературы / References:

1. Parra E., Perez-Gil J. Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chem Phys Lipids.*, 2015, vol. 185, pp. 153-175, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002.
2. Lewis J.E., Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury. *Crit. Care Med.*, 2003, suppl. 4, pp. 324-328.
3. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г. Коронавирусная инфекция. Тяжелый острый респираторный синдром. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*, 2015, № 3, с. 35-42. [Lvov D.K., Kolobukhina L.V., Deryabin P.G. Coronavirus infection. Severe acute respiratory syndrome. *Infectious diseases: news, opinions, training*, 2015, no. 3, pp. 35-42. (In Russ.)]
4. Junqiang L. et al. CT Imaging of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*, 2020, vol. 295, no. 1, p. 18, doi: 10.1148/radiol.20200236.

5. Розенберг О.А. Препараты легочного сурфактанта и сурфактантотерапия ОРДС в условиях хирургической реанимации (обзор литературы). *Креативная хирургия и онкология*, 2019, т. 9, № 1. [Rozenberg O.A. Pulmonary surfactant preparations and surfactant therapy for ARDS in surgical intensive care (literature review). *Creative surgery and oncology*, 2019, vol. 9, no. 1, doi: 10.24060/2076-3093-2019-9-1-50-65. (In Russ.)]
6. Пилипчук Н.С. и др. *Способ исследования состояния сурфактанта при туберкулезе легких*. 1413528 SU. [Pilipchuk N.S. et al. *A method for studying the state of surfactant in pulmonary tuberculosis*. 1413528 SU. (In Russ.)]
7. Мизев А.И. и др. *Способ оценки состояния легочного сурфактанта*. 2500347 RU. 2013. [Mizev A.I. et al. *Method for assessing the state of pulmonary surfactant*. 2500347 RU. 2013. (In Russ.)]
8. Казаринов К.Д., Полников И.Г. Патент на изобретение № 2735315. *Измеритель параметров поверхности жидкости*. Дата гос. регистрации в Гос. Реестре изобретений РФ 29 октября 2020. Приоритет изобретения 03 марта 2020 г. [Kazarinov K.D., Polnikov I.G. Patent for invention no. 2735315. *Meter of liquid surface parameters*. State date registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation October 29, 2020. Invention priority March 03, 2020. (In Russ.)]

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR STUDYING THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM USING ELECTRIC GENERATION OF CAPILLARY WAVES (EXPRESS METHOD)

Kazarinov K.D.¹, Malinin V.S.¹, Shchelkonogov V.A.^{1,2,3}, Chekanov A.V.²

¹ Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics

Vvedensky sq., 1, Fryazino, Moscow region, 141190, Russia; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)

Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia

³ MIREA – Russian technological University

Vernadsky prospectus, 86, Moscow, 119571, Russia

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0517

Abstract. Based on the use of a new design of a capillary wave generator, a method is proposed for studying the human surfactant system for diagnosing patients suffering from pulmonary diseases, including after infection with COVID-19. The study of the surfactant system of the lungs (SSL) in a healthy organism and in pathology is one of the important tasks of modern pulmonology. The proposed method for monitoring human exhaled air condensate consists in applying a condensate sample to the surface of an aqueous solution, on which capillary waves are created due to the phenomenon of electrostriction, the change in the amplitude and phase of which makes it possible to determine the surface tension of the liquid and the parameters of the surfactant layer. To this end, we have developed a design and received a patent for the invention of a liquid parameter meter containing a liquid cuvette, a generator associated with a system for creating capillary waves on the liquid surface and a system for recording the characteristics of liquid vibrations. Improving the technology of the CCL control process is aimed at solving the problems of reducing the time of measuring the CCL and reducing the cost of the method.

Key words: *capillary wave generation method, surface properties of lipid monolayers, pulmonary surfactant, surface tension at the interface between two media, surfactants, wavelength and attenuation of surface waves.*

ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТА

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, стр. 24, г. Москва, 119892, РФ; e-mail: slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0518

Аннотация. Эритроцит представляет собой клетку, внутриклеточное пространство которой на 40% состоит из молекул гемоглобина (Гб), остальные 60% приходятся на молекулы воды. При изменении внутриклеточного объема, которое возможно при прохождении клеток эритроцита по кровеносному руслу, предполагается возможность перераспределения внутриклеточных компонентов клетки вследствие изменения её объема. Методами оптической спектроскопии (неинвазивные методы инфракрасной спектроскопии, Раман-спектроскопии, лазерной интерференционной микроскопии) выявлены изменения морфологии, конформации и перераспределения молекул Гб в эритроците человека в следствие увеличения соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы клетке. Установлено, что снижение активности работы Na^+/K^+ -АТФазы при помощи блокатора уабаина (3 мМ), приводит не только к увеличению $[Na^+]_{in}$ в клетке, но и увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны эритроцита. В этих условиях выявлены изменения конформации как гемовой, так и глобиновой части цитоплазматического Гб. Показано, что деполаризация клетки, вместе с изменением объема клетки, приводит к снижению плотности упаковки молекулы Гб, которые могут быть связаны как с сорбцией внутриклеточного Na^+ (или Ca^{2+}) с Гб, так и увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением Гб в клетке. Данные процессы могут приводить к изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб.

Ключевые слова: гемоглобин, конформация, уабаин, Раман-спектроскопия, инфракрасная спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения гемоглобина (Гб) при изменениях ионного гомеостаза эритроцита. Мы предполагаем, что изменения морфологии и объема эритроцита приводят к изменению способности Гб связывать или сбрасывать лиганды (в том числе O_2 и NO_x). Очевидно, эти процессы могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть последствием ряда патологий [1-3]. Известно, что при уремии и у больных с хронической почечной недостаточностью и при уремии, выявлено увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ [4,5]. При этом, важно отметить, что перераспределение ионов в клетке эритроцита сопровождается изменением мембранного потенциала, который, в свою очередь, модифицируют состояние мембранных белков и липидов. В качестве агента, способного изменять объем клетки, выбран уабаин – блокатор ферментативной активности Na^+/K^+ -АТФазы (Na-K-аденозин трифосфатаза EC 3.6.3.9) [6,7]. Na-K-АТФаза осуществляет перенос ионов против градиента их концентрации за счет гидролиза АТФ и поддерживает низкий уровень $[Na^+]_{in}$ в клетке [8]. Однако мало известно, каким образом изменения ионного гомеостаза и/или мембранного потенциала при работе Na-K-АТФазы в эритроците регулируют распределение и конформацию гемоглобина. Целью работы было исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроците при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы уабаином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение эритроцитов. Объектом исследования служили выделенные из цельной крови доноров эритроциты (объект предоставлен ФГБУ НМИЦ кардиологии имени академика А.Е. Чазова). Эксперименты с кровью человека проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 ед./мл крови). После забора, кровь хранили при $t = +4$ °С. Для выделения эритроцитов методом последовательного центрифугирования при 1500g использовали физиологический фосфатный буфер следующего состава: 145мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ CaCl₂, 4мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, pH 7.4. Полученную суспензию эритроцитов хранили на льду не более 3 часов.

Блокирование активности Na^+/K^+ -АТФазы. Для инкубации эритроцитов с убаином (G-Strophanthin, Sigma), готовили раствор с 10 мМ убаином (Fluka, #75640) в буфере Аллена и добавляли его к образцам эритроцитов (конечная концентрация убаина 3 мМ) и инкубировали в течении 60 минут.

Регистрация ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита. Для контроля за изменениями ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита, пробу выделенной суспензии эритроцитов разводили в 1000 раз ($Ht = 40\%$) физиологическим фосфатным буфером. Далее, 1 мл полученного раствора помещали в одноразовую капиллярную поликарбонатную U-образную кювету DTS1070 (Malvern, Великобритания) с золотыми электродами и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей воздуха или скопления эритроцитов в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатирующей ячейке прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при $+25^\circ\text{C}$. Время адаптации образца к температуре – 60 секунд, количество снятых измерений – 100. Каждое измерение включало не менее пяти повторов. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS и MS Excel.

Измерение объема эритроцита. Контроль за изменениями объема и формы эритроцита проводили при помощи лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ), разработанного во ВНИИОФИ на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия) с объективом 30x ($NA=0,65$), с λ полупроводникового лазера - 650 нм с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС видеокамеру VS-415U (NPK Videoscanner, Россия). Общее время регистрации изображения составляло 10 сек [9,10]. Образец наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Препарат с клетками эритроцитов находился в буфере и в буфере с 3 мМ убаином [11]. Все измерения проводили после часовой инкубации эритроцитов в растворах с соответствующей концентрацией убаина. Для восстановления фазового изображения по 9 регистрируемым интерферограммам методом фазовых шагов, использовали программу WinPhast, для последующей работы с изображениями – программы FIJI (США) и Origin 2017 (Microcal Inc., США).

Метод ЛИМ позволяет рассчитать объема эритроцитов [12–14] по формуле:

$$V = \frac{OPX_{mean}}{n_1 - n_0} \times S, \quad (1)$$

где S – площадь клетки, рассчитанная методом наименьших квадратов по фоновому значению. Измерения объема эритроцита с помощью ЛИМ проведено на 60 клетках.

КР-спектроскопия. Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР, Раман-спектроскопия) внутриклеточного Гб проводили с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига $1000-3200\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 1 см^{-1} , объектив 5x, мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15-30 секунд, количество накоплений сигнала - 3. Для регистрации сигнала, образец помещали в гематокритный капилляр с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия). Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное Origin 2017. Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии.

Для анализа полученных результатов использовали соотношение интенсивностей абсолютных величин полос спектра КР гемоглобина (табл. 1).

ИК-спектроскопия. Регистрацию спектров ИК внутриклеточного Гб проводили с использованием приставки НПВО (неполное внутренне отражение) на ИК-Фурье спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США). Измерения проводили при температуре 25°C в диапазоне $550-4000\text{ см}^{-1}$ с шагом измерения 4 см^{-1} . Время регистрации – 20 секунд. Измерения проводили в количестве повторов не менее 12. Для анализа положения максимумов пиков полос и построения соотношений интенсивностей полос, осуществляли коррекцию базовой линии спектра в программе Origin2017. Для анализа изменений структуры белковой части гемоглобина в эритроците использовали соотношения интенсивностей полос ИК-спектра (табл. 2) [15,16].

Таблица 1. Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [16-21]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1375}/I_{1172}	Выраженность симметричных и асимметричных колебания пиррольных колец. Снижение величины соотношения характеризует возрастание подвижности гема
I_{1580}/I_{1375}	Вклад валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец Относительная способность Гб выделять лиганды
I_{2880}/I_{2930}	вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов (возрастает при увеличении упорядоченности CH_2 -групп)

Таблица 2. Соотношение интенсивностей полос спектра ИК гемоглобина [15,16]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1650}/I_{1540}	Характеризует изменение вклада AmideI/AmideII. Смещение положения пика AmideI (1650 см^{-1}) указывает на изменение общего конформационного состояния белка в клетке
I_{1650}/I_{1243}	Различия по белкам*
I_{1450}/I_{1243}	Различия по аминокислотам*
I_{2930}/I_{1243}	Различия по жирным кислотам*

* - если после вычета базовой линии, полоса с максимумом при 1243 см^{-1} одинакова, то её можно использовать в качестве внутреннего стандарта оценки количественных изменений [10].

Флуоресценция триптофана белков эритроцита. Для контроля за изменениями конформации белков эритроцита (в первую очередь, гемоглобина) регистрировали изменения времени жизни флуоресценции триптофана с помощью метода счета одиночных фотонов с корреляцией по времени. Для этого, флуоресценцию белков эритроцита вызывали импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLED 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм, Chroma, США). Регистрацию сигнала флуоресценции осуществляли в диапазоне 300–400 нм, с максимумом при 340 нм. Аппаратуру TCSPC использовали в режиме FIFO, регистрируя поток спектрально меченных фотонов в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (Becker & Hickl GmbH, ФРГ).

Измерения проводили в кварцевой кювете (толщина поглощающего слоя 10 мм). Регистрация потока около 10^6 фотонов проводилась в течение 10 с в термостатирующей ячейке при $+25 \text{ }^\circ\text{C}$. Время адаптации образца к температуре – 60 секунд. Все эксперименты проводились не менее трех раз. Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью пакета программ SPCImage 8.0 (Becker & Hickl, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений морфологии эритроцита при блокировании Na-K-АТФазы. При селективном связывании убаина с Na-K-АТФазой блокируется выход из клетки Na^+ и вход K^+ [17], что приводит к накоплению Na^+ внутри клетки снижению входа K^+ на 88% с [18] и, как следствие наблюдается увеличение объема эритроцита (рис. 1).

Так, инкубация с убаином приводит к увеличению фазового объема клетки, а так же, снижению величины оптической разности хода за счет перераспределения молекул Гб в клетке при входе воды и накоплении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ [19]. Вероятно, увеличение объема эритроцита при блокировании насоса [18,20] может сопровождаться изменением трансмембранного потенциала и поверхностного заряда плазматической мембраны эритроцита. Действительно, при повышении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$, происходит деполяризация мембранного потенциала, которая запускает обратную моду $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, увеличивая $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Так же, основную роль в стабилизации объема эритроцитов выполняет кальций активируемые калиевые каналы [21]. Вероятно, этими процессами обусловлено увеличение заряда мембраны с $-15,2 \pm 0,2$ до $-13,1 \pm 0,1$ мВ, а также, перераспределение Гб в клетке.

Исследование изменений конформации Гб эритроцита при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы. Установлено, что блокирование активности Na-K-АТФазы приводит к увеличению $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и поверхностного заряда мембраны, а также перераспределению Гб в цитоплазме клетки. Вероятно, данные процессы могут быть фактором активации ряда внутриклеточных процессов (активация фосфолипаз), которые меняют упорядоченность жирнокислотных хвостов мембранных липидов, снижая долю примембранного Гб, связанного с белком полосы 3 (БПЗ), а также формирования комплекса Гб и БПЗ, за счет отрицательно заряженного компонента БПЗ [22–24], что может оказывать влияние на конформацию Гб в клетке.

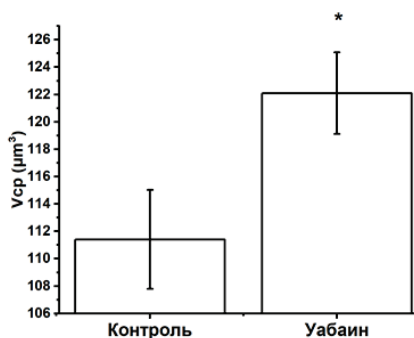


Рисунок 1. Фазовый объем эритроцита после 60-минутной инкубации в растворе с убаином. Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0,05$)

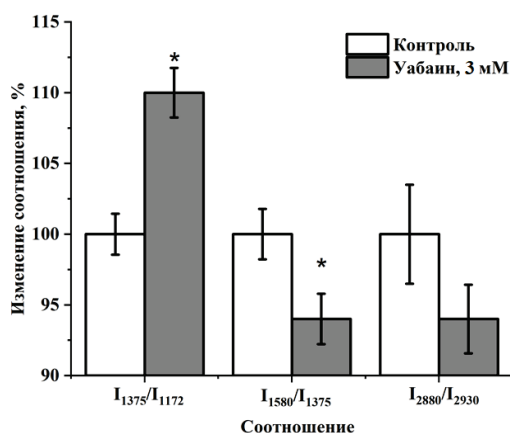


Рисунок 2. Величины соотношений интенсивностей полос КР-спектра представлены как изменение относительно контроля (эритроциты без добавления уробилина). Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0,05$)

С помощью метода КР установлено, что в условиях блокирования Na-K-АТФазы (деполяризация мембраны и вход ионов Na^+ в клетку), наблюдаются изменения в спектре гема гемоглобина (область валентных колебаний пирролов, соотношение I_{1375}/I_{1172}), свидетельствующие об изменении доли гема в «куполообразной конформации» (рис. 2). Так, выявлены изменения в конформации гема, характеризующие снижение подвижности гема (увеличение интенсивности соотношения I_{1375}/I_{1172}) и снижение способности Гб выделять лиганды (снижение величины соотношения I_{1580}/I_{1375}), что может быть вызвано как деполяризацией мембраны, так и снижением плотности Гб за счет входа воды, экранирование Гб молекулами воды, а так же, селективного связывания катионов Na^+ белками [19]. Отметим, что накопление внутриклеточного натрия приводит и к изменению конформации глобиновой части молекулы Гб (выявлена тенденция к снижению упорядоченности CH_n -групп (снижение величины соотношения I_{2880}/I_{2930}), что указывает на снижение плотности упаковки глобулы глобина и коррелирует с данными, свидетельствующими о снижении плотности распределения гемоглобина (по величине ОРХ) в клетке.

Для более детального исследования изменений конформации глобина гемоглобина и состояния липидов плазматической мембраны эритроцита использовали ИК-спектроскопию. Установлено, что в данных условиях наблюдаются изменения в валентных колебаниях связей CH_3 -групп аминокислотных остатков (I_{1450}/I_{1243}) и увеличение величины соотношения I_{2930}/I_{1243} , характеризующие упорядоченность жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов плазматической мембраны эритроцита. Например, при инкубации клеток с уробилином возрастает интенсивность полосы 1738 см^{-1} (рис. 3), которая характеризует растяжение $\text{C}=\text{O}$ связей фосфолипидов мембраны [25,26]. При инкубации эритроцитов с уробилином не выявлены изменения соотношения I_{1650}/I_{1540} (отношение AmideI к AmideII) и I_{1650}/I_{1243} , но смещение полосы 1650 до 1647 см^{-1} может свидетельствовать об изменении длины сопряжения между амидными связями $\text{C}=\text{O}$ во вторичной структуре белка.

В дополнительной серии экспериментов нами были выявлены изменения конформации белков СЭ (Гб, белки плазматической мембраны, цитоскелета и т.д.) (снижение времени флуоресценции триптофанов на 63 ± 5 %), что в первую очередь свидетельствует об изменении конформации глобина за счет изменения положения триптофанов глобина близ гема, либо в окружения молекул Гб (например, БПЗ) [27]. Все это,

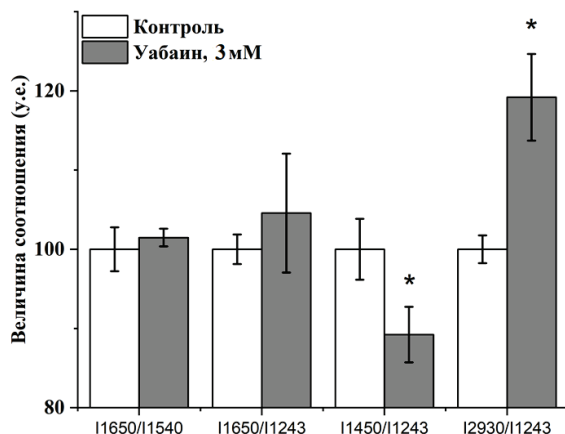


Рисунок 3. Величины соотношений интенсивностей полос ИК-спектра. Данные представлены как изменение относительно контроля (эритроциты без добавления уробилина). Данные представлены как среднее \pm SE (* $p \leq 0,05$)

вероятно, отражает перераспределение Гб в цитоплазме и снижение плотности упаковки глобулы Гб (рис. 1, 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения морфологии и конформации Гб в эритроците в результате увеличения соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в клетке так же сопровождаются увеличением положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. При этом, происходит снижение плотности упаковки глобина, что может быть связано с сорбцией Na^+ с Гб, либо с увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением молекул Гб в клетке. Вероятно, выявленные изменения характеризуют главным образом изменения во вторичной структуре глобина близ центров локализации гема, что в свою очередь оказывает влияние на конформацию гема – возрастает вероятность нахождения гема в куполообразной форме, что повышает способность молекул Гб связываться с лигандами.

Таким образом, увеличение соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в клетке может привести как к деполяризации плазматической мембраны и изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб. Все вышеперечисленное нарушает способность эритроцитов переносить кислород и является причиной гипоксии в норме и при патологии.

Исследование выполнено при финансовой РФФИ (№ 20-34-90073, для С.О.В.)

Список литературы / References:

1. Brearley C.J., Aronson J.K., Boon N.A., Raine A.E.G. Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on abnormalities of ion transport in vivo in patients with chronic renal failure. *Clinical Science*, 1993, vol. 85, no. 6, doi: 10.1042/cs0850725.
2. Kovalenko S.S., Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. Changes in the hemoporphyrin conformation in hemoglobin and NO-binding in erythrocytes under the action of insulin-like growth factor 1. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 6, doi: 10.1134/S0006350914060062.
3. Ivanova S.M., Labetskaya O.I., Anisimov N.A., Maksimov G.V., Parshina E.Yu., Yusipovich A.I. Morfobioximicheskie pokazateli e`ritroцитов i sostoyaniya gemoporfirinov gemoglobina u obsleduemy`x v dinamike kratkovremennoy izolyacii v germoob`eme, *Aviakosmicheskaya i e`kologicheskaya medicina*, 2019, vol. 53, no. 2, doi: 10.21687/0233-528X-2019-53-2-62-67.
4. Franceschi L. de, Oliveri O., Girelli D., Lupo A., Bernich P., Corrocher R. Red blood cell cation transports in uraemic anaemia: evidence for an increased K/Cl co-transport activity. Effects of dialysis and erythropoietin treatment. *European Journal of Clinical Investigation*, 1995, vol. 25, no. 10, doi: 10.1111/j.1365-2362.1995.tb01955.x.
5. Weiler E.W., Saldanha L.F., Khalil-Manesh F., Prins B.A., Purdy R.E., Gonick H.C. Relationship of Na-K-ATPase inhibitors to blood-pressure regulation in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1996, vol. 7, no. 3, doi: 10.1681/ASN.V73454.
6. Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M.N., Matskevich Y.A. Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, vol. 120, no. 3, doi: 10.1016/S0305-0491(98)10035-4.
7. Krzesinski J.-M., Du F., Pequeux M.L., Rorive G.L. Krzesinski J.-M. Plasma Na-K ATPase inhibitor activity and intracellular ions during hemodialysis. *The International Journal of Artificial Organs*, 1993, vol. 16, no. 1, doi: 10.1177/039139889301600106.
8. Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J.D. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*, 2003, vol. 65, no. 1.
9. Yusipovich A.I., Zagubizhenko M.V., Levin G.G., Platonova A., Parshina E.Y., Grygorzcyk R., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N. Laser interference microscopy of amphibian erythrocytes: Impact of cell volume and refractive index. *Journal of Microscopy*, 2011, vol. 244, no. 3, doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03516.x.
10. Bryzgalova N.Y., Brazhe N.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Rubin A.B. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 308, doi: 10.1134/S0006350909030075.
11. Kozinecz G.I., Simovart Yu.A. Poverxnostnaya arxitektonika kletok perifericheskoy krovi v norme i pri zabolevaniyax sistemy` krovi. *E`stonskaya sel`skoxozyajstvennaya akademiya*, 1984.
12. Mazon P., Muller S., Azouzi H. El On intensity reinforcements in small-angle light scattering patterns of erythrocytes under shear. *European Biophysics Journal*, 1997.
13. Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, vol. 145, no. 382, doi: 10.1007/s10517-008-0097-3.
14. Yusipovich A.I., Novikov S.M., Kazakova T.A., Erokhova L.A., Brazhe N.A., Lazarev G.L., Maksimov G.V. Peculiarities of studying an isolated neuron by the method of laser interference microscopy. *Quantum Electronics*, 2006, vol. 36, no. 9, doi: 10.1070/QE2006v036n09ABEH013408.
15. Din S. El, Aisha A., Bahay A.Z. El Effect of gamma irradiation on infrared spectra of rat hemoglobin. *Radiation Physics and Chemistry*, 1994, vol. 44, no.1-2, doi: 10.1016/0969-806X(94)90130-9.

16. Spigulis J., Kruminas A., Millers D., Sternberg A., Muzikante I., Ozols A., Ozolinsh M. *Micro-Raman scattering and infrared spectra of hemoglobin*. 2008, doi: 10.1117/12.815796.
17. Orlov S.N. Membrannaya teoriya patogeneza arterialnoj gipertenzii: chto my znaem ob etom polveka spustya? *Bulleten sibirskoj mediciny*, 2019, vol. 18, no. 2, doi: 10.20538/1682-0363-2019-2-234-247.
18. Suglobova E.D., Spiridonov V.N., Borisov Yu.A., Lebedeva E.B., Gavrilencov P.V. Biofizicheskie karakteristiki membran e`ritrocitov u bol`ny`x, poluchayushhix lechenie regulyarny`m gemodializom. Rezistenstnost` k dejstviyu vneshnego kanaloformera. *Nefrologiya*, 1998.
19. Sidorenko S.V., Rebrov V.G., Verkhov D.G., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. Competitive Binding of K⁺ in the Presence of Na⁺ with Bovine Serum Albumin and Hemoglobin. *Chemistry. Biology. Ecology*, 2016, vol. 16, no. 3, doi: 10.18500/1816-9775-2016-16-3-279-284.
20. Kalyagina N.V., Marty`nov M.V., Ataulloxanov F.I. Matematicheskij analiz regulyacii ob`ema e`ritrocita cheloveka s uchedom uprugogo vozdejstviya obolochki e`ritrocita na obmenny`e processy`. *Biologicheskie membrany*, 2013, vol. 30, no. 2, doi: 10.7868/S0233475513010052.
21. Ataulloxanov F.I., Klyatkina A.B., Vitviczkij V.M., Pichugin A.V. Regulyaciya obyoma eritrocitov cheloveka. Rol kalievyx kanalov, aktiviruemy s kalciem. *Biologicheskie membrany*, 1993, vol. 10, no. 5.
22. Wiley J.S., McCulloch K.E. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmacology & Therapeutics*, 1982, vol. 18, no. 2, doi: 10.1016/0163-7258(82)90070-5.
23. Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H.J. Influence of Calcium Permeabilization and Membrane-Attached Hemoglobin on Erythrocyte Deformability. *American Journal of Hematology*, 1992, vol. 41, doi: 10.1002/ajh.2830410306.
24. Peng Z., Li X., Pivkin I.V., Dao M., Karniadakis G.E., Suresh S. Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110, no. 33, doi: 10.1073/pnas.131182711.
25. Gasper R., Dewelle J., Kiss R., Mijatovic T., Goormaghtigh E. IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2009, vol. 1788, no. 6.
26. Lasch P., Boese M., Pacifico A., Diem M. FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level. *Vibrational Spectroscopy*, 2002, vol. 28, no. 1, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.02.016.
27. Slatinskaya O.V., Brazhe N.A., Orlov S.N., Maksimov G.V. The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2021, vol. 15, no. 3, doi: 10.1134/S1990747821030090.

CHANGES IN THE ERYTHROCYTE HEMOGLOBIN CONFORMATION AND DISTRIBUTION DURING RBC VOLUME CHANGES

Slatinskaya O.V., Maksimov G.V.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892, Russia; e-mail: slatolya@mail.ru

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0518

Abstract. The intracellular space of red blood cells (RBC) includes 40% hemoglobin (Hb) molecules and 60% being water molecules. When the intracellular volume changes, which is possible when erythrocyte cells pass through the blood stream, the possibility of redistribution of intracellular components of the cell due to its volume changes is assumed. By methods of optical spectroscopy (non-invasive methods of infrared spectroscopy, Raman-spectroscopy, laser interference microscopy) changes of morphology, conformation and redistribution of Hb have been revealed in the human erythrocyte due to an increase in the ratio of [Na⁺]_{in} and [K⁺]_{in} when Na⁺/K⁺-ATPase is blocked in the cell. The decrease of activity of Na⁺/K⁺-ATPase by a ouabaine (3 mM) has been found to lead not only to an increase in [Na⁺]_{in} cell but also to an increase in positive charge on the cytoplasmic surface of the RBC membrane. In these conditions, changes in the conformation of both the heme and globine parts of the cytoplasmic Hb have been identified. It has been shown that cell depolarization, together with cell volume change, leads to a decrease in packing density of Hb molecule, which may be related to sorption of intracellular Na⁺ (or Ca²⁺) c Hb, as well as increasing the amount of water molecules in the cell and redistributin Hb in the cell. These processes can lead to a change in the conformation of Hb, as well as to a redistribution and alteration of the conformation of the cytoplasmic Hb.

Key words: hemoglobin, conformation, Raman-spectroscopy, ouabain.

**ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА С ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ И КАРНОЗИНОМ:
ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИАГРЕГАНТНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ**
Щелконогов В.А.^{1,2,3}, Баранова О.А.², Чеканов А.В.², Казаринов К.Д.³, Шастина Н.С.¹,
Стволинский С.Л.⁴, Федорова Т.Н.⁴, Соловьева Э.Ю.², Федин А.И.², **Сорокоумова Г.М.¹**

¹ МИРЭА – Российский технологический университет

пр. Вернадского, 86, г. Москва, 119571, РФ; e-mail: vasily9999@yandex.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Минздрава Российской Федерации

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

³ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

пл. Введенского, 1, г. Фрязино Московской области, 141190, РФ

⁴ Научный центр неврологии

Волоколамское шоссе, 80, г. Москва, 125367, РФ

Поступила в редакцию 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0519

Аннотация. Были подобраны оптимальные условия для получения липосомальной формы, с липоевой кислотой (ЛК) и карнозином. Методом активной и пассивной загрузки удалось добиться высокой эффективности включения карнозина ($60\pm 5\%$) и липоевой кислоты ($\text{ЭВ}=75\pm 5\%$) в наночастицы (НЧ). Было показано, что добавление сахарозы или холестерина (ХС) к нанодисперсиями (НД) приводило к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы ($45\pm 5\%$). Получение ФХ-липосом (ФХ-Лс) с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному уменьшению степени включения карнозина (16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась ($\text{ЭВ}=58-69\%$). Было установлено, что полученные нанодисперсии представляют гомогенную систему наночастиц с размером 175-250 нм. Методом просвечивающей электронной микроскопии было обнаружено, что Лс ЛК+Карн представляют однородную систему, состоящую в основном из сферических наночастиц размером 120-200 нм. Важно отметить, что полученные липосомы с ЛК и карнозином стабильны в течение длительного хранения (15 мес.) при + 4 °С и комнатной температуре. Установлено, что ЛК с Карн проявляют антиоксидантное действие, приводя к 15-кратному снижению концентрации продуктов перекисидации липидов. Показано влияние полученных липосомальных препаратов на агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленной арахидоновой кислотой (АК). Установлено, что липосомы с ЛК и карнозином снижают степень агрегации Тц на 60-70%, относительно контролей.

Ключевые слова: липоевая кислота, карнозин, наночастицы, липосомы тромбоциты, арахидоновая кислота.

Принятые сокращения: АК – арахидоновая кислота, АФК – активные формы кислорода, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, Лс – липосомы, ЛК – липоевая кислота, Карн – карнозин, МДА – малоновый альдегид, МЛВ – мультиламеллярные везикулы, НД – нанодисперсии, НЧ – наночастицы, ФХ – фосфатидилхолин, ХС – холестерин, ОЛВ – одноламеллярные везикулы, ПОЛ – перекисное окисление липидов, Тц – тромбоциты, ТБК-АП – ТБК-активные продукты, ЭВ – эффективность включения.

ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые заболевания головного мозга занимают второе место среди всех причин инвалидизации и смерти во всем мире, уступая сердечно-сосудистым патологиям. Особо важен фактор ишемии при развитии хронических нарушений мозгового кровообращения, вследствие чего образуется сосудистая деменция. Поэтому ишемический инсульт следует рассматривать в качестве ключевого патогенетического фактора развития самых разнообразных нозологических форм в рамках сосудистой патологии головного мозга и, в первую очередь, ишемического инфаркта мозга [1].

Сама по себе ишемия головного мозга является пусковым фактором развития чрезвычайно многообразного комплекса патобиохимических реакций, которые приводят к гипоксии (кислородному голоданию) и, в последствие к процессам дегенерации и гибели нейронов в результате нарушения механизмов ауторегуляции мозгового кровообращения. К наиболее важным патогенетическим механизмам развития ишемического инфаркта головного мозга относят [2]: нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, воспалительные реакции, аутофагию и деструкцию ГЭБ.

Иностранные и отечественные научные публикации по данной теме [3,4] показывают, что одним из наиболее перспективных и широко применяемых в медицине антиоксидантов при комплексной терапии ишемии головного мозга в настоящее время является альфа-липоевая кислота (ЛК). На экспериментальных моделях

ишемического инсульта у крыс было показано нейропротекторное действие ЛК, которое связано с подавлением количества малинового альдегида (МДА – основанного биохимического маркера ишемического повреждения, который является продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ)) и снижением концентрации активных форм кислорода, а также с повышением активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях головного мозга [5-7]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что липоевая кислота подавляет агрегацию тромбоцитов (Тц), снижает уровни кальция и тромбоксана В2 при активации данных клеток коллагеном и арахидоновой кислотой [8,9].

Другим эффективным антиоксидантом является карнозин (Карн.). Карнозин (β - аланил-L-гистидин), - первый пептид, который был когда-либо выделен из природного материала [10]. Данный дипептид содержится в больших количествах в мышечной и нервной ткани. Карнозин может достигать очень высокой концентрации в скелетных мышцах человека (до 20 mM). Демонстрация антиоксидантного антиишемического, репаративного, антикатарактального действия дипептида в конце 20-ого века привела к большому интересу со стороны медицинского научного сообщества к карнозину. [11]. Карнозин является эффективным хелатором ионов металлов, таких как цинк, который требуется для активности матриксных металлопротеиназ. На экспериментальных моделях ишемии у животных было установлено, что карнозин хорошо переносится (усваивается) и является надежным защитником нейронов [12]. Y. Shen и др. [13] на модели инсульта мышей показали, что карнозин уменьшает эксайтотоксичность глутамата, что приводит к уменьшению размера инфаркта и улучшению неврологических функций. В другом исследовании [14] было выявлено, что данный дипептид не только уменьшает размер инфаркта, но и подавляет активность ММП и уровни активных форм кислорода (АФК). Он также легко проникает через ГЭБ, что позволяет его применять даже на ранних стадиях инсульта.

