

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 8, № 1
2023**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 8, № 1
2023**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 8, No. 1, 2023**

Севастополь
2023

Учредитель и издатель

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

«Актуальные вопросы биологической физики и химии» – научный журнал, посвященный актуальным вопросам общей и молекулярной биофизики, моделированию в биофизике, биоинформатике, медицинской биофизике, биофизической химии, биофизической экологии и биологическим ресурсам. Издание рассчитано на научных работников, аспирантов, студентов.

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

Главный редактор

Евстигнеев М.П. (Севастополь).

Chief Editor

Evstigneev M.P. (Sevastopol).

Научный редактор

Твердислов В.А. (Москва).

Science Editor

Tverdislov V.A. (Moscow).

Редакционная коллегия

Ануфриева Е.В. (Севастополь)
Костюков В.В. (Севастополь);
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);
Пионтковский С.А. (Севастополь);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Семенов К.Н. (Санкт-Петербург);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Холявка М.Г. (Воронеж);
Шейнман М. (Севастополь);
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

Editorial Board

Anufrieva E.V. (Sevastopol);
Hernandez Santiago A.A. (Puebla,
Mexico);
Holyavka M.G. (Voronezh);
Kostjukov V.V. (Sevastopol);
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);
Piontkovski S.A. (Sevastopol);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Semenov K.N. (Saint Petersburg);
Sheinman M. (Sevastopol);
Soldatov A.A. (Sevastopol).

Ответственный секретарь

Воронин Д.П. (Севастополь).

Executive Secretary

Voronin D.P. (Sevastopol).

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

СОДЕРЖАНИЕ

Том 8, № 1, 2023

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Н.Н. Тимченко, Е.В. Шупова**
Состояние гемоглобина после замораживания-оттаивания с глицерином7
- Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова**
Роль оксида азота при действии УФ-В излучения на клетки дрожжей 12
- Г.А. Агаева, У.Т. Агаева, Н.М. Годжаев**
Конформационные свойства и электронная структура противоопухолевого агента Тут-Ser-Leu 16
- Г.А. Агаева, Г.З. Наджафова**
Электронные параметры конформационных состояний бета-амилоидного пептида (25-35) 21

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

- Л.И. Исмаилова, Н.А. Ахмедов**
Структурная организация глипролиновой гексапептидной молекулы.....27
- Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов**
Структурная организация молекул лактоферроксинов33
- Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Л.И. Исмаилова**
Структурная организация молекул сойморфинов39

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, С.В. Назимова, Е.П. Тимохина**
Изменения в синтезе половых стероидов у самцов крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ 48
- Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина, А.О. Симонян**
Антагонист рецепторов сигма-1, соединение ВD-1063, подавляет Ca^{2+} -ответы, вызываемые моликсаном в макрофагах.....52
- В.А. Королева, С.М. Панкова, Ю.А. Редько, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов**
Влияние УФ-излучения и температуры на активность папаина59
- М.В. Федорова, В.И. Вознесенский, М.М. Созарукова, А.А. Харченко, Е.А. Соснова, Е.В. Проскурнина**
Антиоксидантный потенциал перитонеальной жидкости при раке яичников63

| | |
|--|-----|
| О.А. Могильная, Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, В.С. Бондарь О субстратной специфичности и некоторых свойствах внеклеточной оксидазы из базидиомицета <i>Neonothopanus nambi</i> | 71 |
| Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, В.М. Ле, О.А. Могильная, Ю.В. Захарова, А.С. Сухих, В.С. Бондарь Кофейная кислота стимулирует свечение мицелия высших грибов <i>Neonothopanus nambi</i> и <i>Armillaria borealis in vivo</i> | 78 |
| О.М. Масленникова, А.Л. Сибирев, М.Н. Шипко, М.А. Степович Об информативных возможностях и результатах экспериментальных исследований ГРВ-визуализации белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ | 84 |
| БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ | |
| Ж.М. Ибрагимова, М.М. Мухтаров, П.А. Шукюрова, С.Д. Байрамова Влияние оксидативного стресса, индуцированного электромагнитным излучением в раннем периоде постэмбрионального развития | 89 |
| С.А. Пионтковский, И.А. Минский, Я.В. Мегер Соотношение биомассы желетелого и кормового зоопланктона в Мировом океане | 93 |
| М.А. Савицкий, А.В. Кузнецов Фракционирование планктона с помощью последовательной фильтрации и построение пирамид биоразнообразия | 99 |
| Л.Н. Шишкина, П.Д. Белецкая, А.С. Дубовик, А.В. Машукова, В.О. Швыдкий Механизм воздействия ионов тяжелых металлов на физико-химические свойства фосфолипидов | 111 |

CONTENTS

Volume 8, No. 1, 2023

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

- N.N. Timchenko, E.V. Shupova**
State of hemoglobin after its freezing-thawing with glycerol.....7
- N.K. Kocharli, S.T. Gummatova**
The role of nitric oxide under the influence of UV-B radiation on yeast cells..... 12
- G.A. Agaeva, U.T. Agaeva, N.M. Godjaev**
Conformational properties and electronic structure of antitumor agent Tyr-Ser-Leu 16
- G.A. Agaeva, G.Z. Najafova**
Electronic parameters of conformational states of Abeta-amyloid peptide (25-35)..... 21

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

- L.I. Ismailova, N.A. Akhmedov**
Structural organization of the glyproline hexapeptide molecule27
- L.N. Agayeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, N.A. Akhmedov**
Structural organization of lactoferroxin molecules33
- N.A. Akhmedov, L.N. Agayeva, L.I. Ismailova**
Structural organization of soymorphin molecules39

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova, E.P. Timokhina**
Developmental exposure to endocrine disruptor DDT alters parameters of sex steroid production in male rats..... 48
- L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina, A.O. Simonyan**
Sigma-1 receptor antagonist, compound BD-1063, attenuates Ca²⁺ responses induced by molixan in macrophages52
- V.A. Koroleva, S.M. Pankova, Yu.A. Redko, M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov**
Effect of UV radiation and temperature on papain activity59
- M.V. Fedorova, V.I. Voznesensky, M.M. Sozarukova, A.A. Kharchenko, E.A. Sosnova, E.V. Proskurnina**
Antioxidant potential of peritoneal fluid in ovarian cancer63

O.A. Mogilnaya, N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, V.S. Bondar

On the substrate specificity and some properties of the extracellular oxidase from the *Neonothopanus nambi* basidiomycete 71

N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, V.M. Le, O.A. Mogilnaya, Ju.V. Zakharova, A.S. Sukhikh, V.S. Bondar

Caffeic acid stimulates *in vivo* luminescence of the mycelia of the higher fungi *Neonothopanus nambi* and *Armillaria borealis*.....78

O.M. Maslennikova, A.L. Sibirev, M.N. Shipko, M.A. Stepovich

About informational opportunities and results of experimental studies of GDV visualization protein-induced molecular complexes in aqueous solutions of tablets, containing antibodies to interferon- γ 84

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES**Zh.M. Ibragimova, M.M. Mukhtarov, P.A. Shukyurova, S.D. Bairamova**

Influence of oxidative stress induced by electromagnetic radiation in the early period of postembryonic development 89

S.A. Piontkovski, I.A. Minsky, Y.V. Meger

The gelatinous-to-forage zooplankton biomass ratio of the World Ocean93

M.A. Savitsky, A.V. Kuznetsov

Plankton fractionation by sequential filtration and construction of biodiversity pyramids..... 99

L.N. Shishkina, P.D. Beletskaya, A.S. Dubovik, A.V. Mashukova, V.O. Shvydkiy

Mechanism of action of the heavy metal ions on the physicochemical properties of phospholipids.....111

СОСТОЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ С ГЛИЦЕРИНОМ

Тимченко Н.Н., Шупова Е.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 04.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0580

Аннотация. Нами было изучено, как влияет глицерин на HbA. При исследовании влияния криопротектора на конформацию гемоглобина А использовали методы сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа ПСП (первых производных спектров поглощения). Линейный характер зависимости $\Delta E/E$ (отношение разности поглощения гемоглобина в глицерине и поглощения гемоглобина в физиологическом растворе к поглощению гемоглобина в физиологическом растворе) от концентрации глицерина для растворов гемоглобина А с глицерином соответствует литературным данным и означает, что с помощью метода сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии не фиксируются изменения конформации белка при увеличении концентрации глицерина до 40%. Был проведен анализ ПСП HbA в физиологическом растворе (контроля) и растворов HbA с глицерином, который показал, что они практически не отличаются. После замораживания-оттаивания растворов HbA с глицерином не зафиксировано изменения конформационного состояния белков. Зависимости $\Delta E/E$ от концентрации глицерина для растворов HbA с глицерином после замораживания-оттаивания не изменились. Был проведен анализ ПСП растворов гемоглобина А с глицерином до и после замораживания-оттаивания. Наблюдается неизменность положений отрицательных максимумов ПСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм на ПСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания практически не отличаются от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Полученные результаты могут быть связаны с изменением сольватной оболочки биополимеров. Благодаря наличию гидроксильных групп молекулы глицерина способны занимать часть сольватной оболочки HbA с сопутствующим изменением структуры и энергетических параметров макромолекулы, поскольку структура макромолекулы в растворе, как известно, поддерживается растворителем в ближайшем окружении макромолекулы. Стабилизация происходит благодаря водородным связям между неэлектролитами и биополимерами, причем неэлектролиты действуют как заменители воды, хотя эффекты действия растворителя не обязательно являются монотонной функцией состава растворителя.

Ключевые слова: гемоглобин, конформация, замораживание-оттаивание.

Гемоглобин относится к числу дыхательных белков, осуществляющих перенос кислорода от лёгких к тканям. Кроме того, гемоглобин прямо и косвенно участвует в переносе углекислого газа. Этот белок широко распространён в природе. Он содержится в эритроцитах всех позвоночных и некоторых беспозвоночных животных, а также в корневых клубеньках некоторых бобовых растений (леггемоглобин). Гемоглобин – основной компонент эритроцитов крови. В каждом эритроците содержится около 280 млн. молекул гемоглобина, каждая из них состоит из 10 000 атомов, в том числе 4 атома железа. Молекулярная масса гемоглобина равна 64500. По химической природе гемоглобин относится к группе гемопротеидов, имеющих в своём составе белок и железосодержащую простетическую группу – гем, на долю которого приходится 4% массы молекулы. Гем – это комплексное соединение протопорфирина IX (одного из 15 теоретически возможных изомеров протопорфирина) с железом. Протопорфирин IX состоит из 4 пирроловых колец, соединённых СН-мостиками со следующими заместителями в боковых цепях: 1,3,5,8-метильные группы, 2,4-винильные группы, 6,7-остатки пропионовой кислоты. В геме железо находится в центре протопорфиринового ядра и связано с 4 атомами пирроловых колец двумя главными (с замещением протона у атомов азота) и двумя дополнительными связями. Поскольку координационное число железа равно 6, остаются 2 неиспользованные координационные связи, которые располагаются в направлениях, перпендикулярных плоскости гема. Одна из них реализуется при связи гема с глобином, а к другой присоединяется кислород или другие лиганды. Гем крайне неустойчив и легко превращается либо в гематин с окислением 2 до трёхвалентного железа и присоединением к последнему гидроксильной группы, либо в гемин, содержащий вместо гидроксильной группы ионизированный хлор. Гемин легко образует устойчивые кристаллы Тейхмана. Гем одинаков для гемоглобина всех видов животных; различия в свойствах гемоглобина обусловлены различием белкового компонента. Молекула гемоглобина является тетрамером, в её состав входят 4 попарно одинаковые полипептидные цепи, совокупность которых и образует белковую часть молекулы – глобин. Молекула гемоглобина человека гетерогенна, что обусловлено различием полипептидных цепей, входящих в её состав. Определена первичная структура глобиновых цепей молекулы гемоглобина А. Отличительной особенностью гемоглобина А является отсутствие в его составе изолейцина и цистина. Цепи альфа и бета гемоглобина А состоят соответственно из 141 и 146 аминокислотных остатков,

связанных в генетически определённой последовательности; в целом молекула гемоглобина содержит 574 аминокислоты. Эти цепи тождественны в 65 и различны в 76 позициях первичной структуры. N-концевые остатки в обеих цепях образованы валином, C-концевые остатки альфа-цепей – аргинином, а бета-цепей – гистидином. Как в альфа-, так и в бета-цепи предпоследнее положение с C-конца занимает тирозин. Рентгеноструктурный метод анализа кристаллов гемоглобина (разрешение 28 нм) позволил выявить основные особенности пространственного расположения как отдельных цепей, так и молекулы гемоглобина в целом. Оказалось, что альфа- и бета-цепи свёрнуты в спиральные сегменты различной длины, которые имеют строение правых альфа-спиралей: 7 спиралей в альфа-цепях и 8 в бета-цепях. Возникающая при этом структура носит название вторичной структуры белковых цепей глобина. Степень спирализации, т.е. относительное число аминокислотных звеньев, заключённых в спиральные участки цепи, составляет в молекуле гемоглобина 70-75%. Рентгеноструктурный анализ молекул гемоглобина показал, что полипептидные цепи с заданной последовательностью аминокислот в результате взаимодействия между боковыми группами аминокислотных остатков свёртываются и образуют сложную нерегулярную трёхмерную структуру. Эта структура стабилизирована гидрофобными и водородными связями, а также электростатическими взаимодействиями. Структура, которая возникает при закручивании полипептидной цепи, содержащей альфа-спиральные участки, называется третичной. Известно, что третичная структура белков определяется их первичной структурой. Поэтому можно было ожидать, что различия в длине и аминокислотном составе альфа- и бета-цепей обусловят различие и в их пространственной конформации. Оказалось, однако, что третичная структура альфа- и бета-цепей молекулы гемоглобина, а также молекул мышечного дыхательного белка – миоглобина почти идентична. Это обусловлено специфическим расположением аминокислот, приводящих к скоплению электронейтральных боковых остатков аминокислот во внутренней части глобулы с образованием гидрофобного ядра. Наружная поверхность глобулы усеяна аминокислотами, несущими электрические заряды и диполи, контактирующие с водой. Каждая полипептидная цепь соединена с гемом. Эта связь является очень специфичной. Доказательством этой специфичности является строгая стехиометричность прохождения реакции с присоединением 4 молей гема к 1 молю глобина. Сродство гема к глобину очень велико. Специфичность связи гема с глобином зависит от их нативности. Нарушения в их структуре обуславливают возникновение неспецифичных центров связывания между ними с потерей способности присоединять кислород. Денатурированный глобин в зависимости от степени денатурации присоединяет от 6 до 24 молей гема.

В настоящее время гемоглобин изучают в биофизических исследованиях [1]. В условиях действия низких температур происходят изменения структуры и функции белков. Исследования структуры и функции белков при замораживании биоматериала помогают выяснению механизмов криоповреждения мембран, субклеточных органелл и клеток. Замораживание изолированных белков дает возможность отыскать причину и структурный уровень повреждения молекулы белка. Исследование состояния белков при низкотемпературном консервировании биоматериала может помочь определить выживаемость клеток после замораживания [2].

К факторам криоповреждения структуры и функции белков относятся: концентрирование в остающейся жидкой фазе (при замораживании биоматериала) солей и других компонентов раствора, дегидратация макромолекул; изменение pH среды и условий межмолекулярных взаимодействий [3,4]. При замораживании-оттаивании белков, имеющих четвертичную структуру, гиперконцентрация электролитов, возникающая в растворе при вымораживании воды, повышенная ионная сила, изменения pH раствора вызывают диссоциацию молекулы белка на субъединицы. Позже может возникать их реассоциация в гибридные формы [5], но добавление некоторых криопротекторов в среду замораживания предупреждает гибридизацию.

Несомненный интерес представляет работа по определению влияния состава среды замораживания (ионной силы, глицерина, 1,2-пропандиола, диметилсульфоксида) на агрегационные свойства липосом из природного фосфатидилхолина (ФХ) или его смеси с фосфатидилсерином (ФС), а также протеолипосом, образованных этими липидами и цитохромом P-450 [6]. Отрицательно заряженные протеолипосомы в большей мере агрегируют при замораживании и действии криопротекторов, чем нейтральные протеолипосомы. Внедрение белка не влияет на устойчивость нейтрального бислоя к агрегирующему действию замораживания и криопротекторов, но существенно снижает устойчивость отрицательно заряженных бислоев.

Проведенное Горбенко Г.П. с соавторами [7] изучение кинетики комплексообразования метгемоглобина с липосомами из ФХ и смеси ФХ с кардиолипином (КЛ) при воздействии глицерина, пропиленгликоля и диметилсульфоксида показало, что повышение эффективности связывания метгемоглобина с липидным бислоем при добавлении криопротекторов в основном обусловлено изменением параметров первой стадии комплексообразования. Действие криопротекторов на характер межмолекулярных связей в комплексе метгемоглобина с липосомами определяется модификацией гидрофобных взаимодействий.

Установлено [8], что низкая температура, глицерин и 1,2-пропиленгликоль влияют на структуру лецитиновых липосом и протеолипосом, образованных лецитином и цитохромом P-450, изменяя площадь поверхности и объем гидрофобной области липидного бислоя.

В исследованиях Жегунова Г.Ф. по изучению влияния криопротекторов на активность Са-АТФазы после замораживания [9] инкубацию саркоплазматического ретикулума (СР) с глицерином, ПЭГ-400, диметилсульфоксидом (ДМСО) в 10%-ной концентрации проводили при 4°C в полиэтиленовых ампулах в течение 20 минут с последующим замораживанием до -196°C. Проведенные эксперименты показали, что инкубация СР с глицерином и ПЭГ-400 приводит к уменьшению активности Са-АТФазы и замедлению скорости аккумуляции ионов кальция. Инкубация мембран с ДМСО, наоборот, приводит к увеличению активности Са-

АТФазы и скорости транспорта ионов кальция внутрь пузырьков СР.

Также отмечено, что при взаимодействии глицерина и ПЭГ-400 с гемоглобином, сывороточным альбумином быка и миозином существенных изменений в структуре белков не наблюдалось, а добавление ПЭГ-400 к раствору γ -глобулина приводит к компактизации макромолекулы белка. ПЭГ различных молекулярных весов способны связываться с гидрофобной полостью сывороточного альбумина быка, существенно не влияя на структуру белка.

В литературе представлено исследование действия глицерина и 1,2-пропандиола на эритроциты [10-14].

Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что замораживание-оттаивание в ряде случаев может вызывать изменение структурно-функциональных свойств белков. Криопротекторы, такие, как глицерин, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоли могут предотвращать эти изменения, однако, в больших концентрациях криопротекторы сами могут влиять на конформацию белков.

Для сохранения структурно-функционального состояния биологических объектов в процессе замораживания-оттаивания используются криопротекторы. Широко используемыми для эритроцитов являются глицерин и 1,2-ПД [10-14]. Проведены исследования с ПЭГ-1500 [14-16]. Эти криопротекторы оказались эффективными и для ряда белков [17-19]. Поэтому мы использовали глицерин для сохранения конформации гемоглобина.

Нами было изучено, как влияет глицерин на НбА. При исследовании влияния криопротектора на конформацию гемоглобина А использовали методы сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа ИСП (первых производных спектров поглощения).

Линейный характер зависимости $\Delta E/E$ (отношение разности поглощения гемоглобина в глицерине и поглощения гемоглобина в физиологическом растворе к поглощению гемоглобина в физиологическом растворе) от концентрации глицерина для растворов гемоглобина А с глицерином соответствует литературным данным [20] и означает, что с помощью метода сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии не фиксируются изменения конформации белка при увеличении концентрации глицерина до 40%. Был проведен анализ ИСП НбА в физиологическом растворе (контроля) и растворов НбА с глицерином, который показал, что они практически не отличаются.

После замораживания-оттаивания растворов НбА с глицерином не зафиксировано изменения конформационного состояния белков. Зависимости $\Delta E/E$ от концентрации глицерина для растворов НбА с глицерином после замораживания-оттаивания не изменились. Был проведен анализ ИСП растворов гемоглобина А с глицерином до и после замораживания-оттаивания. Наблюдается неизменность положений отрицательных максимумов ИСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм на ИСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания практически не отличаются от соответствующих образцов после замораживания-оттаивания (рис. 1).

Полученные результаты могут быть связаны с изменением сольватной оболочки биополимеров. Благодаря наличию гидроксильных групп молекулы глицерина способны занимать часть сольватной оболочки НбА с сопутствующим изменением структуры и энергетических параметров макромолекулы, поскольку структура макромолекулы в растворе, как известно, поддерживается растворителем в ближайшем окружении макромолекулы. Стабилизация происходит благодаря водородным связям между неэлектролитами и биополимерами, причем неэлектролиты действуют как заменители воды, хотя эффекты действия растворителя не обязательно являются монотонной функцией состава растворителя.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что методом сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии обнаружено, что предпочтительно использовать глицерин для низкотемпературного консервирования гемоглобина А.

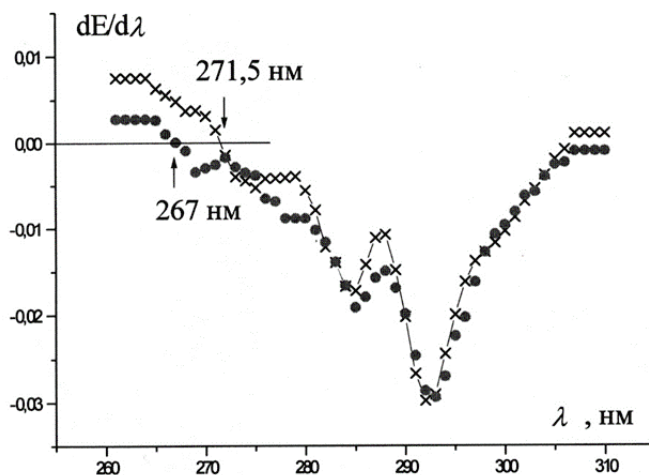


Рисунок 1. ИСП растворов гемоглобина с глицерином до и после замораживания-оттаивания (x – до замораживания-оттаивания, • – после замораживания-оттаивания)

Список литературы / References:

1. Webb K.L., Dominelli P.B. Influence of high hemoglobin-oxygen affinity on human during hypoxia. *Front. Physiol*, 2022, doi: 10.3389/fphys.2021.763933.
2. Пушкаря Н.С., Белоуса А.М. *Актуальные проблемы криобиологии*. К.: Наукова думка, 1981, 608 с. [Pushkar N.S., Belous A.M. K.: Naukova dumka. *Actual problems of cryobiology*, 1981, 608 p. (In Russ.)].
3. Leibo S.P., Mazur P. The role of cooling rates in low temperature preservation. *Cryobiology*, 1971, vol. 8, no. 4, pp. 447-452.
4. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Boil.*, 1965, vol. 24, no. 1, pp. 175-182.
5. Chilson O.P., Costello G.A., Kaplan N.O. Effect freezing on enzymes. *Fed.Proc.*, 1965, vol. 24, no. 2, pp. 55-65.
6. Дюбко Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А. Влияние среды замораживания на агрегационные свойства липосом. *Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии*, Харьков: Б.И., 1993, с. 44-51 [Dubko T.S., Gorbenko G.P., Nardid O.A. Influence of freezing medium on the aggregation properties of liposomes. Kharkov: B.I. *Fundamental and applied problems of cryobiology*, 1993, pp. 44-51 (In Russ.)].
7. Горбенко Г.П., Дюбко Т.С., Нардид О.А. Влияние криопротекторов на липид-белковые взаимодействия в модельных системах. Харьков: Б.И. *Физико-химические процессы в криобиологических системах*, 1991, с. 14-19 [Gorbenko G.P., Dubko T.S., Nardid O.A. Influence of cryoprotectors on the lipid-protein interactions in model systems. Kharkov: B.I. *Physic and chemical processes in cryobiological systems*, 1991, pp. 14-19 (In Russ.)].
8. Дюбко Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование влияния низких температур и органических растворителей на структуру модельных мембран методом флуоресцентных зондов. *Биофизика*, 1994, т. 39, № 1, с. 58-62 [Dubko T.S., Gorbenko G.P., Nardid O.A., Moiseev V.A. Investigation of influence of low temperature and organic solvents on the structure of model membranes by fluorescence zonds method. *Biofizika*, 1994, vol. 39, no. 1, pp. 58-62 (In Russ.)].
9. Жегунов Г.Ф. Функциональное состояние кальциевого насоса мембран саркоплазматического ретикулума после замораживания в присутствии криопротекторов. К.: Наукова думка. *Вопросы криоконсервирования биологических объектов*, 1978, с. 35-38 [Zhegunov G.F. Functional state of calcium pump of membranes of sarcoplasmatic reticulum after freezing in presence of cryoprotectors. K.: Naukova dumka. *The questions of cryopreservation of biological objects*, 1978, pp. 35-38 (In Russ.)].
10. Лоевский М.М., Воротилин А.М., Белоус А.М., Каплун Е.А., Гусева Н.В. Консервирующее действие глицерина и 1,2-пропандиола при гипотермическом хранении эритроцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 1987, № 7, с. 128 [Loevskiy M.M., Vorotilin A.M., Belous A.M., Kaplun E.A., Guseva N.V. Preserving action of glycerol and 1,2-propandiol at the hypotermic storage of erythrocytes. *Bulletin of the experimental biology and medicine*, 1987, no. 7, p. 128 (In Russ.)].
11. Гучок В.М., Воротилин А.М., Шраго М.И., Гончаров В.И., Положенцева Л.Л. Функциональная сохранность эритроцитов, криоконсервированных под защитой 1,2-пропандиола. Харьков: Б.И. *Криоконсервирование клеток и тканей*, 1989, с. 48-54 [Guchok V.M., Vorotilin A.M., Shrago M.I., Goncharov V.I., Polozhenceva L.L. Functional safety of erythrocytes cryoconserving by protection of 1,2-propandiol. Kharkov: B.I. *Cryopreservation of cell and tissues*, 1989, pp. 48-54 (In Russ.)].
12. Розанова Е.Д., Розанов Л.Ф., Некоз И.А. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола. *Криобиология*, 1989, № 4, с. 30-35 [Rozanova E.D., Rozanov L.F., Nekoz I.A. The kinetics of interation of human erythrocytes with glycerol and 1,2-propandiol solutions. *Cryobiology*, 1989, no. 4, pp. 30-35 (In Russ.)].
13. Vorotilin A.M., Loyevsky M.M. Hypothermal storage of erythrocytes in cryoprotective media containing 1,2-propandiol and glycerol. *Cryo-Letters.*, 1989, no. 10, pp. 371-378.
14. Кучеренко Ю.В., Зинченко А.В., Зинченко В.Д. Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-пропандиолом и ПЭГ-1500. *Проблемы криобиологии*, 1999, № 1, с. 3-8 [Kucherenko Yu.V., Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. Phase transitions in erythrocytes suspensions, conserving with glycerol, 1,2-propandiol and PEG-1500. *Problems of cryobiology*, 1999, no. 1, pp. 3-8 (In Russ.)].
15. Ajsjaka K., Iwashita Y. Modification of human-hemoglobin with polyethylene glycol: a new candidate for blood substitute. *Biochem. And Biophys. Research communications*, 1980, vol. 97, no. 3, pp. 1076-1081.
16. Бабийчук Л.А. Конформационные и объемные изменения эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в зависимости от условий эквilibрации их с криопротектором ПЭО-1500. *Проблемы криобиологии*, 1997, № 3, с. 8-15 [Babiychuk L.A. Conformational and volume changes of erythrocytes in freezing-thawing process depending of conditions of equilibrating their with cryoprotector PEO-1500. *Problems of cryobiology*, 1997, no. 3, pp. 8-15 (In Russ.)].
17. Леонов Б.Н. Исследование взаимодействия водных растворов сывороточного альбумина с полиэтиленгликолем методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. К.: Наукова думка. *Современные проблемы криобиологии*, 1976, с. 3-5 [Leonov B.N. The investigation of interaction of water solutions of serum albumin with polyethylenglycol by method of low angle scattering of x-rays. K.: Naukova dumka. *Modern problems of cryobiology*, 1976, pp. 3-5 (In Russ.)].
18. Иванов Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. Исследование действия низких температур и криопротекторов на белки различной структуры. К.: Наукова думка. *Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур*, 1977, с. 34 [Ivanov L.V., GavriloVA I.I., Moiseev V.A. Investigation of effect

of low temperature and cryoprotectors on the proteins of different structure. K.: Naukova dumka. *The mechanisms of cryodamage and cryoprotection of biological structures*, 1977, p. 34 (In Russ.)].