Однако оба этих антиоксиданта (липовая кислота, и карнозин) обладают рядом недостатков. Основными недостатками ЛК являются её очень низкая растворимость в воде, быстрое связывание с различными белками и быстрая биодegradация под действием различных ферментов [15], что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. Полная деградация в кровотоке происходит менее чем за час. В результате чего при терапии различных патологий пациентам вводят препараты, содержащие ЛК, в больших дозах и в течение длительного времени, для достижения её терапевтического эффекта. В наше время, как правило, практикуется внутривенное введение ЛК. Карнозин также вводят в больших дозах, т.к. он быстро биодegradирует в организме под действием фермента карнозинызы.

Создание новых лекарственных форм данных препаратов с целью адресной доставки в и улучшения антиоксидантного, антиагрегационного и терапевтического действия является актуальной проблемой в наше время. Одним из подходов решения данной проблемы служит создание липосомальной формы, содержащей одновременно липоевую кислоту и карнозин. Известно, что липосомы способны проникать через гематоэнцефалический барьер и через различные мембраны клеток (посредством их слияния с клеточной мембраной или рецептор-опосредованного эндоцитоза).

Целью данной работы является получение липосомальной формы, содержащей карнозин и липоевую кислоту, и исследование её антиоксидантных и антиагрегационных свойств в отношении тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 94% чистоты, выделенный из бобов сои («LipoidGmbH», Германия); Липоевую кислоту, карнозин, холестерин («Sigma-Aldrich», США); арахидоновую кислоту (Helena Biosciences Europe, США); хлороформ, хлорид натрия (0,9%), этиловый спирт, сульфат аммония (Химмед, Россия).

Методы. Для получения липосом использовали миниэкструдер «LiposoFast basic» («Avestin», США), использованием фильтров «Whatman» (США) с размером пор 100, 200 нм.

Гель-фильтрацию проводили на колонке illustra NAP-5 с сорбентом Sephadex G25 Medium. Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре SHIMADZU UV-1601, P/N 206-67001 (Япония). Для определения размеров частиц методом динамического светорассеяния использовали прибор Delsa Nano C («Beckman Coulter Inc.», США).

Получение липосомального препарата, содержащего липоевую кислоту с карнозином. Смесь ФХ (40 мг) и ЛК (5 мг) растворяли в 2 мл хлороформа, затем реакционную смесь упаривали, растворяли в сульфате аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,3 M) в 1 мл растворе NaCl (0,9%). Одноламеллярные везикулы получали методом экструзии. Затем липосомы разделяли от сульфата аммония методом гель фильтрации и добавляли к липосомам водный раствор карнозина (1 мл) с концентрацией 25 мг/мл, при нагревании при температуре 50 °C и перемешивали в течении 30 минут. Степень включения субстанций в липосомах определяли спектрофотометрическим методом.

Определение ТБК-активных продуктов. Использовали свежеприготовленный реагент, который получали следующим образом: 30 г трихлоруксусной кислоты и 0,134 г тиобарбитуровой кислоты (ТБК) растворяли в 200 мл дистиллированной воды при нагревании на водяной бане. К 0,5 мл 1% (m/v) водной дисперсии анализируемого образца добавляли 3 мл указанного выше реагента и кипятили в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл хлороформа, при этом липиды переходили в нижнюю хлороформную фазу. Измеряли оптическую плотность раствора в верхней водной фазе относительно реагента при 580 и 532 нм и рассчитывали концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в образце по формуле:

$$C_{\text{ТБК-АП}} = \frac{(OD_{532} - OD_{580}) \times 6 \times 1000}{155}, \text{ (нмоль/мл)},$$

коэффициент экстинкции МДА при 532 нм – 155 мМ⁻¹×см⁻¹;

коэффициент разведения липосом в реакционной среде – 6.

Выделение обогащённой тромбоцитами плазмы. Эксперименты проводили *in vitro* на обогащённой тромбоцитами плазме, выделенной из крови, полученной у здоровых доноров. У всех участников было получено добровольное согласие на взятие биоматериала. Обогащённую тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием крови в течение 12 мин при 135 g при комнатной температуре. Затем отбирали супернатант, осадок центрифугировали в течение 15 мин при 850 g для получения обеднённой тромбоцитами плазмы (ОТП).

Метод исследования процесса агрегации тромбоцитов. В образцы с ОТП (225 мкл), добавляли липосомы без антиоксидантов, или липосомальный препарат с ЛК и карнозином, или липосомы с ЛК, или с карнозином, или их водорастворимые формы (20-30 мкл), инкубировали в течение 5 мин при 37 °С. Затем добавляли индуктор агрегации Тц арахидоновую кислоту (25 мкл, 1 мг/мл). Агрегатограмму регистрировали на четырехканальном агрегометре «Helena AggRAM» (США) в течение 10 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Даная работа посвящена разработке липосомальной формы, содержащей одновременно две субстанции: карнозин и липоевую кислоту. Эти оба вещества проявляют антиоксидантные свойства и применяются при различных патологиях, в том числе и при нейродегенеративных расстройствах. Для увеличения растворимости ЛК и защиты ЛК и Карн. от биодеградации под действием ферментов, нами предложено использовать их липосомальную форму.

В ходе работы подбирали оптимальные условия для максимально возможного включения ЛК и Карн в липосомы, в том числе путем подбора метода загрузки и липидного состава липосом. Липосомы, содержащие ЛК и Карн, получали из природного липида соевого фосфатидилхолина (ФХ) или из смеси ФХ и холестерина, используя метод пассивной и активной загрузки. Размер частиц и индекс полидисперсности определяли методом динамического светорассеяния. Эффективность включения субстанций определяли спектрофотометрическим методом. Результаты проведенных экспериментов приведены в таблице 1.

В результате проведенных исследований были получены липосомы с ЛК+Карн на основе ФХ, ФХ+ХС, и ФХ с сахарозой с размером НЧ равным 150-250 нм. Значения индекса полидисперсности (PDI) полученных липосом были меньше 0,3, что подтверждало однородность данных нанодисперсий. Необходимо отметить, что размеры и PDI полученных наночастиц не отличались при вариации методов их получения. Вместе с этим было установлено, что при получении ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки происходило уменьшение степени включения карнозина (ЭВ = 16%) в липосомы. При этом получение липосом, содержащих ЛК и Карн. одновременно активной загрузкой привело к значительному увеличению эффективности включения карнозина в липосомы (63±5%). Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы (35-45%). Тем временем эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов пассивной и активной загрузки практически не изменилась (58-75%). Полученные нанодисперсии были электронейтральными. Необходимо отметить, что липосомы, содержащие ЛК и Карн., были стабильными при длительном хранении (12 мес.) при комнатной температуре (рис. 1), по-видимому, за счет стабилизации липидного бислоя ЛК или карнозином. Данные вещества могут выступать в роли со-ПАВА в наночастицах.

Таблица 1. Характеристики липосом, содержащих одновременно липоевую кислоту с карнозином, рН 7,4, ионная сила 0,15 мМ

Состав липосом, 40мг/мл	Лекарственное вещество		ζ-потенциал, мВ	ЭВ, %		PDI	Размер частиц, нм
	ЛК Сисх., мг/мл	Карнозин Сисх., мг/мл		ЛК	Карнозин		
пассивная загрузка							
ФХ	5	25	5,5±2,5	57±10	18±5	0,154±0,010	220±20
активная загрузка							
ФХ	5	25	3,0±1,5	75±5	63±5	0,153±0,017	230±10
ФХ+ХС	5	25	7,5±3,5	68±5	35±10	0,184±0,052	245±10
ФХ+сахароза	5	25	5,0±2,5	58±10	45±7	0,081±0,023	150±15

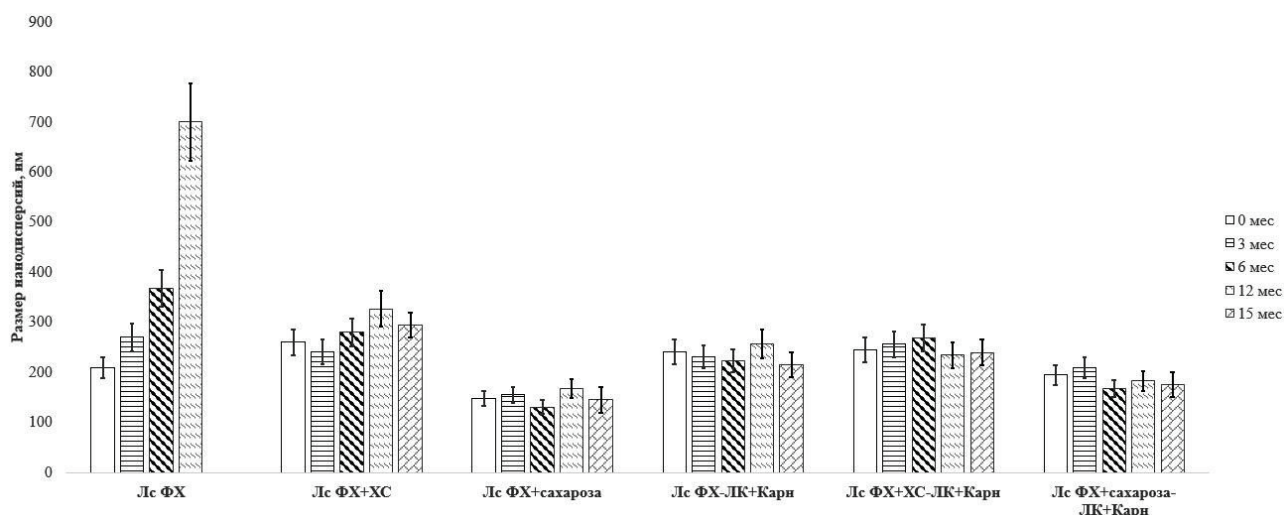


Рисунок 1. Размер липосом, содержащих ЛК и Карн, в течение длительного хранения при комнатной температуре. (Сфх=40 мг/мл, Схол=4 мг/мл, Слк=5 мг/мл, Скарн=25 мг/мл)

С помощью метода электронной сканирующей микроскопии была изучена морфология липосом, содержащих карнозин с липоевой кислотой. Было показано, что липосомы с ЛК+Карн представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических НЧ с размером 150 – 250 нм (рис. 2, Б – Г). Однако Лс, без антиоксидантов, также имеют сферическую форму, но образуют небольшие агрегаты, гетерогенные системы (рис. 2, А).

Для исследования антиоксидантного действия полученных липосомальных препаратов с ЛК и Карн на следующем этапе работы на модели реакции Фентона изучалось их влияние на окисление липидов в присутствии индуктора окисления Fe^{2+} и H_2O_2 . К образцам ФХ Лс содержащим Карн или ЛК, в различных концентрациях (Скарн = 10^{-4} М – 10^{-2} М, Слк = 5×10^{-3} М) добавляли компоненты реакции Фентона: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (С= 10^{-4} М) и H_2O_2 (С= 10^{-3} М), затем инкубировали при различных температурах (37 или 100 °С) в течение 15, 30 или 60 мин,

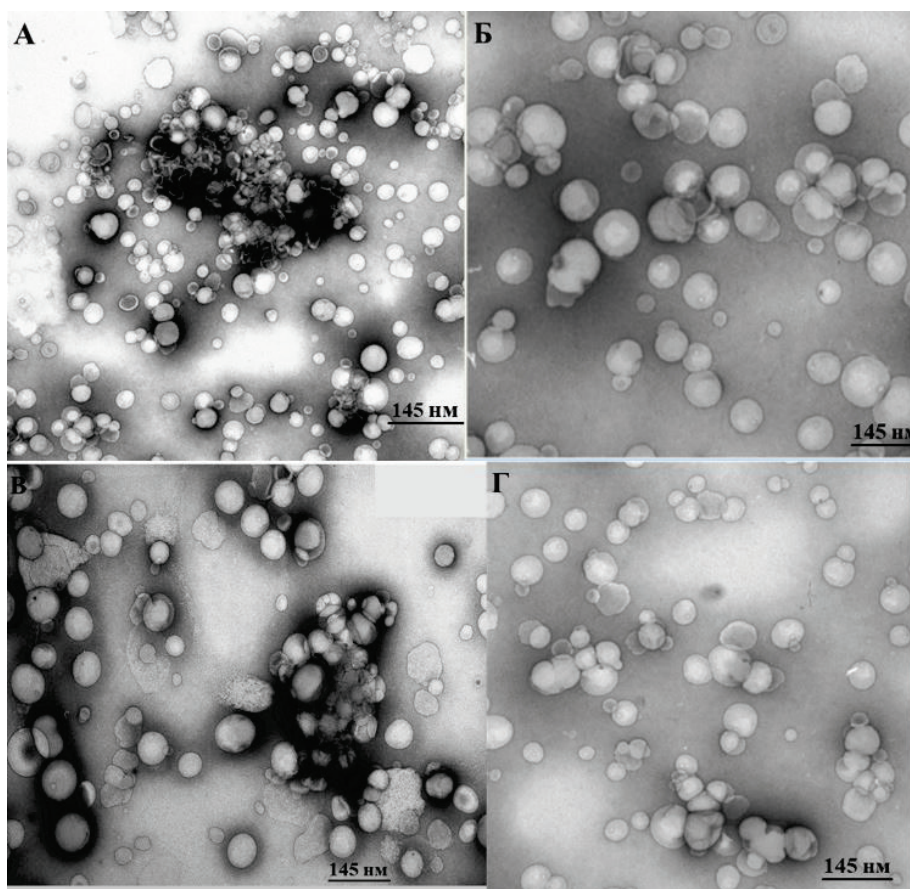


Рисунок 2. Электронные микрофотографии липосом: А – Лс ФХ; Б – Лс ФХ- Карн+ЛК; В – Лс ФХ+ХС- Карн+ЛК; Г – Лс ФХ+сахароза- Карн+. ЛК (Сфх=40 мг/мл, Схс=4 мг/мл, Слк =5 мг/мл, Скарн. =20 мг/мл)

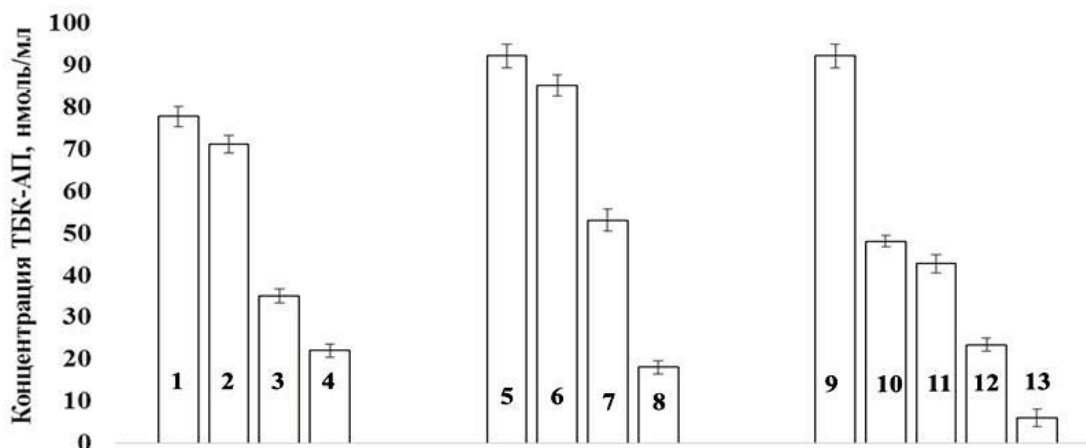


Рисунок 3. Влияние Карн и ЛК на концентрацию ТБК-АП в фосфолипидах: **1,5,9** – контроль, Лс-ФХ без антиоксидантов; **2,3,4** – реакция Фентона, проведённая при 100 °С в течение 15 мин; Лс ФХ-Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М); **6,7,8** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ-Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М); **10** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ-ЛК (5×10^{-3} М); **11,12,13** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ ЛК (5×10^{-3} М) и Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М)

соответственно, и определяли содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП). В качестве контроля использовали ФХ-липосомы, не содержащие данных антиоксидантов (рис. 3).

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при добавлении Fe^{2+} и H_2O_2 к ФХ-липосомам происходило накопление ТБК-АП (рис. 3, **1,5,9**). Добавление сульфата железа и пероксида водорода к Лс ФХ-Карн (10^{-3} , 10^{-2} М, рис. 3, **3,4, 7,8**) или ЛК (Слк= 5×10^{-3} М, рис. 3, **10**), приводило к значительному уменьшению (в 2-4 раза) содержания ТБК-АП (рис.3, **3,4,7,8,10**). При этом температура и время нагревания образцов никак не повлияли на антиоксидантные свойства субстанций. Наиболее эффективно антиоксидантные свойства проявляли липосомы, содержащие оба антиоксиданта (Скарн = 10^{-2} М, Слк= 5×10^{-3} М). При этом был отмечен синергетический эффект – липосомы, содержащие Карн и ЛК, в 15 раз эффективнее предотвращали накопление ТБК-АП по сравнению с контролем (рис. 3, **13**). Вероятнее всего проявление антиоксидантных свойств ЛК и Карн в данной биологической системе связаны с хелатированием ионов железа.

На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных липосомальных форм антиоксидантов на функциональную активность тромбоцитов в условиях индукции агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, полученных от условно здоровых доноров. Оценивалось влияние полученных ФХ-липосом с ЛК + Карн. на функциональную активность тромбоцитов в сравнении с контролями: Тц+АК, ФХ-липосомами, не содержащими ЛК и растворами Карн и ЛК в фосфатном буферном растворе с рН 7,4. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 4.

В результате проведенных исследований было установлено, что липосомы, содержащие ЛК (2 мМ) и Карн (2,5 мМ), подавляют агрегацию Тц, обусловленную арахидоновой кислотой, на 50% относительно контролей (рис. 3). Вместе с этим, было показано, что липосомы с ЛК (2 мМ) и с Карн. (2,5 мМ) уменьшают степень агрегации тромбоцитов, индуцированную АК на 67 и 38%, соответственно. Однако, как Лс без антиоксидантов, так и водорастворимые формы препаратов липоевой кислоты и карнозина, практически не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором. Вероятнее всего, что водорастворимые препараты

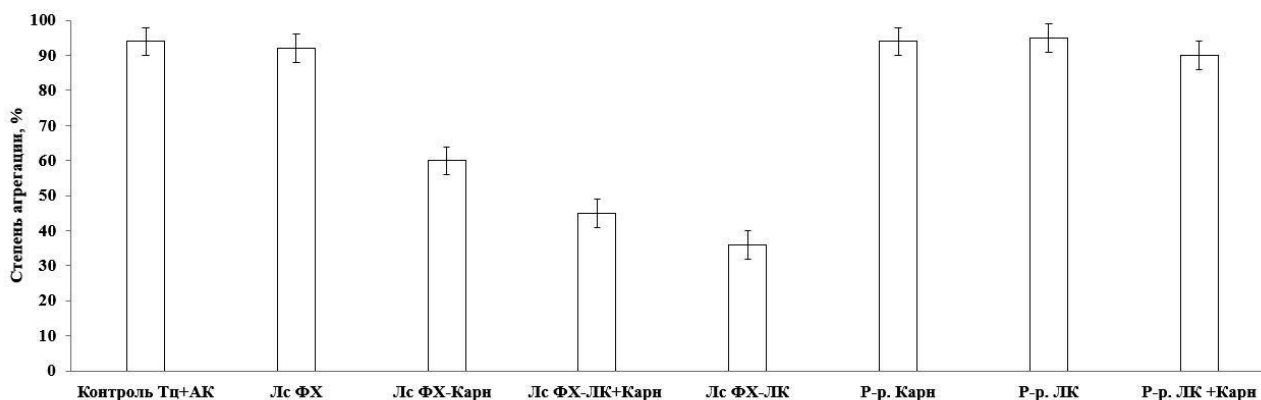


Рисунок 4. Влияние липосомальных и водорастворимых форм с липоевой кислотой карнозином на агрегацию тромбоцитов человека (здоровые доноры, $n=20$, 1×10^6 кл/мл), обусловленную арахидоновой кислотой

липоевой кислоты и карнозина обладают низкой способностью к проникновению в клетки. Липосомы, содержащие ЛК или Карн, а также липосомальный препарат, включающий ЛК и Карн, по-видимому, способны проникать через клеточную мембрану за счет слияния липосом с мембраной тромбоцитов или за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом были подобраны оптимальные условия для получения липосомального препарата, содержащего карнозин с липоевой кислотой. С помощью методов активной и пассивной загрузки удалось добиться достаточно высокой степени включения липоевой кислоты ($75\pm 5\%$) и карнозина ($63\pm 5\%$) в липосомы. Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению эффективности включения карнозина в наночастицы ($35-45\%$). Получение ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному уменьшению степени включения карнозина (16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась ($58-75\%$). Необходимо отметить, что полученные липосомальные препараты представляют собой однородную систему наночастиц с размером $150-250$ нм. Методом электронной микроскопии была изучена морфология липосомальных препаратов. Было обнаружено, что липосомы с ЛК+Карн. представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических НЧ и практически одинакового размера. Было установлено, что полученные липосомальные препараты дисперсионно стабильны в течение длительного хранения (более 15 мес.) при комнатной температуре и не образуют никаких агрегатов НЧ.

На модели реакции Фентона показано антиоксидантное действие Карн, ЛК и их комбинированного препарата на образование продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Установлено, что при использовании концентрации ЛК 5×10^{-3} М и Карн 10^{-4} М – 10^{-2} М эти субстанции проявляют антиоксидантное действие, а в комплексном препарате ЛК+Карн проявляется их аддитивный эффект, приводящий к 15-кратному снижению концентрации ПОЛ.

Изучение влияния липосомальной формы карнозина с ЛК на агрегацию тромбоцитов, выделенных из крови, полученной от условно здоровых доноров, показало, что липосомальный препарат, содержащий Карн с ЛК, ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой на 50%. Важно отметить, что водорастворимые препараты карнозина и липоевой кислоты никак не влияли на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой. Вероятно, это связано с плохой способностью проникать в клетку этих препаратов, тогда как липосомальный комбинированный препарат более легко проникает через клеточную мембрану путём её слияния с мембраной тромбоцита или за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Таким образом, нами получен эффективный комплексный препарат, содержащий два антиоксиданта и проявляющий антиагрегационные свойства в отношении тромбоцитов человека.

Данная работа выполнена в рамках гос. задания (№ гос. регистрации НИОКТР АААА-А19-119100390063-9) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики "Базис" (№ гранта 22-1-1-28-1).

Авторы выражают благодарность Абдулджаббар Балсам Тарек за получение липосомальных препаратов, руководителю организации представительства компании "ЛИПОИД АГ" (Германия), г. Москва, к.х.н., Сымону Андрею Валентиновичу, за предоставление фосфатидилхолина Lipoid S-100 и вед. науч. сотр. лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ИМБ РАН Попенко В. И. за определение морфологии нанодисперсий.

Список литературы / References:

1. Бурчинский С.Г. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции. *Статьи института геронтологии АМН Украины*, 2006, т. 14, с. 15-18. [Burchinsky S.G. Brain ischemia: the possibilities of complex pharmacological correction. *Articles of the Gerontology Institute of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 2006, vol. 14, pp. 15-18. (In Russ.)]
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. *Ишемия головного мозга*. М.: Медицина, 2001, 328 с. [Gusev E.I., Skvortsova V.I. *Cerebral ischemia*. M.: Medicine, 2001, 328 p. (In Russ.)]
3. Соловьева Э.Ю., Миронова О.П., Баранова О.А. и др. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при ишемии головного мозга. *Журн. неврол. и психиат.*, 2008, т. 108, № 6, с. 88-94. [Solovieva E.Yu., Mironova O.P., Baranova O.A. et al. Free-radical processes and antioxidant therapy for cerebral ischemia. *Zhurn. неврол. and psychiat.*, 2008, vol. 108, no. 6, pp. 88-94. (In Russ.)]
4. Mitsui Y., Sahmelzer J.D., Zollman P.J. et al. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemic-reperfusion injury of peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*, 1999, vol. 163, pp. 11-16.
5. Clark W.M., Rinker L.G., Lessov N.S., Lowery S.L., Cipolla M.J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*, 2001, vol. 32, pp. 1000-1004.
6. Deng H., Zuo X., Zhang J., Liu X., Liu L.I., Xu Q., Wu Z. α -Lipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion induced injury in rats. *Molecular medicine REPORTS*, 2015, vol. 11, pp. 3659-3665.
7. Packer L., Tritschler H.J., Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.*, 1997, vol. 22, pp. 359-378.

8. Lai Y.S., Shih C.Y., Huang Y.F., Chou T.C. Antiplatelet activity of alpha-lipoic acid. *J Agric Food Chem.*, 2010, vol. 58, pp. 8596-8603.
9. Щелконогов В.А., Сорокумова Г.М., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д. и др. Липосомальная форма липоевой кислоты: получение и определение антиагрегационной и антиоксидантной активности. *Биомедицинская химия*, 2016, т. 5, с. 577-583. [Shchelkonogov V.A., Sorokumova G.M., Baranova O.A., Chekanov A.V., Kazarinov K.D. et al. Liposomal form of lipoic acid: preparation and determination of antiplatelet and antioxidant activity. *Biomedical chemistry*, 2016, vol. 5, pp. 577-583. (In Russ.)]
10. Castelletto V., Cheng G., Stain C., Connon C.J., Hamley I.W. Self-Assembly of a Peptide Amphiphile Containing L Carnosine and Its Mixtures with a Multilamellar Vesicle Forming Lipid. *Langmuir*, 2012, vol. 28, pp. 11599-11608.
11. Фадеева Д.А., Халикова М.А., Жилиякова Е.Т., Новиков О.О., Новикова М.Ю., Попов Н.Н., Сорокопудов В.Н. Аналитическая характеристика карнозина. *Серия Медицина. Фармация*, 2010, т. 93, с. 179-184. [Fadeeva D.A., Khalikova M.A., Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Novikova M. Yu., Popov N.N., Sorokopudov V.N. Analytical characteristic of carnosine. *Series Medicine. Pharmacy*, 2010, vol. 93, pp. 179-184. (In Russ.)]
12. Bae O.N. Serfozo K., Baek S.-H et al Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. *Stroke*, 2013, vol. 44, pp. 205-212.
13. Shen Y.P., Shen Y.P., He Y.-Y. et al. Carnosine protects against permanent Cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, vol. 48, pp. 727-735.
14. Rajanikant G., Rajanikant G., Zemke D., Senut M.C. et al. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2007, vol. 38, pp. 3023-3031.
15. Akiba S., Matsugo S., Packer L., Konishi T. Assay of Protein-Bound Lipoic Acid in Tissues by a New Enzymatic Method. *Analytical biochemistry*, 1998, vol. 2, pp. 299-304.

LIPOSOMAL FORM WITH LIPOIC ACID AND CARNOSINE: PRODUCTION, ANTIPLATELET AND ANTIOXIDANT EFFECT

Shchelkonogov V.A.^{1,2,3}, Baranova O.A.², Chekanov A.V.², Kazarinov K.D.³, Shastina N.S.¹, Stvolinsky S.L.⁴, Fedorova T.N.⁴, Solovieva E.Y.², Fedin A.I.², Sorokoumova G.M.¹

¹ MIREA – Russian Technological University

86 Vernadsky Ave., Moscow, 119571, Russia; e-mail: vasily9999@yandex.ru

² Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of the Russian Federation

1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

³ V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of the Russian Academy of Sciences
1 Vvedensky Square, Fryazino, Moscow Region, 141190, Russia

⁴ Scientific Center of Neurology

Volokolamsk highway, 80, Moscow, 125367, Russia

Received 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0519

Abstract. Optimal conditions were selected for obtaining the liposomal form with lipoic acid (LA) and carnosine. Using methods of active and passive loading, it was possible to achieve high efficiency inclusion of carnosine (60±5%) and lipoic acid (75±5%) in nanoparticles (NPs). It has been shown that the addition of sucrose or cholesterol (Chol) to nanodispersions (NDs) led to a slight decrease in the efficiency incorporation of carnosine in nanoparticles (45±5%). The production of PC-liposomes (PC-Ls) with LA and carnosine by passive loading led to a significant decrease in the efficiency inclusion of carnosine in liposomes (16%). At the same time, the efficiency of inclusion of LA in PC liposomes using methods of both passive and active loading practically did not change (58-69%). It has been found that the obtained nanodispersions are homogeneous system of nanoparticles with size of 175-250 nm. By transmission electron microscopy, it has been shown that LA+Carn. Liposomes represent a homogeneous system consisting mainly of spherical nanoparticles with a size of 120-200 nm. It is important to note that the obtained liposomes with LA and carnosine are stable during long-term storage (15 months) at + 4 ° and at room temperature. It was established that liposomes LA with Carn exhibit an antioxidant effect, leading to a 15-fold decrease in the concentration of lipid peroxidation products. The effect of the obtained liposomal forms on platelet aggregation caused by arachidonic acid has been revealed. It has been found, that liposomes with LA and carnosine reduce the degree of aggregation of platelets by 60-70%, relative to controls.

Key words: lipoic acid, carnosine, nanoparticles, liposomes, platelets, arachidonic acid.

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ СДВИГЕ БАЛАНСА ДЕЙТЕРИЯ И ПРОТИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.

НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Абрикосовский пер., 2, г. Москва, 119991, ГСП-1, РФ; e-mail: rodich_k@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0520

Аннотация. Способность снижения изотопного состава водорода во внутренней среде организме влиять на физиологию органов эндокринной системы – новое и практически неизученное направление в науке. Целью работы было изучение морфологических и функциональных изменений щитовидной железы самцов крыс после двухнедельного понижения содержания дейтерия во внутренней среде организма. Эксперимент был проведен на самцах крыс Вистар, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия вместо питьевой воды в течение 2 недель. Основное действие, оказываемое водой со сниженным содержанием дейтерия на организм – постепенное снижение содержания дейтерия в жидких средах и тканях за счёт реакций изотопного обмена. Через 2 недели после начала эксперимента определяли концентрации тиреоидных гормонов: общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4), общего и свободного трийодтиронина (Т3 и сТ3), и тиреотропного гормона (ТТГ). Проводили гистологическое и морфометрическое исследование препаратов щитовидной железы. Полученные данные показали, что длительное снижение дейтерия во внутренней среде организма приводит к структурным перестройкам в щитовидной железе и ее секреторной активности, и связано с гипоталамо-гипофизарным гипотиреозом вследствие снижения синтеза тиреотропного гормона.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопы водорода, щитовидная железа, тиреоидные гормоны.

Дейтерий – стабильный изотоп водорода, широко распространенный в живой природе. Если рассматривать дейтерий как химический элемент, входящий в состав не только воды, но и важнейших органических соединений, то по значимости его можно поставить на одно из первых мест. Среди других элементов в организме человека дейтерий оказывается сразу за натрием. Его содержание в плазме крови в 4 раза больше, чем калия, в 6 раз больше, чем кальция, в 10 раз больше, чем магния и намного больше содержания таких важнейших микроэлементов, как фтор, железо, йод, медь, марганец и кобальт. При этом содержание дейтерия в плазме крови здоровых животных на 3-6 ppm превышает уровень содержания дейтерия в питьевой воде [1]. В настоящее время значительное развитие получили исследования биологических эффектов воды с пониженным содержанием дейтерия. Основное действие, оказываемое водой с модифицированным изотопным составом со сниженным содержанием дейтерия на организм – постепенное снижение содержания дейтерия в жидких средах и тканях за счёт реакций изотопного обмена [2]. В научной литературе имеются единичные публикации по влиянию изменения содержания в организме дейтерия на функции эндокринной системы и контролируемые ими метаболические процессы [3,4]. При этом исследование функции щитовидной железы в условиях изменения концентрации дейтерия во внутренней среде организма ранее не проводилось.

Целью работы было изучение морфологических и функциональных изменений щитовидной железы самцов крыс после двухнедельного понижения содержания дейтерия во внутренней среде организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар. Животные контрольной группы (n=6) потребляли дистиллированную воду с содержанием дейтерия [D]=146 ppm ad libitum, что соответствует содержанию дейтерия в водопроводной воде. Животные опытной группы (n=6) потребляли воду с пониженным содержанием дейтерия [D]=10ppm (ИП Селиваненко, Россия) в течение 2 недель. Учитывали количество потребленной крысами жидкости, рассчитывали объемы потребленной жидкости на 100г массы тела.

Животных выводили из эксперимента через 2 недели передозировкой золетила.

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрации тиреоидных гормонов: общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4), общего и свободного трийодтиронина (Т3 и сТ3), и тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью коммерческих наборов («BioVendor», «Monobind», США).

Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна и после гистологической проводки заливали в парафин. Изготавливали срезы, которые после депарафинизации окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое и морфометрическое исследование препаратов с помощью световой микроскопии и компьютерной морфометрии с использованием программы “Image Scope” и светового микроскопа “Leica DM2500” (“Leica Microsystems”, Германия). Определяли размеры фолликулов, количество фолликулов в 1мм² площади среза железы и высоту фолликулярных тироцитов. Исследование проводили с учетом особенностей регионарного строения долей щитовидной железы крыс, по отдельности в центральных и периферических зонах долей, составляющих одну треть и две трети доли соответственно [5]. Статистическую обработку осуществляли

с помощью пакета программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У крыс контрольной группы щитовидная железа представляла собой парный орган паренхиматозного строения, состоящий из двух долей, снаружи покрытых соединительно-тканной капсулой, от которой отходили тонкие перегородки, делящие паренхиму на дольки. Паренхима была представлена группами различных по размеру фолликулов овальной и круглой формы. Более крупные фолликулы локализовались в периферических зонах. Фолликулы были заполнены плотным коллоидом. Фолликулярный эпителий был, в основном, кубической формы. Ядра имели округлую форму. Цитоплазма характеризовалась умеренной базофилией. Стромальный компонент был слабо развит.