19. Леонов Б.Н. Влияние замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 на структуру бычьего сывороточного альбумина. *Проблемы криобиологии*, 1993, № 1, с. 27-33 [Leonov B.N. Influence of freezing and polyethyleneglycol molecular mass 600 on the bovine serum albumin structure. *Problems of cryobiology*, 1993, no. 1, pp. 27-33 (In Russ.)].

20. Herskovits T.T., Greenblatt J. Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins. II. On the environment and location of the tryptophyl residues in hemoglobin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1969, vol. 130, pp. 30-38.

STATE OF HEMOGLOBIN AFTER ITS FREEZING-THAWING WITH GLYCEROL

Timchenko N.N., Shupova E.V.

Sevastopol State University

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

Received 04.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0580

Abstract. We have studied the influence of glycerol upon HbA. The cryoprotector effect on conformation of hemoglobin A was investigated using methods of solvent-perturbation differential spectrophotometry and analysis of the IDAS (first derivatives of absorption spectra). Linear nature of the $\Delta E/E$ dependence (the ratio of the difference between absorption of hemoglobin in glycerol and absorption of hemoglobin in saline to absorption of hemoglobin in saline) on glycerol concentration for hemoglobin A solutions with glycerol corresponds to literature data and means that if glycerol concentration is raised up to 40%, no changes of protein conformation are recorded by the method of solvent-perturbation differential spectrophotometry. An analysis of the IDAS of HbA in saline (control solution) and HbA solutions with glycerol was carried out. After freeze-thawing of HbA solutions with glycerol, no changes in the conformational state of proteins were recorded. The dependences of $\Delta E/E$ on concentration of glycerol for HbA solutions with glycerol after freeze-thawing did not change. An analysis of the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol before and after freezing-thawing, was carried out. There is a permanence of negative maxima of the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol after freeze-thawing from corresponding samples till freeze-thawing. Intensities of negative maxima within 284-286 and 292 nm on the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol after freeze-thawing slightly differ from corresponding samples before freeze-thawing. The results obtained may be related to a change in the solvate shell of biopolymers. Providing hydroxyl groups, glycerol molecules are capable to occupy part of solvate shell of HbA with corresponding change in structure and energy parameters of the macromolecule, since the structure of the macromolecule in solution is known to be supported by a solvent in the immediate environment of the macromolecule. Stabilization occurs due to hydrogen bonds between nonelectrolytes and biopolymers, with nonelectrolytes acting as water substitutes, although influence effects of solvent not necessarily constitute a monotone function of the solvent composition.

Key words: hemoglobin, conformation, freezing-thawing.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию 11.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0581

Аннотация. Настоящая работа посвящена изучению продукции оксида азота в клетках дрожжей после действия УФ-В излучения. Кроме того, проведена сравнительная оценка продукции активных форм кислорода (АФК), оксида азота и супероксиданион радикала. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата- $H_2DCF\cdot DA$. Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. Внутриклеточную концентрацию оксида азота мы определяли при помощи флуоресцентного красителя; -4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеиндиацетат (DAF-FM). 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 с ростом дозы УФ-В лучей увеличивается интенсивность флуоресценции DAF-FM. При действии высокой дозы ($4,8\cdot 10^2$ эрг/мм².) УФ-В лучей генерация АФК и оксида азота уменьшается. Как видно из полученных данных, при высоких дозах облучения интенсивность хемилюминесценции люцигенина сохраняется на высоком уровне.

Ключевые слова: активные формы кислорода (АФК), активные формы азота (АФА), флуоресценции DCF, клетки дрожжей, хемилюминесценция (ХЛ).

ВВЕДЕНИЕ

Высокая биологическая активность различных активных форм кислорода и азота, их взаимодействие обусловили необходимость постоянного функционирования в организме специальных механизмов противоокислительной (антиоксидантной) биологической защиты. NO-ергическая система, как и антиоксидантная система, играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах организма, являясь универсальным регулятором физиологических функций и метаболизма клеток [1,2].

К экологически важным агентам оксидативного стресса относится мягкое ультрафиолетовое излучение УФ-А и УФ-В диапазонов спектра. На поверхности клеток высших организмов имеются специализированные чувствительные рецепторы, которые воспринимают УФ-сигнал и далее, благодаря сопряжению рецепторов с внутриклеточными посредниками, запускается сложная регуляторная система, приводящая к активизации ряда генов и синтезу белков, участвующих в отклике объекта на действие УФ-излучения. Данная система регуляции внутриклеточного метаболизма относится к числу наиболее глобальных в мире высших животных и растений и, по-видимому, микроорганизмов. Стресс у эукариот связан с включением сигнальных путей, в которых участвуют активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO) обладающие широким спектром биологического действия [3]. В клетках в ходе метаболизма образуются АФК и АФА. Однако чрезмерно продуцируемые АФК и АФА могут приводить к повреждению клеток и к их гибели. Активные формы азота представляют собой продукты метаболизма оксида (NO), взаимодействует с такими формами кислорода, как супероксид ($O_2\cdot^-$) и перекись водорода (H_2O_2) [4]. Одним из механизмов функционального взаимодействия между АФК и NO может быть влияние последнего на активность и экспрессию генов антиоксидантных ферментов. При этом даже прямое действие оксида азота на антиоксидантные ферменты, связано с нитрозилирование и нитрования, может приводить к различным результатам, как к повышению или к снижению активности в условиях *in vivo* умеренное ингибирование антиоксидантов оксидом азота может индуцировать усиление экспрессии их генов и через некоторое время приводить к повышению активности [5].

Доказательства, представленные авторами, подчеркивают роль оксида азота (NO) как антистрессовой молекулы, способной справляться с вызванными УФ-В изменениями в окислительно-восстановительном состоянии клетки. Наша модель предполагает, что восприятие УФ-В вызывает увеличение концентрации абсцизовой кислоты (АБК), что увеличивает H_2O_2 и индуцирует NO. Параллельно УФ-В активирует рецептор УФ-В UVR8. UVR8 стабилизируется эндогенным NO и активирует фактор транскрипции HY5. HY5 может регулировать экспрессию и активность нитратредуктазы, вызывая увеличение NO. NO снижает уровень АФК за счет своей активности поглотителя. Точно так же HY5 также повышает экспрессию CHS и CHI. Это приводит к увеличению содержания флавоноидов и антоцианов, которые способны поглощать УФ-В излучение и улавливать АФК. Кроме того, NO может также регулировать активность антиоксидантной системы (АС) посредством посттрансляционных модификаций антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, пероксидазы, оксидазы и др.

Люцигенин как метод количественного определения супероксидных радикалов. Обнаружение супероксидного радикала в живых клетках – чрезвычайно важно из-за ведущей роли этого радикала в редокс-

сигнализации внутри клетки и в развитии большого числа патологических состояний. В силу высокой чувствительности люцигенина в качестве ХЛ-зонда на супероксидный радикал, люцигенин-активируемая ХЛ (Люц-ХЛ) использовалась для обнаружения $\cdot\text{OO}^-$ при окислении ксантина или гипоксантина ксантинооксидазой, НАДФН цитохром редуктазой микросом, НАДФН-оксидазой клеточфагоцитов, и чувствительными к дифенилениодониуму НАДФН-оксидазами клеток эндотелия, фибробластов и гладкомышечных клеток стенок кровеносных сосудов. Было также предложено использовать Люц-ХЛ для изучения образования $\cdot\text{OO}^-$ [6].

Ранее нами было изучена продукция АФК в клетках дрожжей после УФ-В излучения. Целью данной работы было изучение продукции оксида азота в клетках дрожжей после действия УФ-В излучения.

МАТЕРИАЛЫ 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 NO. Клетки дрожжей облучали при 21°C. Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния УФ-В излучения. Внутриклеточную концентрацию оксида азота мы определяли при помощи флуоресцентного красителя DAF-FM [7]. В суспензию клеток добавляли флуоресцентный краситель в концентрации 5 мкМ и инкубировали в течение 30 минут. После инкубации клеток с красителем интенсивность флуоресценции определяли на спектрофлуориметре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при УФ-В излучении клеток дрожжей изменяется внутриклеточная концентрация оксида азота. При низкой дозе УФ-В лучей ($1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм²) не было существенных отличий в концентрации азота между контрольными и облученными клетками. Концентрация оксида азота в облученных клетках дозами ($2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм²) была 1,2 и 1,5 раза выше соответственно, чем в контроле (рис. 1).

На основании этих данных мы сделали вывод, что УФ-В излучение способствует увеличению продукции оксида азота клетками дрожжей. Но при высоких дозах ($4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²) УФ-В излучения, количество оксида азота уменьшается.

Нами показано, что в клетках дрожжей, облученных этой дозой УФ-В, увеличивается количество супероксидного радикала, установленного хемиллюминесцентным методом по интенсивности хемиллюминесценции люцигенина (рис. 2).

Нами изучена интенсивность хемиллюминесцентной (ХЛ) реакции люцигенина-нитрат бис-N-метилакридиния (Люц++) в клетках дрожжей, подвергнутых воздействию различных доз ультрафиолетовых-В лучей ($1,2 \cdot 10^2$ составляла эрг/мм², $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм², $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²). Исследование супероксидного радикала методом ХЛ характеризует не концентрацию радикалов, а скорость реакции, в которой они образуются. Установлено, что с увеличением дозы УФ-В лучей интенсивность хемиллюминесценции люцигенина и выход ХЛ по сравнению с контролем увеличивается в зависимости от дозы. Выявлено, что после воздействия УФ-лучей активируется NADPH- оксидазный ферментный комплекс в плазматической мембране клеток дрожжей [8].

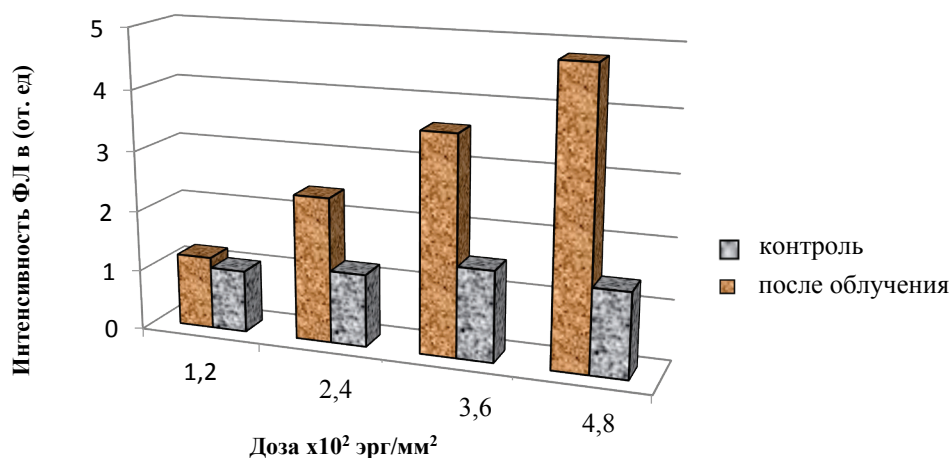


Рисунок 1. Динамика изменения оксида азота в клетках дрожжей после УФ-В излучения

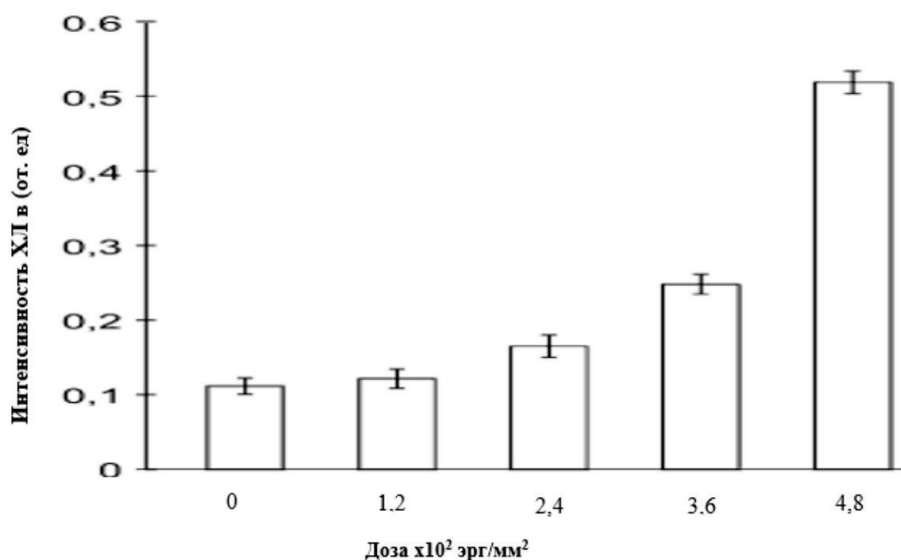


Рисунок 2. Зависимость ХЛ люциферина от дозы УФ-В лучей в клетках дрожжей

Как видно из полученных данных при высоких дозах облучения интенсивность люциферина сохраняется на высоком уровне.

По литературным данным увеличение продукции оксида азота происходит пропорционально поступлению в цитоплазму ионов Ca^{2+} . Главный фактор, инактивирующий оксид азота – супероксидный радикал. В результате его взаимодействия с молекулой NO происходит образование высокоактивных радикалов – нитропероксильного и гидропероксильного.

При истощении своего основного субстрата L-аргинина, NO-синтаза сама может генерировать супероксидный радикал. Оксид азота также участвует в детоксикации супероксида с образованием пероксинитрита (ONOO^-) и перекиси водорода [9]. Таким образом, оксиду азота, в зависимости от конкретных условий, т.е. в зависимости от дозы действующего фактора свойственны повреждающие и защитные функции.

Супероксид-анион и NO являются свободными радикалами кислорода. Они вступают в реакцию, скорость которой в 3 раза быстрее скорости реакции супероксид-аниона с SOD и антиоксидантом. Однако в физиологических условиях эндогенная антиоксидантная защита минимизирует это взаимодействие и поддерживает некий баланс между O_2^- и NO. Сдвиг этого равновесия (при разного рода патологических состояниях) в сторону супероксид-аниона приводит к образованию ONOO^- [10], вызывающего повреждение мембран и ДНК клетки, мутации, апоптоз, способствующего развитию воспалительных процессов, ПОЛ и другим нарушениям. NO увеличивает активность антиоксидантных ферментов и экспрессию кодирующих их генов [11]. NO^\bullet может замедлять ПОЛ, действуя как скавенджер кислородных радикалов. Этот своеобразный антиоксидантный эффект NO^\bullet авторам позволил предположить, что взаимодействие между супероксид-анионом и NO^\bullet может быть биологически важным путем детоксикации потенциально опасных АФК.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что уменьшение количества АФК и оксида азота в клетках дрожжей при дозе $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм² связано с повреждением и гибелью клеток, так как при этой дозе выживаемость клеток составляет 20%.

Список литературы / References:

1. Гудков Л.Л. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота. *Биофизика*, 2007, № 3, вып. 52, с. 503-509 [Gudkov L.L. Anitioksidantnoe i prooksidantnoe dejstvie donorov i metabolitov oksida azota. *Biofizika*, 2007, no. 3, iss. 52, pp. 503-509 (In Russ.)].
2. Малахов В.А. *Проблема оксида азота в неврологии*: монография. Суми: Видавництво СумДПУ им. А.С.Макаренка, 2009, 242 с. [Malahov V.A. *Problema oksida azota v nevrologii*: monografija. Sumi: Vidavnictvo SumDPU im. A.S. Makarenka, 2009, 242 p. (In Russ.)].
3. Маргулис А.Б., Ярулина Д.Р., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Роль внутриклеточных NO и АФК в ответе лактобацилл на сигнальные молекулы бактерий гомосеринлактон и гексилрезорцин. *Уч. Записки Государственного Университета*, 2010, т. 152, кн. 2, с. 137-144 [Margulis A.B., Jarulina D.R., Kolpakov A.I. Il'inskaja O.N. Rol' vnutrikletocnyh NO i AFK v otvete laktobacill na signal'nye molekuly bakterij gomoserinlakton i geksilrezorcin. *Uch. Zapiski Gosudarstvennogo Universiteta*, 2010, vol. 152, iss. 2, pp. 137-144 (In Russ.)].
4. Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е. Активные формы кислорода: Участие в клеточных процессах и развитии патологии. *Биоорганическая химия*, 2020, т. 46, № 5, с. 466-485 [Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tjagunova E.E. Aktivnye formy kisloroda: Uchastie v kletocnyh processah i razvitii patologii. *Bioorganicheseskaja himija*, 2020, vol. 46, no. 5, pp. 466-485 (In Russ.)].
5. Raul Kassiya et al. *Reactive Oxygen Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, pp. 555-572.

6. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная Хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, т. 49, 2009, с. 341-388 [Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. Svobodnye radikaly i kletochnaja Hemiljuminescencija. *Uspehi biologicheskoy himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388 (In Russ.)].
7. Sheng I.Z. DAF-FM (4-Amino- 5 methylamino-2,7- difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, vol. 315, pp. 931-940.
8. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Влияние ультрафиолетовых-В лучей на хемилюминесценцию люцигерина в клетках дрожжей. *Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук*, 2020, № 2, с. 13-19 [Kocharli N.K., Gummatova S.T. Vlijanie ul'trafiol'etovyh-V luchej na hemiljuminescenciju ljucigenina v kletkah drozhzhej. *Vestnik Bakinskogo Universiteta. Serija estestvennyh nauk*, 2020, no. 2, pp.13-19 (In Russ.)].
9. Салей А.П., Рецкий М.И. роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения. *Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация*, 2003, № 1, с. 75-80 [Salej A.P. M.I. Reckij rol' oksida azota v formirovanii motivacionnogo povedenija i obuchenija. *Vestnik VGU. Serija himija, biologija, farmacija*, 2003, no. 1, pp. 75-80 (In Russ.)].
10. Zielonka J. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses. *J. Biol Chem.*, 2012, no. 5, iss. 287, pp. 2984-2995, doi: 10.1074/jbc.M111.309062.
11. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободнорадикального окисления в условиях патологии. *Современные проблемы науки и образования*, 2006, № 6, с. 21-26 [Chesnokova N.P. Molekuljarno-kletochnye mehanizmy indukcii svobodnoradikal'nogo okislenija v uslovijah patologii. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2006, no. 6, pp. 21-26 (In Russ.)].

THE ROLE OF NITRIC OXIDE UNDER THE INFLUENCE OF UV-B RADIATION ON YEAST CELLS

Kocharli N.K., Gummatova S.T.

Baku State University, Department of Biophysics and Biochemistry
Zahid Khalilov Street, 23, Baku, Azerbaijan, e-mail: sam_bio@mail.ru

Received 11.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0581

Abstract. The present work is devoted to the study of nitric oxide production in yeast cells after exposure to UV-B radiation. In addition, a comparative evaluation of the production of reactive oxygen species (ROS) was carried out. The change in the level of ROS was determined using the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-H2DCF•DA. That dye is used to determine the level of ROS in living cells. We determined the intracellular concentration of nitric oxide using a fluorescent dye; -4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM). It was found that under the action of UV-B radiation on cells, depending on the dose, the rate of oxidation of the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF•DA) increases and a high intensity of DCF fluorescence is observed. Under the action of a high dose ($4,8 \cdot 10^2$ erg/mm²) of UV-B rays, the generation of ROS and nitric oxide decreases. As can be seen on the obtained data, at high doses of radiation, the intensity of chemiluminescence of lucigenin remains at a high level.

Key words: reactive oxygen species (ROS), active nitrogen species (ANS), DCF fluorescence, yeast cells, chemiluminescence (CHL).

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА И ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА TYR-SER-LEU

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

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. Захара Халилова, 23, г. Баку, AZ-1048, Азербайджан, e-mail: gulshen@mail.ru
Поступила в редакцию 12.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0582

Аннотация. Методами молекулярного моделирования были исследованы особенности пространственного и электронного строения противоопухолевого трипептида YSL (Tyr-Ser-Leu), разработанного китайскими учеными. Конформационный анализ молекулы выявил ограниченный набор ее энергетически предпочтительных конформационных состояний в определенном интервале относительной энергии. Была определена природа сил, стабилизирующих низкоэнергетические конформации молекулы трипептида. В результате исследования были также определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов, величины энергетических вкладов межстаточных взаимодействий и водородных связей, а также взаимное расположение остатков и их боковых цепей в низкоэнергетических конформациях трипептида. Методами молекулярной механики были получены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекулы. На основе квантово-химических расчетов были определены распределение электронной плотности и величины дипольных моментов наиболее оптимальных пространственных структур молекулы трипептида YSL. Квантово-химическими расчетами также была исследована реакционная способность трипептида на основе полученных электронных характеристик каждой низкоэнергетической конформации молекулы. Используя рассчитанные координаты атомов энергетически предпочтительных структур молекулы, были построены их молекулярные модели, сопоставление которых дает возможность выделить структурные критерии, необходимые для создания лекарственного препарата пригодного для клинического использования.

Ключевые слова: противоопухолевый агент, трипептид, конформация, метод молекулярной механики, квантово-химические расчеты.

Рак является одной из ведущих причин смерти во всем мире. Обычные методы лечения рака в основном сосредоточены на массовом уничтожении клеток без высокой специфичности и это вызывает серьезные побочные эффекты и токсичность. Пептиды представляют собой новый класс противоопухолевых агентов, которые могут целенаправленно воздействовать на раковые клетки с меньшей токсичностью по отношению к нормальным тканям, что открывает новые возможности для профилактики и лечения рака. В работе [1] китайскими учеными было изучено ингибирующее действие небольшого пептида, Tyr-Ser-Leu (tyroserleutide, YSL), на гепатокарциному человека BEL-7402, как антиопухолевого агента. Мышам с ксенотрансплантатами человеческой гепатомы BEL-7402 ежедневно вводили внутривенно инъекции YSV или физиологического раствора (в качестве контроля) после трансплантации опухоли. Подсчет объема опухоли и измерение массы опухоли определяли степень ингибирования ксенотрансплантатов. Ультраструктуру опухолевых клеток наблюдали с помощью электронной микроскопии. Было также показано, что YSL может значительно ингибировать рост гепатокарциномы человека BEL-7402 у мышей и индуцировать апоптоз опухолевых клеток [2]. Трипептид состоит из трех природных аминокислот: L-тирозина, L-серина и L-лейцина с соответствующей химической структурой C₁₈H₂₇N₃O₆. L-тирозин – это оптически изомерная форма ароматической аминокислоты – тирозина. Эта аминокислота участвует в липидном обмене, регулирует аппетит, улучшает синтез меланина, нормализует работу надпочечников, гипофиза, щитовидной железы. Аминокислота L тирозин относится к заменимым, так как вырабатывается в организме. L-серин заменимая аминокислота, вырабатывается из треонина и глицина, присутствует во всех клеточных мембранах, при этом в большом количестве. Эта аминокислота является важнейшей составляющей клеток мозга, миелиновых оболочек, которые выполняют функцию защиты нервных клеток от различного рода повреждений. L-лейцин незаменимая алифатическая аминокислота с разветвленной цепочкой, а своим объемом одна из самых больших аминокислот. Лейцин защищает мышечные ткани и является источником энергии, а также способствует восстановлению костей, кожи, мышц. Молекулярная масса YSL составляет 381,42. Было документально подтверждено, что YSL ингибирует рост опухоли как *in vitro*, так и *in vivo* [4,5].

В настоящей работе с целью выяснения механизма действия противоопухолевого трипептида и стратегии модификации его для улучшения противораковых эффектов мы исследовали его конформационные свойства и параметры электронной структуры. Как известно флуктуации полярных групп в пределах пептидной молекулы в зависимости от заряда, электростатического поля или конформационного изменения играют важную роль в определении структуры и связывающих свойств молекулы. Было показано, что флуктуации атомных зарядов при конформационных изменениях достигают нескольких десятых единиц заряда электрона. Этот эффект является одним из проявлений электронно-конформационного взаимодействия и может вносить существенный вклад в изменение энергии взаимодействия между функциональными группами и в изменение реакционной способности

молекулы. В этом случае распределение электронной плотности и дипольный момент пептида зависят от его конформационного состояния и, следовательно, могут быть полезными как показатели его геометрии и конформационного поведения. С этой точки зрения определенным интересом представляет исследование пространственного и электронного строения относительно небольших пептидов, содержащих в своей последовательности полярные остатки, а также способных в свободном состоянии производить биологический эффект.

В данной работе расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [6]. 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. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов φ и ψ . Углы φ и ψ основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей стерической карты: R ($\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных трипептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (φ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида [6]. Отсчет двугранных углов вращения φ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [7]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [8]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [8]. Электронное строение молекул трипептидов изучалось с помощью полуэмпирического метода квантовой химии AM1, позволяющего количественно оценить суммарное влияние структурных изменений на распределение электронной плотности молекулы в целом и в любой ее части. Расчеты электронной структуры проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [9], позволяющего проводить квантово-химические расчеты молекул методом AM1.

В данной работе сначала методом молекулярной механики были определены низкоэнергетические конформационные состояния исследуемого пептида и выявлены их конформационные характеристики. В результате расчетов были получены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекулы. На следующем этапе исследования методом квантово-химических расчетов были определены электронные характеристики, распределения электронной плотности, электростатические потенциалы и величины дипольных моментов молекулы в низкоэнергетических конформационных состояниях.

На основе полученных результатов были определены энергетические и электронные характеристики наиболее оптимальных пространственных структур молекулы трипептида YSL. Используя расчетные координаты атомов молекулы, были построены молекулярные модели наиболее стабильных конформаций трипептида. На рисунке 1 приведены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформаций молекулы трипептида YSL, распределение электронной плотности и электростатический потенциал соответствующих конформеров.