Через 2 недели после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, были выявлены морфологические изменения щитовидной железы. Отмечалось уменьшение размеров фолликулов, особенно заметно в центральной зоне (табл. 1), при этом отмечалось незначительное увеличение их числа в единице площади среза железы. Фолликулы имели овальную и круглую форму. Более крупные фолликулы, как и в контроле, локализовались в периферических зонах. Содержание коллоида в полости фолликулов в периферических зонах заметно снизилось (табл. 1). Также отмечалось уплощение фолликулярного эпителия как в центральных, так и в периферических зонах (табл. 1). В цитоплазме эпителиальных клеток встречались включения коллоидных капель крупного размера. Доля стромального компонента не изменилась по сравнению с контрольной группой.

Через 2 недели после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, было отмечено снижение уровня всех тиреоидных гормонов (рис. 1). При этом концентрация ТТГ также была понижена.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводило как к функциональным, так и к морфологическим изменениям щитовидной железы крыс. Отмечались признаки снижения синтеза тироглобулина, то есть значительного снижения функциональной активности щитовидной железы, подтвержденные уровнем тиреоидных гормонов в крови. Также отмечалось усиление процессов резорбции тироглобулина. Значительно сниженный уровень ТТГ и тиреоидных гормонов указывает на развитие центрального гипотиреоза.

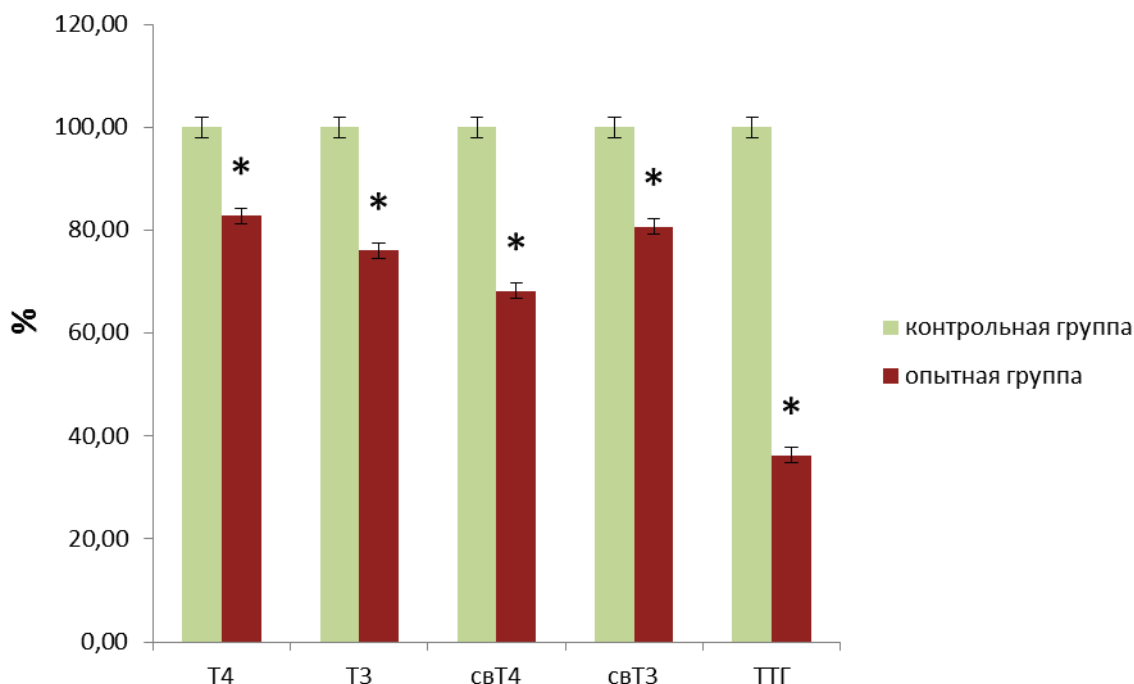


Рисунок 1. Изменения продукции тиреоидных гормонов и ТТГ гипофиза через 2 недели потребления воды с пониженным содержанием дейтерия ($M \pm m$)

Примечание: значения контрольной группы приняты за 100%. * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы

Таблица 1. Морфологические изменения в щитовидной железе крыс через 2 недели понижения поступления дейтерия в организм ($M \pm m$)

Параметр \ Группа	контрольная	С пониженным содержанием дейтерия
Площадь срезов фолликулов, мкм^2		
Периферическая зона долей	11813,5 \pm 473,98	10109,47 \pm 421,22*
Центральная зона долей	2146,00 \pm 88,81	1650,11 \pm 52,33*
Содержание коллоида в полости фолликулов, %		
Периферическая зона долей	61,74 \pm 3,29	47,92 \pm 2,37*
Центральная зона долей	97,46 \pm 1,77	98,43 \pm 1,02
Высота фолликулярных тироцитов, мкм		
Периферическая зона долей	14,09 \pm 0,30	11,40 \pm 0,25*
Центральная зона долей	12,22 \pm 0,26	11,10 \pm 0,19*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Известно, что у крыс в строении долей щитовидной железы выделяется периферическая, более синхронно и упорядоченно функционирующая зона и центральная зона, в которой асинхрония более выражена, поскольку именно в этих участках происходят реактивные изменения, обеспечивающие поддержания необходимого для гомеостаза уровня гормонов [5]. Наше исследование показало, что структурные изменения при длительном снижении дейтерия во внутренней среде организма, связанные с развитием центрального гипотиреоза, затрагивают как центральную, так и периферическую зоны, но более выражены в периферической зоне долей щитовидной железы. Так, в периферической зоне было отмечено снижение содержания коллоида в полости фолликулов, а также более значительное уплощение фолликулярного эпителия, указывающие на более выраженное снижение не только резорбции, но и синтеза тироглобулина, а значит более значительное снижения функциональной активности щитовидной железы в этой зоне.

В научной литературе имеются данные об ускорении пролиферации и усилении метаболической активности здоровых клеток при кратковременном снижении уровня дейтерия во внутренней среде организма [6]. Ранее проведенное нами исследование показало, что кратковременное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия (1 сутки) приводит к стимуляции функциональной активности щитовидной железы [7]. При этом настоящее исследование показывает, что более длительный период потребления воды с пониженным содержанием дейтерия, приводящий к более значительному снижению дейтерия во внутренней среде организма, подавляет секреторные процессы и приводит к морфологическим изменениям в паренхиме щитовидной железы, а также к функциональным нарушениям гипоталамо-гипофизарной системы. Отмеченное нарушение синтеза тиреоидных гормонов происходило вследствие недостаточности стимулирующего действия тиреотропного гормона. Таким образом, на структурные перестройки в щитовидной железе и ее секреторную активность влияет не только концентрация дейтерия в потребляемой воде, но и длительность потребления.

ВЫВОДЫ

Длительное снижение дейтерия во внутренней среде организма приводит к структурным перестройкам в щитовидной железе и ее секреторной активности и связано с развитием центрального гипотиреоза вследствие снижения синтеза тиреотропного гормона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.

Список литературы / References:

1. Басов А.А., Барышев М.Г., Быков И.М., Павлюченко И.И., Джимаков С.С., Сепиашвили Р.И. Воздействие воды с модифицированным изотопным составом на интенсивность свободнорадикальных процессов в эксперименте на лабораторных животных. *Аллергология и иммунология*, 2012, т. 13, № 4, с. 314-320. [Basov A.A., Baryshev M.G., Bykov I.M., Pavlyuchenko I.I., Dzhimak S.S., Sepiashvili R.I. The effect of water with a modified isotopic composition on the intensity of free radical processes in an experiment on laboratory animals. *Allergology and immunology*, 2012, vol. 13, no. 4, pp. 314-320. (In Russ.)]

2. Джимаков С.С., Басов А.А., Федулова Л.В., Дыдыкин А.С., Быков И.М., Лясота О.М., Наумов Г.Н., Барышев М.Г. Коррекция метаболических процессов у крыс при хроническом эндотоксикозе с помощью реакций изотопного (D/H) обмена. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*, 2015, № 5, с. 518-527. [Dzhimak S.S., Basov A.A., Fedulova L.V., Dydykin A.S., Bykov I.M., Lyasota O.M., Naumov G.N., Baryshev M.G. Correction of metabolic processes in rats with chronic endotoxycosis using isotope (D/H) exchange reactions. *News of the Russian Academy of Sciences. Biological series*, 2015, no. 5, pp. 518-527, doi: 10.7868/S0002332915050069. (In Russ.)]
3. Somlyai G., Javaheri B., Davari H., Gyöngyi Z., Somlyai I., Tamaddon K.A., Boros L.G. Pre-clinical and clinical data confirm the anticancer effect of deuterium depletion. *Biomacromol. J.*, 2016, vol. 2, no. 1, pp. 1-7, doi: 10.1016/j.eujim.2016.08.068.
4. Halenova T., Zlatskiy I., Syroeshkin A., Maximova T., Pleteneva T. Deuterium-depleted water as adjuvant therapeutic agent for treatment of diet-induced obesity in rats. *Molecules*, 2019, vol. 25, no. 1, pp. 23, doi: 10.3390/molecules25010023.
5. Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2011, т. 152, № 8, с. 215-219. [Yaglova N.V. Disorders of the secretory cycle of follicular thyrocytes and their correction with thyroid-stimulating hormone in the experimental syndrome of non-thyroid diseases. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, vol. 152, no. 8, pp. 215-219. (In Russ.)]
6. Zlatska A., Gordiienko I., Vasyliov R., Zubov D., Gubar O., Rodnichenko A., Syroeshkin A., Zlatskiy I. In Vitro Study of Deuterium Effect on Biological Properties of Human Cultured Adipose-Derived Stem Cells. *ScientificWorldJournal*, 2018, vol. 2018, p. 5454367, doi: 10.1155/2018/5454367.
7. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2021, т. 171, № 2, с. 232-234. [Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V. The response of the pituitary-thyroid axis to a short-term change in the content of deuterium in the body. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2021, vol. 171, no. 2, pp. 232-234, doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-2-232-234. (In Russ.)]

CHANGES IN THYROID MORPHOLOGY AND FUNCTION PRODUCED BY THE SHIFT IN DEUTERIUM/PROTIUM BALANCE IN THE ORGANISM

Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.

Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery"

117418, Moscow, ul. Tsyurupy, d. 3; e-mail: rodich_k@mail.ru

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0520

Abstract. The ability to reduce the isotopic composition of hydrogen in the internal environment of the body to influence the physiology of the organs of the endocrine system is a new and practically unexplored direction in science. The aim of the work was to study the morphological and functional changes in the thyroid gland of male rats after a two-week decrease in the content of deuterium in the internal environment of the body. The experiment was carried out on male Wistar rats fed deuterium-reduced water instead of drinking water for 2 weeks. The main effect exerted by water with a reduced content of deuterium on the body is a gradual decrease in the content of deuterium in liquid media and tissues due to isotope exchange reactions. Two weeks after the start of the experiment, the concentrations of thyroid hormones were determined: total and free thyroxine, total and free triiodothyronine, and thyroid-stimulating hormone. Histological and morphometric examination of thyroid preparations was carried out. Morphological and functional changes in the thyroid gland of male rats after a two-week reduction of the deuterium content in the internal environment of the body was studied. A prolonged decrease in deuterium influx led to structural changes in the thyroid gland and its secretory activity and were associated with hypothalamic-pituitary hypothyroidism due to a decrease in the synthesis of thyroid-stimulating hormone.

Key words: deuterium, protium, isotope mechanism, thyroid gland, thyroid hormones.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ВИБРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОСОВЫХ СВЯЗОК

Беловолова Л.В.¹, Беловолов М.И.¹, Парамонов В.М.¹ Беловолов М.М.¹
Свиштушкин М.В.², Луничева А.А.²

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научный центр волоконной оптики РАН им. Е.М. Дианова
ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: est123321@mail.ru

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, г. Москва, 119435, РФ
Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0521

Аннотация. С целью разработки аппаратуры для диагностики состояния голосовых связок (ГС) человека и контроля их активности в процессе лечения выполнен комплекс исследований образцов ГС животных (кроликов). Создана высокочувствительная бесконтактная лазерно-оптическая аппаратура и методика регистрации вибраций ГС в потоке воздуха с регулируемым напором. Для группы кроликов одного возраста приводятся данные по регистрации вибрационных частот у здоровых ГС и полученных в результате лечебных воздействий («леченые» ГС). Обнаружено, что при пропуске через трахею воздуха под небольшим давлением $\sim 10 - 20$ мм рт. ст. проявляются три пика характерных частот собственных механических вибраций ГС в диапазоне $\sim 200 - 1000$ Гц. Как правило, это основная частота f_1 и две ее гармоники $f_2 = 2 f_1$ и $f_3 = 3 f_1$. Лучше всего эти колебания возбуждаются на исходе вытекания воздуха под давлением $1 - 5$ мм рт. ст. Обнаружено различие возбуждаемых вибраций на низких частотах у здоровых ГС и ГС, имеющих дефекты в виде рубца на одной связке. Частоты низших собственных вибраций у дефектной ГС несколько выше по сравнению с низшей частотой у здоровой ГС, что объясняется ростом ее жесткости при образовании рубцовой ткани. Методика отличается простотой регистрации, чувствительностью и информативностью при проведении лечения методами регенеративной медицины. Диагностика состояния ГС в процессе лечения в сравнении с данными для здоровой ГС представляется информативной и полезной для восстановления вибрационных свойств голосовых связок в процессе лечения.

Ключевые слова: голосовые связки, собственные частоты вибраций, волоконно-оптический зонд, лазерный интерферометр, амплитудно-частотная характеристика.

ВВЕДЕНИЕ

Голосовые связки (ГС) – небольшого размера мышечные складки (рис. 1), которые крепятся к внутренней стороне гортани. В норме они достаточно гибкие и могут регулировать расстояние между своими краями в очень широких пределах. При дыхании они разведены в стороны, чтобы не препятствовать потоку выдыхаемого воздуха. При голосовом звучании они смыкаются и вибрируют в зависимости от их напряжения и напора выдыхаемого воздуха. Частота колебаний ГС, от которой зависит высота тона, определяется упругостью голосовых связок, их длиной и массой. Поверхность складок покрыта плотной эластичной тканью и слизью, внутри них находятся внешние и внутренние щиточерпаловидные мышцы. Внутренние мышцы называют вокальными мышцами. Мышечные волокна в вокальных мышцах располагаются параллельно внутреннему краю складки и в косом направлении. Благодаря такому строению голосовая складка может менять не только свою длину и толщину, но и колебаться по частям: во всю ширину, длину и частями, а производимый ими звук может содержать набор частот.

Существует большое число нарушений функционирования ГС, обусловленных простудными и воспалительными явлениями, вирусно-инфекционными и онкологическими заболеваниями. Поэтому, создание бесконтактной высокочувствительной аппаратуры для измерений объективных параметров, которые бы

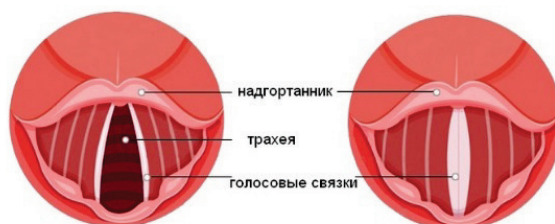


Рисунок 1. Схема строения голосовых связок (ГС). Слева — связки раскрыты, воздух проходит свободно, голос не создаётся. Справа — сомкнутые ГС при создании голоса

однозначно характеризовали состояние ГС в норме и патологиях, является актуальной задачей. Этой теме посвящен ряд работ (см. [1-4]) по исследованию вибрационных характеристик ГС. Общими недостатками существующих методов и подходов в настоящее время является низкая чувствительность приборов и неприменимость методик к слабым вибрациям ГС, что приводит к необходимости использования сильных возбуждений ГС, которые не всегда возможны при болезни и могут вызывать искажения общей картины вибраций. Задачей настоящей работы была разработка высокочувствительного лазерного комплекса для диагностики колебаний ГС в слабых воздушных потоках, наиболее подходящих для диагностики и лечения ГС в щадящих по голосовым нагрузкам условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Исследования вибрационной активности ГС были проведены на специально созданной экспериментальной установке (рис. 2). Она представляет собой высокочувствительный виброметр с лазерным волоконно-оптическим зондом 3 на конце одномодового волокна с керамическим наконечником и плоским торцом. Чувствительным элементом установки является низкодобротный интерферометр Фабри-Перо, образуемый плоским торцом волоконного наконечника с 4% Френелевским отражением и первой границей вибрирующей поверхности ГС, покрытой слизью (показатель преломления около 1,5 и коэффициент отражения $\sim 1-4\%$). Наконечник волоконного зонда подводится к вибрирующей поверхности ГС (правой на рис. 2) на расстояние $\sim 0,5-1$ мм и отраженное излучение эффективно собирается этим же одномодовым волокном в наконечнике и поступает в фотоприемник оптоэлектронного блока для детектирования и преобразования в выходной электрический сигнал вибро-акустического отклика, который подается на правый R канал аналого-цифрового преобразователя (АЦП). На левый канал одновременно может подаваться сигнал с малогабаритного электрического конденсаторного микрофона 4 для контроля слабого уровня звуковой нагрузки для ГС или в качестве индикатора, если звук зондом не регистрируется.

Оптоэлектронный блок 5 установки содержит малошумящий стабилизированный одночастотный полупроводниковый лазер непрерывного режима работы с внешним резонатором на волоконной Брэгговской решетке типа BDL-1550-14DL-20 (фирма НОЛАТЕХ, Россия) мощностью 1 мВт на длине волны 1,55 мкм и шириной спектральной линии генерации $\Delta\nu \leq 0,1$ МГц. Это излучение не видимо для глаз и безопасно для человека. Лазер питается стабилизированным током инжекции и корпус лазера стабилизирован по температуре с точностью $\sim 0,001$ °С. Длина когерентности излучения лазера составляет сотни метров и степень когерентности излучения для длин резонатора $\sim 1-2$ мм с высокой точностью равняется единице ($\gamma=1$). Диапазон регистрируемых блоком 5 частот вибраций составляет ~ 20 Гц - 20 кГц. В качестве детектора обратно отраженного сигнала с наконечника волоконно-оптического зонда использовали малошумящий фотоприемник типа PDA30B2 с регулируемым усилением и рабочим диапазоном длин волн 800–1800 нм и полосой частот до 590 кГц.

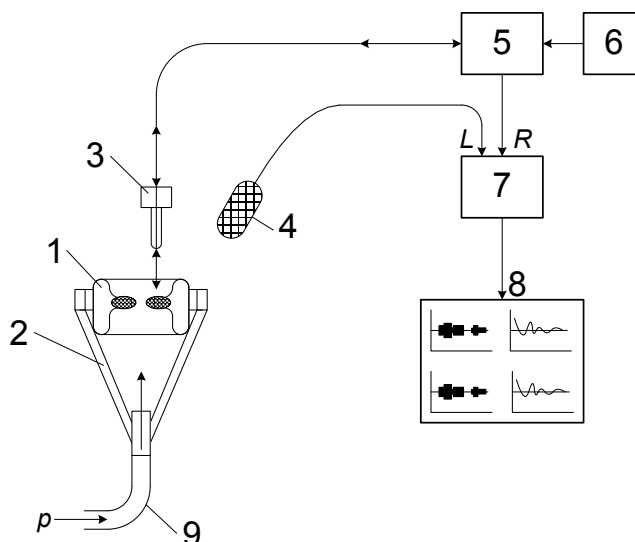


Рисунок 2. Схема экспериментальной установки для исследования вибрационной активности ГС лазерным волоконно-оптическим зондом и записи звучания производимого ими звука в персональный компьютер (8). Образец трахеи 1 животного с ГС установлен в силиконовом конусе - фиксаторе 2. Применены следующие обозначения основных составляющих установки: 3 - керамический наконечник с одномодовым волокном - оптический зонд, 4 - электрический микрофон, 5 - оптоэлектронный блок со стабилизированным одночастотным лазером на 1,55 мкм, мощностью 1 мВт и фотоприемником, 6 - вспомогательный полупроводниковый лазер на красной длине волны 0,63 мкм, 7 - двухканальный АЦП, 8 - персональный компьютер со специальным программным обеспечением и быстрым преобразованием Фурье звуковых сигналов, P - вход для продува воздуха или ввода стимулирующего малые вибрации звукового сигнала силой 60–80 дБ

В составе блока 5 в качестве оптического мультиплексора, выполняющего роль устройства ввода/вывода излучения из волоконно-оптического зонда 3, применен направленный разветвитель 1:3 на одномодовых оптических волокнах типа SMF28. Для визуализации места зондирования на третий волоконный вход мультиплексора одновременно с основным измерительным излучением одночастотного лазера на 1,55 мкм может подаваться излучение от вспомогательного полупроводникового лазера 6 на длине волны 0,63 мкм.

Механические вибрации ГС регистрировали с помощью волоконно-оптического зонда независимо от измерения звука, который мог быть слабым и не слышимым человеческим ухом по уровню звукового давления $\leq 2 \cdot 10^{-5}$ Па. Положение точки оптического зондирования образца варьировали с помощью трехкоординатного столика x, y, z для механических перемещений образца ГС относительно волоконно-оптического зонда.

Для записи результатов и обработки данных мы использовали специальное программное обеспечение типа Спектра Плюс, которое было предназначено для обработки звуковых и вибрационных сигналов и адаптировано для решения задач нашей работы.

Техническими особенностями разработанной нами установки являются использование одночастотного полупроводникового лазера со стабилизацией режима питания током и температуры, а также малошумящего высокочувствительного фотоприемника. Особенность методики работы состояла в сопоставлении частот и формы спектральных линий вибрационных сигналов от здоровых и леченых ГС.

Волоконно-интерферометрический метод регистрации вибраций с помощью одночастотного лазерного излучения обладает высокой чувствительностью, безынерционностью, стерильностью и адекватно отображает спектр колебаний исследуемого объекта, если регистрация отклика производится в режиме слабого сигнала воздействия с линейной модуляционной характеристикой преобразователя вибраций в аналогичный по форме выходной электрический сигнал. Физические основы работы лазерного интерферометрического вибрметра были изложены, например, в работе [5].

Основы методики измерений и обработки сигналов. В основе методики диагностических измерений вибрационных свойств ГС лежит предположение, что при малых давлениях протекающего через гортань стимулирующего вибрации воздуха сомкнутые ГС слегка расходятся и начинают совершать колебательные движения, которые можно представить колебаниями натянутой струны с закрепленными концами. При слабых воздействиях колебания каждой ГС происходят независимо друг от друга с малой амплитудой - меньше четверти длины волны ($\lambda/4$) зондирующего лазерного излучения. При этом предположительно возбуждаются собственные частоты, характерные для мод колеблющейся струны. Наиболее интенсивными по амплитуде можно ожидать основную частоту f_1 и ее гармоники, кратные основной частоте $f_2 = 2f_1$ и $f_3 = 3f_1$. Основная частота f_1 колебаний голосовой связки соответствует условию, когда на длине струны укладывается половина длины волны механического колебания ГС. На середине струны – ГС можно ожидать колебание наибольшей амплитуды (пучность). При достаточной добротности колебаний здоровой ГС возможны вибрации с частотами более высокого порядка, чем 3-я. Такая ситуация характерна для упругой здоровой ГС.

Таким образом, основным индикатором работы диагностической аппаратуры является регистрация основной низшей частоты f_1 вибраций ГС и одной или большего числа кратных гармоник у здоровой ГС. У ГС, подвергнутой лечению, можно ожидать изменение частоты основной гармоники колебаний f_1 , уменьшение числа кратных гармоник и само нарушение кратности гармоник, а также их исчезновение, если в результате лечения ГС потеряла однородность, содержит рубцы и узлы более плотной ткани. Поскольку ГС являются парным органом у животных и человека, то характеристические частоты вибраций здоровой ГС служат образцом для оценки эффективности лечения и степени восстановления вибрационных свойств ГС при лечении.

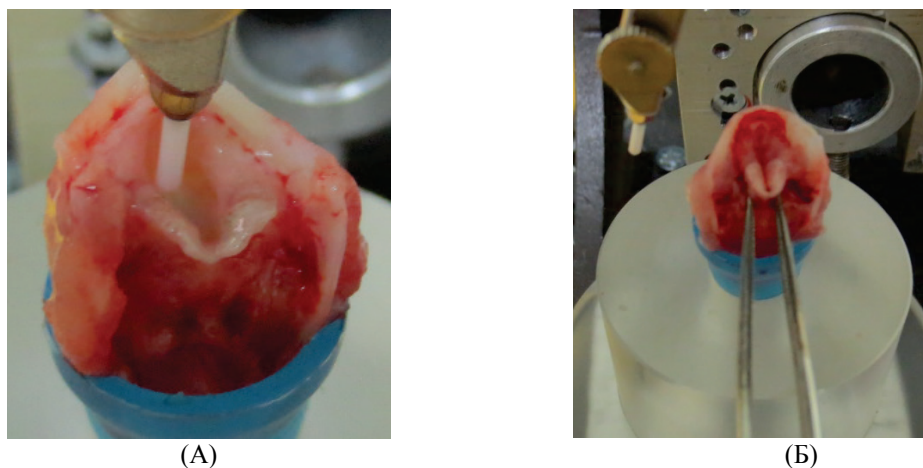


Рисунок 3. Фото образца гортани ГС на рабочем месте в силиконовом конусе. А – зонд на левой ГС (леченой), Б – ГС сомкнуты

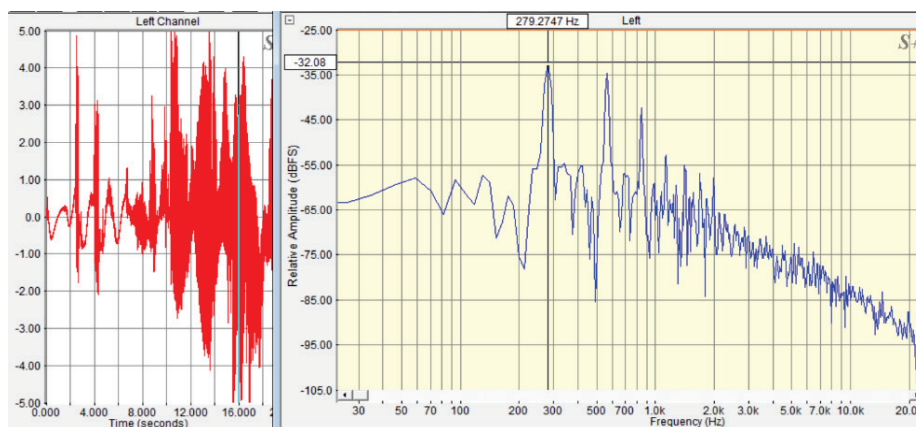


Рисунок 4. Запись амплитуды вибраций от времени у здоровой ГС кролика №1 (слева) и спектр быстрого преобразования Фурье (справа) в выбранной точке времени, помеченном вертикальной линией – маркером. Основная частота характеристических вибраций и ее гармоники составляют $f_1 = 279$ Гц, $f_2 = 554$ Гц, $f_3 = 843$ Гц

Таким образом при записи выходного сигнала в реальном времени и параллельной обработке с помощью быстрого преобразования Фурье, предоставляется возможность наблюдать как амплитуды сигналов на отдельных частотах вибрационного отклика, так и их огибающую - амплитудно-частотную характеристику (АЧХ). Предполагаем, что по сдвигу частот и нарушению их регулярности (кратности) можно судить о степени дефектности голосовой связки и эффективности лечения.

На рисунке 3 показаны гортани кролика на рабочем месте установки с разомкнутыми (А) и сомкнутыми ГС (Б). Воздух поступает через гортань снизу, а волоконный зонд считывает вибрации сверху. Торцы волоконного наконечника подводят к поверхности выбранной ГС на расстояние ~ 1 мм. При этом обеспечивалась достаточная светосила установки, чтобы регистрировать вибрационные отклики в динамическом диапазоне не менее 60 дБ над уровнем шумового фона системы регистрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе сравнивали сигналы частот вибраций здоровых ГС и ГС, подвергнутых лечению разной степени воздействия, включая хирургическое.

На рис. 4 представлены записи амплитуды вибраций правой здоровой ГС у кролика №1 от времени (слева) и мгновенная АЧХ - спектр Фурье (справа) в выделенный маркером момент времени (вертикальная линия на рис. 4 слева), зарегистрированные волоконно-оптическим зондом.

Из рисунка 4 видно, что для здоровой ГС основная гармоника на частоте $f_1 = 279$ Гц вибрирует активно и наблюдаются последующие вторая и третья гармоники вибраций $f_2 = 554$ Гц, $f_3 = 843$ Гц, соответственно.

Следует отметить, что в данном эксперименте для здоровых ГС наблюдается кратность частот гармоник с погрешностью измерений частот не больше ~ 20 Гц. Наличие четких гармоник вибраций качественно свидетельствует в пользу модели ГС в виде струны с закрепленными концами.

На рисунке 5 приведены записи амплитуд вибраций левой леченой ГС у кролика №1 и спектр быстрого преобразования Фурье в отмеченной точке записи. Обнаружено, что основная частота характеристических вибраций и ее гармоники проявляются активно: $f_1 = 321$ Гц, $f_2 = 644$ Гц, $f_3 = 980$ Гц. Заметны также частоты

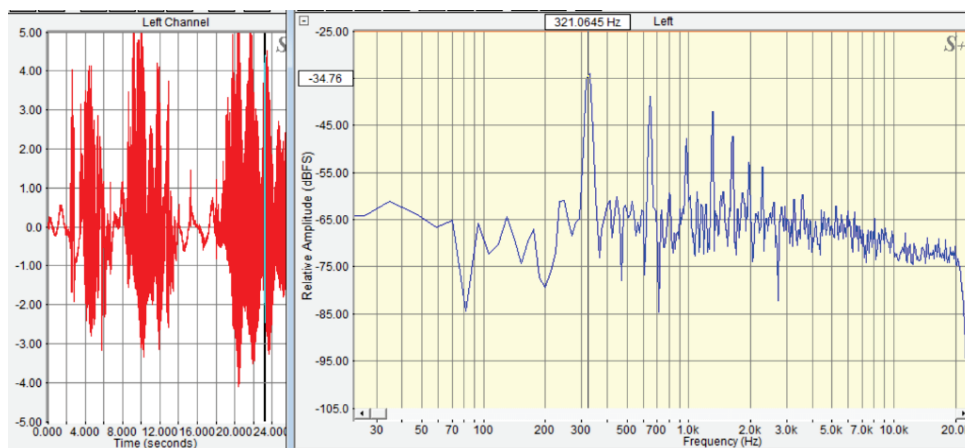


Рисунок 5. Запись амплитуд вибраций левой леченой ГС у кролика №1 (слева) и спектр быстрого преобразования Фурье (справа) в отмеченной точке записи. Основная частота характеристических вибраций и ее гармоники составляют $f_1 = 321$ Гц, $f_2 = 644$ Гц, $f_3 = 980$ Гц

Таблица 1. Результаты измерений основных частот вибраций f_1 и их гармоник у здоровых и леченых ГС кроликов

Кролик №	ГС правая здоровая Основная частота и гармоники, $f_1, f_2, f_3, \text{ Гц}$			ГС левая леченая Основная частота и гармоники, $f_1, f_2, f_3, \text{ Гц}$		
	f_1	f_2	f_3	f_1	f_2	f_3
1	279,	554,	843	321,	664,	980
2	187,	358,	569	201,	400,	602
3	242,	490,	711	276,	559,	840
4	292,	602,	905	339	-	-
5	315,	636,	975	нет вибраций		

вибраций более высокого порядка. Из сравнения частот вибраций здоровой и леченой ГС видно, что основные частоты и первые две гармоники по частотам являются заметно увеличенными для леченых ГС.

Увеличение частоты вибраций первой основной частоты f_1 у леченых ГС обнаружено нами на образцах ГС у 10 исследованных кроликов примерно одинаковой возрастной группы и подтверждает первые положительные результаты, полученные ранее в работе [5]. Сводка результатов измерений частот вибраций ГС для некоторой группы кроликов приведена в таблице 1.

Из таблицы 1 можно видеть, что увеличение частот леченых ГС относительно здоровых может составлять десятки Герц ($\sim 10\text{--}40$ Гц) или больше 10% от абсолютного значения частоты f_1 . После лечения основная частота вибраций, как правило, существует, в то время как частоты – гармоники более высокого порядка могут пропадать, как демонстрируют результаты измерений на рисунке 6.

На рисунке 6 показаны вибрации ГС кролика 4 после хирургического воздействия, в результате чего образовались хирургические рубцы, что привело к повышению жесткости ткани связок и уменьшению их эластичности (упругости).

Возможен и вариант, когда в ходе лечения пропадает и первая гармоника, как это видно из данных таблицы 1 для случая кролика № 5. Такое поведение спектра частот вибраций характерно при грубых хирургических рубцах на ГС и лечения, которое привело к повышению жесткости ткани связок и потере эластичности (упругости).