Определение пространственного строения противоопухолевого трипептида YSL проводилось путем минимизации потенциальной энергии выбранных конформационных состояний, исходя из особенностей, составляющих его аминокислотных остатков. При составлении структурных вариантов трипептида ориентации боковых цепей остатков брались с учетом оптимальных межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в конформационных состояниях молекулы. В результате расчетов было определено, что в слабополярной среде трипептид предпочтительно формирует похожие стабильные полностью свернутые структуры. Было показано, что энергетически предпочтительная конформация трипептида стабилизируется эффективными дисперсионными взаимодействиями с образованием водородной связи между атомами карбоксильной группы C-терминальной части и N-концевой аминогруппы. Во всех стабильных конформациях трипептида реализуются эффективные дисперсионные и электростатические взаимодействия между атомами концевых аминокислотных остатков. Наиболее значимый энергетический вклад между концевыми остатками реализуется в полностью свернутой структуре, и он составляет -8,6 ккал/моль. Такие межостаточные взаимодействия сопровождаются образованием стабильных водородных связей. Все эти конформации с образованной водородной связью между атомами концевых остатков могут считаться квазициклическими структурами трипептида. В таблице 1 приведены энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в наиболее низкоэнергетических конформациях молекулы. Из таблицы 1 следует, что существенный энергетический вклад в стабилизацию структур трипептида YSL вносят дисперсионные взаимодействия. В таблице 2 представлены величины двугранных углов аминокислотных остатков молекулы YSL в низкоэнергетических конформациях. Результаты квантово-химических расчетов представлены в таблице 3. Распределение атомного парциального заряда, определялось как сумма молекулярных орбитальных плотностей, каждая из которых является квадратом орбитальной волновой функции. В данной работе определялось как распределение заряда молекулы может быть связано с ее реакционной способностью. Распределение атомного парциального заряда устойчивой конформации молекул позволяет прогнозировать взаимосвязь их реакционной способности с отдельными областями молекулы. Здесь мы будем рассматривать только само распределение заряда, оставив пока в стороне обсуждение внутримолекулярных электростатических и поляризационных энергий и их связи с энергиями межмолекулярного взаимодействия. При расчете электронной структуры молекулы трипептида суммарный заряд системы брался равным нулю, для трипептида учитывалось число

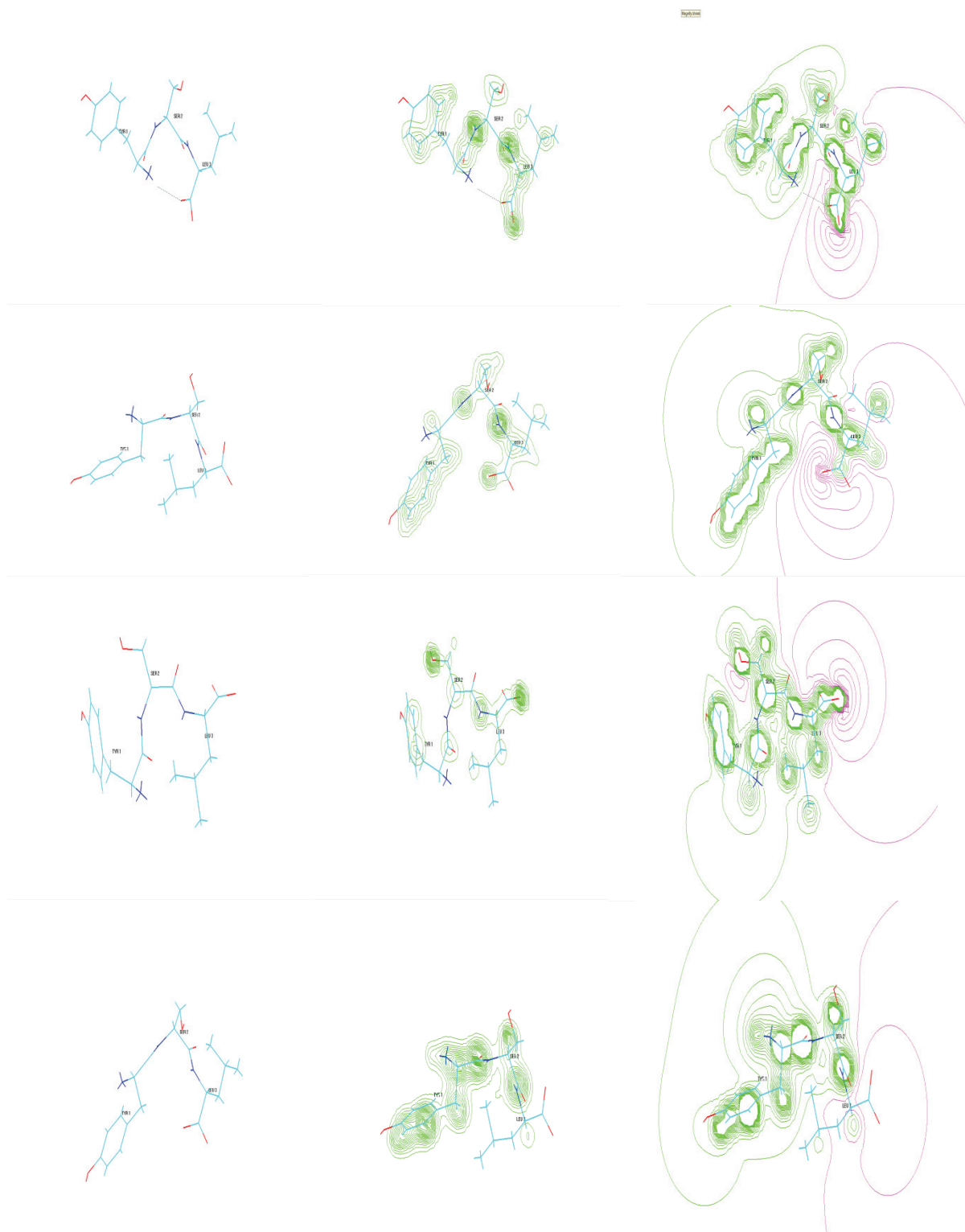


Рисунок 1. Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур трипептида YSL, распределение электронной плотности и электростатический потенциал соответствующих конформеров

электронов, количество заселенных уровней и исходное число орбиталей. Расчеты показывают высокую электронную плотность вблизи атомов кислорода карбонильной группы, расположенной в пептидной цепи между двумя остатками Pro и самые большие отрицательные заряды в трипептиде сконцентрированы на атомах кислорода карбонильной группы и атомах азота аминогруппы. По всей видимости, наличие в трипептиде полярных пептидных групп может играть существенную роль в их реакционной способности, т.е. биологической активности. Анализ зарядовых характеристик и электронной плотности на атомах пептидных групп молекулы трипептида позволяет сделать вывод, что большей электронодонорной способностью обладают атомы кислорода карбонильной группы по сравнению с ее другими атомами, т.е. наличие пептидных групп играет существенную

Таблица 1. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в наиболее стабильных конформациях молекулы YSL

| № | Конформация | Энергетические вклады, ккал/моль | | | | |
|----|---------------|----------------------------------|----------|------------|------------|-----------|
| | | $E_{нев}$ | $E_{эл}$ | $E_{торс}$ | $E_{полн}$ | $E_{отн}$ |
| 1. | $R_2 R_3 R_3$ | -9,9 | 0,2 | 3,1 | -6,6 | 0 |
| 2. | $B_3 R_1 B_3$ | -9,5 | 2,3 | 1,4 | -5,6 | 1 |
| 3. | $B_3 B_3 B_3$ | -10,2 | 2,8 | 1,9 | -5,5 | 1,1 |
| 4. | $R_2 B_3 B_3$ | -8,9 | 1,7 | 1,9 | -5,3 | 1,3 |

Таблица 2. Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков молекулы YSL. в низкоэнергетических конформациях I – $R_2 R_3 R_3$ ($E_{отн} = 0$ ккал/моль), II – $B_3 R_1 B_3$ ($E_{отн} = 1,0$ ккал/моль), III – $B_3 B_3 B_3$ ($E_{отн} = 1,5$ ккал/моль), IV- $R_2 B_3 B_3$ ($E_{отн} = 1,7$ ккал/моль)

| Конформеры | Аминокислота | Основная цепь | | | Боковая цепь | | | |
|---------------|--------------|---------------|--------|----------|--------------|----------|----------|----------|
| | | φ | ψ | ω | χ_1 | χ_2 | χ_3 | χ_4 |
| $R_2 R_3 R_3$ | TYR | -47 | -61 | 166 | 177 | 85 | 180 | - |
| $B_3 R_1 B_3$ | | -74 | 167 | 176 | -60 | 98 | 179 | - |
| $B_3 B_3 B_3$ | | -63 | 162 | 179 | -61 | 101 | 179 | - |
| $R_2 B_3 B_3$ | | -70 | -70 | 178 | 169 | 64 | 179 | - |
| $R_2 R_3 R_3$ | SER | -71 | -54 | 166 | 57 | 179 | - | - |
| $B_3 R_1 B_3$ | | -79 | -59 | 178 | 56 | 178 | - | - |
| $B_3 B_3 B_3$ | | -82 | 83 | 183 | -60 | 180 | - | - |
| $R_2 B_3 B_3$ | | -81 | 76 | 184 | -62 | 180 | - | - |
| $R_2 R_3 R_3$ | LEU | -86 | 49 | 180 | -52 | 177 | 186 | 180 |
| $B_3 R_1 B_3$ | | -105 | 163 | 180 | -50 | 174 | 185 | 180 |
| $B_3 B_3 B_3$ | | -106 | 162 | 180 | -49 | 176 | 185 | 180 |
| $R_2 B_3 B_3$ | | -103 | 171 | 180 | -48 | 178 | 185 | 180 |

Таблица 3. Электронные характеристики в энергетически предпочтительных конформациях трипептидной молекулы Tyr-Ser-Leu

| Конформация | Полная энергия | Энергия связывания | Энергия изолированных атомов | Электронная энергия | Энергия взаимодействия ядер | Суммарный дипольный момент (Debye) |
|---------------|----------------|--------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| $R_2 R_3 R_3$ | -120299 | -5312 | -114986 | -968094 | 847795 | 20 |
| $B_3 R_1 B_3$ | -120244 | -5257 | -114986 | -955210 | 834965 | 36 |
| $B_3 B_3 B_3$ | -120224 | -5237 | -114986 | -985569 | 865345 | 32 |
| $R_2 B_3 B_3$ | -120279 | -5292 | -114986 | -952605 | 832326 | 26 |

роль в реакционной способности молекулы. В настоящее время известно, что если в молекуле пептида отсутствуют другие координационно-активные заместители, то в качестве акцептора протона при образовании комплексов выступает карбонильный кислород. Связь C=O пептидной группы является эффективным акцептором протонов, обладает высокой химической активностью и способностью к образованию межмолекулярных комплексов. Сравнение рассчитанных величин дипольных моментов стабильных конформаций трипептида, согласно таблице 3, показывает, что более высоким дипольным моментом обладает полусвернутая конформация, а меньшее значение у полностью свернутой конформации, что вероятно связано с различиями структуры пептидного остова.

Расчет показал, что данные структурно похожие конформации трипептида формируют практически идентичные пространственные конформации, различающиеся лишь ориентацией боковых цепей отдельных остатков. Полученные величины энергетических и электронных параметров наиболее стабильных конформаций трипептида дают представление о предпочтительной пространственной структуре молекулы. В результате расчетов были определены и сопоставлены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекулы. Полученные характеристики пространственной и электронной структуры противоопухолевого трипептида могут способствовать

целенаправленному поиску эффективных аналогов молекул в качестве лекарственных препаратов для стимулирования или блокирования конкретного физиологического воздействия в лечении ряда раковых заболеваний.

Список литературы / References:

1. Wang C., Wang S., Lu R., Zhao L., Zhu Z.F., Xu Q., Lv J.Q., Wang L.L., Fu Z., Lin G., Yao Z. Effects of a novel tripeptide, tyrosyleutide (YSL), on cell cycle progression of human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*, 2009, vol. 20, no. 7, pp. 534-42, doi: 10.1097/CAD.0b013e32832ced93.
2. Wang H.Y., Yi W.J., Qin S.Y., Li C., Zhuo R.X., Zhang X.Z. Tyrosyleutide-based gene vector for suppressing VEGF expression in cancer therapy. *Biomaterials*, 2012, vol. 33, no. 33, pp. 8685-8694, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.022.
3. Fu Z., Lu R., Li G., Zhao L., Gao W., Che X., Jian X., Zhou C., Yao Z. Tyrosyleutide tripeptide affects calcium homeostasis of human hepatocarcinoma BEL-7402 cells. *Sci. China C Life Sci.*, 2005, vol. 48, no. 5, pp. 523-530.
4. Lu R., Jia J., Bao L., Fu Z., Li G., Wang S., Wang Z., Jin M., Gao W., Yao Z. Experimental study of the inhibition of human hepatocarcinoma Bel7402 cells by the tripeptide tyrosyleutide(YSL). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2006, vol. 57, no. 2, pp. 248-256.
5. Ding W., Zhang J., Yao Z., Lu R., Wu D., Li G., Shen Z., Sun Y., Lin G., Wang C., Zhao M., Peng S. The synthesis, distribution, and anti-hepatic cancer activity of YSL. *Bioorg Med Chem.*, 2004, vol. 12, no. 18, pp. 4989-4994.
6. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокинина-1 человека и гемокинина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470 [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Gojaev N.M. Features of the spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biophysics*, 2015, vol. 60, iss. 3, pp. 457-470 (In Russ.)].
7. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
8. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, т. 24, № 4, 1983, с. 147-148 [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Gojaev N.M. The program of semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, vol. 24, no. 4, 1983, pp. 147-148 (In Russ.)].
9. Chem 3D Pro, "Molecular Modeling and Analysis", Cambridge Soft Corporation, 875 Massachusetts, 02139 U.S.A (2005)

CONFORMATIONAL PROPERTIES AND ELECTRONIC STRUCTURE OF ANTITUMOR AGENT TYR-SER-LEU

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

Institute for Physical Problems, Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ-1048, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

Received 12.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0582

Abstract. Molecular modeling methods were used to study the features of the spatial and electronic structure of the antitumor tripeptide YSL (Tyr-Ser-Leu), developed by Chinese scientists. The conformational analysis of the molecule revealed a limited set of its energetically preferable conformational states in a certain range of relative energy. The nature of the forces stabilizing the low-energy conformations of the tripeptide molecule was determined. As a result of the study, the energetically preferable ranges of dihedral angles, the energy contributions of interresidual interactions and hydrogen bonds, as well as the mutual arrangement of residues and their side chains in low-energy conformations of the tripeptide were also determined. Using the methods of molecular mechanics, the energy contributions of intramolecular interactions in low-energy conformational states of the molecule were obtained. Based on quantum-chemical calculations, the distribution of electron density and the values of dipole moments of the most optimal spatial structures of the YSL tripeptide molecule were determined. The reactivity of the tripeptide was also studied by quantum chemical calculations based on the obtained electronic characteristics of each low-energy conformation of the molecule. Using the calculated coordinates of the atoms of the energetically preferable structures of the molecule, their molecular models were built, the comparison of which makes it possible to identify the structural criteria necessary to create a drug suitable for clinical use.

Key words: antitumor agent, tripeptide, conformation, molecular mechanics method, quant-chemical calculations.

ЭЛЕКТРОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ БЕТА-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА (25-35)

Агаева Г.А.¹, Наджафова Г.З.²

¹ Институт физических проблем, Бакинский государственный университет
ул. Захара Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан

² Азербайджано-Французский Университет УФАЗ
ул. Низами, 183, г. Баку, AZ-1010, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0583

Аннотация. Методами молекулярного моделирования исследованы электронные характеристики стабильных конформационных состояний бета-амилоидного пептида (25-35). Бета-амилоидный пептид (A β) является основным компонентом сенильных бляшек, обнаруживаемых в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. A β (25-35) фрагмент молекулы с аминокислотной последовательностью Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met. Показано, что конформационные особенности молекулы во многом определяются ее окружением, поэтому целью настоящей работы было изучение различий конформаций бета-пептида амилоида (25-35) в вакууме и в слабополярной среде методами молекулярной механики и квантово-химических расчетов. Исследования были проведены в два этапа: 1) определены геометрические и энергетические параметры низкоэнергетических конформационных состояний указанного пептида, 2) рассчитаны электронные характеристики установленных низкоэнергетических конформаций данных молекулы. Расчеты показали, что конформационное поведение этого пептида может быть описано набором подобных низкоэнергетических конформаций, имеющих α -спиральную структуру на C-концевой последовательности. Было показано также, что низкоэнергетические структуры амилоидного бета-пептида (25-35) обладают наиболее благоприятными дисперсионными контактами и, следовательно, можно ожидать, что они станут наиболее предпочтительными в слабополярной среде, когда электростатические взаимодействия не играют существенной роли. Были также исследованы допустимые изменения значений двугранных углов амилоидного бета-пептида (25-35) в энергетически предпочтительной конформации и стабильность элементов вторичной структуры. Были получены и сопоставлены распределение электронной плотности и эквипотенциальные поверхности в энергетически предпочтительных конформациях бета-амилоидного пептида (25-35). Квантовохимический расчет показал, что наиболее большие отрицательные заряды в пептиде сконцентрированы именно на атомах кислорода карбонильных групп и атомах азота аминогруппы. Были получены и сопоставлены распределение электронной плотности и эквипотенциальные поверхности в энергетически предпочтительных конформациях бета-амилоидного пептида (25-35).

Ключевые слова: бета-амилоидный пептид (25-35), квантово-химический расчет, метод молекулярной механики, конформация.

Знание конформационного поведения биологически активных пептидов позволяет более рационально исследовать механизм действия и структурно-функциональные связи этих молекул. Бета-амилоидный пептид (A β) является основным компонентом сенильных бляшек, обнаруживаемых в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. A β (25-35) фрагмент молекулы с аминокислотной последовательностью Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met, которая содержит как гидрофильные, так и гидрофобные остатки, является биологически активным фрагментом A β [1-3].

Под термином "пространственное строение" подразумевают положение в пространстве ядер атомов, составляющих данную молекулу. Как известно, положение же электронов, т.е. распределение электронной плотности в молекуле, называют электронным строением. Очевидно, что пространственное и электронное строение молекулы тесно взаимосвязаны: при изменении положения ядра меняется электронное строение. Перемещение одних атомных групп относительно других меняет электронное распределение и геометрические параметры, в результате меняется характер взаимодействия и функциональные свойства молекулы. Химическая реакция является наиболее важной предпосылкой для определения структурно-функциональных взаимосвязей, и, следовательно, электронная структура пептидной молекулы, содержащей как полярные, так и неполярные радикалы, является ключом для продуктивного пептид-рецепторного взаимодействия. Перемещение полярных групп в пределах пептидной молекулы в зависимости от заряда, электростатического поля или конформационного изменения играют важную роль в определении структуры и связывающих свойств молекулы. Было показано, что перемещение атомных зарядов при конформационных изменениях достигают нескольких десятых единиц заряда электрона. Этот эффект является одним из проявлений электронно-конформационного взаимодействия и может вносить существенный вклад в изменение энергии взаимодействия между функциональными группами и в изменение реакционной способности молекулы. Электронное строение молекулы бета-амилоидного пептида (25-35) изучалось с помощью полуэмпирического метода квантовой химии AM1, позволяющего количественно оценить суммарное влияние структурных изменений на распределение электронной плотности молекулы в целом и в любой ее части. С помощью этого комплекса

программ строились карты распределения электростатического потенциала, а также карты зарядовой плотности. Для установления пространственного строения исследуемого пептида в работе использовался метод молекулярной механики.

Для реализации поставленной цели необходимо решение задачи, которая предусматривает анализ полученных квантово-химическим методом величин, характеризующих электронное строение исследуемой молекулы – эффективных зарядов и электронных плотностей на атомах, энергетических характеристик и дипольных моментов. Кроме этого, интересно было проследить изменение перечисленных параметров α , следовательно, и протоноакцепторной способности потенциального реакционного центра в молекуле в зависимости от электронной природы растворителя и конформационной перестройки. Исследования были проведены в два этапа: 1) определены геометрические и энергетические параметры низкоэнергетических конформационных состояний указанного пептида, 2) рассчитаны электронные характеристики установленных низкоэнергетических конформаций данной молекулы. Исследование конформационных возможностей пептида (25-35) проводилось фрагментарно. В таблице 1 приведены величины относительной энергии стабильных структур в отдельных фрагментах $\text{A}\beta$ (25-35) пептида. Как видно из таблицы практически все С-концевые последовательности, кроме N-концевого тетрапептида, энергетически предпочтительно формируют спиральные структуры. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов φ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов φ и ψ . Углы φ и ψ основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей стерической карты: R ($\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [4]. Отсчет двугранных углов вращения φ, ψ, ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [5]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [6]. Расчеты электронной структуры проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [7], позволяющего проводить квантово-химические расчеты молекул методом AM1.

Полученные расчеты показали, что пространственная структура этого пептида имеет тенденцию принимать α -спиральную конформацию от Lys28 до Met35. Ряд спектральных исследований показывают, что этот пептид имеют альфа-спиральные структуры в своих С-концевых областях. Показано, что конформационные особенности молекулы во многом определяются ее окружением, поэтому целью настоящей работы было изучение различий конформаций бета-пептида амилоида (25-35) в вакууме и в слабополярной среде методами молекулярной механики и квантово-химических расчетов. Расчеты показали, что конформационное поведение

Таблица 1. Величины относительной энергии стабильных структур в отдельных фрагментах $\text{A}\beta$ (25-35) пептида

| Gly-Ser-Asn-Lys тетрапептид | | Lys-Gly-Ala-Ile тетрапептид | |
|--|----------------------------------|---|----------------------------------|
| Форма пептидной цепи | Относительная энергия(kcal/mol) | Форма пептидной цепи | Относительная энергия (kcal/mol) |
| RRBB | 0,0 | RRRR | 0,0 |
| BRBB | 1,1 | BRRR | 1,0 |
| RRRR | 2,4 | BBRR | 1,9 |
| BBBB | 2,7 | RBRR | 2,0 |
| RBBB | 2,8 | RBBB | 2,4 |
| BRRR | 2,9 | BRBB | 2,8 |
| RBRR | 3,2 | RRRR | 3,0 |
| BBRR | 3,2 | RRBB | 3,7 |
| | | | |
| Ile-Ile-Gly-Leu-Met пентапептид | | Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met октапептид | |
| Форма пептидной цепи | Относительная энергия (kcal/mol) | Форма пептидной цепи | Относительная энергия(kcal/mol) |
| RRRRR | 0,0 | RRRRRRR | 0,0 |
| RRBRR | 3,0 | BRRRRRR | 1,6 |
| BRBBB | 3,1 | BBRRRRR | 5,4 |
| RBBRR | 3,1 | RBRRRRR | 6,6 |
| BRBRR | 3,6 | RLRRRRR | 7,1 |
| RBBBB | 3,7 | RRRBRRR | 7,3 |
| RBBBBR | 3,8 | BRBRRRR | 8,0 |
| BBBBB | 4,6 | BRRBRBR | 8,2 |

этого пептида может быть описано набором подобных низкоэнергетических конформаций, имеющих α -спиральную структуру на С-концевой последовательности. Было показано также, что низкоэнергетические структуры амилоидного бета-пептида (25-35) обладают наиболее благоприятными дисперсионными контактами и, следовательно, можно ожидать, что они станут наиболее предпочтительными в слабополярной среде, когда электростатические взаимодействия не играют существенной роли. Были также исследованы допустимые изменения значений двугранных углов амилоидного бета-пептида (25-35) в энергетически предпочтительной конформации и стабильность элементов вторичной структуры.

В представленной работе было исследовано как распределение заряда молекулы может быть связано с ее конформационными возможностями. Распределение атомного парциального заряда устойчивой конформации молекулы позволяет также прогнозировать взаимосвязь ее структурной и реакционной способности. На рис. 1(a) представлены энергетически предпочтительных конформаций молекулы. Как видно из рисунка в самой стабильной конформации молекулы образуется устойчивая водородная связь: Pe7CO...HNMet11 . Электростатический потенциал молекулы часто позволяет интерпретировать электрофильные и нуклеофильные свойства молекулы в основном и электронно-возбужденном состояниях. Электростатический потенциал чувствителен даже к малым изменениям молекулярной структуры. В последние годы это привело к использованию электростатического потенциала молекулы в качестве показателей реакционной и селективной способности молекулы. Области отрицательного потенциала обозначены пунктирными линиями, положительного потенциала – сплошными линиями. Сопоставление электростатического потенциала стабильных конформаций пептида (рис. 1) показало, что конформационные перестройки N-концевого участка молекулы, приводят к оттоку электростатического потенциала от N-конца на периферию молекулы. Из-за этого электростатический потенциал молекулы в С- конце пептида становится менее отрицательным, и форма его изменяется. Квантовохимический расчет показал, что наиболее большие отрицательные заряды в пептиде сконцентрированы именно на атомах кислорода карбонильных групп и атомах азота аминокетильной группы. На рисунке 1 приведены также распределение электронной плотности и эквипотенциальная поверхность в энергетически предпочтительных конформациях бета-амилоидного пептида (25-35). Поскольку предварительно, с помощью метода молекулярной механики были изучены конформационные возможности исследуемого пептида, определяющиеся в основном углами вращения вокруг связей, которые использовались в качестве исходных геометрических параметров для пептида. В таблице 2 приведены величины электронных характеристик для конформаций молекулы, рассчитанные по методу AM1. Как видно из таблицы 2, величины электронные характеристики распределения зарядов в отдельных случаях одинаковы, да и сами значения зарядов практически не меняются. Поэтому в дальнейшем расчеты проводились только с оптимизацией геометрических параметров заместителя бензольного кольца, тем самым прослеживая влияние другого заместителя на распределение электронной плотности бензольного кольца. При квантово-химическом расчете бета-амилоидного пептида (25-35) суммарный заряд системы был равен нулю, учитывалось 417 электронов, количество заселенных уровней 207 и исходное число орбиталей – 374.

Спиральные конформации пептида реализуются взаимодействием пептидных групп остова, т.е. орбиталями карбонильной группы и неподеленных электронных пар атомов азота и кислорода, что приводит к высокой полярности таких молекул и лабильности их электронного строения при перемещении и под влиянием межмолекулярных взаимодействий. Наличие в молекуле пептида двух потенциально реакционноспособных центров – атома кислорода карбонильной группы и атома азота аминокетильной группы – позволяет им в принципе образовывать два типа связей с молекулами донорами протона. На стабильность образующихся соединений значительно влияет делокализованная р-электронная система амидов $-\text{NH}_2$, способная перераспределять заряд на карбонильную группу – $\text{C}=\text{O}$ молекулы. В настоящее время известно, что если в молекуле пептида отсутствуют другие координационно-активные заместители, то в качестве акцептора протона при образовании комплексов выступает карбонильный кислород. Связь $\text{C}=\text{O}$ пептидной группы является эффективным акцептором протонов, обладает высокой химической активностью и способностью к образованию межмолекулярных комплексов. Расчеты показывают высокую электронную плотность вблизи атомов кислорода.

Результаты исследований показали, что предпочтительными конформациями бета-амилоидного пептида (25-35) являются пространственные структуры со стабильным спиральным участком в С-концевой части молекулы. Наши теоретические результаты могут быть важны для разработки состава и концентрации раствора для предупреждения отложения амилоида, наблюдаемого у пациентов с болезнью Альцгеймера. Эти результаты будут иметь значение для изучения того, как изменить условия для принятия необходимой конформации $\text{A}\beta_{25-35}$.

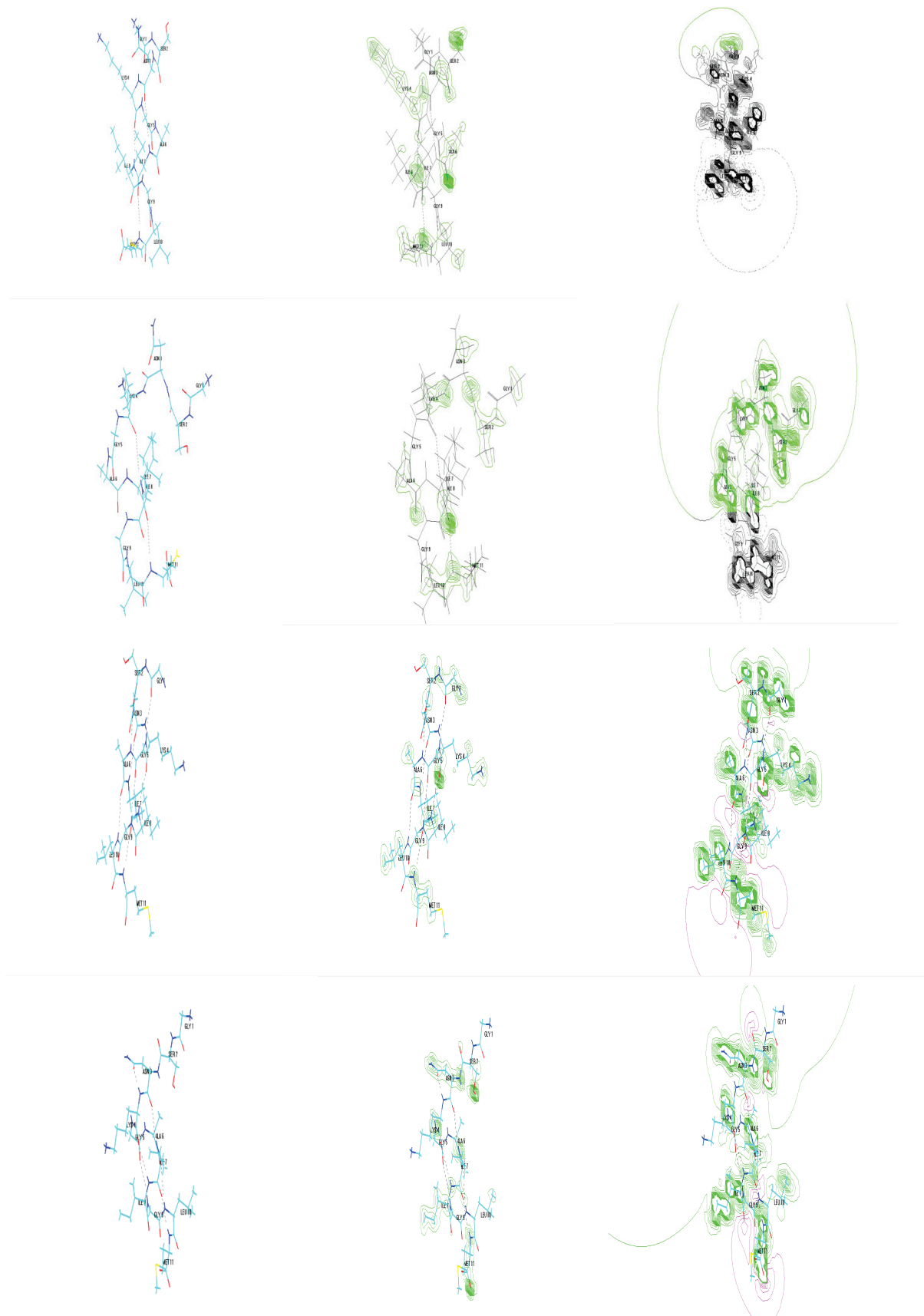


Рисунок 1. Молекулярные модели четырех энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур бета-амилоидного пептида (25-35), распределения парциальных зарядов и электростатического потенциала соответственно

Таблица 2. Электронные характеристики в энергетически предпочтительных конформациях молекулы бета-амилоидного пептида (25-35)

| Конформация | Полная энергия | Энергия связывания | Энергия изолированных атомов | Электронная энергия | Энергия взаимодействия ядер | Суммарный дипольный момент (Debye) |
|-------------|----------------|--------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Конформер1 | -328730 | -14648 | -314082 | -5036778 | 4708048 | 39 |
| Конформер2 | -328730 | -14637 | -314082 | -5078596 | 4749876 | 27 |
| Конформер3 | -328602 | -14520 | -314082 | -4916048 | 4587446 | 33 |
| Конформер4 | -320702 | -14435 | -304082 | -4847421 | 4526719 | 42 |

Список литературы / References:

1. Beyreuther K., Masters C.L. Alzheimer's disease: the ins and outs of amyloid. *Nature*, 1997, vol. 389, pp. 677-678.
2. Kohno T., Kobayashi K., Maeda T., Sato K., Takashima A. Three-dimensional structures of the amyloid β -peptide (25–35) in membrane-mimicking environment. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 16094-16104.
3. Shanmugam G., Jayakumar R. Structural analysis of amyloid beta peptide fragment (25-35) in different microenvironments. *Biopolymers*, 2004, vol. 76, pp. 421-434.
4. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокинина-1 человека и гемокинина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470 [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Gojaev N.M. Features of the spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biophysics*, 2015, vol. 60, iss. 3, pp. 457-470. (In Russ.)].
5. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
6. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148 [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Gojaev N.M. The program of semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148 (In Russ.)].
7. Chem 3D Pro, "Molecular Modeling and Analysis", Cambridge Soft Corporation, 875 Massachusetts, 02139 U.S.A (2005).

ELECTRONIC PARAMETERS OF CONFORMATIONAL STATES OF ABETA-AMYLOID PEPTIDE (25-35)Agaeva G.A.¹, Najafova G.Z.²¹ Institute for Physical Problems, Baku State University
Z. Khalilov str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan² French-Azerbaijan University – (UFAZ) under Azerbaijan State Oil and Industry University
Nizami str. 183, Baku, AZ1010, Azerbaijan, e-mail: gulshen@mail.ru

Received 12.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0583

Abstract. The electronic characteristics of stable conformational states of beta-amyloid peptide (25-35) have been studied by molecular modeling methods. Beta-amyloid peptide ($A\beta$) is the main component of senile plaques found in the brains of patients with Alzheimer's disease. $A\beta$ (25-35) fragment of a molecule with the amino acid sequence Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met. It has been shown that the conformational features of a molecule are largely determined by its environment; therefore, the aim of this work was to study the differences in the conformations of amyloid beta-peptide (25-35) in vacuum and in a low-polarity medium using the methods of molecular mechanics and quantum chemical calculations. The studies were carried out in two stages: 1) the geometric and energy parameters of the low-energy conformational states of the indicated peptide were determined, 2) the electronic characteristics of the established low-energy conformations of these molecule were calculated. Calculations showed that the conformational behavior of this peptide can be described by a set of similar low-energy conformations with structure on the C-terminal sequence. It has also been shown that the low-energy structures of the amyloid beta-peptide (25-35) have the most favorable dispersion contacts and, therefore, it can be expected that they will become most preferable in a low-polarity environment, when electrostatic interactions do not play a significant role. Permissible changes in the dihedral angles of the amyloid beta-peptide (25-35) in the energetically preferred conformation and the stability of secondary structure elements were also investigated. The distribution of electron density and equipotential surfaces in the energetically preferred conformations of the beta-amyloid peptide were obtained and compared (25-35). Quantum chemical calculations showed that the largest negative charges in the peptide are concentrated precisely on the oxygen atoms of the carbonyl groups and the nitrogen atoms of the amino group. The distribution of electron density and equipotential surfaces in the energetically preferred conformations of the beta-amyloid peptide (25-35) were obtained and compared.

Key words: beta-amyloid peptide (25-35), quant-chemical calculations method, molecular mechanics method, conformation.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛИПРОЛИНОВОЙ ГЕКСАПЕПТИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ

Исмаилова Л.И., Ахмедов Н.А.

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

Поступила в редакцию 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0584

Аннотация. Компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, которые позволяют получать графическое изображение пространственных структур биомолекул, было выполнено для гексапептидной молекулы – глипролина H-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro-OH. Глипролины – это короткие пептиды, аминокислотные последовательности которых содержат остатки глицина и пролина. Механизмы их действия в настоящее время мало изучены. С помощью метода молекулярной механики было определено пространственное строение и конформационные возможности этой гексапептидной молекулы. Ее потенциальная энергия оценивалась как сумма невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Было найдено 9 низкоэнергетических структур для глипролинового гексапептида, значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу. Была оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для гексапептида являются свернутые формы основной цепи. В них боковые цепи аминокислот фенилаланинов и пролина, которые являются конформационно жесткими, осуществляют эффективные взаимодействия со всеми участками гексапептидной молекулы.

Ключевые слова: структура, конформация, гексапептид, молекула.

Пептидные молекулы определяют функционирование всех биологических процессов, которые происходят в живых организмах. Понять их механизмы действия можно, если решить задачу структурно-функциональной организации пептидов. Поэтому изучение трехмерной структуры пептидных молекул, изменения их конформационных возможностей при взаимодействии с другими молекулами является актуальной проблемой молекулярной биофизики. При создании новых лекарственных препаратов исследователи все чаще обращаются к использованию собственных ресурсов человеческого организма – пептидным молекулам. Для этих молекул характерна малая токсичность и отсутствие побочных эффектов. Выяснение структурно-функциональных свойств этих пептидов имеет большое прикладное значение в медицине и фармакологии.

В настоящее время открываются новые семейства пептидов, изучаются их свойства. Одним из таких семейств являются глипролины – короткие линейные пептиды, аминокислотные последовательности которых включают остатки глицина (Gly) и пролина (Pro). Они имеют широкий диапазон физиологических свойств. Глипролины влияют на систему свертывания крови, модулируют работу иммунной и нервной систем, обладают противовоспалительным действием [1-3]. Они обладают нейропротекторными свойствами, обеспечивают сохранение нормальной функции инсулярной и противосвертывающей систем крови на фоне развития диабета. Иногда глипролины могут содержать аминокислоты Phe, Arg, Val или Leu.

Целью наших исследований является изучение пространственной структуры гексапептида H-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro-OH. В случае исследуемой гексапептидной молекулы аминокислотная последовательность содержит два остатка фенилаланина с ароматическим кольцом в боковой цепи. Конформационная подвижность фенилаланина определяется двумя двугранными углами χ^1 , χ^2 . Аминокислота Gly не имеет боковой цепи (точнее в боковой цепи глицина находится только один атом водорода). Пролин имеет жесткую боковую цепь.

Было выполнено компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, позволяющих получать графическое изображение пространственных структур молекулы. Важно отметить, что активной является не только сама гексапептидная молекула, но и ее фрагменты. Так трипептидный Phe-Gly-Gly и тетрапептидный Phe-Gly-Gly-Phe участки сами по себе являются активными пептидными молекулами [4,5]. Известно, что эти фрагменты являются N-концевыми участками молекулы ноцицептина, который модулирует нейроповедение, включая реакцию на стресс, двигательную активность и пространственное внимание [6].

Так N-концевой участок молекулы H-Phe-Gly-Gly-OH, включающий три аминокислоты, был исследован методами ИК и КД спектроскопии [4]. Структура N-концевого тетрапептидного участка молекулы H-Phe-Gly-Gly-Phe-OH была также изучена в работе [5]. Сама структура и конформационные возможности активной гексапептидной молекулы не были исследованы.

Расчет проводился в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. При расчете пространственной структуры гексапептидной молекулы использовался метод теоретического конформационного анализа. Он позволяет определить геометрические и энергетические параметры пептидной молекулы, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Знание аминокислотной последовательности позволяет с помощью метода теоретического конформационного анализа рассчитывать трехмерную структуру пептидных молекул. В расчетах использовалась разработанная специальная классификация пространственной структуры пептидов - конформация, форма основной цепи и шейп. Формы остатков определялись областями В, R, L и P двугранных углов основной цепи ϕ - ψ . При расчете рассматривались развернутые формы дипептидной молекулы (BB, BR, LB, LR, RL, PL, PP- шейп e) и свернутые формы основной цепи (RB, RR, BL, LL, PR, PB- шейп f).

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул, учитывались невалентные ($E_{нев}$), электростатические ($E_{эл}$), торсионные взаимодействия ($E_{тор}$) и энергии водородных связей ($E_{вс}$). Конформационное состояние каждого аминокислотного остатка обозначалось через X_{ij} , где X – характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L, P), а символы $ij = 11\dots, 12\dots, 13\dots, 21\dots$, и т.д. отвечают положениям боковой цепи (χ^1, χ^2). Обозначения и отсчеты двугранных углов вращения соответствуют принятой международной номенклатуре [7]. Для фенилаланина Phe учитывались возможные B и R формы основной цепи, положения его боковой цепи определялось двумя двугранными углами χ_1^1, χ_1^2 для первого остатка и χ_4^1, χ_4^2 для четвертой аминокислоты. Углы χ_1^1 и χ_4^1 могут принимать значения $60^\circ, 180^\circ$ и -60° , а для углов χ_1^2 и χ_4^2 задавалось значение 90° . Для глицина начальные приближенные формировались из низкоэнергетических конформаций (R форма – $\phi = -90^\circ; \psi = -90^\circ$; B форма – $\phi = -90^\circ; \psi = 100^\circ$; L форма – $\phi, \psi = 90^\circ$ и P форма основной цепи – $\phi = 90^\circ; \psi = -90^\circ$), учитывались также для этого остатка граничные области ($\phi = -90^\circ; \psi = 0^\circ; \phi = -90^\circ; \psi = 180^\circ; \phi = 90^\circ; \psi = 0^\circ$ и $\phi = 90^\circ; \psi = 180^\circ$). Для нахождения пространственного строения данной гексапептидной молекулы использовалась специально разработанная программа [8]. Данная научная работа является продолжением проведенных нами расчетов пространственной структуры пептидных молекул [9-14].

Расчетная модель гексапептидной молекулы H-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro-OH включает 78 атомов и 20 переменных двугранных углов. Аминокислотная последовательность исследуемого гексапептида содержит два остатка фенилаланина (Phe) с конформационно жесткой боковой цепью, один остаток пролина (Pro) и три аминокислоты глицин (Gly). Остаток Gly лишен боковой цепи. Пространственная структура гексапептидной молекулы была исследована фрагментарно. Сначала на основе известных низкоэнергетических конформаций монопептидов были оценены конформационные возможности N-концевого трипептидного фрагмента Phe-Gly-Gly, затем тетрапептидного участка Phe-Gly-Gly-Phe и, наконец, на основе низкоэнергетических конформаций тетрапептидного фрагмента и дипептида Gly-Pro была изучена структура и конформационные возможности всего гексапептида.

Конформационные возможности трипептида Phe-Gly-Gly были изучены на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L- фенилаланина и N-ацетил-L-глицина. Для данного трипептида, содержащего 37 атомов и 10 переменных двугранных углов, возможны 4 шейпа (ee, ef, fe и ff), представленные 32-мя формами основной цепи. Всего было рассчитано около 100 конформаций, все они были проминимизированы по энергии, оценены их геометрические и энергетические параметры. Расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации по формам основной цепи и шейпам. Каждый из рассчитанных четырех шейпов имеет низкоэнергетические конформации. Также, как и в экспериментальной работе [4] эти конформации могут представлять четыре структуры. Самой низкой энергией обладает конформация $B_{21}BL$ ($E_{общ} = -2,6$ ккал/моль), которая принадлежит шейпу ef. Этот полусвернутый шейп представлен самым большим числом низкоэнергетических конформаций – 12. В глобальной конформации $B_{21}BL$ энергия невалентных взаимодействий составляет -6,4 ккал/моль, электростатических 2,3 ккал/моль и торсионных 1,5 ккал/моль. Всего 0,6 ккал/моль проигрывает ей полностью развернутая форма основной цепи $B_{21}BR$ ($E_{общ} = -2,0$ ккал/моль) шейпа ee. Низкоэнергетическими являются конформации полностью свернутого шейпа ff $B_{21}PR$ ($E_{общ} = -0,6$ ккал/моль). Более 3 ккал/моль проигрывают конформации другого полусвернутого шейпа fe $B_{11}PL$ ($E_{общ} = 0,4$ ккал/моль). Следует отметить, что в энергию низкоэнергетических конформаций основной вклад вносили дипептидные и трипептидные взаимодействия. Основной энергетический вклад принадлежит невалентным взаимодействиям.