Следует отметить, что в некоторых случаях, после лечения спектр частот вибраций ГС восстанавливался практически полностью как по значениям основной частоты f_1 и ее гармоник (с точностью измерения абсолютных значений частот $\sim 1\text{--}3$ Гц), так и по их амплитудам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе продемонстрирована эффективная работа высокочувствительной бесконтактной лазерно-оптической аппаратуры и методика регистрации вибраций ГС в потоке воздуха с регулируемым напором. Экспериментально показано, что при пропускании через трахею воздуха под давлением $\sim 1\text{--}20$ мм рт. ст., обнаруживаются пики резонансов характерных частот собственных механических вибраций ГС в диапазоне $\sim 200\text{--}1000$ Гц, как правило, основная низшая частота f_1 и две ее гармоники $f_2 = 2 f_1$ и $f_3 = 3 f_1$. Лучше всего эти колебания возбуждаются на исходе вытекания воздуха под давлением $1\text{--}5$ мм рт. ст. Обнаружено различие возбуждаемых вибраций на низких частотах у здоровых ГС и ГС леченых или имеющих дефекты в виде рубца на одной связке. Частоты низших собственных вибраций у дефектных ГС несколько выше по сравнению с низшей частотой у здоровых ГС, что объясняется ростом их жесткости при образовании рубцовой ткани. Приводятся данные по регистрации вибрационных частот у здоровых и леченых ГС, полученные для группы

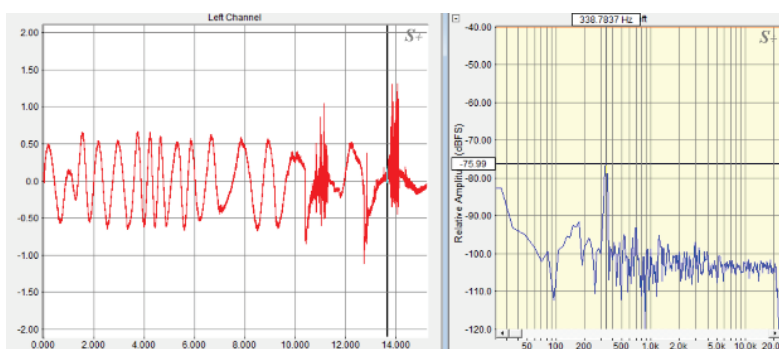


Рисунок 6. Вибрации левой леченой ГС Кролика №4. Наблюдается только основная частота $f_1 = 339$ Гц, увеличенная по сравнению с частотой здоровой ГС $f_1 = 292$ Гц вследствие рубца или огрубления ткани. Более высокие гармоники не наблюдаются

кроликов одного возраста Диагностика состояния леченой или дефектной ГС в паре с данными по частотам вибраций у здоровой ГС представляется информативной и полезной для восстановления вибрационных свойств голосовых связок в процессе лечения.

Оптический канал регистрации вибрационной активности голосовых связок с помощью волоконно-оптического зонда позволяет уверенно регистрировать собственные характеристические частоты вибрации ГС с малыми амплитудами колебаний, как правило, меньше ~ 1 мкм в щадящем режиме их возбуждения при пропуске воздуха, имитирующего выдох из легкого при небольшом давлении.

Методика диагностики состояния голосовых связок по регистрируемым резонансным частотам вибраций низшего порядка отличается простотой регистрации, чувствительностью и информативностью при проведении лечения методами регенеративной медицины. Мы полагаем существенную пользу от разработанной методики при клинической диагностике и лечении голосовых связок у животных с переносом методики на живых людей.

Список литературы / References:

1. Ammar H. Quantitative analysis of healthy and pathological vocal fold vibrations using an optical flow based waveform. *International Journal of Advanced Computer Science and Applications*, 2019, vol. 10, no. 4, pp. 388-393.
2. Titze I.R. Parameterization of the glottal area, glottal flow, and vocal fold contact area. *Journal Acoustical Society America*, 1984, vol. 75, no. 2, pp. 570-580.
3. Wittenberg T., Tigges M., Mergell P., Eysholdt U. Functional imaging of vocal fold vibration: digital multislice high-speed kymography. *Journal of Voice*, 2000, vol. 14, no. 3, pp. 422- 442.
4. Qiu Q., Schutte H., Gu L. and Yu Q. An automatic method to quantify the vibration properties of human vocal folds via videokymography. *Folia Phoniatrica et Logopeaetica*, 2003, vol. 55, no. 3, pp. 128-136.
5. Belovolov M.I., Paramonov V.M., Belovolov M.M., Svistushkin M.V., Svistushkin V.M., Arkhipov M.V., Mokonyane Z.T., Timofeeva V.A., Kotova S.L., Timashev P.S., Timashev S.F. Vibration activity of the vocal folds and a new instrumental technique for their study. *Optical Engineering*, 2020, vol. 59, no. 6, p. 061611.

METHODOLOGY FOR STUDYING THE VIBRATIONAL ACTIVITY OF THE VOCAL FOLDS

Belovolova L.V.¹, Belovolov M.I.¹, Paramonov V.M.¹, Belovolov M.M.¹, Svistushkin M.V.², Lunicheva A.A.²

¹ A.M. Prokhorov Institute of General Physics. RAS, E.M. Dianov Fiber Optics Research Center RAS

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

² I.M. Sechenov University

Bol'shaya Pirogovskaya Ulitsa, 2, build. 4, Moscow, 119435, Russia

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0521

Abstract. In order to develop equipment for diagnosing the state of the human vocal folds (VF) and monitoring their activity during treatment, a complex of studies of animal VF samples (rabbits) was performed. A highly sensitive non-contact laser-optical equipment and a technique for recording VF vibrations in an air flow with controlled pressure have been developed. For a group of rabbits of the same age, data are given on the registration of vibrational frequencies in healthy VFs and received as a result of therapeutic effects ("treated" VFs). It was found that when air is passed through the trachea under a slight pressure of 10-20 mm Hg. three peaks of the characteristic frequencies of natural mechanical vibrations of the VF appear in the range of $\sim 200 - 1000$ Hz. As a rule, this is the fundamental frequency f_1 and its two harmonics $f_2 = 2 f_1$ and $f_3 = 3 f_1$. Best of all, these oscillations are excited at the end of the outflow of air under a pressure of 1 - 5 mm Hg. A difference was found in the excited vibrations at low frequencies in healthy VF and VF with defects in the form of a scar on one ligament. The frequencies of the lowest natural vibrations in a defective VF are somewhat higher compared to the lowest frequency in a healthy VF, which is explained by an increase in its rigidity during the formation of scar tissue. The technique is characterized by ease of registration, sensitivity and informativeness during treatment by methods of regenerative medicine. Diagnosis of the state of the VF during treatment in comparison with the data for a healthy VF seems to be informative and useful for restoring the vibrational properties of the vocal cords during the treatment.

Key words: *vocal folds, natural vibration frequencies, fiber optic probe, laser interferometer, frequency response.*

СИСТЕМА ЦИТОХРОМА P450 МОЖЕТ УЧАСТВОВАТЬ В СВЕТОИЗЛУЧЕНИИ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Могильная О.А., Пузырь А.П., Гительзон И.И.,
Бондарь В.С.

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

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

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0522

Аннотация. Приводятся данные, свидетельствующие в пользу участия системы цитохрома P450 в светоизлучении высших грибов. Из мицелия разных видов светящихся базидиомицетов получены экстракты, которые содержат грибные люминесцентные системы, обеспечивающие свечение *in vitro*. Условия выделения систем (обработка биомассы ультразвуком, осветление гомогенатов центрифугированием при 40000g) указывают на наличие в экстрактах мембранных структур, в частности, микросом, образующихся в результате разрушения эндоплазматического ретикула (ЭПР) ультразвуком. Дифференциальный спектральный анализ экстрактов, обработанных дитионитом натрия и CO, выявил наличие двух пиков поглощения при 410 нм и 450 нм, что указывает на наличие цитохромов P450 и b₅. Свечение экстрактов стимулируется восстановленными пиридиновыми нуклеотидами, однако установлено, что больший уровень свечения наблюдается при добавках НАДФН, по сравнению с НАДН. Значения V_{max} световой эмиссии под действием НАДФН практически в 2 раза выше, а значения кажущихся K_m в 2 раза ниже, по сравнению с НАДН. Добавки пероксида водорода значительно (от нескольких раз до 1-2 порядков) увеличивают интенсивность свечения экстрактов, активированных НАД(Ф)Н. Установлено, что добавки флуконазола (5-60 мкг в пробе) существенно ингибируют световую эмиссию экстрактов – наблюдается снижение как исходного уровня свечения, так и свечения после добавок НАД(Ф)Н. Совокупность полученных данных свидетельствует, что в механизме светоизлучения высших грибов может участвовать ассоциированная с мембранами ЭПР система цитохрома P450 с вовлечением в процесс электронно-транспортных ферментных систем: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома P450 – цитохром P450 и НАДН-зависимая редуктаза цитохрома b₅ – цитохром b₅ – цитохром P450. В этом случае цитохром P450 может осуществлять гидрокселирование гиспидина (прекурсор субстрата люминесцентной реакции) с образованием люциферина и катализировать его окисление в присутствии АФК с излучением света.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, мицелий, гиспидин, система цитохрома P450, восстановленные пиридиновые нуклеотиды, флуконазол, пероксид водорода.

Несмотря на внушительные успехи, достигнутые за последнее десятилетие в исследованиях биолюминесценции высших грибов [1-10], некоторые биохимические аспекты этого феномена пока недостаточно ясны и требуют дальнейшего изучения. Ранее была высказана гипотеза об участии активных форм кислорода (АФК) и ферментов с оксидазной функцией в механизмах свечения базидиомицетов [11-13], которая подтверждается результатами наших предыдущих исследований [14-17]. В частности, в этих работах мы высказывали предположение, что в механизм грибного светоизлучения может вовлекаться система цитохрома P450, которая катализирует окисление органических субстратов (включая грибной люциферин) с излучением квантов видимого света [14-16]. В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу участия системы цитохрома P450 в реакции светоизлучения высших грибов.

Для исследований использовали мицелий разных видов светящихся базидиомицетов (*Neonothopanus nambi*, *Armillaria borealis*, *Armillaria* sp., *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*) из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск). Эксперименты проводили с мицелием в виде шарообразных пеллет, полученных при глубинном культивировании грибов в жидких питательных средах («HiMedia Laboratory», Индия) [5,18,19]. Холодные экстракты, содержащие грибные люминесцентные системы, получали разрушением биомассы механически измельченных пеллет мицелия ультразвуком (дезинтегратор «Волна», Россия) с последующим центрифугированием гомогенатов при 40000g (центрифуга Avanti® J-E, «Beckman-Coulter», США) [1,5]. Полученные супернатанты отбирали для исследований. В качестве субстрата люминесцентной реакции использовали горячий экстракт из мицелия несветящегося высшего гриба *Pholiota squarrosa* (Коллекция ССIBSO 836) [5], содержащий гиспидин [2]. Доказано, что гиспидин является, по крайней мере, одним из предшественников субстрата реакции светоизлучения высших грибов, который преобразуется НАД(Ф)Н-зависимой гидроксилазой в 3-гидроксигиспидин (люциферин) и затем окисляется люциферазой с излучением квантов видимого света [2,3,7]. Световую эмиссию холодных экстрактов активировали добавками восстановленных пиридиновых нуклеотидов, которые являются необходимыми компонентами функционирования грибных люминесцентных систем [20,21], и горячего экстракта из *P. squarrosa*. Интенсивность и динамику световых сигналов регистрировали с помощью люминометра Glomax® 20/20 («Promega BioSystems Sunnyvale, Inc.», США). Наличие цитохрома P450 в экстрактах оценивали методом дифференциальной спектроскопии [22,23]. Метод основан на появлении в спектре поглощения характерного

спектрального сдвига при связывании монооксида углерода с восстановленным атомом железа гемма в активном центре фермента и позволяет выявлять наличие активной формы цитохрома P450 в сложных биологических системах без необходимости его выделения [24]. Дифференциальный спектральный анализ проводили на UV/VIS спектрофотометре UVIKON 943 («Kontron Instruments», Италия) в диапазоне длин волн 300-700 нм после обработки образцов экстрактов дитионитом натрия и последующей обработки опытной пробы CO. В экспериментах оценивали эффект флуконазола на интенсивность свечения экстрактов, поскольку известно, что азольные соединения являются ингибиторами цитохромов P450 [25]. Для исследований использовали: НАДФН, НАДН и дитионит натрия («Serva», Германия), флуконазол («Dr. Reddy's Laboratories Ltd.», Индия), пероксид водорода (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия).

В работе было показано, что полученные из мицелия изучаемых видов базидиомицетов холодные экстракты содержат функционально активные люминесцентные системы, обеспечивающие свечение *in vitro* при добавках восстановленных пиридиновых нуклеотидов и субстрата реакции. Анализ условий выделения систем использованным в работе способом (ультразвуковая обработка биомассы и осветление гомогенатов при ускорении 40000 g) указывают на наличие в экстрактах мембранных структур. Положительный эффект Тиндаля, наблюдающийся в экстрактах, свидетельствует об их неоднородности и присутствии нерастворимых частиц. В частности, такими структурами могут являться микросомы и их фрагменты, образующиеся при ультразвуковом разрушении эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Хорошо известно, что обработка биомассы ультразвуком применяется для получения микросом, а центрифугирование гомогенатов при ускорениях более 15000 g позволяет удалять крупные обломки клеточных мембран, ядра и митохондрии [26]. Следует сказать, что ранее мы установили необходимость ультразвуковой обработки биомассы грибного мицелия для получения экстрактов, содержащих активные люминесцентные системы [5]. Было показано, что экстракты, полученные при простом механическом разрушении мицелия с последующим осветлением гомогенатов центрифугированием, либо не обладали свечением при добавках НАД(Ф)Н и субстрата, либо уровень их световой эмиссии был крайне мал.

Дифференциальным спектральным анализом в обработанных дитионитом натрия и CO экстрактах выявлено наличие двух пиков поглощения с λ_{\max} при 410 нм и 450 нм (рис. 1). Это указывает на наличие в образцах экстрактов цитохромов P450 и b₅.

В экспериментах показано, что свечение холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов стимулируется восстановленными пиридиновыми нуклеотидами. Однако при этом было установлено, что больший уровень люминесценции наблюдается при добавках НАДФН, по сравнению с добавками НАДН. Из расчетов кинетических показателей (табл. 1) следует, что значения V_{\max} световой эмиссии при использовании НАДФН практически в 2 раза выше, а значения кажущихся K_m в 2 раза ниже, чем при использовании НАДН.

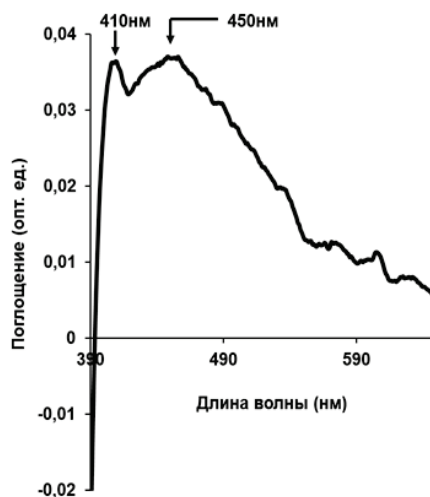


Рисунок 1. Дифференциальный спектр поглощения экстракта из гриба *N. nambi*: контроль (дитионит) – опыт (дитионит + CO)

Таблица 1. Значения кинетических показателей V_{\max} и K_m , рассчитанные из зависимостей интенсивности свечения холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов от концентрации НАД(Ф)Н (на примере экстрактов из грибов *N. nambi* и *A. borealis*)

Базидиомицет	V_{\max} НАДФН (отн. ед.)	V_{\max} НАДН (отн. ед.)	K_m НАДФН (мкМ)	K_m НАДН (мкМ)
<i>N. nambi</i>	$7,21 \cdot 10^6$	$3,96 \cdot 10^6$	43	85
<i>A. borealis</i>	$2,44 \cdot 10^7$	$1,10 \cdot 10^7$	46	92

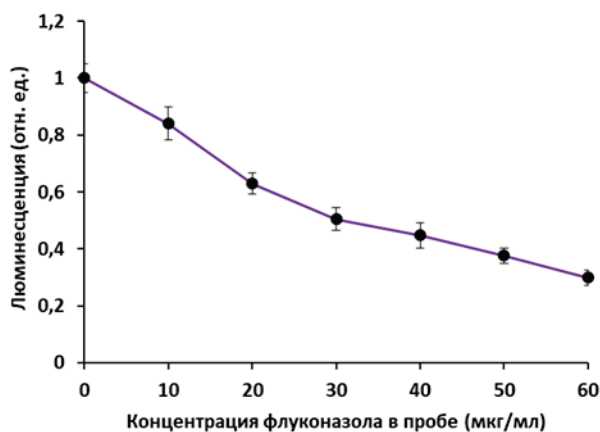


Рисунок 2. Интенсивность люминесценции холодного экстракта из мицелия базидиомицета *A. borealis* в зависимости от концентрации флуконазола. Показания нормированы на величину световой эмиссии контрольных образцов экстракта (без добавления флуконазола)

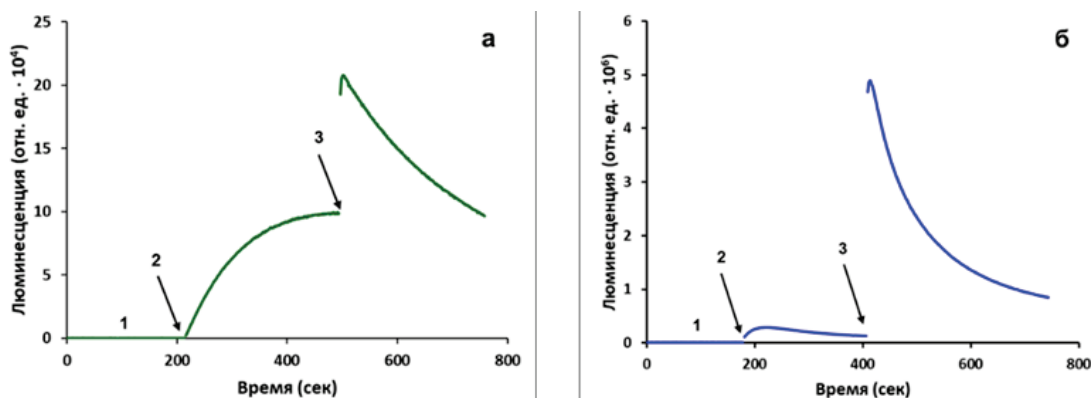


Рисунок 3. Эффект стимуляции свечения холодных экстрактов из мицелия грибов *P. stipticus* (а) и *M. citricolor* (б) пероксидом водорода: 1 – начальный уровень люминесценции, 2 – активация свечения добавками НАДФН и субстрата реакции, 3 – уровень световой эмиссии после добавления H_2O_2 . Стрелками показаны моменты добавления реагентов к экстрактам

В экспериментах установлено, что добавки флуконазола (5-60 мкг в пробе) к холодным экстрактам из разных видов базидиомицетов существенно подавляют их световую эмиссию при последующем добавлении НАДФ(Ф)Н и субстрата реакции. В качестве примера на рисунке 2 представлен ингибирующий эффект флуконазола на люминесценцию экстракта из мицелия гриба *A. borealis*.

Как показали исследования, интенсивность свечения холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов, активированных НАДФН и субстратом реакции, значительно (от нескольких раз до 1-2 порядков) возрастает при добавках пероксида водорода (рис. 3). В качестве примера на рисунке представлена стимуляция свечения экстрактов из базидиомицетов *M. citricolor* и *P. stipticus* добавками H_2O_2 .

Таким образом, совокупность полученных в работе экспериментальных данных свидетельствует, что в механизме светоизлучения высших грибов может участвовать ассоциированная с мембранами ЭПР система цитохрома Р450 с вовлечением в процесс электронно-транспортных ферментных систем: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома Р450 – цитохром Р450 и НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома b_5 – цитохром b_5 – цитохром Р450 (рис. 4).

Из представленной выше схемы следует, что при функционировании системы цитохром Р450 может осуществлять гидрокселирование гиспидина с образованием люциферина и катализировать его окисление в

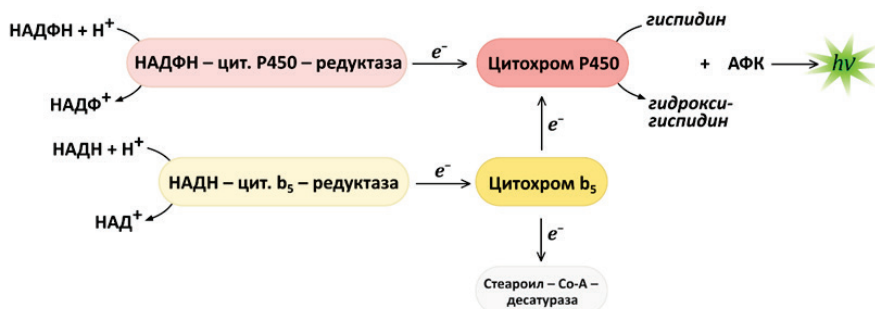


Рисунок 4. Гипотетический механизм свечения высших грибов с участием системы цитохрома Р450

присутствии АФК с излучением квантов видимого света. Такой механизм участия системы цитохрома Р450 в светоизлучении высших грибов представляется вполне возможным. Известно, что цитохромы Р450: являются гем-содержащими монооксигеназами; участвуют в окислительной трансформации широкого спектра органических соединений; катализируют реакцию гидроксирования с образованием АФК, в частности, пероксида водорода, принимающего участие в катализируемых данными ферментами окислительных реакциях [27-29].

В целом, результаты проведенных исследований дополняют и развивают представления о механизмах биолюминесценции высших грибов. Они свидетельствуют в пользу того, что в светящихся базидиомицетах генерация квантов видимого света может обеспечиваться двумя путями – за счет функционирования системы НАД(Ф)Н-зависимая гидроксилаза – люцифераза [2] и системы цитохрома Р450.

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

Список литературы / References:

1. Bondar V.S., Puzyr A.P., Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Shpak B.A., Tyaglik A.B., Shimomura O., Gitelson J.I. Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 455, doi: 10.1134/S1607672914020045.
2. Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S. et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, vol. 54, doi: 10.1002/anie.201501779.
3. Oba Y., Suzuki Y., Martins G.N.R. et al. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2017, vol. 16, doi: 10.1039/c7pp00216e.
4. Kaskova Z.M., Dorr F.A., Petushkov V.N. et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Science Advances*, 2017, vol. 3, doi: 10.1126/sciadv.1602847.
5. Puzyr A.P., Medvedeva S.E., Artemenko K.S., Bondar V.S. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2017, vol. 7, doi: 10.5943/cream/7/3/9.
6. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A. et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, doi: 10.1073/pnas.1803615115.
7. Teranishi K. Bioluminescence and chemiluminescence abilities of *trans*-3-hydroxyhispidin on the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, 2018, vol. 33, doi: 10.1002/bio.3540.
8. Puzyr A.P., Burov A.E., Medvedeva S.E., Burova O.G., Bondar V.S. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, 2019, vol. 10, doi: 10.1080/21501203.2019.1583688.
9. Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., Navizet I. Fungal light emitter: understanding its chemical nature and pH-dependent emission in water solution. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, vol. 85, doi: 10.1021/acs.joc.0c00246.
10. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Finding the light emission stimulator of *Neonothopanus nambi* basidiomycete and studying its properties. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2022, vol. 503, doi: 10.1134/S1607672922020120.
11. Shimomura O. Superoxide-triggered chemiluminescence of the extract of luminous mushroom *Panellus stipticus* after treatment with methylamine. *Journal of Experimental Botany*, 1991, vol. 42, no. 237, pp. 555-560.
12. Shimomura O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. *Journal of Experimental Botany*, 1992, vol. 43, no. 256, pp. 1519-1525.
13. Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006, 470 p.
14. Bondar V.S., Puzyr A.P., Purtov K.V., Medvedeva S.E., Rodicheva E.K., Gitelson J.I. The luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2011, vol. 438, doi: 10.1134/S1607672911030082.
15. Bondar V.S., Shimomura O., Gitelson J.I. Luminescence of higher mushrooms. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 331-351.
16. Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Tyaglik A.B., Shpak B.A., Gitelson J.I. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2013, vol. 449, DOI: 10.1134/S1607672913020075.
17. Kobzeva T.V., Melnikov A.R., Karogodina T.Y., Zikirin S.B., Stass D.V., Molin Yu.N., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S., Gitelson J.I. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, 2014, vol. 29, doi: 10.1002/bio.2656.
18. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., Bondar V.S. Morphological properties and levels of extracellular peroxidase activity and light emission of the basidiomycete *Armillaria borealis* treated with β -glucosidase and chitinase. *Mycosphere*, 2017, vol. 8, doi: 10.5943/mycosphere/8/4/11.

19. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Bondar V.S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with β -glucosidase. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2018, vol. 8, doi: 10.5943/cream/8/1/6.
20. Airth R.L., McElroy W.D. Light emission from extracts of luminous fungi. *Journal of Bacteriology*, 1959, vol. 77, doi: 10.1128/jb.77.2.249-250.1959.
21. Airth R.L. Foerster G.E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962, vol. 97, doi: 10.1016/0003-9861(62)90124-8.
22. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, vol. 239, no. 7, pp. 2370-2378.
23. Peisach J., Stern J.O., Blumberg W.E. 1973 – Optical and magnetic probes of the structure of cytochrome P-450's. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 1, no. 1, pp. 45-61.
24. Moskaleva N.E., Zgoda V.G. Modern methods of cytochrome P450 analysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*, 2013, vol. 7, doi: 10.1134/S1990750813020078.
25. Kelly S.L. et al. An old activity in the cytochrome P450 superfamily (CYP51) and a new story of drugs and resistance. *Biochemical Society Transaction*, 2001, vol. 29, doi: 10.1042/0300-5127:0290122.
26. Maddy A.H. *Biochemical analysis of membranes*. London: Chapman & Hall Ltd., 1976, 513 p.
27. Archakov A.I., Bachmanova G.I. *Cytochrome P450 and active oxygen*. London: Taylor & Francis, 1990, 339 p.
28. Lewis D.F.V. *Guide to cytochromes P450. Structure and function*. London, New York: Taylor & Francis, 2001, 215 p.
29. Munro A.W., McLean K.J., Grant J.L., Makris T.M. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 2018, vol. 46, doi: 10.1042/BST20170218.

CYTOCHROME P450 SYSTEM MAY BE INVOLVED IN THE LIGHT EMISSION OF HIGHER FUNGI

Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Puzyr A.P., Gitelson J.I., Bondar V.S.

Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

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

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0522

Abstract. The paper presents data that testify in favor of the participation of the cytochrome P450 system in the light emission of higher fungi. Extracts from mycelia of different species of luminous basidiomycetes containing fungal luminescent systems that provide luminescence in vitro were obtained. Applied conditions for the isolation of luminescent systems (sonication, centrifugation at 40000g) indicate the presence of membrane structures in the extracts, in particular, microsomes formed as a result of ultrasonic disintegration of the endoplasmic reticulum (ER). Differential spectral analysis of the extracts revealed the presence of two absorption peaks at 410 nm and 450 nm, which indicates the presence of cytochromes b_5 and P450. The luminescence of the extracts is stimulated by reduced pyridine nucleotides, however, the addition of NADPH causes a higher level of luminescence compared with NADH. The addition of hydrogen peroxide significantly (from several times to 1-2 orders of magnitude) increases the luminescence intensity of extracts activated by NAD(P)H. The addition of fluconazole significantly inhibits the light emission of extracts. The data obtained indicates that the cytochrome P450 system associated with ER membranes may participate in the mechanism of light emission of higher fungi with the involvement in the process of electron transport enzyme systems: NADPH-dependent reductase of cytochrome P450 - cytochrome P450 and NADH-dependent reductase of cytochrome b_5 - cytochrome b_5 - cytochrome P450. In this case, cytochrome P450 may hydroxylate hispidin (precursor of the luminescent reaction substrate) to form luciferin and catalyze its oxidation in the presence of ROS with light emission.

Key words: *luminous higher fungi, mycelium, hispidin, cytochrome P450 system, reduced pyridine nucleotides, fluconazole, hydrogen peroxide.*

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Малиновская Е.М.¹, Савинова Е.А.¹, Сергеева В.А.¹, Ершова Е.С.^{1,3}, Проскурнина Е.В.¹, Каменева Л.В.¹, Долгих О.А.¹, Вейко Н.Н.¹, Краевая О.А.², Жиленков А.В.², Трошин П.А.², Костюк С.В.^{1,3}

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

² Институт проблем химической физики РАН
просп. ак. Семенова, 1, г. Черноголовка, 142432, РФ; e-mail: troshin2003@inbox.ru

³ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии
ул. Петровка, 25, с. 2, г. Москва, 107031, РФ; e-mail: svet-vk@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0523

Аннотация. В работе рассматривается влияние двух водорастворимых производных фуллерена C₆₀, модифицированных аминокислотными остатками, на уровень активных форм кислорода (АФК) в культивируемых клетках человека и на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность клеток. Производные фуллерена C₆₀ с присоединенными остатками аминокислот серина и фенибута синтезировали из хлорфуллеренов C₆₀Cl₆. В экспериментах *in vitro* использовали культуры эмбриональных фибробластов легких человека. Различные концентрации производных фуллерена добавляли к среде культивирования, клетки культивировали в присутствии соединений от 1 до 72 часов. Уровень АФК определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA), который под действием свободных радикалов окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF), методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и с использованием планшетного ридера. Уровень экспрессии белков определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител. Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показали, что при введении изучаемых соединений в клеточную среду они интенсивно поглощают активные формы кислорода за счет двойных сопряженных связей в каркасе. При этом производные фуллерена способствуют развитию вторичного окислительного стресса в клетках через 24 часа после введения. Данный эффект происходит за счет активации фермента NOX4. В клетках эмбриональных фибробластов легких человека, которым были введены исследуемые производные фуллерена C₆₀, обнаружена корреляция между экспрессией белка фермента NOX4 и уровнем активных форм кислорода. Отсутствие активации антиоксидантного транскрипционного фактора NRF2 при инкубации эмбриональных фибробластов легких человека в присутствии производных фуллерена C₆₀ способствует развитию вторичного окислительного стресса в клетках.

Ключевые слова: водорастворимые производные фуллерена C₆₀, активные формы кислорода, эмбриональные фибробласты легких человека, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

С момента своего открытия фуллерены привлекают значительное внимание исследователей в различных научных областях, включая биомедицину. Фуллерены – это углеродные сферы, которые в настоящее время используются во всем мире и имеют широкий спектр применений. Эти молекулы обладают уникальными электронными свойствами, которые делают их перспективными кандидатами для методов диагностики и терапевтического применения [1-7]. Наноразмер и возможность модификации поверхности позволяют фуллеренам стать незаменимым материалом в нанотехнологиях, в том числе, в наномедицине. Сложность исследований фуллеренов заключалась в том, что ранее синтез этих наносоединений протекал очень неселективно, и, в связи с этим получение индивидуальных соединений было медленным, сложным и дорогим. Однако с появлением новых методов синтеза эти проблемы были решены. Ковалентное присоединение различных функциональных групп к каркасу фуллерена позволяет получить широкий круг водорастворимых производных фуллерена (ВРПФ), которые проявляют различные свойства в отношении биологических объектов, в том числе, культивируемых *in vitro* клеток человека [4,6].

Однако на сегодняшний день еще недостаточно изучено воздействие наносоединений на молекулярно-генетический аппарат клетки и организм человека в целом. Известно, что в основе развития и прогресса многих сердечно-сосудистых, онкологических и неврологических заболеваний лежит окислительный стресс. Накопление в организме активных форм кислорода (АФК) в результате повышенного уровня их синтеза и/или

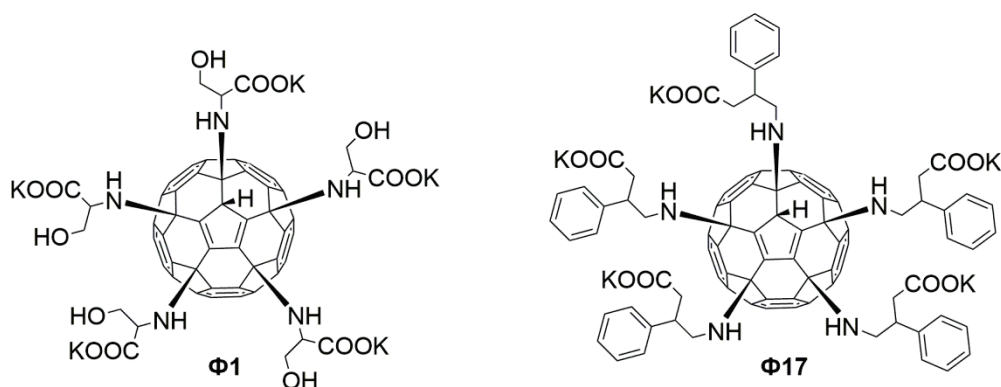


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных производных C_{60}

сниженной активности антиокислительных систем приводит к повреждениям клеточной ДНК. Показано, что фуллерены и их водорастворимые производные являются мощными акцепторами свободных радикалов, что делает этот класс соединений привлекательным инструментом для регулирования свободнорадикальных процессов и для снижения тяжести окислительного стресса в биологических системах [1-3,10]. В настоящее время растет интерес к применению производных фуллеренов в различных отраслях наномедицины, проводятся эксперименты как на животных моделях, так и на клеточных культурах, в том числе, на культивируемых клетках человека [5-9]. В ходе исследования биологического действия ВРПФ C_{60} на клетки человека выяснилось, что данные соединения вызывают активацию ряда генов в клетках [8,9]. При этом ответ клетки зависит не только от природы функциональных групп, присоединенных к фуллерену, но и от типа клетки.

Задачей данного исследования являлось изучение влияния двух водорастворимых производных фуллерена C_{60} на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали влияние двух производных C_{60} , модифицированных аминокислотными остатками, на прооксидантную активность эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ). Производные фуллерена C_{60} с присоединенными остатками аминокислот серина (Ф1) и фенилбута (Ф17) синтезировали из хлорфуллеренов $C_{60}Cl_6$, как описано в работе [11] (рис. 1).

В экспериментах *in vitro* использованы культуры эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ» 2-6-го пассажей. Культуры клеток для проведения научной работы в рамках НИР получены с соблюдением этических норм в рамках проведения научных исследований. Различные концентрации производных фуллерена добавляли к среде культивирования, клетки культивировались в присутствии соединений от 1 до 72 часов.

Для определения токсичности соединений в отношении культур клеток проводили стандартный МТТ-тест с детекцией на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия).

Уровень АФК определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) («Molecular Probes/Invitrogen», «СА», США), который под действием АФК окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF). Детектировали методами флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия), проточной цитометрии (Partec CyFlow® ML, Германия) и с использованием планшетного ридера («EnSpire», Финляндия).

Уровень экспрессии белков определяли путем проточной цитофлуориметрии с использованием специфических антител на приборе CyFlow Space (Partec, Германия).

Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. После воздействия фуллеренов из клеток выделяли РНК с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Россия) согласно стандартной методике с последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent («MoViTec», Германия) на планшетном ридере («EnSpire equipment», Финляндия) $\lambda_{\text{возб}} - 487 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{флу}} - 524 \text{ нм}$. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике. ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров («Синтол») и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. При анализе предполагаемых различий между выборками исходили из гипотезы об отсутствии различий, которую проверяли с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

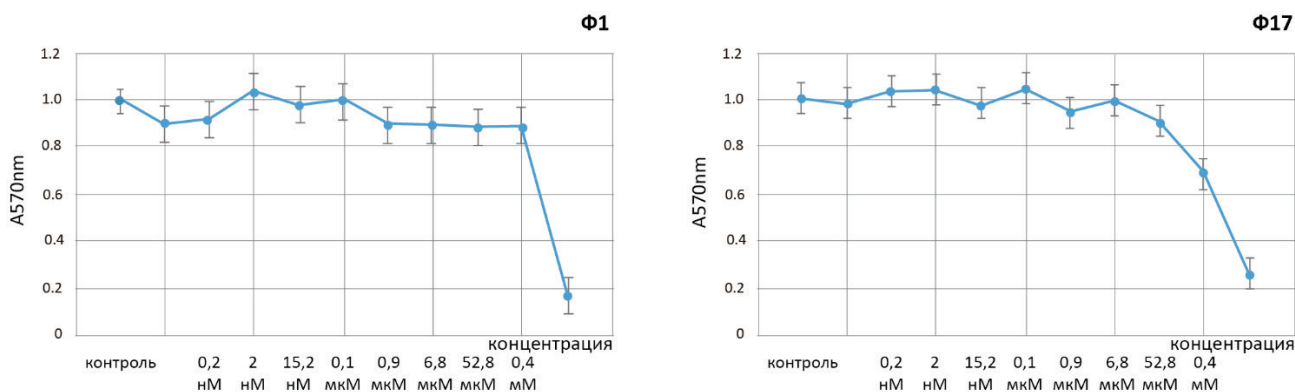


Рисунок 2. МТТ-тест: по оси X – концентрации производных фуллеренов, обозначены на рисунке; по оси Y – оптическая плотность при 570 нм

МТТ-тест показал, что диапазон концентраций 0,2 нМ-0,4 мМ исследуемых соединений безопасен для клеток (рис. 2).

Все исследованные производные фуллерена C_{60} флуоресцируют в красной области спектра (600-800 нм) с максимумом флуоресценции 732 нм – у Ф1 и 732 нм – у Ф17.

Наличие флуоресценции ВРПФ позволило детектировать их проникновение в клетки. Показали, что в течение 1 часа исследованные ВРПФ проникают в цитоплазму клеток. Максимум флуоресценции фуллеренов в клетках приходится на 3 часа после их добавления в среду культивирования. В течение 24 часов все исследованные ВРПФ остаются в клетках. На рисунке 3 приведен пример флуоресценции соединения Ф1 через 24 часа после добавления к клеткам. На большом увеличении видны места локализации флуоресцирующего производного фуллерена в клетке.

Из литературных данных известно, что водные растворы производных фуллеренов обладают антиоксидантным эффектом [6]. Однако данные относительно разных производных противоречивы. Поэтому был проведен ряд экспериментов для исследования скорости образования АФК в культуре клеток ФЛЭЧ, которые культивировали с исследуемыми соединениями.

Уровень АФК в клетках после воздействия производных фуллерена исследовали с помощью реагента H2DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). После проникновения через плазматическую мембрану клетки, реагент деацетируется внутриклеточными эстеразами. Нефлуоресцирующий DCFH в цитоплазме окисляется свободными радикалами до интенсивно флуоресцирующего DCF. Детектировали уровень синтеза АФК в клетках на планшетном ридере на термостатируемой платформе (EnSpire, Финляндия). Выбрали одинаковую нетоксичную концентрацию всех исследованных производных фуллерена – 0,4 мкМ. В этой концентрации соединения вводили во флаконы с клетками ФЛЭЧ, инкубация проводилась в CO_2 -инкубаторе в течение 3 и 24 часов. В качестве контроля использовались клетки, культивирующиеся без воздействия Ф1 и Ф17, и среда без клеток (фон). После инкубации добавляли H2DCFH-DA и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра (рис. 4).

Количественные данные, свидетельствующие о влиянии производных фуллерена на уровень АФК в ФЛЭЧ, полученные на проточном цитофлуориметре, подтвердили данными, полученными на приборе EnSpire Equipment (Финляндия). На рисунке 5 приводится пример анализа уровня АФК в клетках при действии производного Ф1 на планшетном ридере. По окончании времени воздействия фуллерена на клетки добавляли раствор H2DCFH-DA и анализировали изменение флуоресценции сигнала (длины волн λ возбуждения = 495 нм, λ эмиссии = 526 нм) в зависимости от времени инкубации клеток в присутствии красителя. Получали зависимость увеличения флуоресценции DCF от времени, которая представлена на рисунке 5. Угол наклона между кривой и осью X – скорость синтеза DCF (k). Для получения величины угла наклона применяли линейную аппроксимацию.



Рисунок 3. Локализация фуллерена Ф1 в клетках (ФЛЭЧ) через 24 часа после добавления к среде культивирования. Увеличение X40

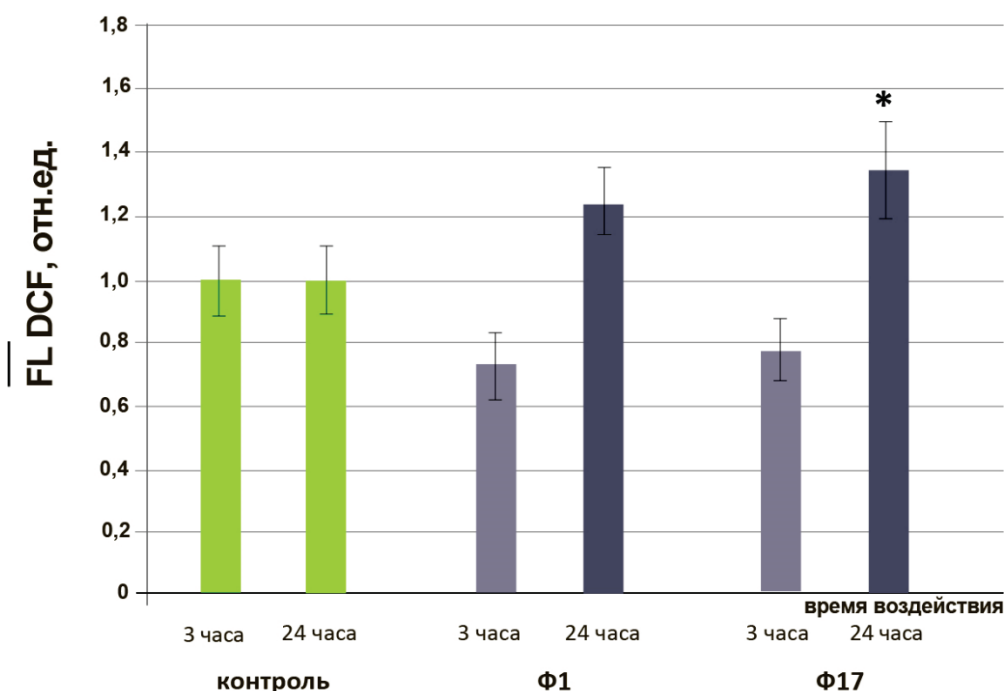


Рисунок 4. Гистограмма зависимости синтеза АФК в клетках от времени инкубации (в течение 24 часов) с производными фуллерена C_{60} (концентрация 0,4 мкМ), метод проточной цитофлуориметрии. (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Коэффициенты линейной регрессии были не ниже 0,96 ($p < 0,001$). Скорость синтеза DCF отражает количество АФК в клеточной культуре. Результаты представляли в виде отношения констант скорости синтеза k_i/k_0 .

С использованием планшетного ридера подтвердили данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии. При воздействии производных фуллерена C_{60} в концентрации 0,4 мкМ на фибробласты уровень АФК достоверно ($p < 0,01$) снижается на протяжении 3 часов после инкубации, но через 24 часа синтез АФК значительно возрастает (в 2-4 раза, $p < 0,001$) (рис. 6).

Для определения молекулярного механизма действия производных фуллерена на клетки были проанализированы источники АФК в клетке. Одним из основных продуцентов АФК в фибробластах является NADPH-оксидаза – фермент NOX4, катализирующий синтез пероксида водорода. Регуляция активности АФК ферментом NOX4 происходит, в основном, на транскрипционном уровне.

Был исследован уровень экспрессии мРНК фермента NOX4 методом ПЦР в реальном времени. Предварительно клетки ФЛЭЧ инкубировали с производными фуллерена C_{60} (концентрация 0,4 мкМ) в течение 3 и 24 часов (рис. 7).

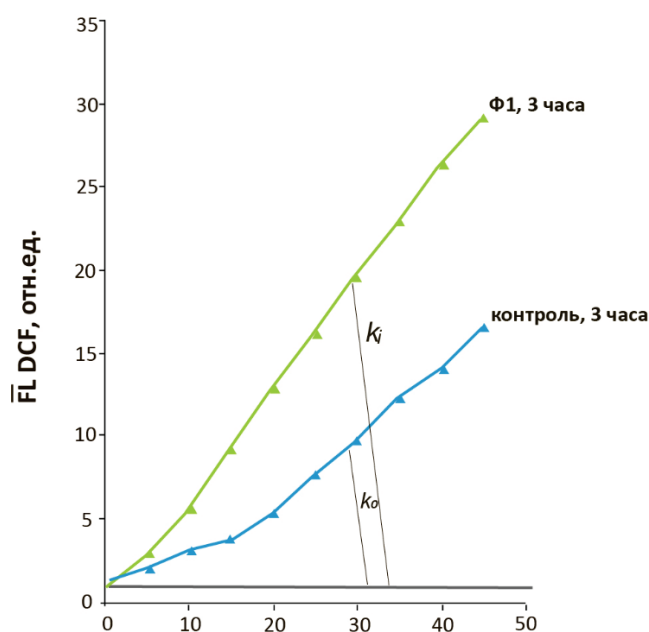


Рисунок 5. Пример анализа уровня АФК в клетках ФЛЭЧ при действии фуллерена Ф1. Клетки культивировали 3 часа в присутствии Ф1 или без производного фуллерена (контроль)

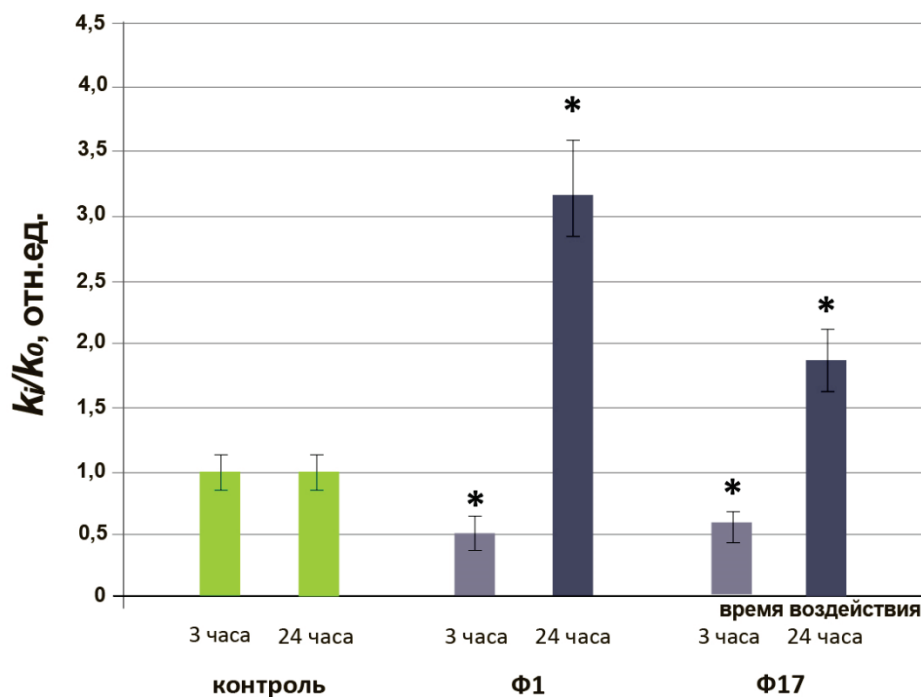


Рисунок 6. Гистограмма отношения констант скорости синтеза k_i/k_0 синтеза АФК в клетках от времени инкубации (в течение 24 часов) с производными фуллерена C_{60} (концентрация $0,4\text{мкМ}$), данные получены с использованием планшетного ридера. (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Из гистограмм видно, что уровень экспрессии гена фермента *NOX4* при добавлении исследуемых соединений в течение 3 часов практически не отличается от уровня контроля, но через 24 часа картина существенно меняется, и уровень экспрессии гена *NOX4* при воздействии производных фуллерена статистически значимо увеличивается – в 1,6-1,8 раз ($p < 0,01$).

На следующем этапе исследования необходимо было проверить влияние производных фуллерена C_{60} на синтез белка фермента *NOX4*. Количество белка *NOX4* определяли методом проточной цитофлуориметрии. Гистограммы строили с использованием среднего значения FL1-*NOX4* (рис. 8).

После введения соединений через 3 часа наблюдается незначительное снижение уровня белка *NOX4* (рис. 8). Через 24 часа уровень белка *NOX4* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в присутствии производных C_{60} возрастает в 1,8-2,4 раза ($p < 0,01$).

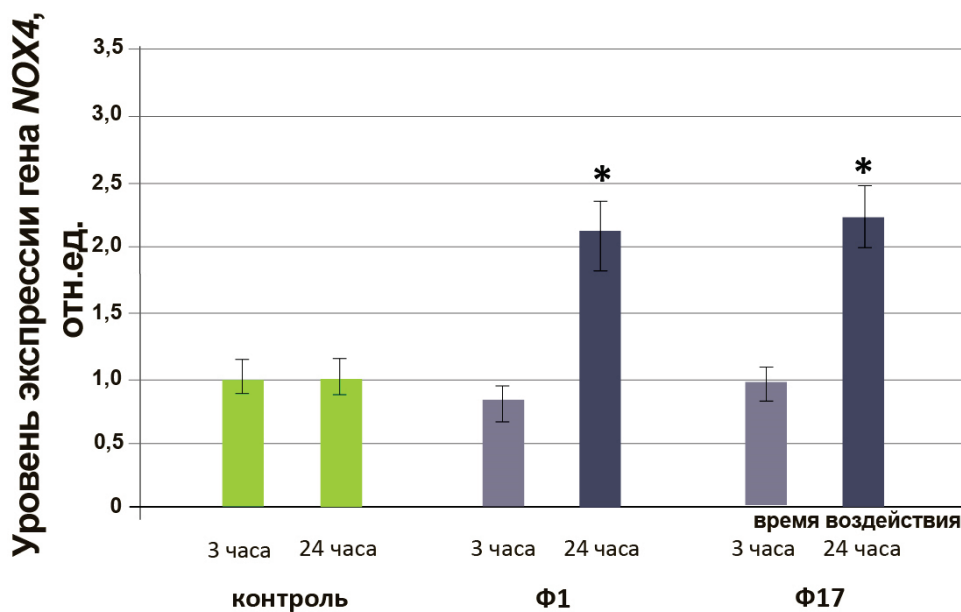


Рисунок 7. Гистограммы, отражающие уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии C_{60} в концентрации $0,4\text{мкМ}$. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

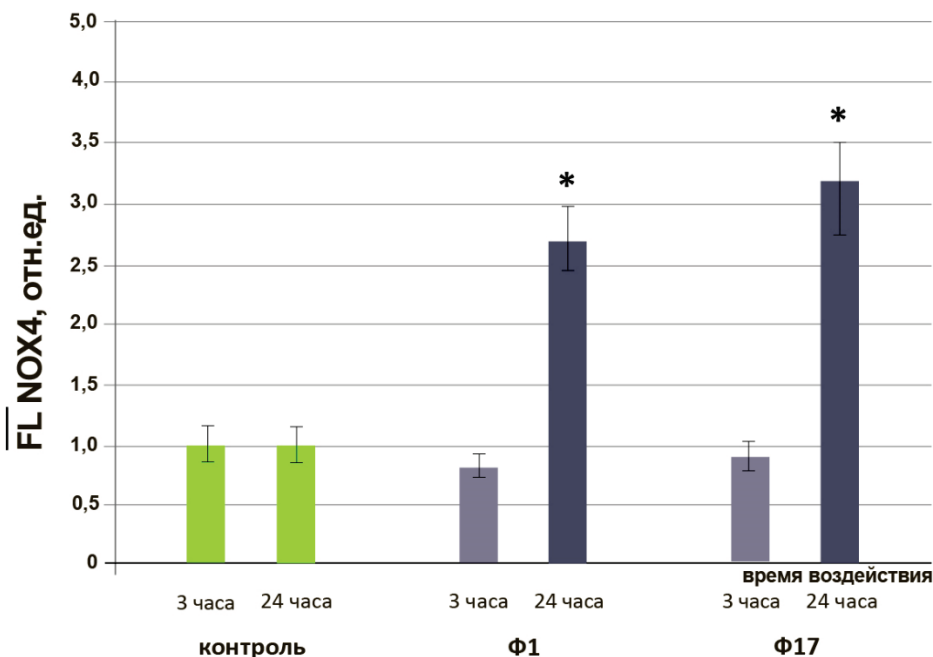


Рисунок 8. Гистограммы, отражающие уровень экспрессии белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии производных C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

Применение плюмбагина – ингибитора фермента NOX4, позволило доказать, что увеличение уровня АФК зависит от возрастания экспрессии фермента NOX4. При добавлении производных фуллерена в среду культивирования клеток после 1 мкМ плюмбагина уровень экспрессии фермента NOX4 не возрастал, количество АФК в клетке также не увеличивалось (рис. 9).

Одним из главных транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию антиоксидантных белков, является NRF2 (Nuclear factor erythroid 2). При окислительном стрессе NRF2, не удерживаемый белком KEAP1, накапливается в цитоплазме и перемещается в ядро. В ядре NRF2 связывается с ARE (antioxidant response element) цис-регуляторными элементами, регулирующими экспрессию антиоксидантных генов и белков. Активация NRF2 приводит к индукции многих цитопротекторных белков, включая NADH-оксидоредуктазу NOX4. Влияние производных фуллерена C_{60} на уровень АФК и фермента NOX4 (наблюдается из экспериментальных данных) позволило предположить, что производные фуллерена могут также оказывать влияние на транскрипционный фактор NRF2. Решено было проверить действие производных фуллерена C_{60} на уровень экспрессии NRF2 в клетках фибробластов легкого эмбриона человека (рис. 10). Выяснили, что при воздействии производных фуллерена C_{60} уровень транскрипции гена *NRF2* остается близким к контролю.

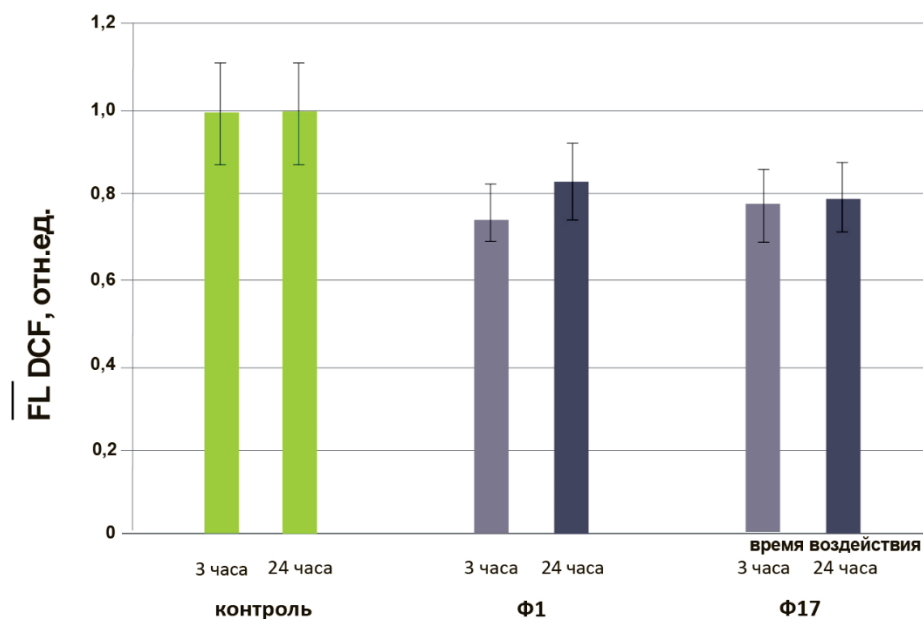


Рисунок 9. Снижение уровня АФК после внесения производных фуллерена C_{60} в среду культивирования ФЛЭЧ при ингибировании плюмбагином. Концентрация введенных соединений 0,4мкМ

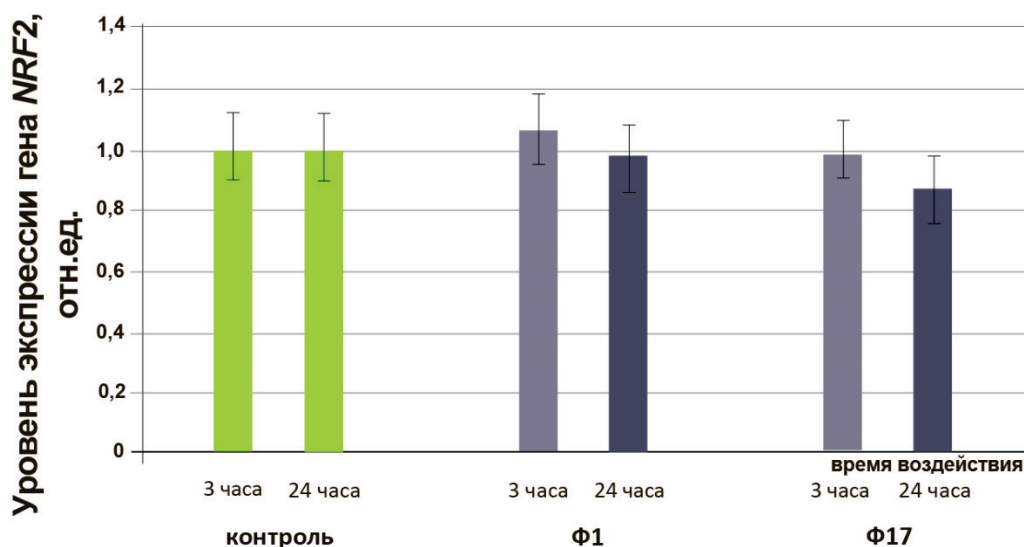


Рисунок 10. Уровень экспрессии гена *NRF2* в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

Проанализировали влияние производных фуллерена C_{60} в ФЛЭЧ на уровень белка NRF2 методом проточной цитофлуориметрии (рис. 11).

Как видно из графиков, воздействие производных фуллерена C_{60} , добавленных к среде культивирования ФЛЭЧ, не приводит к возрастанию уровня NRF2 относительно контроля (рис. 11).

Активность транскрипционного фактора NRF2 зависит от его локализации, NRF2 в контроле локализован, преимущественно, в цитоплазме. Воздействие производных фуллерена C_{60} приводит к снижению уровня флуоресценции NRF2 в цитоплазме (рис. 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что при введении исследуемых ВРПФ в клеточную среду, независимо от характера присоединённых к каркасу C_{60} остатков аминокислот, оба соединения активно поглощают АФК за счет двойных сопряженных связей в каркасе. В ответ на снижение уровня АФК повышается транскрипционная активность гена *NOX4*. Спустя 24 часа после введения производных фуллерена C_{60} происходит увеличение уровня транскрипционной активности фермента NOX4 и, соответственно, уровня АФК. При этом через 24 часа производные фуллерена C_{60} способствуют развитию вторичного окислительного стресса в клетках (рис. 13).

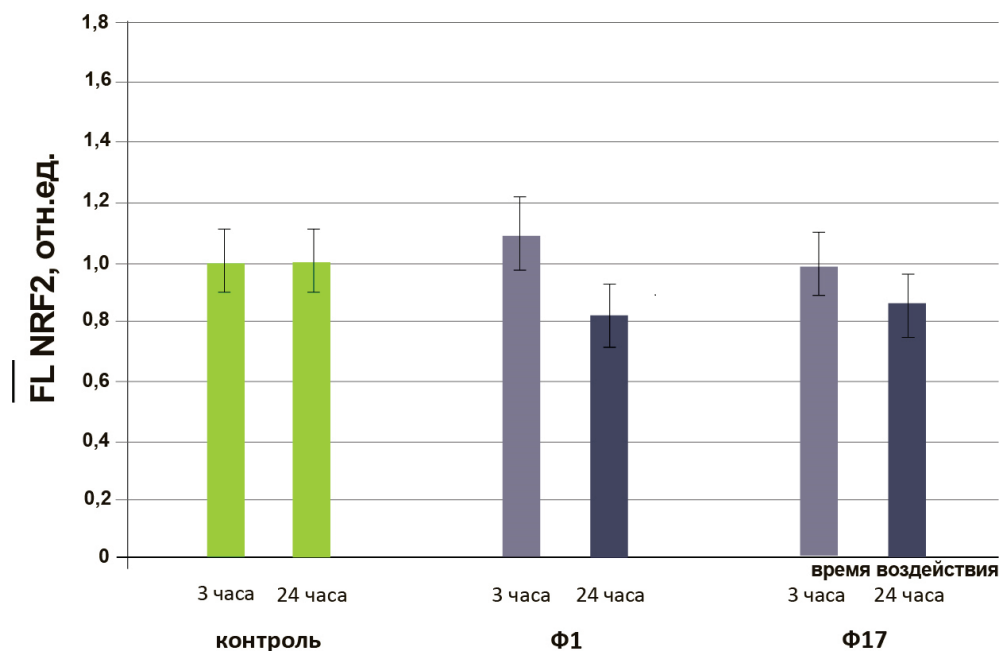


Рисунок 11. Уровень белка NRF2 в клетках ФЛЭЧ при инкубации в течение 3 и 24 часов в присутствии производных C_{60} в концентрации 0,4мкМ. (*) по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля ($p < 0,01$)

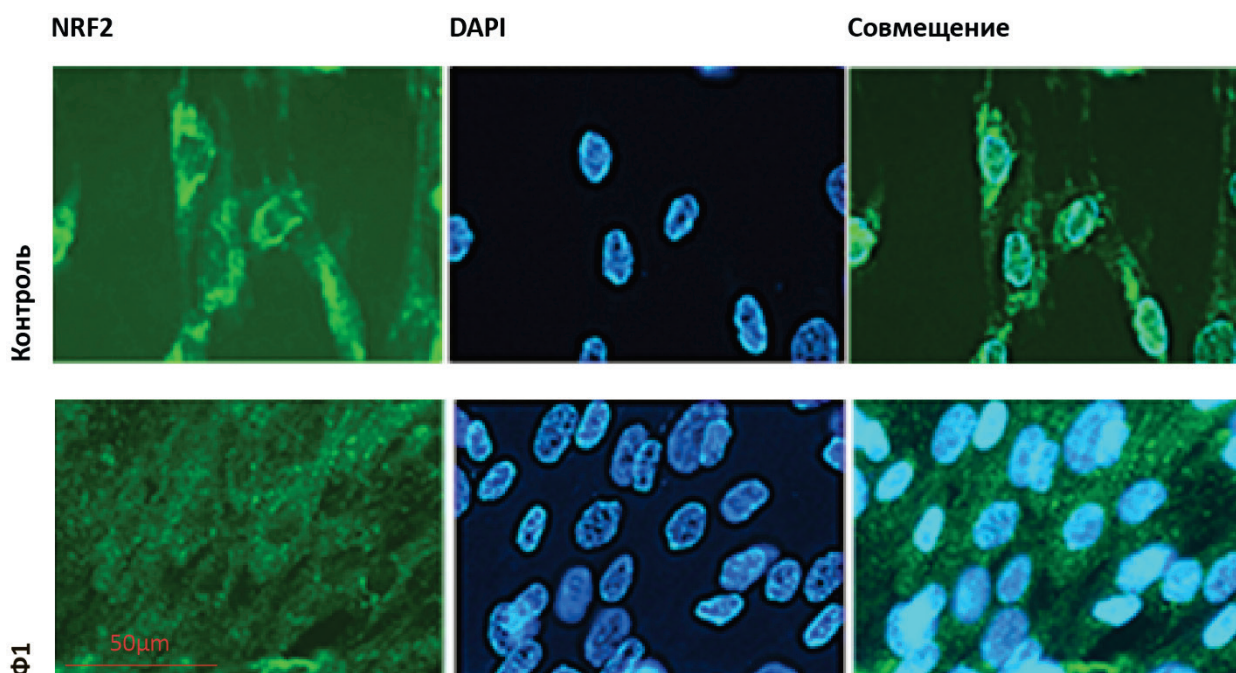


Рисунок 12. Локализация и экспрессия NRF2 в ФЛЭЧ при действии соединений на основе C_{60} на примере соединения Ф1 в концентрации 0,4 мкМ на культуру клеток ФЛЭЧ в течение 24 часов. NRF2 визуализировали с помощью антител к NRF2. Для окраски ядер использовался раствор ДНК-связывающегося красителя DAPI

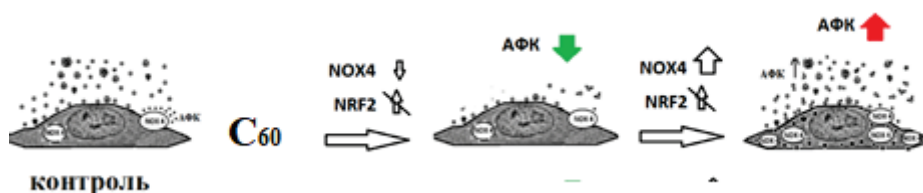


Рисунок 13. Схематичное объяснение влияния производных фуллерена C_{60} на ФЛЭЧ

Мы показали, что развитие вторичного окислительного стресса при действии на клетки производных фуллерена C_{60} происходит за счет активации фермента NOX4. В клетках ФЛЭЧ, которым были введены исследуемые производные фуллерена C_{60} , обнаружена корреляция между средним значением белка фермента NOX4 и уровнем АФК. Отсутствие активации NRF2 при инкубации ФЛЭЧ в присутствии производных фуллерена C_{60} способствует развитию вторичного окислительного стресса в клетках.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ: проект 19-13-00411-П (синтез Ф1 и Ф17) и проект 18-15-00437 П (влияние Ф1 и Ф17 на ФЛЭЧ).

Список литературы / References:

1. Dugan L.L., Lovett E.G., Quick K.L., Lotharius J., Lin T.T., O'Malley K.L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 2001, vol. 7, no. 3, pp. 243-246.
2. Wolff D.J., Papoiu A.D., Mialkowski K., Richardson C.F., Schuster D.I., Wilson S.R. Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by tris-malonyl-C(60)-fullerene adducts. *Arch Biochem. Biophys.*, 2000, vol. 378, no. 2, pp. 216-223.
3. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*, 2005, vol. 5, pp. 2578-2585.
4. Kraevaya O.A., Peregudov A.S., Troyanov S.I. et al. Diversion of the Arbuzov reaction: alkylation of C-Cl instead of phosphonic ester formation on the fullerene cage. *Org Biomol Chem*, 2019, vol. 17, no. 30, pp. 7155-7160.
5. Bisaglia M., Natalini B., Pellicciari R., Straface E., Malorni W., Monti D., Franceschi C., Schettini G. C3-fullerotrismethanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem*, 2000, vol. 74, pp. 1197-1204.
6. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E. et al. Antioxidant properties of fullerene derivatives depend on their chemical structure: a study of two fullerene derivatives on HELFs. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, vol. 2019, p. 4398695.
7. Monti D., Moretti L., Salvioli S., Straface E., Malorni W., Pellicciari R., Schettini G., Bisaglia M., Pincelli C., Fumelli C., Bonafè M., Franceschi C. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, vol. 277, pp. 711-717.

8. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Tabakov V.J. et al. Functionalized fullerene increases NF- κ B activity and blocks genotoxic effect of oxidative stress in serum-starving human embryo lung diploid fibroblasts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016, vol. 805, pp. 46-57.
9. Ershova E.S., Sergeeva V.A., Chausheva A.I. et al. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Oxid. Med. Cell Longev*, 2016, vol. 2016, p. 9895245.
10. Xiao L., Takada H., Gan X.h., Miwa N. The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, vol. 16, pp. 1590-1595.
11. Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., Kushch A.A., Peregudov A., Vasilchenko A., Deryabin D.G., Martynenko V.M., Troshin P.A. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60] fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₆ as a precursor. *Chem. Commun*, 2012, vol. 48, pp. 5461-5463.

THE EFFECT OF WATER-SOLUBLE DERIVATIVES OF FULLERENE C₆₀ ON THE LEVEL OF OXIDATIVE STRESS AND ON THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF GENES REGULATING PRO- AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HUMAN EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS (HELFs) *IN VITRO*

Malinovskaya E.M.¹, Savinova E.A.¹, Sergeeva V.A.¹, Ershova E.S.^{1,3}, Proskurnina E.V.¹, Kameneva L.V.¹, Dolgikh O.A.¹, Veiko N.N.¹, Kraevaya O.A.², Zhilenkov A.V.², Troshin P.A.², Kostyuk S.V.^{1,3}

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

² IPCP RAS

Semenov ave. 1, Chernogolovka, 142432, Russia; e-mail: troshin2003@inbox.ru

³ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology

Petrovka St, 25, B.2, Moscow, 107031, Russia; e-mail: svet-vk@yandex.ru

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0523

Abstract. The paper considers the effect of two water-soluble C₆₀ fullerene derivatives modified with amino acid residues on the level of reactive oxygen species (ROS) in cultured human cells and on the transcriptional activity of genes that regulate pro- and antioxidant activity of cells. C₆₀ fullerene derivatives with attached serine and phenibut amino acid residues were synthesized from C₆₀Cl₆ chlorofullerenes. Human embryonic lung fibroblast cultures were used in in vitro experiments. Various concentrations of fullerene derivatives were added to the culture medium, the cells were cultured in the presence of compounds from 1 to 72 hours. The level of ROS was determined using the dye 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized by free radicals to form fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF), by fluorescence microscopy, flow cytometry, and using a plate reader. The level of protein expression was determined by flow cytometry using specific antibodies. The level of gene expression was assessed by real-time polymerase chain reaction. It was shown that when the studied compounds are introduced into the cellular environment, they intensively absorb reactive oxygen species due to double conjugated bonds in the framework. At the same time, fullerene derivatives contribute to the development of secondary oxidative stress in cells 24 hours after administration. This effect occurs due to the activation of the NOX4 enzyme. In the cells of human embryonic lung fibroblasts, which were injected with the studied C₆₀ fullerene derivatives, a correlation was found between the average value of the NOX4 enzyme protein and the level of reactive oxygen species. The lack of activation of the antioxidant transcription factor NRF2 upon incubation of human embryonic lung fibroblasts in the presence of C₆₀ fullerene derivatives contributes to the development of secondary oxidative stress in cells.

Key words: water-soluble derivatives of fullerene C₆₀, reactive oxygen species, human embryonic lung fibroblasts, oxidative stress.

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОМБИНАЦИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Никанорова Е.А., Варганова И.А., Медведев Я.И., Нагиба В.И.

Российский Федеральный ядерный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной физики

пр. Мира, 37, Саров, Нижегородская обл., 606189, РФ; e-mail: gane@orb2.vniief.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0524

Аннотация Представлены результаты сравнительного исследования биоэффектов 30-минутного сеанса воздействия электромагнитным излучением с частотой 1000 мГц и ППЭ 10 мВт/см², 30-минутного сеанса воздействия низкочастотным импульсным магнитным полем с магнитной индукцией 4 мТл, а также их комбинации, на уровень апоптоза лимфоцитов крыс *in vivo*. Уровень апоптоза оценивали морфологически на флуоресцентном микроскопе после 24-часового культивирования клеточных суспензий в иммунологических планшетах при 37 °С в питательной среде без нагрузки. Количественно определяли процентное содержание клеток с признаками апоптоза (маргинация, конденсация и фрагментация хроматина в ядре). Установлено, что электромагнитное излучение не оказало значимого влияния на уровень апоптоза, а действие магнитного поля привело к снижению уровня апоптотических клеток на 16 % ($p \leq 0,01$) в сравнении с контрольной группой. Комбинация электромагнитного излучения и низкоинтенсивного магнитного поля повышала количество апоптотических клеток на 28% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контролем. Таким образом, опосредованное действие ЭМИ на геном клеток крови приводит к нарушению его нормального функционирования. Показано, что низкочастотное магнитное поле может разнонаправленно влиять на внутриклеточные процессы, в комбинации с электромагнитным излучением оно может усиливать патологические реакции, и, тем самым, запускать массовую программу апоптоза.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, низкочастотное импульсное магнитное поле, лимфоциты, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день создана новая техногенная среда обитания, в которой на человека постоянно воздействует сложноорганизованное модулированное электромагнитное излучение (ЭМИ) широкого спектра частот. Развитие новых телекоммуникационных стандартов связи влечет за собой усложнение структуры сигналов, освоение новых диапазонов частот ЭМИ, увеличение площади покрытия и продолжительности радиопередающих систем. Неизбежность подвергнуться воздействию электромагнитного излучения с возможно неблагоприятными последствиями заставляет нас оценивать опасность различных типов этого физического фактора для здоровья человека [1]. Возможный механизм влияния ЭМИ на биосистемы состоит в их взаимодействии и интерференции с эндогенными полями и изменении информационной составляющей естественных сигналов из окружающей среды [2]. Степень влияния эффектов ЭМИ на биосистемы зависит от частоты волны (определяет затухание и глубину проникновения в ткани); от параметров экспозиции электромагнитного поля (импульсные поля более эффективны, чем непрерывные); от формы импульса (излучения с прямоугольной формой импульса более биоэффективны, чем с синусоидальной); от напряженности поля (наличие амплитудных окон с наибольшим физиологическим сдвигом) [3].

В то же время показано, что локальное действие импульсного магнитного поля вызывает изменение состояния неспецифических адаптационных механизмов; с модификацией реактивности организма на уровне клетки [4]. Комбинация двух физических факторов, влияющих на одинаковые системы, вызывает более выраженный биологический эффект, чем комбинация факторов, влияющих на разные системы [5].

Исследование воздействия физического фактора на организм подразумевает изучение последствий его влияния на систему крови, пролиферацию клеток, экспрессию генов, генотоксические и канцерогенные эффекты. Возникновение тяжелых патологических состояний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели (апоптоза), при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей; либо гибель захватывает избыточное число клеток, что, в свою очередь, приводит к патологической дегенерации тканей и органов. Вопросы исследования молекулярных механизмов апоптоза в последние годы стали одной из самых актуальных проблем биологических наук.

Целью настоящей работы являлось изучение биоэффектов действия электромагнитного излучения (ЭМИ), низкоинтенсивного импульсного магнитного поля (МП), а также их комбинации на уровень апоптоза клеток крови лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали белых беспородных крыс – самцов в количестве 48 особей, массой 200-220 граммов, разделенных на четыре группы по 12 животных в каждой, в зависимости от характера воздействия.

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Биологические эффекты оценивали через 10 минут после окончания 30-минутного сеанса воздействия на животных электромагнитным излучением частотой 1000 МГц и средней плотностью потока энергии 4,54 мВт/см²; а также после 30-минутного сеанса воздействия на животных импульсным низкоинтенсивным магнитным полем с максимальным значением модуля магнитной индукции в рабочей зоне индуктора 4 мТл и формой сигнала в виде затухающей синусоиды. Сочетанное воздействие двух факторов осуществляли последовательно с 2-минутным временным промежутком между воздействиями ЭМИ и НМП. Для реализации ЭМИ использовали экспериментальную радиотехническую систему, включающую генератор, усилитель и рупорную антенну. Контроль уровня плотности потока энергии осуществляли с помощью прибора ПЗ – 41 (Россия). Источником импульсного МП служил макетный образец разработанного во ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» программно-аппаратного комплекса «Буфон» [6]. Магнитную индукцию измеряли миллitesламетром Ш1-15У-01 (Россия). Животных контрольных групп экспонировали в рабочей зоне установки при отсутствии воздействующего фактора в течение 30 минут. Все воздействия проводили на животных, помещенных в пластиковом контейнере без фиксации.

Взятие образцов крови проводили из подязычной вены крыс в пластиковые моноветы с гепарином лития в конечной концентрации 50 Ед/мл. Лимфоциты крови сразу же выделяли в градиенте плотности Ficoll-Paque (Швеция) согласно [7]. Уровень апоптоза свежеевыделенных лимфоцитов крови животных оценивали морфологически после 24-часового культивирования клеточных суспензий в иммунологических планшетах, помещенных в термошейкер PST-60HL «Biosan» (Латвия) при 37 °С в питательной среде с антибиотиками без тестирующей нагрузки по модифицированной методике [8]. Клеточные суспензии затем фиксировали в 2%-ном растворе параформальдегида и хранили при 4 °С. Количественно определяли содержание клеток с признаками апоптоза (маргинация, конденсация и фрагментация хроматина в ядре (рис. 1), с использованием ДНК-специфичного флуорохрома акридинового оранжевого, на флуоресцентном микроскопе «Axio» (Германия). Для акридинового оранжевого использовали фильтр с длиной волны возбуждения 450-490 нм и эмиссии 515 нм. У каждого животного анализировали не менее трех повторностей клеточных культур, учитывали не менее 200 клеток для каждой повторности [9]. Уровень апоптоза оценивали по апоптотическому индексу, рассчитанному как процентное отношение числа клеток с признаками апоптоза к общему числу просмотренных клеток.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами согласно [10]. Для каждого параметра был проведен расчёт основных статистических показателей: среднего значения, стандартного отклонения, дисперсии. Проверку статистической гипотезы о нормальности распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Оценку статистически значимых различий средних значений показателей, полученных в экспериментальных и контрольных группах, при нормальном распределении и равенстве дисперсий, проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, а при распределении, отличным от нормального, использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и двухвыборочный критерий Уилкоксона [11]. Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Степень отклонения параметра от контрольного уровня выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процентное содержание клеток с признаками апоптоза в культурах выделенных лимфоцитов в исследуемых группах животных представлено в таблице 1 и на рисунке 2.

В ходе исследований установлено, что в контрольной группе животных после 24-часовой инкубации в питательной среде доля лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза составила 15%, что соответствует опубликованным данным [12]. Морфологически апоптоз проявлялся в конденсации цитоплазмы, сморщивании клетки, ярком свечении и агрегации хроматина вблизи ядерной оболочки; в образовании апоптотических телец (изолированные ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включающие

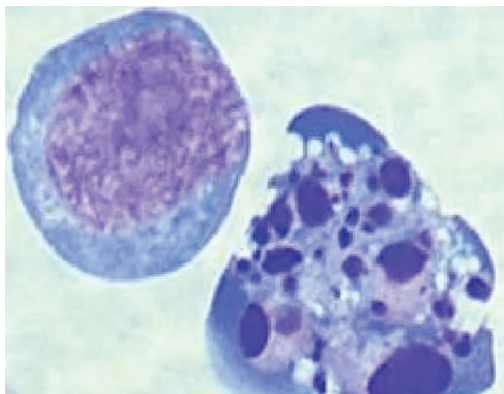


Рисунок 1. Пример клетки крови с признаками апоптоза, рядом нормальный лимфоцит (приводится по [7])

Таблица 1. Апоптоз в клеточных культурах различных групп животных

Группа животных	Проанализировано клеток	Содержание клеток с признаками апоптоза, % от общего количества, $M \pm m$
Контроль	7253	$15,0 \pm 0,42$
МП	7255	$12,7 \pm 0,39^{***}$
ЭМИ	6618	$16,3 \pm 0,5$
ЭМИ+МП	7216	$19,2 \pm 0,46^{***}$

Примечание:*** - статистически значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,001$

интактные органеллы и окруженные фрагментами плазматической мембраны), фагоцитируемых соседними клетками или макрофагами [13].

Количество апоптотических клеток в группе животных, подвергнутых действию магнитного поля (НМП), оказалось значимо ниже на 16% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контрольным уровнем, однако находилось в пределах нормы. Полученные данные согласуются с результатами исследователей, показавших, что действие МП может приводить к потере устойчивости клеток к антиапоптотическим сигналам посредством повышения экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 [14]. Механизм этого явления обусловлен тем, что клетка не в состоянии выполнять свои функции в организме до тех пор, пока не восстановит существующие в ней повреждения ДНК. В работе [15] показано, что слабое низкочастотное комбинированное магнитное поле может как стимулировать, так и замедлять развитие физиологического процесса. Направленность и величина биоэффектов слабых МП, настроенных в режиме параметрического резонанса, зависят от ферментативной активности живой системы [15]. С другой стороны, ослабление апоптотической гибели клеток является одним из важнейших факторов канцерогенеза [16]. В целом, выявленные функциональные изменения после воздействия ЭМИ как отдельно, так и в комбинации с низкочастотными МП, можно рассматривать как неблагоприятные, поскольку как подавление, так и усиление апоптоза ведет к патологическим изменениям в органах и тканях [17].

В группе животных, подвергнутых действию ЭМИ-излучения, установлена тенденция к повышению числа клеток с апоптозом относительно контрольных значений. Данные литературы указывают на то, что влияние ЭМИ на апоптоз лимфоцитов *in vitro* может быть различным и зависит от времени воздействия, а также от частотных и амплитудных характеристик поля [18,19].

Показатель апоптоза клеток крови в группе животных, подвергнутых сочетанному воздействию «ЭМИ+МП», оказался на 28% значимо выше контроля ($p \leq 0,01$), а также на 51% значимо отличался от показателя в группе «МП» ($p \leq 0,01$). Это может указывать на массивный выброс активных форм кислорода, которые в высоких концентрациях способны ингибировать синтез ДНК и деление клеток, тем самым активируя апоптоз [20].

Таким образом, низкоинтенсивное магнитное поле оказалось способным оказывать разнонаправленные биоэффекты, зависящие от наличия другого, энергетически более ёмкого физического фактора. Возрастание апоптоза в группе «ЭМИ+МП» может быть обусловлено формированием неспецифической реакции клеток на комбинацию внешних воздействий, в результате которой расходуется определённое количество энергии, накопленной в виде макроэргических связей АТФ, а также способностью ЭМИ к активации сигнальных путей апоптотической гибели клеток [21]. Результаты сравнительного анализа биоэффектов, развивающихся в

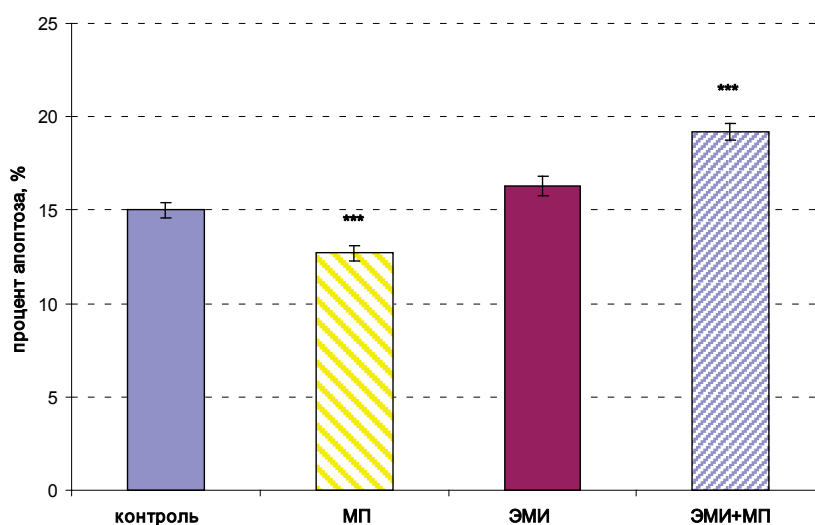


Рисунок 2. Процентное содержание клеток с морфологическими признаками апоптоза в исследуемых группах животных

Примечание: ***- статистически значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,001$

организме при действии физических факторов по отдельности и в сочетании, можно рассматривать как методологическую основу для понимания некоторых физиологических механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие импульсного магнитного поля, генерируемого установкой «Бутон», статистически значимо снижало количества клеток с признаками апоптоза. Длительность воздействия ЭМИ выбранных параметров оказалась недостаточна для значимого влияния на апоптоз лимфоцитов. Сочетанное действие «ЭМИ+МП» привело к статистически значимому увеличению количества апоптозных клеток по сравнению с контролем. Установленные нами статистически значимые различия в уровне апоптоза лимфоцитов после облучения МП и сочетанного (ЭМИ+МП) воздействия согласуются с данными литературы. Биологический эффект действия импульсного магнитного поля, электромагнитного излучения и их комбинации в целом зависит от времени воздействия и частотных и амплитудных характеристик воздействия.

Список литературы / References

1. Григорьев Ю.Г. Мобильная связь и электромагнитный хаос в оценке опасности для здоровья населения. Кто несет ответственность? *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2018, т. 58, № 6, с. 633-645. [Grigoriev Yu.G. Mobile communications and electromagnetic chaos in assessing the danger to public health. Who is responsible? *Radiation biology. Radioecology*, 2018, vol. 58, no. 6, pp. 633-645. (In Russ.)]
2. Ахиезер А.И., Ахиезер И.А. *Электромагнетизм и электромагнитные волны*. Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 1985, 504 с. [Akhiezer A.I., Akhiezer I.A. *Electromagnetism and electromagnetic waves*. Textbook for universities. M.: Higher school, 1985, 504 p. (In Russ.)]
3. Кудряшов Ю.Б., Перов С.Ю., Рубин А.Б. *Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения*. Учебник. М.: Физматлит, 2008, 184 с. [Kudryashov Yu.B., Perov S.Yu., Rubin A.B. *Radiation biophysics: radiofrequency and microwave electromagnetic radiation*. Textbook. M.: publishing house Phismatlit, 2008, 184 p. (In Russ.)]
4. Куликов А.Г., Воронина Д.Д. Возможности общей магнитотерапии в лечении и реабилитации (обзор). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 2016, т. 93, № 2, с. 48-52. [Kulikov A.G., Voronina D.D. Possibilities of general magnetic therapy in treatment and rehabilitation (review). *Issues of balneology, physiotherapy and exercise therapy*, 2016, vol. 93, no. 2, pp. 48-52. (In Russ.)]
5. Ушаков И.Б. *Комбинированные воздействия в экологии человека и экстремальной медицины*. М.: Издатцентр, 2003, 442 с. [Ushakov I.B. *Combined impacts in human ecology and extreme medicine*. M.: Izdattsentr, 2003, 442 p. (In Russ.)]
6. *Макетный образец программно-аппаратного комплекса «Бутон»*. Свидетельство на товарный знак № 386501 от 03.12.2007. Патент RU 2290970 C2 от 28.03.2005. Патент RU 159809 U1 от 16.06.2015. [Model sample of the hardware-software complex "Buton". Trademark certificate No. 386501 dated 03.12.2007. Patent RU 2290970 C2 dated March 28, 2005. Patent RU 159809 U1 dated 06.16.2015. (In Russ.)]
7. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. *Методы исследования программируемой клеточной гибели*. Учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза». Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011, 61 с. [Skibo Yu.V., Abramova Z.I. *Methods for the study of programmed cell death*. Educational and methodological manual for masters in the course "Theory of apoptosis". Kazan: FGAOU VPO KFU, 2011, 61 p. (In Russ.)]
8. Карпищенко А.И. *Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013, 792 с. [Karpishchenko A.I. *Medical laboratory technologies: a guide to clinical laboratory diagnostics*. M.: GEOTAR-Media, 2013, 792 p. (In Russ.)]
9. Свирновский А.И., Шелег С.В. и др. *Методы оценки структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови*. Методические рекомендации. Минздрав Респ. Беларусь, 2000, рег. № 173-0012. [Svirnovsky A.I., Sheleg S.V. *Methods for assessing the structural and functional state of peripheral blood lymphocytes*. Guidelines. Ministry of Health Rep. Belarus, 2000, reg. no. 173-0012. (In Russ.)]
10. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Киев: Морион, 2000, 319 с. [Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. *Statistical methods in biomedical research using Excel*. Kiev: Morion, 2000, 319 p. (In Russ.)]
11. Гланц С.М. *Медико-биологическая статистика: практика*. М.: Наука, 1999, 459 с. [Glantz S.M. *Medico-biological statistics: practice*. M.: Nauka, 1999, 459 p. (In Russ.)]
12. Graziano M.J. Induction of apoptosis in rat peripheral blood lymphocytes by the anticancer drug CI-994 (acetyldinaline). *J. Biomed. Biotechnol.*, 2001, no. 1, pp. 52-61.
13. Gorman A., McCarthy J., Finucane D. et al. Morphological assessment of apoptosis. In: Techniques in apoptosis. A user's guide. Cotter T.G. and Martin S.J. *Portland Press*, 1994, pp. 1-20.
14. Белкин А.Д. Содержание белков-регуляторов апоптоза bcl-2 и bad в регионарных лимфатических узлах печени при воздействии магнитного поля 50 Гц. *Гигиена и санитария*, 2015, № 1, с. 112-114. [Belkin A.D. The content of proteins-regulators of apoptosis bcl-2 and bad in the regional lymph nodes of the liver under the influence of a magnetic field of 50 Hz. *Hygiene and Sanitation*, 2015, no. 1, pp. 112-114. (In Russ.)]
15. Тирас Х.П., Скавуляк А.Н., Асландини К.Б., Иваницкий Г.Р. Почему эффекты от воздействия слабых комбинированных магнитных полей на биосистемы не всегда воспроизводимы? *ДАН*, 2012, т. 443, № 6, с. 1-3.

[Tiras Kh.P., Skavulyak A.N., Aslandini K.B., Ivanitsky G.R. Why are the effects of weak combined magnetic fields on biosystems not always reproducible? *DAN*, 2012, vol. 443, no. 6, pp. 1-3. (In Russ.)]

16. Ivashkin V.T., Lapina T.L., Bondarenko O.Yu., Bueverov A.O., Osadchuk A.M., Kogan E.A. et al. Processes apoptoza I proliferation pathology gastrointestinal and live. *Rossiyskiy Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii*, 2002, no. 6, pp. 38-43.

17. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения. *Клиническая медицина*, 2000, т. 1, с. 5-10. [Aruin L.I. Apoptosis in pathological processes in the digestive organs. *Clinical medicine*, 2000, vol. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]

18. Rajendra P., Sujatha H.N., Sashidhar R.B., Subramanyam C., Devondranath D., Aradhya R.S. Viability of unstimulated lymphocytes exposed to extremely low frequency electromagnetic fields is dependent on intensity. *BioDiscovery*, 2012, vol. 2, p. e8925, doi: 10.7750/BioDiscovery.2012.2.2.

19. Плеханов Г.Б. *Основные закономерности низкочастотной электромагнитобиологии*. Томск: изд-во Томского ун-та, 1990, 188 с. [Plekhanov G.B. *Basic regularities of low-frequency electromagnetobiology*. Tomsk: publishing house of Tomsk University, 1990, 188 p. (In Russ.)]

20. Рыбаков Ю.Л. Противоопухолевое и радиомодифицирующее действие слабого низкочастотного вихревого магнитного поля. *Радиационная экология. Радиоэкология*, 2016, т. 56, № 2, с. 177-189. [Rybakov Yu.L. Antitumor and radiomodifying effect of a weak low-frequency vortex magnetic field. *Radiation ecology. Radioecology*, 2016, vol. 56, no. 2, pp. 177-189. (In Russ.)]

21. Коломиец И.А. *Адаптивные реакции клеток крови млекопитающих на воздействие электромагнитных полей радиочастотного диапазона*. Дисс. канд. биол. наук, Челябинск, 2009, 23 с. [Kolomiets I.A. *Adaptive responses of mammalian blood cells to the impact of electromagnetic fields of the radio frequency range*. Diss. cand. biol. Sciences, Chelyabinsk, 2009, 23 p. (In Russ.)]

LYMPHOCYTES APOPTOSIS UNDER THE ACTION OF PHYSICAL FACTORS COMBINATION

Nikanorova E.A., Varganova I.A., Medvedev Ya.I., Nagiba V.I.

Russian Federal Nuclear Center - All-Russian Scientific Research Institute
of Experimental Physics

pr. Mira, 37, Sarov, Nizhny Novgorod region, 607189, Russia; e-mail: gane@orb2.vniief.ru

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0524

Abstract. The article presents the comparative study results of the bioeffects of 30-minute exposure session to electromagnetic radiation with 1000 MHz frequency and 10 mW/cm² EFD; of 30-minute exposure session to low-frequency pulsed magnetic field with 4 mT magnetic induction, as well as their combination, on rat's lymphocytes apoptosis level *in vivo*. The apoptosis level was assessed morphologically with fluorescent microscope after 24-hours of cell suspension cultivation at immunological plates at 37 °C in nutrient medium without loading. The percentage of cells with morphological signs of apoptosis (margination, condensation and fragmentation of chromatin in nucleus) was quantitatively determined. It was found that electromagnetic irradiation had no significant impact on apoptosis level, but magnetic field action resulted in reducing the apoptosis cells number by 16% ($p \leq 0,01$) compared to the control group. The combination of electromagnetic radiation and low intensity magnetic field increased the apoptotic cells number by 28% ($p \leq 0,01$) compared to the control. Thus, the mediated effect of electromagnetic radiation on blood cells genome leads to disruption of its normal functioning. It has been shown that low-frequency magnetic field can influence on intracellular processes in different directions; in combination with electromagnetic radiation it can intensify pathological reactions, and thus launching the apoptosis massive program.

Key words: *electromagnetic radiation, pulsed magnetic field, lymphocytes, apoptosis.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Маторин Д.Н.¹, Яковлева О.В.¹, Тодоренко Д.А.¹, Горячев С.Н.¹, Алексеев А.А.²

¹Московский государственный университет, биологический факультет

ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119991, РФ

²Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова,

ул. Беллинского, 58, г. Якутск, 677027, Республика Саха (Якутия), РФ; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0525

Аннотация. Рассмотрена природа замедленной флуоресценции хлорофилла (ЗФ) в водорослях, которая возникает уже после прекращения освещения за счет энергии, выделяемой в ходе обратных реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционном центре фотосистемы 2. Показана перспективность использования этой флуоресценции у водорослей для биотестирования загрязнений. К достоинствам использования ЗФ для экспресс-оценки токсичности вод и в особенности питьевой воды является короткая продолжительность испытаний и, соответственно, минимизация негативного влияния изменения физико-химических свойств среды на результаты, использование малых количеств тест-объектов. Преимущество ЗФ также в том, что измеряются только живые клетки с активными реакционными центрами фотосинтеза, что увеличивает чувствительность тестов на токсичность. Этот метод несет дополнительную информацию о важнейшем процессе в клетке – энергизации фотосинтетических мембран и связанным с этим образованием АТФ.

Ключевые слова: замедленная флуоресценция, фотосинтез, биотестирование, микроводоросли.

Важным источником информации о характере функционирования фотосинтетического аппарата является процесс замедленной флуоресценции (ЗФ) или длительного послесвечения, обнаруженный Стреллером и Арноном в 1951 г. [1]. Явление замедленной флуоресценции состоит в том, что после светового возбуждения в фотосинтезирующих клетках наблюдается слабое длительно затухающее красное свечение, испускаемое хлорофиллом *a*. Это свечение возникает уже после прекращения флуоресценции за счет энергии, выделяемой в ходе темновых реакций первичных фотопродуктов фотосинтеза в реакционном центре (РЦ) фотосистемы 2 (ФС 2). Различие между быстрой и замедленной флуоресценцией связано с природой возбуждения излучающей молекулы хлорофилла. Быстрая флуоресценция связана с процессами дезактивации возбуждения хлорофилла перед разделением зарядов в реакционном центре, тогда как ЗФ возникает после первичного акта фотосинтеза, и энергия появляется в результате обратной рекомбинации разделенных зарядов. В процессе быстрой флуоресценции излучается 2-3 % поглощенной энергии, тогда как выход ЗФ составляет только 0,03 % и менее от испускаемой флуоресценции.

Природа и свойства разных компонент рассмотрены в многочисленных обзорах [2-8]. В реакционном центре фотосистемы 2 после поглощения кванта света может образовываться целый ряд состояний, связанных с обратимой стабилизацией энергии при переносе электрона от РЦ на вторичные акцепторы, а также при переносе положительного заряда ко вторичным донорам. Обратная рекомбинация между продуктами в разном состоянии приводит к излучению ЗФ со временами затухания, соответствующим временам жизни данного состояния. Подробный анализ связи появления отдельных компонент ЗФ с состояниями РЦ ФС 2 содержится в работах [2,3,5]. Изучение кинетики затухания ЗФ позволяет изучать последовательность процессов стабилизации энергии возбуждения в ФС 2.

Генерация ЗФ зависит не только от состояния акцепторной части ФС2, но от окисленных переносчиков на донорной стороне ФС2. Для многих компонент ЗФ показана связь с накоплением положительных зарядов в кислород-выделяющем комплексе (КВК) – так называемых состояний $S_1 \rightarrow S_4$ [2,8,9]. Функционирование КВК успешно изучают по кинетике выделения O_2 на одиночные световые вспышки (1-10 мкс). При освещении водорослей или листьев серией коротких вспышек наблюдается осцилляция интенсивности ЗФ с периодом 4, которые отражают состояния в кислородовыделяющей системе.

Показана связь выхода ЗФ с энергизацией тилакоидных мембран, обусловленной появлением разности значений рН и электрических потенциалов на мембране [10]. Создание разности рН на мембране увеличивает скорость реакции рекомбинации, обуславливающей появление ЗФ. Связь выхода ЗФ с энергизацией мембран была подтверждена экспериментами, показывающими возрастание интенсивности ЗФ при добавлении кофакторов, ускоряющих транспорт электрона и сопряженное с ним образование разности электрохимических потенциалов ионов водорода на тилакоидной мембране, а также подавление этого возрастания разобщителями [4].

Влияние трансмембранного электрического поля на выход ЗФ было подробно изучено в экспериментах со стимуляцией ЗФ при добавлении к хлоропластам солей [10], а также при наложении внешнего электрического поля [11].

В последнее время после периода относительного покоя в исследованиях ЗФ вновь началось активное изучение индукционных кривых ЗФ в миллисекундном интервале времени, что связано с выпуском новейших

приборов для регистрации ЗФ (HansaTech, Англия) [3]. Этот прибор позволяет проводить одновременную регистрацию индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также регистрировать поглощение при длине 820 нм в отраженном модулированном свете, отражающее изменения P_{700} . На этом приборе в последнее время проведен цикл работ по исследованию индукционных кривых ЗФ [3,12-15].

Для решения задач мониторинга водной среды необходимы методы, позволяющие проводить диагностику на ранних стадиях антропогенных воздействий до появления видимых нарушений экосистемы. Биотестирование, как метод водной токсикологии обычно используется для регламентирования токсического загрязнения водной среды или выработки норм допустимых нагрузок на водные экосистемы. Водоросли лежат в основе водных экосистем и поэтому могут быть использованы в качестве биоиндикаторов водных сред. Преимуществом использования в биотестировании фотосинтетиков является высокая чувствительность к загрязнителям. В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Chlorella* и *Scenedesmus*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия служат рост и выживаемость культуры в опытах по сравнению с контролем в ходе длительного культивирования. Между тем экспресс-оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции, в том числе и ЗФ, является чрезвычайно актуальна [5]. К достоинствам относятся короткая продолжительность испытаний и, соответственно, минимизация негативного влияния изменения физико-химических свойств среды на результаты, использование малых количеств тест-объектов. Преимущество ЗФ также в том, что измеряются только живые клетки, что увеличивает чувствительность тестов на токсичность. Подсчет клеток под микроскопом или спектроскопические измерения хлорофилла включает также клетки, погибшие из-за токсинов. Это часто занижает токсические эффекты.

Преимущества использования ЗФ связаны с тем, что она несет дополнительную информацию о важнейшем процессе в клетке – энергизации фотосинтетических мембран и связанным с этим образованием АТФ. Показано, что многие токсические вещества в первую очередь влияют на эти энергопреобразующие процессы в клетке. Кроме того, оценка токсичности с измерением ЗФ по сравнению с методами быстрой флуоресценции исключает проблемы с флуоресценцией фона, которая может быть существенной, например, в стоках сточных вод.

Нами были отработаны научно-методологические подходы по использованию ЗФ в биотестировании различных загрязнений [4,5]. Как флуоресцентный метод, ЗФ также характеризуется быстротой (2 мин), низкой трудоемкостью процесса измерения и высокой чувствительностью к действию токсикантов. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 3 часов, по сравнению с 1–10 сутками при оценке токсичности по снижению скорости роста.

Проведенные нами многочисленные токсикологические эксперименты с тяжелыми металлами, гербицидами, полиароматическими углеводородами (ПАУ), ПАВ, органическими пестицидами и др. показали, что снижение относительного выхода ЗФ и отношения индукционного максимума к стационарному значению являются одной из первичных неспецифических реакций водорослей на воздействие токсикантов. При использовании интенсивной культуры хлореллы присутствие в среде веществ в токсических концентрациях, способных привести к гибели водорослей, достоверно обнаруживается по ЗФ уже в первые 3-4 часа эксперимента, что может быть использовано для экспрессной оценки степени токсичности и пределов токсических концентраций различных загрязнителей.

Для определения наличия токсического вещества в анализируемых пробах предпочтительно использовать наиболее интенсивные миллисекундные компоненты ЗФ микроводорослей (тест-объект) [5]. Загрязнения, неблагоприятно влияющие на водоросли и растения и, соответственно, угнетающие фотосинтез, изменяют параметры ЗФ и ингибируют интенсивность ЗФ. При тестировании измеряется индукционная кривая ЗФ замедленной флуоресценции после включения света. Интенсивность свечения после включения света возрастает до максимума (I_m) с последующим уменьшением к стационарному уровню ($I_{ст}$) (рис. 1). Присутствие токсиканта (гербицид-прометрин) приводит к уменьшению амплитуды индукционного максимума и уменьшению отношения амплитуды свечения в индукционном максимуме к стационарному уровню. Сильнодействующие агенты могут вызывать ингибирование всего свечения по всей индукционной кривой. Изменения этих параметров ЗФ по сравнению с контрольным вариантом без токсиканта более чем на 25% свидетельствует о фитотоксическом действии исследуемого вещества или наличии фитотоксического агента в сточной воде.

Наиболее чувствительны водоросли были к действию солей тяжелых металлов, гербицидов, оловоорганических соединений. Как показали результаты пробит-анализа, токсичность веществ указанных групп для водорослей возрастала в следующей последовательности: цинк < свинец < медь < ТПОХ < кадмий < хром < ДСМУ < ртуть. Экспериментально установленные максимальные концентрации веществ, не оказывавшие достоверного действия как на интенсивную культуру хлореллы (по ЗФ) в суточных опытах, так и на стандартную культуру хлореллы в хронических опытах продолжительностью 10-25 суток, показали близкое соответствие результатов.

В литературе с использованием миллисекундной ЗФ также продемонстрированы ранние эффекты токсического действия цинка, кобальта, кадмия, связанные со снижением энергизации тилакоидных мембран клеток водоросли [12-15]. Существует работы по использованию разных параметров ЗФ для оценки действия на водоросли различных токсикантов и гербицидов [16,17]. При исследовании действия различных фенолов на

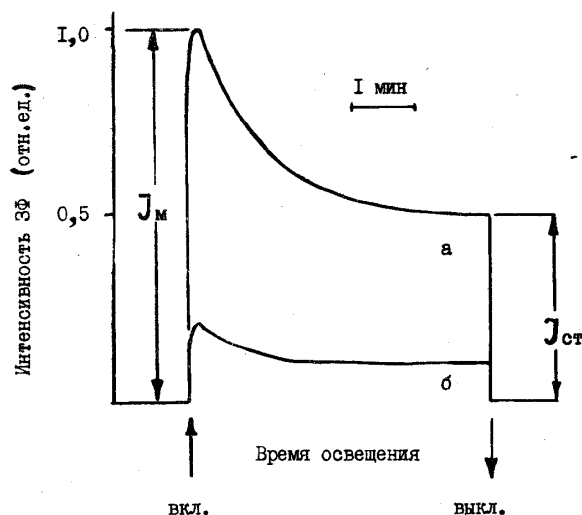


Рисунок 1. Влияние гербицида прометрина на индукционную кривую замедленной флуоресценции клеток хлореллы: а – контроль, б – в присутствии 10^{-7} М прометрина. Стрелками вверх и вниз обозначены моменты включения и выключения света, соответственно.

фотосинтетическую активность водоросли *Chlorella pyrenoidosa* также показано преимущество метода ЗФ, связанное с более ранним выявлением токсического воздействия по сравнению с параметрами быстрой флуоресценции [13]. Современные приборы (например, М-РЕА-2) позволяют проводить наряду с ЗФ одновременную регистрацию индукции быстрой флуоресценции и изменения активности ФС1 по P_{700} . Это позволяет получить информацию о конкретных местах воздействий токсиканта на реакции фотосинтеза.

Показано, что замедленную флуоресценцию можно использовать в стандартном биотесте на токсичность. Метод миллисекундной ЗФ введен в сертифицированную методику по определению острой токсичности различных вод и отходов [18]. Методика основана на измерении изменений относительного показателя ЗФ хлорофилла тест-культуры хлореллы. Применимость измерения долгоживущих компонент послесвечения ЗФ со временем затухания 0,2 секунды и дольше для биотестирования на токсичность была продемонстрирована в работе [6].

Полученные результаты токсикологических исследований указывают на возможность использования характеристик замедленной флуоресценции в интенсивной культуре микроводорослей для экспрессного обнаружения в водной среде фитотоксических веществ в концентрациях, токсичность которых подтверждается хроническими опытами на аналогичных тест-объектах по стандартной методике.

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды», российского научного фонда (проект № 20-64-46018) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00465).

Список литературы / References:

1. Strehler B.L., Arnold W. Light production by green plants. *J. Gen. Phys.*, 1951, vol. 34, pp. 809-820.
2. Govindjee Jursinic P.A. Photosynthesis and fast changes in light emission by green plants. In *Photochemical and Photobiological Reviews*. (Edited by K. C. Smith). *Plenum Press.*, New York, 1979, vol. 4, pp. 125-205.
3. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J., Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 101, pp. 217-232.
4. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. Замедленная флуоресценция и ее использование для оценки состояния растительного организма. *Изд. АН СССР. Сер. биол.*, 1985, № 4, с. 508-520. [Matorin D.N., Venediktov P.S. Rubin A.B. Delayed fluorescence and its use to assess the state of the plant organism. *Izd. AN SSSR, ser. biol.*, 1985, no. 4, pp. 508-520. (In Russ.)]
5. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. *Замедленная флуоресценция растений и водорослей. Теоретические и практические аспекты.* М.: Изд-во Альтрекс, 2011, 202 с. [Matorin D.N., Osipov V.A., Venediktov P.S., Rubin A.B. *Delayed fluorescence of plants and algae. Theoretical and practical aspects.* М.: Izd-vo Al'treks, 2011, 202 p. (In Russ.)]
6. Berden-Zrimec M., Drinovec L., Zrimec A.M., Suggett D.J. et al. Delayed Fluorescence. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. *Developments in applied/Phycology 4, Springer Science*, 2011, pp. 293-309.
7. Krasnovsky A.A. Delayed fluorescence and phosphorescence of plant pigments. *Photochem. Photobiol.*, 1982, vol. 36, pp. 773-774.
8. Маторин Д.Н., Яковлева О.В. *Фотолюминесценция растений.* М.: Изд-во Альтрекс, 2019, 256 с. [Matorin D.N., Yakovleva O.V. *Plant photoluminescence.* М. Izd-vo Al'treks, 2019, 256 p. (In Russ.)]

9. Goltsev V.N., Ortoidez T.V., Sokolov J.N., Matorin D.N., Venediktov P.S. Delayed luminescence yield kinetics in flash illuminated green plants. *Plant Sci. Lett.*, 1980, vol. 19, pp. 339-346.
10. Crofts A.R., Wright C.A., Fleischmann D.E. Energy conservation in the photochemical reactions of photosynthesis and its relation to delayed fluorescence. *FEBS Lett.*, 1971, vol. 15, no. 1, pp. 89-100.
11. Ortoidez T.V., Borisevitch G.P., Venediktov P.S., Kononenko A.A., Matorin D.N., Rubin A.B. Electric field stimulation of the delayed fluorescence in dry films of chloroplasts and subchloroplast particles enriched in PS2. *Biochim. Physiol. Pflanzen*, 1979, vol. 174, no. 1, pp. 85-91.
12. Matorin D.N., Todorenko D.A., Seifullina N.Kh., Zayadan B.K., Rubin A.B. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology*, 2013, vol. 82, no. 6, pp. 862-867.
13. Matorin D.N., Plekhanov S.E., Bratkovskaia L.B., Iakovleva O.V., Alekseev A.A. The effect of phenols on the parameters of chlorophyll fluorescence and reaction of P700 in the green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Biofizika*, 2014, vol. 59, no. 3, pp. 458-465.
14. Gabbasova D.T., Matorin D.N., Konyukhov I.V., Seifullina N.Kh., Zayadan B.K. Effect of chromate ions on marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology*, 2017, vol. 86, no. 1, pp. 54-62.
15. Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Matorin D.N., Akmukhanova N.R., Kokocinski M., Timofeev N.P., Balouch Kh., Bauenova M.O. Effect of Cadmium Ions on Some Biophysical Parameters and Ultrastructure of *Ankistrodesmus* sp. B-11 Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2020, vol. 67, no. 5, pp. 845-854.
16. Vasil'ev I.R., Matorin D.N., Lyadsky V.V., Venediktov P.S. Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence. *Photosynth. Res.*, 1988, vol. 15, no. 1, pp. 33-39.
17. Dahse J., Matorin D.N., Liebermann B. A comparison of tentoxin action on the delayed fluorescence chloroplasts of Spinach, *Chlorella* and *Anasystis*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1986, vol. 181, pp. 137-146.
18. Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С. Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. ПНД Ф Т 14.1:2.4.16-09 ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.14-09, 2014, 37 с. [Grigoriev Yu.S., Stravinskene E.S. Method for measuring the relative indicator of delayed fluorescence of a *Chlorella vulgaris* Beijer) culture for determining the toxicity of drinking, fresh natural and waste waters, water extracts from soils, soils, sewage sludge, production and consumption waste. PND F T 14.1:2.4.16-09 PND F T 16.1:2.3:3.14-09, 2014, 37 p. (In Russ.)]

PROSPECTS FOR USING DELAYED FLUORESCENCE OF ALGAE FOR CONTAMINATION BIOTESTING

Matorin D.N.¹, Yakovleva O.V.¹, Todorenko D.A.¹, Goryachev S.N.¹, Alekseev A.A.²

¹Moscow State University, Faculty of Biology,

Leninskie Gory St. 1, p. 12, Moscow, 119991, Russia

²North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov,

58 Belinsky Street, Yakutsk, 677027, Republic of Sakha (Yakutia), Russia; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0525

Abstract. The nature of the delayed chlorophyll fluorescence (DF) in algae, which occurs already after the cessation of illumination due to the energy released during the reverse reactions of the primary photosynthesis photoproducts in the reaction center of the photosystem 2, is considered. The use of this fluorescence in algae for biotesting of contaminants is shown to be promising. The advantages of using DF for express assessment of water toxicity, especially drinking water, are short durations of tests and, accordingly, the minimized negative impact of physicochemical changes in the medium on the results, as well as the need of small amounts of test objects. The other advantage of DF is that only living cells with active photosynthetic reaction sites are measured, which increases the sensitivity of toxicity tests. This method provides additional information about the most important process in the cell - the energization of photosynthetic membranes and the formation of ATP associated with this.

Key words: *photosynthesis, delayed fluorescence, biotesting, microalgae.*

**ВЛИЯНИЕ $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ
CHLORELLA VULGARIS ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ
СРЕДЕ ИСТОЧНИКА АЗОТА – KNO_3**

Ильючик И.А., Захаревич Л.О., Никандров В.Н.

Полесский государственный университет

ул. Днепровской флотилии, 23, г. Пинск, 225710, Республика Беларусь; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0526

Аннотация. Изучено влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10^{-2} – 10^{-8} М на урожай биомассы, концентрацию внутриклеточного белка, хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов в культуре *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE С-19. В отдельных сериях экспериментов концентрация источника азота – KNO_3 была увеличена на 10 и 20%. Хром (III) оказал неоднозначное влияние на функционально-метаболическое состояние культуры хлореллы в зависимости от его концентрации и концентрации источника азота – KNO_3 . В целом, при концентрации KNO_3 5,0 г/л в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-6} М сульфат хрома угнетал развитие культуры водоросли, а в максимальной его концентрации вызвал быструю гибель. В начальный период культивирования резко возрастал уровень хлорофиллов *a* и *b*, что, по-видимому, носило компенсаторно-приспособительный характер. Со стороны биомассы, уровня внутриклеточного белка, хлорофиллов не выявлено динамики колебательного характера, присущей контрольному варианту питательной среды. Увеличение концентрации KNO_3 до 5,5 г/л при концентрации $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 10^{-4} – 10^{-8} М сопровождалось не только приростом биомассы, но и заметным (17–74%) увеличением уровня внутриклеточного белка, снижением «напряженности» фотосинтетического аппарата (судя по уровню пигментов) и восстановлением колебательной динамики фотосинтетических пигментов. Дальнейшее увеличение концентрации нитрата калия не дало положительного результата и вело к усугублению функционально-метаболического состояния культуры хлореллы. Возможно, катион Cr^{3+} , в определенных условиях способствует мобилизации азотистого питания клеток водоросли, усилению биосинтеза белка. Полученные материалы создают основу для дальнейших исследований о путях влияния Cr^{3+} на обмен белков, а также для оптимизации состава питательных сред в целях обогащения клеток хлореллы белком.

Ключевые слова: культура хлореллы, сульфат хрома (III), нитрат калия, биомасса, внутриклеточный белок, хлорофиллы, каротиноиды.

В настоящее время в мировом масштабе достаточно остро стоит проблема поиска альтернативных источников белка [1,2]. К ним относят и одноклеточные водоросли, в том числе хлореллу (*Chlorella*). Более чем в 60 странах мира, в том числе США, Мексике, Таиланде, Индии, Китае, Японии, Канаде, Австралии биомассу водорослей производят в промышленных масштабах свыше тысячи тонн в год [3].

Для роста *Chlorella vulgaris* необходимы углерод, азот, фосфор, сера и металлы. Концентрация азота в питательной среде играет важную роль в регулировании роста и метаболизма водорослей. В клетках хлореллы содержание азота достигает 7–10%. Предполагают, что это связано с особенностями ее фотосинтеза. На долю общего хлорофилла приходится 1–2% от сухой биомассы хлореллы [4]. *Chlorella* способна улавливать более 70% солнечного света, причем только до 10% солнечной энергии использует для наработки биомассы [5], эффективность ее фотосинтеза очень высокая [6].

Белок хлореллы по качеству не уступает известным растительным белкам, так как содержит все аминокислоты [7]. По качеству продуцируемых белка и витаминов *Ch. vulgaris* превосходит все известные кормовые и пищевые продукты. Пищевая ценность белка микроводоросли в 2 раза превышает ценность соевого белка: 1 кг хлореллы эквивалентен 4–5 кг сои. В зависимости от условий культивирования в клетках хлореллы меняется соотношение белка, углеводов, липидов и минеральных веществ [8]. Это создает условия для разработки подходов к направленному изменению ее метаболизма.

Кроме того, одноклеточные водоросли участвуют в биологической очистке вод естественных водоемов. Все это вызывает необходимость исследования влияния на культуру хлореллы ряда микроэлементов, которые при превышении определенной концентрации оказывают и токсическое действие. Таковым, в частности, является хром (III).

Суточная потребность в хrome организма взрослого человека составляет 50–200 мкг [9]. Он способен повышать активность инсулина и усвоения глюкозы [10].

Прямых доказательств необходимости хрома для растений нет, тем не менее, он постоянно присутствует в их тканях в небольшом количестве. Известно, что этот элемент неспецифически активизирует отдельные ферменты, в низких концентрациях повышают содержание хлорофилла в листьях и общую продуктивность фотосинтеза, а в высоких – существенно ингибирует все ростовые процессы растений, способствует возникновению хлорозов и некрозов [11].

Цель работы. Раскрыть влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на физиолого-биохимическое состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris*, а также его эффект при различной концентрации нитрата калия в питательной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на альгологически чистой культуре *Ch. vulgaris* биологического штамма С 111 ИВСЕ С-19 из коллекции ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Хлореллу выращивали на питательной среде Тамия (концентрация KNO_3 – 5 г/л) [12], не содержащей ЭДТА, при рН среды 7,0. В экспериментальные варианты питательных сред добавляли сульфат хрома (III) в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-8} М. В двух других экспериментальных вариантах концентрация KNO_3 составляла 5,5 и 6,0 г/л.

Ch. vulgaris культивировали в прозрачных стеклянных емкостях объемом 250 мл при температуре 25 ± 1 °С при регулярном перемешивании, освещенности на поверхности сосуда – 5000 лК и продолжительности световых и темновых фаз – 12/12 часов в течение 21 суток. Посевная доза культуры составляла $3,46 \pm 0,06$ млн/мл клеток, предварительно отмытых дистиллированной водой от предыдущей питательной среды.

Каждые вторые сутки культивирования отбирали аликвоты культуры по $10 \pm 0,19$ млн клеток, определяли концентрацию внутриклеточного белка и фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) как подробно описано [12]. Количество клеток хлореллы учитывали с помощью камеры Горяева. Оптическую плотность растворов определяли спектрофотометрически. Концентрацию хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов рассчитывали по формулам Н.К. Lichtenthaler после экстракции пигментов 100%-ным ацетоном [13]. Все операции при гомогенизировании и спектрофотометрировании выполняли в затемненном помещении.

Исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для уровня значимости $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части исследований в среду Тамия добавляли сульфат хрома (III) в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-6} М.

Динамика исследуемых показателей контроля имела достаточно нелинейный характер, отражающий функционально-метаболические перестройки клеток водоросли в культуре, как мы уже отмечали в предыдущих статьях [14,15]. В максимальной концентрации сульфат хрома вызвал через 3 суток гибель культуры (табл. 1, рис. 1*a*).

В целом, в использованных концентрациях $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ угнетал рост культуры водоросли. Заметно снижался и уровень внутриклеточного белка, а в отдельные периоды – хлорофиллов *a* и *b*: на 23–69; 21–54 и 25–80% соответственно (табл. 2–4, рис. 1*b*–*z*). Вместе с тем, при уменьшении концентрации эффектора до 10^{-5} М через 11–17 сутки урожай биомассы возрастал на 12–19%, а при концентрации $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 10^{-6} М через 5 суток концентрация внутриклеточного белка в сравнении с контролем возросла на 69%. В начальный же период роста культуры (1–5 суток) резко – в 1,4–6,9 раз увеличился уровень хлорофиллов *a* и *b* (табл. 2–4). В 1-е сутки роста, это отмечено даже при максимальной концентрации $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$: в 2,0 и 3,4 раз. Со стороны данных показателей в этой части эксперимента выраженный колебательный характер динамики отсутствовал.

В отдельных случаях уровень хлорофиллов возрастал и в конечный период (через 19–21 сутки) культивирования хлореллы – в 1,2–2,7 раз. Возможно, эти сдвиги отражают компенсаторно-адаптивные реакции клеток хлореллы. Сдвиги уровня каротиноидов в клетках водоросли носили сложный колебательный характер от снижения на 25–85% до роста в 1,2–2,1 раза (табл. 5). Здесь стоит упомянуть, что, в частности β-каротины являются специфичными и эффективными перехватчиками синглетного кислорода. При воздействии хрома нельзя исключить развитие окислительного стресса. Однако в литературе мы не обнаружили какие-либо данные об инициации хромом (III) окислительного стресса в клетках различных растений.

Таблица 1. Динамика биомассы хлореллы (млн клеток/мл) при добавлении сульфата хрома (III) в питательную среду (*n* = 9)

Сутки	Контроль, без $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М				
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	$4,21 \pm 0,06$	$3,66 \pm 0,09^*$	$3,08 \pm 0,06^*$	$3,04 \pm 0,06^*$	$4,13 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,06^*$
3	$4,78 \pm 0,03$	гибель	$4,13 \pm 0,07^*$	$3,38 \pm 0,04^*$	$4,73 \pm 0,03$	$4,41 \pm 0,02$
5	$6,54 \pm 0,04$	–	$4,72 \pm 0,11^*$	$3,61 \pm 0,02^*$	$4,98 \pm 0,04^*$	$5,22 \pm 0,07^*$
7	$7,81 \pm 0,05$	–	$5,39 \pm 0,02^*$	$4,30 \pm 0,03^*$	$5,00 \pm 0,06^*$	$10,77 \pm 0,18^*$
9	$8,25 \pm 0,08$	–	$6,03 \pm 0,04^*$	$5,09 \pm 0,08^*$	$7,40 \pm 0,06$	$9,01 \pm 0,06$
11	$9,20 \pm 0,08$	–	$5,43 \pm 0,07^*$	$6,47 \pm 0,08^*$	$10,34 \pm 0,07^*$	$8,12 \pm 0,07$
13	$11,00 \pm 0,07$	–	$5,62 \pm 0,05^*$	$8,59 \pm 0,06^*$	$13,10 \pm 0,06^*$	$9,76 \pm 0,09$
15	$10,81 \pm 0,02$	–	$6,53 \pm 0,07^*$	$8,95 \pm 0,03^*$	$12,47 \pm 0,05^*$	$9,94 \pm 0,06$
17	$10,00 \pm 0,07$	–	$7,86 \pm 0,04^*$	$10,24 \pm 0,05$	$11,91 \pm 0,05$	$10,02 \pm 0,09$
19	$16,14 \pm 0,09$	–	$9,53 \pm 0,07^*$	$11,67 \pm 0,04^*$	$12,56 \pm 0,03^*$	$10,54 \pm 0,06^*$
21	$18,05 \pm 0,03$	–	$8,59 \pm 0,02^*$	$7,87 \pm 0,04^*$	$8,82 \pm 0,05^*$	$9,52 \pm 0,02^*$

Примечание: * – здесь и далее статистически достоверные ($P \leq 0,05$) изменения по отношению к контролю

Таблица 2. Сдвиги уровня внутриклеточного белка (мкг/мл млн клеток) хлореллы при добавлении в питательную среду сульфата хрома (III) (n = 9)

Сутки	Контроль, без Cr ₂ (SO ₄) ₃	Концентрация Cr ₂ (SO ₄) ₃ , М				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	19,15 ± 0,05	14,55 ± 0,02*	16,14 ± 0,04*	14,75 ± 0,09*	17,23 ± 0,06	18,33 ± 0,10
3	21,31 ± 0,07	гибель	18,43 ± 0,07*	19,48 ± 0,04	23,50 ± 0,04	21,54 ± 0,04
5	32,54 ± 0,04	–	20,72 ± 0,09*	25,12 ± 0,03*	30,18 ± 0,04	55,12 ± 0,05*
7	57,61 ± 0,05	–	25,60 ± 0,09*	28,30 ± 0,02*	42,45 ± 0,05*	62,27 ± 0,05
9	59,85 ± 0,09	–	28,23 ± 0,05*	35,05 ± 0,09*	39,66 ± 0,07*	58,08 ± 0,06
11	63,20 ± 0,03	–	31,51 ± 0,10*	47,17 ± 0,03*	50,30 ± 0,12*	47,75 ± 0,12*
13	79,44 ± 0,10	–	24,86 ± 0,04*	54,29 ± 0,05*	68,82 ± 0,03*	59,76 ± 0,09*
15	68,21 ± 0,04	–	30,30 ± 0,07*	59,55 ± 0,05*	60,17 ± 0,05	58,94 ± 0,07*
17	70,38 ± 0,08	–	42,07 ± 0,06*	60,20 ± 0,10*	59,71 ± 0,06*	57,02 ± 0,08*
19	80,66 ± 0,09	–	50,77 ± 0,12*	64,67 ± 0,07*	66,13 ± 0,08*	58,54 ± 0,03*
21	89,23 ± 0,11	–	40,09 ± 0,08*	52,80 ± 0,08*	53,91 ± 0,07*	54,06 ± 0,02*

Таблица 3. Изменения содержания хлорофилла *a* (мкг/мл млн клеток) в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду сульфата хрома (III) (n = 9)

Сутки	Контроль, без Cr ₂ (SO ₄) ₃	Концентрация Cr ₂ (SO ₄) ₃ , М				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	2,34 ± 0,09	7,94 ± 0,08*	16,10 ± 0,06*	7,49 ± 0,07*	15,82 ± 0,10*	14,15 ± 0,07*
3	2,60 ± 0,06	гибель	16,33 ± 0,11*	10,22 ± 0,15*	17,77 ± 0,07*	14,16 ± 0,10*
5	7,49 ± 0,08	–	10,62 ± 0,05*	19,34 ± 0,11*	15,05 ± 0,19*	7,06 ± 0,10
7	16,81 ± 0,17	–	11,22 ± 0,05*	11,27 ± 0,11*	19,80 ± 0,12*	7,77 ± 0,05*
9	14,76 ± 0,11	–	8,18 ± 0,09*	9,73 ± 0,06*	9,40 ± 0,06*	7,56 ± 0,12*
11	13,46 ± 0,09	–	7,37 ± 0,07*	6,07 ± 0,09*	5,00 ± 0,05*	6,23 ± 0,08*
13	7,25 ± 0,06	–	9,66 ± 0,08*	5,06 ± 0,10*	4,50 ± 0,09*	6,53 ± 0,08
15	8,25 ± 0,12	–	7,15 ± 0,08*	6,07 ± 0,08*	4,50 ± 0,12*	6,03 ± 0,07*
17	8,78 ± 0,09	–	6,90 ± 0,13*	6,41 ± 0,80*	4,10 ± 0,05*	4,21 ± 0,13*
19	7,03 ± 0,08	–	6,94 ± 0,14	14,98 ± 0,09*	5,57 ± 0,08*	14,15 ± 0,07*
21	7,61 ± 0,06	–	9,42 ± 0,09*	12,08 ± 0,14*	7,26 ± 0,11	14,16 ± 0,10*

Таблица 4. Изменения содержания хлорофилла *b* (мкг/мл млн клеток) в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду сульфата хрома (III) (n = 9)

Сутки	Контроль, без Cr ₂ (SO ₄) ₃	Концентрация Cr ₂ (SO ₄) ₃ , М				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	4,33 ± 0,10	8,84 ± 0,12*	27,02 ± 0,11*	16,42 ± 0,06*	25,56 ± 0,16*	20,67 ± 0,12*
3	4,78 ± 0,09	гибель	27,30 ± 0,06*	18,15 ± 0,08*	30,10 ± 0,09*	24,02 ± 0,16*
5	12,98 ± 0,09	–	13,35 ± 0,09	32,47 ± 0,08*	19,17 ± 0,05*	5,76 ± 0,09*
7	23,72 ± 0,06	–	17,91 ± 0,07*	13,03 ± 0,15*	32,33 ± 0,06*	10,38 ± 0,07*
9	20,78 ± 0,05	–	10,85 ± 0,08*	7,76 ± 0,13*	13,78 ± 0,08*	5,01 ± 0,11*
11	18,66 ± 0,09	–	6,57 ± 0,04*	5,39 ± 0,04*	5,42 ± 0,12*	5,96 ± 0,10*
13	7,49 ± 0,14	–	10,39 ± 0,05*	4,66 ± 0,12*	4,68 ± 0,10*	6,63 ± 0,06
15	8,46 ± 0,11	–	10,54 ± 0,13*	5,80 ± 0,07*	3,65 ± 0,08*	4,61 ± 0,05*
17	9,51 ± 0,07	–	5,90 ± 0,09*	6,84 ± 0,08*	3,26 ± 0,07*	3,67 ± 0,13*
19	8,57 ± 0,07	–	7,94 ± 0,13	22,75 ± 0,07*	6,15 ± 0,11*	5,94 ± 0,12*
21	9,45 ± 0,18	–	12,48 ± 0,10*	17,33 ± 0,06*	7,63 ± 0,05*	8,92 ± 0,08

Более того, на макрофагоподобных клетках линии U937 было показано, что воздействие Cr⁺³ не изменяло экспрессию Mn-супероксиддисмутазы, Cu, Zn-супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и гемин-оксидазы [16]. Это свидетельствует, во всяком случае, об отсутствии реакции клеток на возможный окислительный стресс. О развитии последнего при действии Cr⁺³ на золотых рыбок и снижении активности каталазы и глутатион-S-трансферазы в жабрах, почках и печени на 20–29% сообщали [17]. Активность глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при этом не изменялась. Однако, разумеется, нельзя проводить какую-либо аналогию этих объектов с одноклеточной зеленой фотосинтезирующей водорослью.

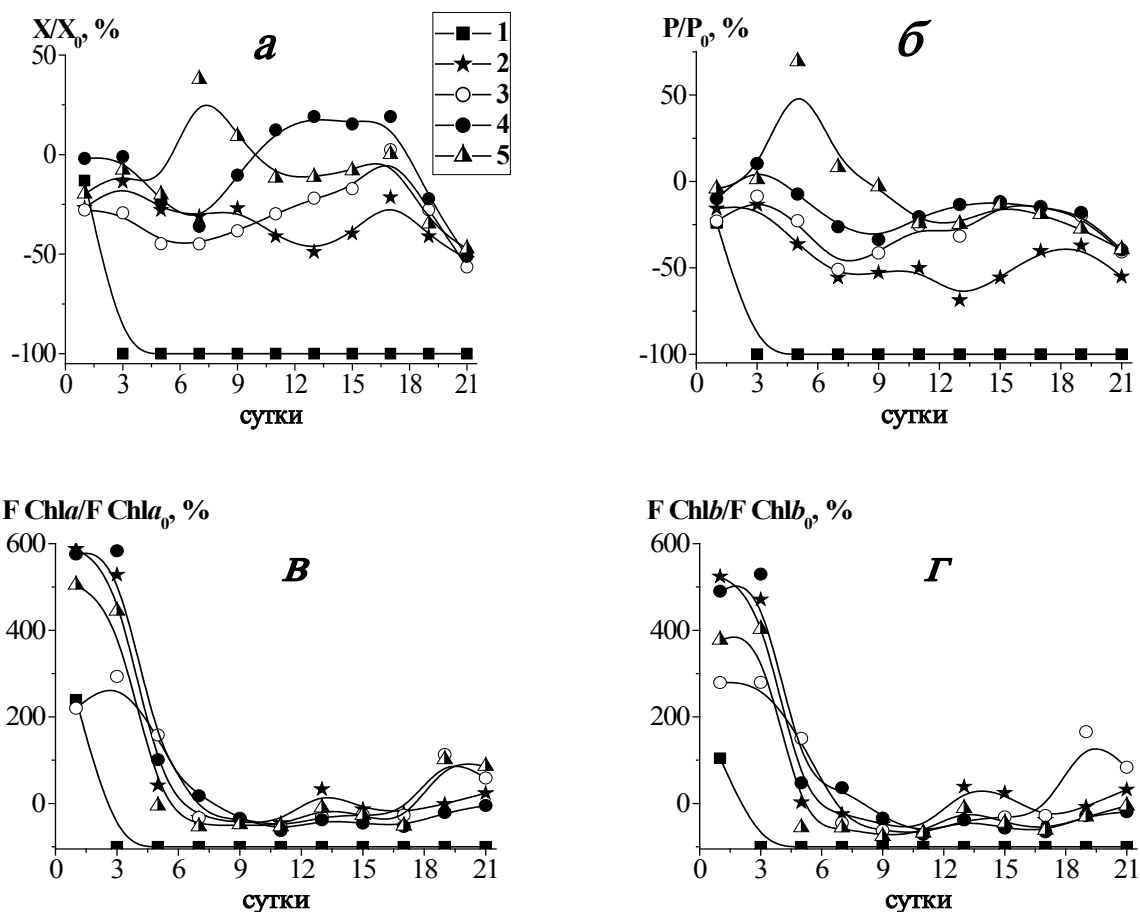


Рисунок 1. Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (а), внутриклеточного белка (б), хлорофиллов а (Chl а) (в) и б (Chl б) (г) в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10^{-2} (1), 10^{-3} (2), 10^{-4} (3), 10^{-5} (4), 10^{-6} (5) М

Учитывая полученные факты, во второй части экспериментов кроме оригинальной среды Тамийя использовали ее варианты с содержанием нитрата калия 5,5 и 6,0 г/л, в которые вносили сульфат хрома (III) в концентрациях 10^{-4} – 10^{-8} М.

Увеличение в питательной среде уровня KNO_3 на 10 или 20% в сравнении с оригинальной средой, даже после добавление $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10^{-4} – 10^{-6} М, сопровождалось менее «фатальными» сдвигами в динамике роста биомассы хлореллы (табл. 6, рис. 2а и 3а).

Более того, в отдельные периоды роста культуры при концентрации KNO_3 5,5 г/л и соли хрома 10^{-8} М урожай биомассы увеличился на 15–23%. Наряду с этим, выявлен рост уровня внутриклеточного белка культуры хлореллы при добавлении 10^{-4} – 10^{-6} М $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в 1–3 сутки культивирования на 20–48%. В последующем, до 19 суток увеличение его уровня на 17–74% отмечено при концентрации Cr^{3+} 10^{-7} – 10^{-8} М (табл. 7, рис. 2б). И даже в

Таблица 5. Изменения содержания каротиноидов (мкг/мл млн клеток) в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду сульфата хрома (III) (n = 9)

Сутки	Контроль, без $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М				
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	$0,70 \pm 0,09$	$1,50 \pm 0,07^*$	$0,30 \pm 0,07^*$	$0,35 \pm 0,10^*$	$0,37 \pm 0,08^*$	$0,84 \pm 0,10^*$
3	$0,85 \pm 0,09$	гибель	$0,17 \pm 0,07^*$	$0,30 \pm 0,12^*$	$0,12 \pm 0,04^*$	$1,06 \pm 0,09^*$
5	$0,98 \pm 0,05$	—	$1,90 \pm 0,09^*$	$0,45 \pm 0,07^*$	$2,04 \pm 0,09^*$	$1,86 \pm 0,12^*$
7	$1,84 \pm 0,05$	—	$0,28 \pm 0,12^*$	$2,01 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,12^*$	$1,08 \pm 0,06^*$
9	$1,84 \pm 0,07$	—	$1,30 \pm 0,13^*$	$2,87 \pm 0,06^*$	$1,77 \pm 0,13$	$2,44 \pm 0,05^*$
11	$1,42 \pm 0,08$	—	$1,98 \pm 0,08^*$	$1,65 \pm 0,12^*$	$0,99 \pm 0,07^*$	$1,38 \pm 0,17$
13	$1,49 \pm 0,12$	—	$2,28 \pm 0,06^*$	$1,37 \pm 0,09$	$1,03 \pm 0,06^*$	$1,43 \pm 0,09$
15	$1,99 \pm 0,10$	—	$1,23 \pm 0,06^*$	$1,44 \pm 0,08^*$	$1,21 \pm 0,10^*$	$1,55 \pm 0,09^*$
17	$1,91 \pm 0,07$	—	$2,01 \pm 0,15$	$1,39 \pm 0,10^*$	$1,25 \pm 0,17^*$	$1,19 \pm 0,07^*$
19	$1,13 \pm 0,06$	—	$1,49 \pm 0,09^*$	$1,25 \pm 0,11$	$1,21 \pm 0,08$	$1,37 \pm 0,11^*$
21	$1,35 \pm 0,08$	—	$1,67 \pm 0,10^*$	$1,68 \pm 0,15^*$	$1,79 \pm 0,09^*$	$1,95 \pm 0,05^*$

конце эксперимента на питательных средах этого варианта уровень белка принципиально не отличался от контрольного варианта.

Динамика содержания фотосинтетических пигментов носила колебательный характер. Однако сдвиги его были менее резкими, чем в упомянутые выше для концентрации эффектора 10^{-2} – 10^{-6} М и уровня нитрата калия 5,0 г/л (рис. 8, 9, рис. 2а, 2г). Для обоих пигментов при двух минимальных концентрациях $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ отмечен рост уровня в период 1–3 сутки в 1,5–2,3 раза. Содержание каротиноидов, в целом снижалось, и лишь через 9 суток культивирования при всех концентрациях соли хрома возрастало на 33–67% (табл. 10).

При увеличении концентрации в питательной среде нитрата калия до 6,0 г/л картина несколько менялась. В этой серии экспериментов не выявлено практически ни одного случая прироста биомассы в сравнении с контролем (табл. 6, рис. 3а).

При этом на протяжении 17 суток уровень внутриклеточного белка при всех концентрациях $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ либо не отличался от контроля, либо превосходил его на 18–86% (табл. 7, рис. 3б).

Динамика изменений хлорофиллов *a* и *b* имела более выраженный колебательный характер, чем в предыдущей серии экспериментов, и более резкое увеличение их содержания в 1–9 сутки: в 1,2–2,6 раза по сравнению с контролем (табл. 8, 9, рис. 3в, 3г).

Содержание каротиноидов в клетках хлореллы на питательных средах этой серии снижалось на 12–53% при всех концентрациях соли хрома, и лишь при ее концентрации 10^{-6} – 10^{-7} М в 1–3 сутки роста культуры водоросли увеличилось на 14–22% (табл. 10).

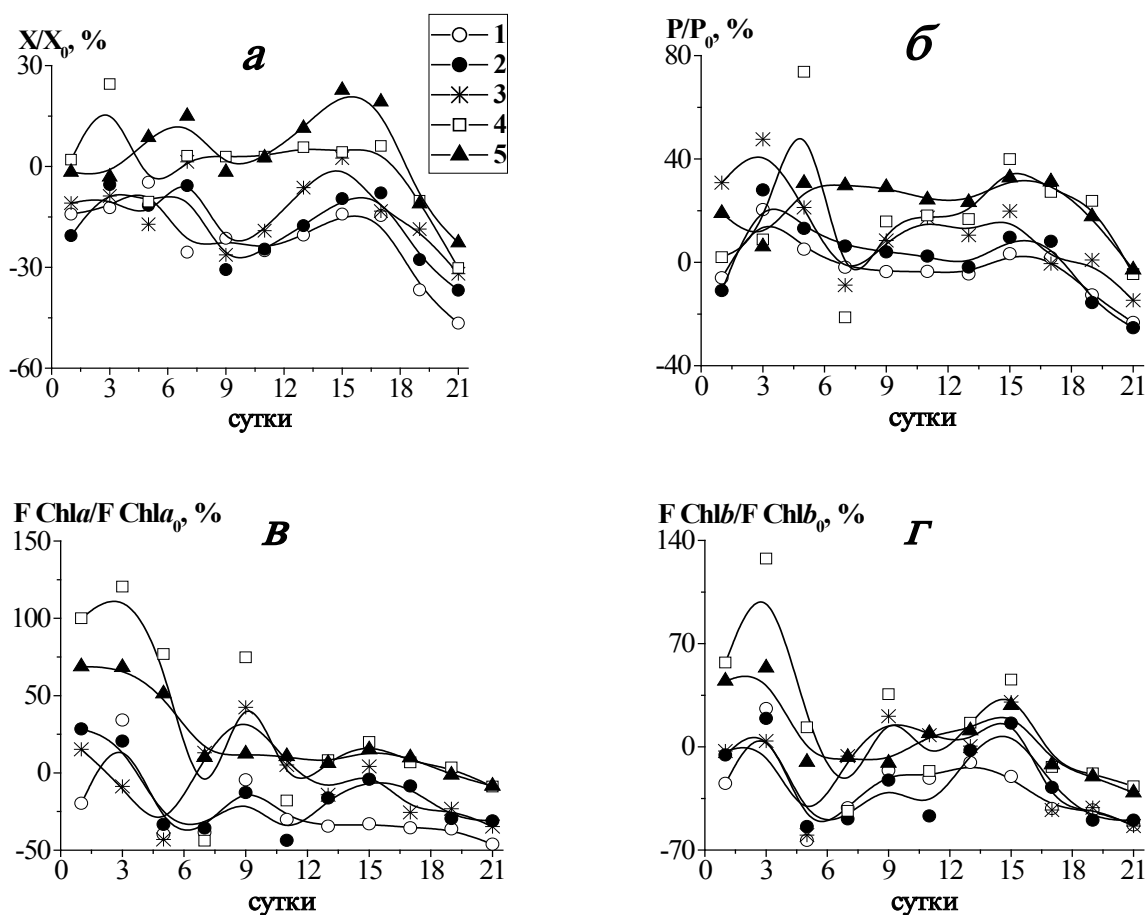


Рисунок 2. Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (а), внутриклеточного белка (б), хлорофиллов *a* (Chl *a*) (в) и *b* (Chl *b*) (г) в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М: 1 – 10^{-4} ; 2 – 10^{-5} ; 3 – 10^{-6} ; 4 – 10^{-7} ; 5 – 10^{-8} в присутствии KNO_3 концентрацией 5,5 г/л

Таблица 6. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на динамику биомассы *Chlorella vulgaris* (млн клеток/мл) при различном содержании в питательной среде нитрата калия ($n = 9$)

Сутки	Контроль, 5,0 г/л KNO_3	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М									
		концентрация $\text{KNO}_3 - 5,5$ г/л					концентрация $\text{KNO}_3 - 6,0$ г/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	4,02±0,07	3,45 ±0,08*	3,19 ±0,03*	3,58 ±0,03	4,10 ±0,09	3,95 ±0,13	3,20 ±0,03*	3,53 ±0,12*	3,17 ±0,12*	4,08 ±0,02	3,31 ±0,07*
3	3,51±0,07	3,08 ±0,12*	3,32 ±0,06	3,20 ±0,08	4,37 ±0,04*	3,40 ±0,06	2,74 ±0,02*	3,02 ±0,07*	3,41 ±0,10	3,90 ±0,04	3,73 ±0,06
5	4,30±0,11	4,10 ±0,07	3,80 ±0,08	3,56 ±0,11*	3,85 ±0,03	4,67 ±0,05	3,15 ±0,05*	3,31 ±0,08*	3,21 ±0,10*	4,41 ±0,10	4,53 ±0,08
7	5,05±0,05	3,76 ±0,09*	4,76 ±0,05	5,12 ±0,05	5,21 ±0,08	5,81 ±0,08*	4,06 ±0,10*	4,11 ±0,03*	4,52 ±0,04	5,10 ±0,12	5,92 ±0,10*
9	6,51±0,04	5,12 ±0,04*	4,51 ±0,04*	4,80 ±0,12*	6,70 ±0,09	6,4 ±0,09	4,62 ±0,04*	5,03 ±0,09*	5,05 ±0,07*	4,83 ±0,04*	5,08 ±0,08*
11	7,82±0,06	5,86 ±0,04*	5,9 ±0,10*	6,33 ±0,09*	8,05 ±0,11	8,02 ±0,04	5,31 ±0,04*	5,27 ±0,10*	6,27 ±0,08*	5,46 ±0,05*	6,50 ±0,03*
13	8,19±0,03	6,52 ±0,05*	6,75 ±0,12*	7,67 ±0,06	8,66 ±0,10	9,12 ±0,05	6,09 ±0,11*	6,44 ±0,03*	7,14 ±0,10*	6,69 ±0,06*	7,01 ±0,09*
15	7,90±0,08	6,78 ±0,06*	7,14 ±0,09	8,10 ±0,09	8,24 ±0,05	9,69 ±0,12*	6,64 ±0,09*	7,25 ±0,05	7,03 ±0,08	6,54 ±0,09*	7,88 ±0,07
17	8,56±0,04	7,31 ±0,03*	7,88 ±0,06	7,42 ±0,11*	9,08 ±0,08	10,20 ±0,15*	6,30 ±0,07*	6,61 ±0,07*	7,95 ±0,03	7,82 ±0,04	6,95 ±0,06*
19	9,72±0,03	6,15 ±0,07*	7,03 ±0,12*	7,91 ±0,06*	8,73 ±0,09	8,64 ±0,08	5,78 ±0,05*	5,97 ±0,09*	7,34 ±0,07*	8,02 ±0,05*	6,70 ±0,08*
21	10,45±0,10	5,58 ±0,05*	6,60 ±0,08*	7,12 ±0,07*	7,29 ±0,07*	8,08 ±0,06*	5,13 ±0,10*	5,20 ±0,03*	6,21 ±0,11*	7,51 ±0,08*	6,23 ±0,12*

Таблица 7. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на изменения уровня внутриклеточного белка (мкг/мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде нитрата калия ($n = 9$)

Сутки	Контроль, 5,0 г/л KNO_3	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М									
		концентрация $\text{KNO}_3 - 5,5$ г/л					концентрация $\text{KNO}_3 - 6,0$ г/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	14,04±0,06	13,20 ±0,10	12,51 ±0,04	18,36 ±0,04*	14,32 ±0,08	16,71 ±0,10*	13,58 ±0,09	13,75 ±0,08	17,11 ±0,09*	14,52 ±0,03	13,44 ±0,12
3	12,21±0,04	14,70 ±0,09*	15,63 ±0,07*	18,02 ±0,08*	13,29 ±0,03	12,95 ±0,04	14,43 ±0,06*	13,06 ±0,03	18,92 ±0,04*	17,07 ±0,04*	14,62 ±0,04*
5	20,76±0,09	21,81 ±0,05	23,47 ±0,08*	25,17 ±0,09*	36,05 ±0,05*	27,12 ±0,07*	28,06 ±0,11*	26,25 ±0,07*	38,50 ±0,06*	29,19 ±0,09*	43,17 ±0,06*
7	31,08±0,03	30,48 ±0,07	33,04 ±0,04	28,33 ±0,05	24,47 ±0,09*	40,30 ±0,03*	40,59 ±0,03*	55,76 ±0,11*	31,11 ±0,03	40,59 ±0,07*	33,09 ±0,05
9	44,25±0,05	42,67 ±0,04	46,02 ±0,06	48,01 ±0,07	51,23 ±0,06*	57,10 ±0,05*	59,13 ±0,07*	37,03 ±0,04*	58,04 ±0,08*	53,12 ±0,08*	56,77 ±0,03*
11	50,90±0,07	49,11 ±0,05	52,11 ±0,03	59,72 ±0,03*	60,10 ±0,09*	63,22 ±0,09*	53,01 ±0,06	61,14 ±0,06*	67,10 ±0,07*	68,33 ±0,05*	70,06 ±0,04*
13	56,78±0,03	54,25 ±0,04	55,78 ±0,05	62,74 ±0,10	66,24 ±0,05*	69,93 ±0,05*	57,44 ±0,04	60,73 ±0,03	60,45 ±0,05	59,94 ±0,03	63,10 ±0,09
15	54,11±0,05	55,90 ±0,07	59,36 ±0,11	64,84 ±0,07*	75,71 ±0,03*	71,80 ±0,04*	60,22 ±0,09	63,11 ±0,07*	54,90 ±0,04	60,05 ±0,08	68,02 ±0,05*
17	60,23±0,13	61,30 ±0,04	65,08 ±0,03	59,90 ±0,09	76,60 ±0,08*	79,01 ±0,07*	60,07 ±0,03	58,30 ±0,04	66,27 ±0,07	64,40 ±0,09	60,43 ±0,12
19	59,80±0,05	52,24 ±0,09*	50,50 ±0,05*	60,35 ±0,11	74,04 ±0,14*	70,40 ±0,13*	50,89 ±0,13*	49,96 ±0,06*	58,12 ±0,09	69,08 ±0,03*	58,37 ±0,08
21	64,91±0,11	49,77 ±0,04*	48,52 ±0,08*	55,40 ±0,09*	61,95 ±0,06	63,03 ±0,05	48,49 ±0,09*	50,04 ±0,12*	52,02 ±0,07*	59,91 ±0,11	55,18 ±0,06*

Следовательно, состав питательной среды оказывает существенное влияние на проявления эффектов хрома. По-видимому, этим объясняются разноречивые данные литературы, упомянутые [18]. Кроме того, разнообразие объектов исследования и их специфика в немалой степени сказываются на отклике клеток на воздействие Cr^{+3} . Например, при исследовании соединения хрома (III) в концентрации 10^{-3} – 10^{-8} М на функциональное состояние клеток одноклеточной пресноводной зеленой водоросли *Micrasterias denticulata* было отмечено торможение развития клеток, но не их размножения. Не выявлено сколь-нибудь существенных изменений ни фотосинтеза (общего количества хлорофиллов), ни дыхания клеток водоросли [19].

Таблица 8. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на содержание хлорофилла *a* (мкг/мл млн клеток) *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде нитрата калия (n = 9)

Сутки	Контроль, 5,0 г/л KNO_3	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М									
		концентрация KNO_3 – 5,5 г/л					концентрация KNO_3 – 6,0 г/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	5,03 ± 0,07	4,04 ±0,03*	6,46 ±0,04*	5,80 ±0,07*	10,06 ±0,05*	8,49 ±0,08*	9,24 ±0,03*	6,98 ±0,07*	5,25 ±0,08	10,10 ±0,04*	10,64 ±0,10*
3	4,48 ± 0,03	6,01 ±0,07*	5,40 ±0,03*	4,09 ±0,03	9,88 ±0,07*	7,54 ±0,04*	9,50 ±0,05*	5,12 ±0,04*	6,37 ±0,05*	10,45 ±0,03*	11,58 ±0,05*
5	9,10 ± 0,06	5,50 ±0,06*	6,07 ±0,05*	5,18 ±0,05*	16,10 ±0,03*	13,76 ±0,06*	19,07 ±0,07*	22,08 ±0,06*	15,32 ±0,04*	12,70 ±0,07*	24,02 ±0,07*
7	16,46 ± 0,04	10,12 ±0,09*	10,59 ±0,03*	18,60 ±0,04*	9,23 ±0,09*	18,12 ±0,03	24,11 ±0,04*	16,47 ±0,10	23,29 ±0,09*	25,16 ±0,06*	19,13 ±0,03*
9	16,06 ± 0,09	15,34 ±0,04*	14,02 ±0,09*	22,87 ±0,11*	28,05 ±0,04*	18,04 ±0,07*	23,03 ±0,10*	16,96 ±0,05	24,83 ±0,04*	27,10 ±0,04*	25,60 ±0,06*
11	24,48 ± 0,10	17,10 ±0,13*	13,78 ±0,12*	25,72 ±0,06	20,09 ±0,06*	27,11 ±0,04	20,68 ±0,06	23,31 ±0,05	26,06 ±0,06	22,59 ±0,03	26,57 ±0,04
13	26,82 ± 0,05	17,58 ±0,03*	22,44 ±0,07*	23,04 ±0,05*	29,03 ±0,09	28,49 ±0,05	21,27 ±0,10	19,02 ±0,04*	24,15 ±0,03	22,04 ±0,09*	26,22 ±0,03
15	25,09 ± 0,03	16,80 ±0,09*	24,06 ±0,10	26,15 ±0,09	30,11 ±0,07*	28,86 ±0,12*	26,79 ±0,09	25,14 ±0,08	22,89 ±0,05	23,56 ±0,04	29,27 ±0,08*
17	29,53 ± 0,09	19,04 ±0,05*	27,01 ±0,09	21,97 ±0,05*	31,55 ±0,12	32,44 ±0,10	25,31 ±0,13	21,05 ±0,03*	28,09 ±0,09	26,11 ±0,08	25,03 ±0,05*
19	28,44 ± 0,05	18,13 ±0,07*	20,03 ±0,08*	21,84 ±0,07*	29,43 ±0,09	28,06 ±0,03	20,05 ±0,01	19,46 ±0,09*	24,22 ±0,06*	29,46 ±0,11	24,08 ±0,07*
21	30,18 ± 0,06	16,27 ±0,06*	20,80 ±0,12*	19,70 ±0,12*	27,52 ±0,08	27,61 ±0,05	18,60 ±0,04*	20,32 ±0,12*	21,75 ±0,11*	24,13 ±0,09*	21,85 ±0,13*

Таблица 9. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на содержание хлорофилла *b* (мкг/мл млн клеток) в клетках *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде нитрата калия (n = 9)

Сутки	Контроль, 5,0 г/л KNO_3	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М									
		концентрация KNO_3 – 5,5 г/л					концентрация KNO_3 – 6,0 г/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	3,11 ± 0,03	2,34 ±0,04*	2,94 ±0,09	3,02 ±0,08	4,89 ±0,03*	4,50 ±0,07*	3,97 ±0,03*	3,16 ±0,07	2,81 ±0,08	5,06 ±0,11*	6,20 ±0,03*
3	2,24 ± 0,06	2,82 ±0,09*	2,67 ±0,03*	2,33 ±0,06	5,10 ±0,05*	3,44 ±0,10*	4,04 ±0,10*	3,01 ±0,03*	3,05 ±0,03*	5,84 ±0,04*	6,86 ±0,06*
5	6,80 ± 0,07	2,49 ±0,07*	3,12 ±0,04*	2,73 ±0,11*	7,70 ±0,08*	6,09 ±0,03	8,10 ±0,05*	10,84 ±0,06*	7,08 ±0,07	6,60 ±0,06	11,13 ±0,05*
7	9,47 ± 0,03	5,56 ±0,11*	4,84 ±0,06*	8,87 ±0,03	5,35 ±0,07*	8,81 ±0,07	11,53 ±0,07*	7,52 ±0,09*	10,55 ±0,09	12,10 ±0,03*	9,58 ±0,09
9	9,13 ± 0,08	7,66 ±0,05*	7,07 ±0,08*	11,03 ±0,05*	12,39 ±0,06*	8,13 ±0,06	10,41 ±0,04*	7,80 ±0,05*	11,13 ±0,04*	12,64 ±0,07*	11,23 ±0,04*
11	11,59 ± 0,04	9,11 ±0,03*	6,15 ±0,05*	12,51 ±0,07	9,69 ±0,09*	12,65 ±0,02	9,06 ±0,06*	12,06 ±0,04	11,79 ±0,12	10,44 ±0,09	11,90 ±0,08
13	11,09 ± 0,09	9,92 ±0,08*	10,84 ±0,07	11,14 ±0,04	12,90 ±0,04*	12,31 ±0,08	9,70 ±0,08*	8,10 ±0,09*	10,62 ±0,05	9,03 ±0,05*	10,17 ±0,03
15	10,28 ± 0,07	8,21 ±0,13*	11,93 ±0,06*	13,41 ±0,09*	14,97 ±0,08*	13,17 ±0,07*	11,18 ±0,05	11,91 ±0,03*	9,30 ±0,04	10,16 ±0,13	13,92 ±0,09*
17	18,01 ± 0,10	10,46 ±0,07*	13,05 ±0,13*	10,31 ±0,03*	15,54 ±0,03*	15,83 ±0,03*	12,20 ±0,10*	10,85 ±0,07*	13,45 ±0,09*	13,05 ±0,07*	12,42 ±0,04*
19	17,44 ± 0,08	9,96 ±0,03*	8,76 ±0,06*	10,26 ±0,12*	14,30 ±0,10*	13,90 ±0,05*	9,09 ±0,04*	8,47 ±0,09*	12,18 ±0,04*	14,53 ±0,03*	12,06 ±0,11*
21	18,50 ± 0,05	8,70 ±0,09*	9,28 ±0,08*	8,57 ±0,08*	13,55 ±0,09*	12,74 ±0,12*	7,84 ±0,09*	8,66 ±0,11*	10,04 ±0,06*	11,80 ±0,10*	11,71 ±0,07*

Таблица 10. Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на содержание каротиноидов (мкг/мл млн клеток) в клетках *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде нитрата калия ($n = 9$)

Сутки	Контроль, 5,0 г/л KNO_3	Концентрация $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М									
		концентрация $\text{KNO}_3 - 5,5$ г/л					концентрация $\text{KNO}_3 - 6,0$ г/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	0,91±0,09	1,01 ±0,03	0,86 ±0,07	1,40 ±0,09*	0,96 ±0,07	1,14 ±0,10*	0,67 ±0,03*	0,80 ±0,07*	1,09 ±0,03*	1,11 ±0,07*	0,84 ±0,07
3	0,94±0,07	0,85 ±0,07	1,40 ±0,03*	1,01 ±0,05	0,90 ±0,04	1,28 ±0,03*	0,85 ±0,06	0,72 ±0,03*	1,14 ±0,11*	1,07 ±0,03*	0,85 ±0,04
5	1,30±0,03	0,94 ±0,09*	1,09 ±0,04*	1,20 ±0,07	1,18 ±0,06	0,98 ±0,05*	0,81 ±0,04*	0,89 ±0,04*	1,05 ±0,04*	0,98 ±0,05*	1,11 ±0,06*
7	1,43±0,12	1,16 ±0,04*	1,77 ±0,09*	1,31 ±0,03	1,22 ±0,03*	0,96 ±0,07*	1,03 ±0,09*	0,72 ±0,05*	0,92 ±0,07*	1,13 ±0,09*	0,96 ±0,08*
9	1,25±0,05	2,09 ±0,08*	1,80 ±0,05*	2,07 ±0,05*	1,98 ±0,08*	1,66 ±0,02*	1,19 ±0,05	1,13 ±0,09	0,90 ±0,05*	1,24 ±0,04	1,30 ±0,05
11	2,16±0,08	2,02 ±0,06	2,12 ±0,08	2,93 ±0,04*	1,75 ±0,09*	2,03 ±0,08	1,23 ±0,08*	1,58 ±0,06*	1,05 ±0,09*	1,90 ±0,10*	1,48 ±0,03*
13	2,07±0,04	1,82 ±0,05*	1,29 ±0,03*	2,35 ±0,06*	2,19 ±0,05	2,20 ±0,04	1,37 ±0,04*	1,87 ±0,10	1,49 ±0,06*	1,98 ±0,08	2,05 ±0,09
15	2,03±0,13	1,25 ±0,07*	1,36 ±0,07*	2,17 ±0,07	2,24 ±0,08	2,03 ±0,09	1,44 ±0,09*	1,90 ±0,05	1,32 ±0,07*	2,04 ±0,07	1,87 ±0,05
17	2,14±0,09	1,08 ±0,13*	1,47 ±0,11*	2,80 ±0,09*	2,51 ±0,09*	2,35 ±0,05	1,38 ±0,04*	1,95 ±0,07	1,51 ±0,09*	2,16 ±0,03	2,40 ±0,11*
19	2,27±0,04	1,11 ±0,09*	1,21 ±0,05*	2,68 ±0,03*	2,30 ±0,05	2,27 ±0,10	1,06 ±0,13*	1,74 ±0,13*	1,25 ±0,03*	1,36 ±0,09*	2,10 ±0,07
21	2,33±0,10	1,02 ±0,08*	1,09 ±0,10*	2,35 ±0,05	2,09 ±0,14	1,97 ±0,04*	1,11 ±0,07*	1,49 ±0,04*	1,08 ±0,10*	1,14 ±0,13*	1,63 ±0,10*

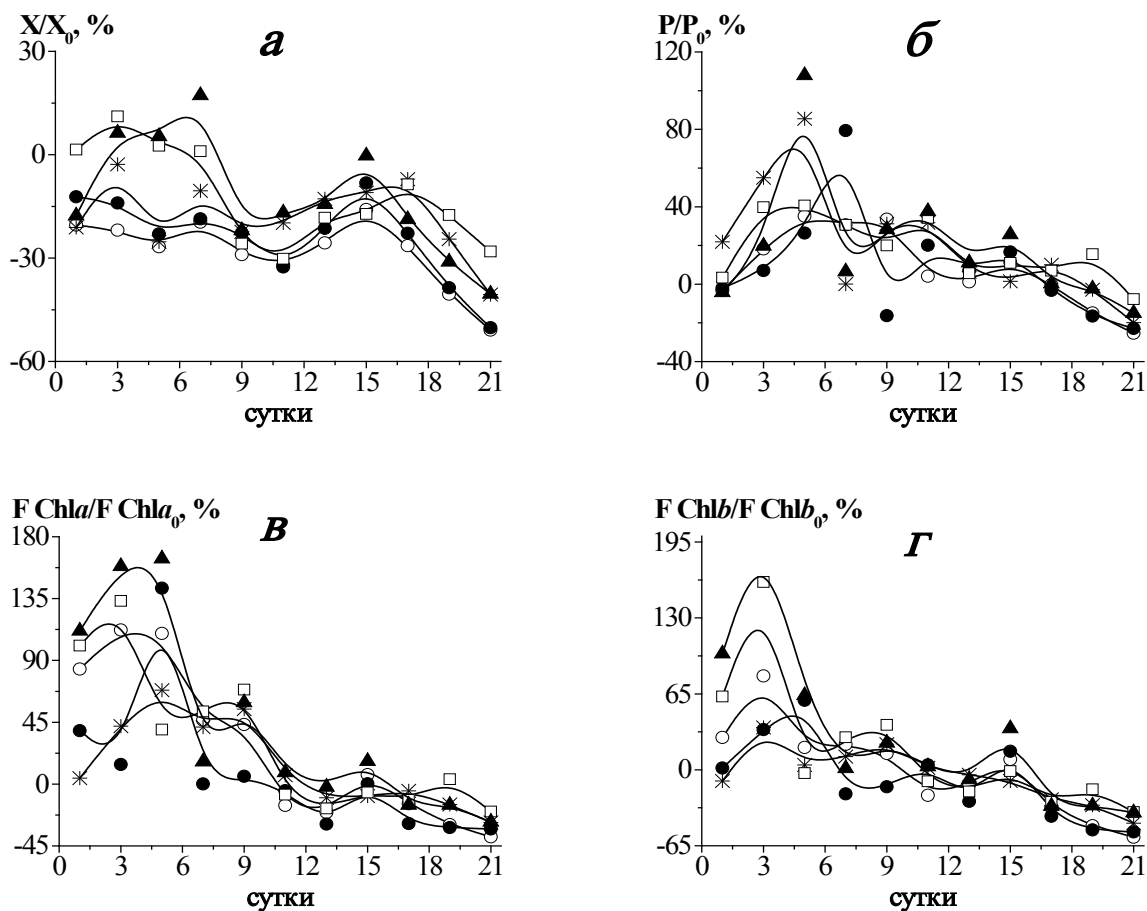


Рисунок 3. Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (а), внутриклеточного белка (б), хлорофиллов а (Chl a) (в) и б (Chl b) (г) в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, М: 1 – 10^{-4} ; 2 – 10^{-5} ; 3 – 10^{-6} ; 4 – 10^{-7} ; 5 – 10^{-8} в присутствии KNO_3 концентрацией 6,0 г/л. Обозначения те же, что в рисунке 2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, хром (III) оказывает неоднозначное влияние на функционально-метаболическое состояние культуры хлореллы в зависимости от его концентрации и концентрации источника азота – KNO_3 . В целом, при концентрации KNO_3 5,0 г/л в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-6} М сульфат хрома угнетал развитие культуры водоросли, а в максимальной концентрации вызвал быструю гибель. В начальный период культивирования резко возрастал уровень хлорофиллов *a* и *b*, что, по-видимому, носило компенсаторно-приспособительный характер. Со стороны биомассы, уровня внутриклеточного белка, хлорофиллов не выявлено динамики колебательного характера, присущей контрольному варианту питательной среды. Увеличением концентрации KNO_3 до 5,5 г/л при концентрации $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 10^{-4} – 10^{-8} М не только сопровождалось приростом биомассы, но и заметным (17–74%) увеличением уровня внутриклеточного белка, снижением «напряженности» фотосинтетического аппарата (судя по уровню пигментов) и восстановлением колебательной динамики фотосинтетических пигментов. Дальнейшее увеличение концентрации KNO_3 не дало положительного результата и вело к усугублению функционально-метаболического состояния культуры хлореллы.

Складывается впечатление, что катион Cr^{3+} , в определенных условиях способствует мобилизации азотистого питания клеток водоросли, усилению биосинтеза белка. Это согласуется с ранее известными данными литературы о стимуляции хромом транспорта ряда аминокислот и усвоению небелкового азота при рубцовом пищеварении [20]. Полученные материалы создают основу для дальнейших исследований о путях влияния Cr^{3+} на обмен белков, а также для оптимизации состава питательных сред в целях обогащения клеток хлореллы белком.

Список литературы / References:

1. Suman G., Nupur M., Anuradha S., Pradeep B. Single cell protein production: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, vol. 4, no. 9, pp. 251-262.
2. Загоровская В. Новый белок. Готов ли российский рынок к альтернативным кормовым белкам? *Агротехника и технологии*, 2020, № 1, с. 50-54. [Zagorovskaya V. New protein. Is the Russian market ready for alternative feed proteins? *Agrotekhnika i tekhnologii*, 2020, no. 1, pp. 50-54. (In Russ.)]
3. Fradique M., Batista A.P., Nunes M.C. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, no. 90, pp. 1656-1664, doi: 10.1002/jsfa.3999.
4. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, vol. 35, pp. 265-278, doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007.
5. Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, pp. 1-21, doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.
6. Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant science*, 2009, vol. 177, iss. 4, pp. 272-280, doi: 10.1016/j.plantsci.2009.06.005.
7. Ursu A.V., Marcati A., Sayd T., Sante-Lhoutellier V., Djelveh G., Michaud P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technology*, 2014, vol. 157, pp. 134-139, doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.071.
8. Panahi Y., Khosroushahi A.Y., Sahebkar A., Heidari H.R. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019, vol. 9, iss. 2, pp. 182-194, doi: 10.15171/apb.2019.022.
9. Реутина С.В. Роль хрома в организме человека. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности, 2009, № 4, с. 50-55. [Reutina S.V. The role of chromium in the person's organism. Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti, 2009, no. 4, pp. 50-55. (In Russ.)]
10. Vincent J.B. Effects of chromium supplementation on body composition, human and animal health, and insulin and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2019, vol. 22, no. 6, pp. 483-489, doi: 10.1097/MCO.0000000000000604.
11. Бессонова В.П., Иванченко О.Е. Накопление хрома в растениях и его токсичность. *Вопрос биоиндикации и экологии*, 2011, вып. 16, № 2, с. 35-52. [Bessonova V.P., Ivanchenko O.YE. Chromium accumulation in plants and its toxicity. *Vopros bioindikatsii i ekologii*, 2011, vol. 16, no. 2, pp. 35-52. (In Russ.)]
12. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*). Пинск: ПолесГУ, 2020, 29 с. [Il'uchik I.A., Nikandrov V.N. Methodological recommendations for the study of biochemical properties of unicellular green algae (for example, *Chlorella vulgaris*). Pinsk: PolesGU, 2020, 29 p. (In Russ.)]
13. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. М.: Изд. центр «Академия», 2003, 256 с. [Gavrilenko V.F., Zhigalova T.V. Large workshop on photosynthesis. M.: Izdatel'skij centr «Akademiy», 2003, 256 p. (In Russ.)]
14. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении MnCl_2 в питательную среду. *Вестник Палесскага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых*

наук, 2018, № 1, с. 53-64. [Il'ichuk I.A., Nikandrov V.N. Chlorella vulgaris culture growth and protein accumulation at $MnCl_2$ addition in nutrient medium. *Viesnik Palieskaha dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh nauk*, 2018, no. 1, pp. 53-64. (In Russ.)]

15. Ильичук И.А., Никандров В.Н. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*, 2020, т. 65, № 3, с. 299-309. [Il'ichuk I.A., Nikandrov V.N. Dynamics of a photosynthetic pigments level of the *Chlorella vulgaris* strain С 111 ИВСЕ С-19 during the growth at the nutrient medium with manganese chloride addition. *Vesci Nacyyanal'naj akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnyh navuk*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 299-309. (In Russ.)]

16. Tkaczyk C., Huk O.L., Mwale F., Antoniou J., Zukor D.J., Petit A., Tabrizian M. Effect of chromium and cobalt ions on the expression of antioxidant enzymes in human U937 macrophage-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2010, pp. 419-425, doi: 10.1002/jbm.a.32688.

17. Kubrak O.I., Lushcak O.V., Lushcak J.V., Torous I.M., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr(III) and Cr(VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2010, vol. 152, iss. 3, pp. 360-370, doi: 10.1016/j.cbpc.2010.06.003.

18. Упитис В.В. *Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей*. Рига: Зинатне, 1983, 240 с. [Upitis V.V. *Macro and microelements in the optimization of mineral nutrition of microalgae*. Riga, Zinatne Publ., 1983, 240 p. (In Russ.)]

19. Volland S., Lutz C., Michalke B., Lutz-Meindl U. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*, 2012, vol. 109, pp. 59-69, doi: 10.1016/j.aquatox.2011.11.013.

20. Mertz W. Chromium occurrence and function in biological system. *Physiological Reviews*, 1969, vol. 49, no. 2, pp. 163-239, doi: 10.1152/physrev.1969.49.2.163.

EFFECT OF $Cr_2(SO_4)_3$ ON A STATUS OF *CHLORELLA VULGARIS* CULTURE CELLS UNDER THE DIFFERENT CONTENT OF NITROGEN SOURCE – KNO_3 IN THE NUTRIENT MEDIUM

Ilyuchik I.A., Zakharevich L.O., Nikandrov V.N.

Polessky State University

Dnieper flotilla str., 23, Pinsk, 225710, Republic of Belarus; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0526

Abstract. The $Cr_2(SO_4)_3$ effect at 10^{-2} – 10^{-8} M concentration on the biomass yield, the concentration of intracellular protein, chlorophylls *a* and *b*, and carotenoids on the culture of *Chlorella vulgaris* strain C 111 ИВСЕ С-19 was studied. In separate experiment series, the nitrogen source, KNO_3 concentration was increased by 10 and 20%. Chromium (III) had an ambiguous effect on the functional and metabolic state of the chlorella culture, depending on its concentration and the nitrogen source – KNO_3 concentration. In general, at 5.0 g/l KNO_3 concentration, chromium sulfate in the 10^{-2} – 10^{-6} M concentration inhibited the algae culture development, and at the maximum concentration caused rapid death. In the initial period of cultivation, the level of chlorophylls *a* and *b* sharply increased, which, apparently, was of a compensatory-adaptive nature. From the side of biomass, the level of intracellular protein, chlorophylls, no dynamics of an oscillatory nature, inherent in the control variant of the nutrient medium, was revealed. An increase in the concentration of KNO_3 to 5.5 g/l at $Cr_2(SO_4)_3$ 10^{-4} – 10^{-8} M concentration was not only accompanied by an increase in biomass, but also by a noticeable (17–74%) increase in the intracellular protein level, a decrease in the “tension” of the photosynthetic apparatus (judgment by the level of pigments) and restoration of the oscillatory dynamics of photosynthetic pigments. A further increase in the potassium nitrate concentration did not give a positive result and led to the aggravation of the chlorella culture functional and metabolic state.

Key words: culture of chlorella, chromium (III) sulfate, potassium nitrate, biomass, intracellular protein, chlorophylls, carotenoids.

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 7, № 2, 2022

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 7, No. 2, 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@sevbppc.ru

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе

ИП Крыховецкий-Кощев 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

Формат – 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура – Times New Roman. Усл. печ. л. – 22,7.

Тираж – 50 экз. Подписано в печать 04.08.2022. Дата выхода в свет 15.09.2022

Свободная цена.