Таблица 1. Энергетические параметры низкоэнергетических конформаций гексапептидной глипролиновой молекулы Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro

| № | Конформация (шейп) | $E_{нев}$ | $E_{эл}$ | $E_{торс}$ | $E_{общ}$ | $E_{отн}$ |
|----|----------------------------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|
| 1 | $B_{11}LPB_{11}RB$ (fffef) | -22,3 | -2,9 | 2,5 | -22,6 | 0,0 |
| 2. | $B_{21}LPB_{21}RR$ (fffef) | -18,1 | -1,4 | 2,9 | -16,6 | 6,0 |
| 3 | $B_{21}LPB_{21}LR$ (fffe) | -19,9 | -2,3 | 3,5 | -18,8 | 3,8 |
| 4 | $B_{11}RRB_{11}PR$ (effff) | -19,4 | -1,3 | 3,4 | -17,2 | 5,4 |
| 5 | $R_{31}BPR_{11}RR$ (ffff) | -18,2 | -1,5 | 2,4 | -17,2 | 5,4 |
| 6 | $B_{21}LPR_{21}PB$ (fffef) | -17,2 | 1,0 | 2,7 | -13,5 | 9,1 |
| 7. | $B_{11}RRB_{11}BR$ (effee) | -19,1 | 2,2 | 2,1 | -14,7 | 7,9 |
| 8. | $B_{11}BBB_{11}RR$ (eeef) | -18,1 | 2,9 | 2,6 | -12,6 | 10,0 |
| 9. | $B_{11}BBR_{11}BR$ (eeefe) | -18,5 | 1,3 | 3,8 | -13,4 | 9,2 |

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) низкоэнергетических конформаций Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro

| | Углы | B ₁₁ LPB ₁₁ RB (fffe) | B ₂₁ LPB ₂₁ LR (fffe) | B ₁₁ RRB ₁₁ PR (efff) | R ₃₁ BPR ₁₁ RR (ffff) |
|---|-----------------------------|--|--|--|--|
| Phe 1 | φ ₁ | -21 | -59 | -8 | -41 |
| | χ ¹ ₁ | 61 | -178 | 60 | -63 |
| | χ ¹ ₂ | 88 | 88 | 81 | 98 |
| | ψ ₁ | 152 | 147 | 157 | -54 |
| | ω ₁ | 178 | 179 | 172 | 179 |
| Gly 2 | φ ₂ | 69 | 79 | -88 | -90 |
| | ψ ₂ | 81 | 79 | -67 | 72 |
| | ω ₂ | 181 | -179 | 173 | -173 |
| Gly3 | φ ₃ | 95 | 87 | -84 | 86 |
| | ψ ₃ | -45 | -67 | -76 | -59 |
| | ω ₃ | -178 | 178 | 169 | 172 |
| Phe4 | φ ₄ | -120 | -91 | -155 | -143 |
| | χ ⁴ ₁ | 58 | 180 | 60 | 57 |
| | χ ⁴ ₂ | 94 | 87 | 89 | 99 |
| | ψ ₄ | 162 | 130 | 150 | -51 |
| | ω ₄ | -177 | -176 | 180 | 179 |
| Gly5 | φ ₅ | -59 | 56 | 119 | -91 |
| | ψ ₅ | -69 | 61 | -90 | -84 |
| | ω ₅ | 177 | -20 | 178 | -178 |
| Pro6 | φ ₆ | -60 | -60 | -60 | -60 |
| | ψ ₆ | 138 | -41 | -50 | -50 |
| Энергия E _{отн} (ккал/моль) | | 0,0 | 3,8 | 5,4 | 5,4 |

Этот вклад меняется в различных конформациях в интервале от -1,1 до -7,0 ккал/моль. Все 24 низкоэнергетические конформации трипептидной молекулы учитывались при расчете пространственной структуры тетрапептида Phe-Gly-Gly-Phe.

Аминокислотная последовательность тетрапептидной молекулы включала в себя две аминокислоты фенилаланина и две аминокислоты глицина. Специфика боковых цепей аминокислот тетрапептида молекулы определила количество начальных приближений. Всего было рассчитано свыше 250 конформаций, принадлежащих 64 формам основной цепи, 8 возможным для этой молекулы шейпам. Все они были проминимизированы по энергии, оценены их геометрические и энергетические параметры. Расчет показал наличие резкой энергетической дифференциации конформаций. В энергетический интервал 0–4 ккал/моль попадают представители 22 форм основной цепи. Самой низкой энергией обладают конформации полностью свернутого шейпа fff B₁₁LPB₁₁ и B₁₁PRB₁₁. Всего 0,5 ккал/моль проигрывают конформации шейпа eff. Все низкоэнергетические конформации тетрапептида и C-концевого дипептида Gly-Phe были учтены при расчете пространственной структуры всей гексапептидной молекулы Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro. Было составлено свыше 300 начальных приближений гексапептидной молекулы, которые затем были проминимизированы по энергии. Результаты расчета представлены в таблице 1.

Из 192 рассчитанных форм основной цепи самой низкоэнергетической является B₁₁LPB₁₁RB шейпа fffef. В этой глобальной конформации B₁₁LPB₁₁RB (ΔE_{отн}=0 ккал/моль) энергия невалентных взаимодействий составляет -22,3 ккал /моль, электростатических -2,9 ккал/моль и торсионных 2,5 ккал/моль. Данная структура является свернутой. Расстояние между концевыми атомами в глобальной конформации составляет 4,2 Å. При этом основной стабилизирующий вклад в энергию данной конформации вносят дипептидные (-5,4 ккал/моль), трипептидные (-5,8 ккал/моль), тетрапептидные (-7,4 ккал/моль), пентапептидные (-2,3 ккал/моль) и гексапептидные взаимодействия (-8,6 ккал/моль). Таким образом, проведенный расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации конформаций, форм основной цепи и шейпов гексапептида. Следует отметить, что на повороте боковая цепь фенилаланинов отвернута в растворитель и конформационно свободна для взаимодействий с рецепторами.

Более 5 ккал/моль проигрывают конформации полностью свернутых шейпов fffff и шейпа effff. В таблице 1 представлены 9 низкоэнергетических структур и соответствующие энергетические параметры: вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий, а также общая энергия и относительная энергия

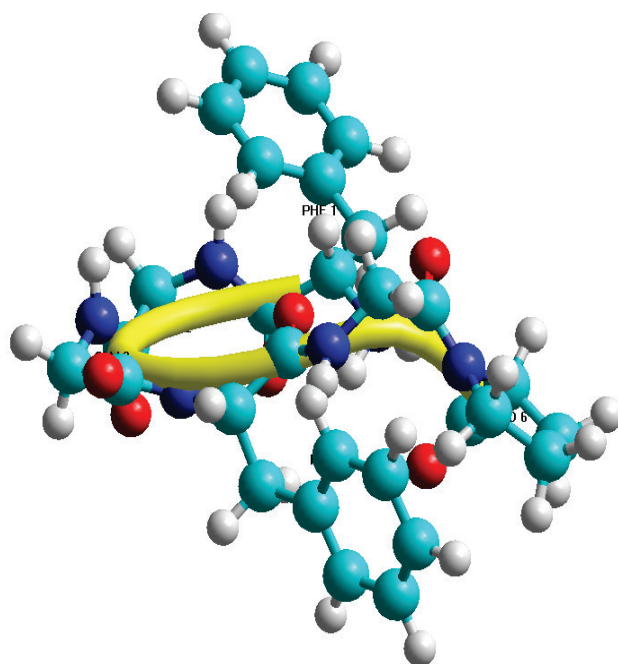


Рисунок 1. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_{11}LPB_{11}RB$ гексапептида Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro

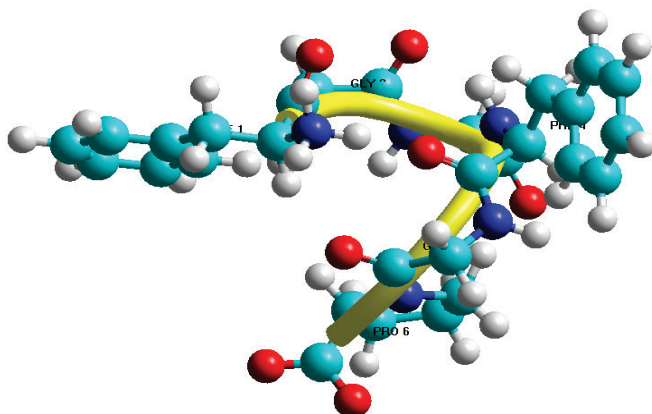


Рисунок 2. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_{21}LPB_{21}LR$ гексапептида

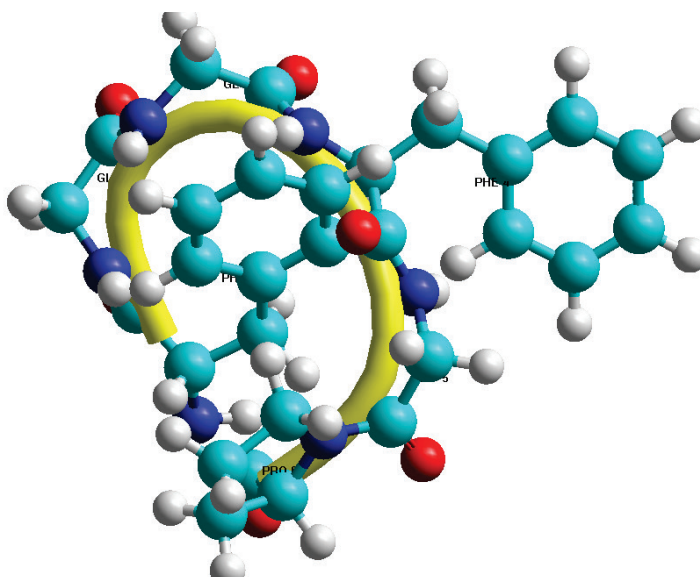


Рисунок 3. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_{11}RRB_{11}PR$ гексапептида Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro

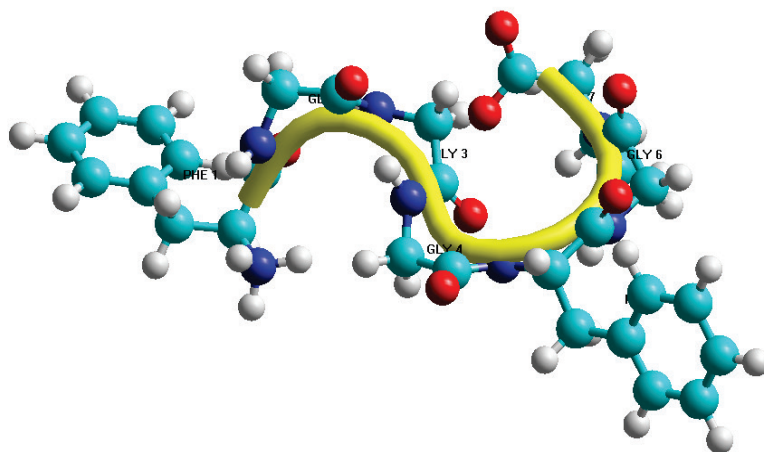


Рисунок 4. Низкоэнергетическая пространственная структура $R_{31}BPR_{11}RR$ гексапептида Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro

для каждой структуры. Основной вклад в низкую энергию найденных конформаций вносят невалентные взаимодействия.

Далее были определены геометрические параметры низкоэнергетических конформаций – значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в гексапептидную глипролиновую молекулу. Геометрические параметры (в градусах) для четырех низкоэнергетических конформаций приведены в таблице 2. Расположение аминокислот в четырех низкоэнергетических структурах $B_{11}LPB_{11}RB$ (fffef), $B_{21}LPB_{21}LR$ (ffffe), $B_{11}RRB_{11}PR$ (effff) и $R_{31}BPR_{11}RR$ (ffff) представлены на рисунках 1-4. Из приведенных рисунков можно увидеть сближенность участков основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в данную гексапептидную молекулу Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro. Полученные результаты могут быть использованы для изучения пространственного строения других аналогов и самой молекулы ноцицептина, а также для исследования конформационной подвижности боковых цепей входящих в них аминокислот при взаимодействии с молекулами рецепторов.

Таким образом с помощью метода молекулярной механики было определено пространственное строение и конформационные свойства глипролиновой гексапептидной молекулы Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro. Результаты расчёта показали, что возникает энергетическая дифференциация между шейпами, формами основной цепи и конформациями этой молекулы. Проведенный расчет обнаружил 9 низкоэнергетических конформаций для данного гексапептида, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри - и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для гексапептида являются полусвернутые и свернутые формы основной цепи. Боковые цепи аминокислот Phe1 и Phe4 в низкоэнергетических конформациях осуществляют эффективные взаимодействия. Они являются конформационно лабильными аминокислотами. Полученные структуры сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в гексапептид. Расчет трехмерной структуры гексапептидной молекулы позволил определить геометрические и энергетические параметры пептида, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Список литературы / References:

1. Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А. и др. Структурно-функциональные исследования глицин и пролин содержащих пептидов, являющихся нейропротекторами. *Биоорг. хим.*, 2009, т. 35, № 2, с. 165-171. [Martynova K.V., Andreeva L.A., Klimova P.A. et al. Structure-functional investigation of the glycin and prolin containing peptides, which are neuroprotectors. *Bioorg. chim.*, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 165-171 (In Russ.)].
2. Falalyeyeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V. et al. Effects of glyprolines PGP, PG and GP on homeostasis of gastric mucosa in rats with experimental ethanol-induced gastric ulcers. *Bull Exp Biol Med*, 2010, vol. 149, no. 6, pp. 699-701.
3. Рогозинская Э.Я., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Андреева Л.А. Тромбоэластографическое исследование аргининсодержащих, лейцинсодержащих и лизинсодержащих пептидов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2020, т. 169, с. 716-719. [Rogozinskaya E.Ya., Lyapina L.A., Shubina T.A., Myasoedov N.F. et al. Trombotlastografic research of arginin-containing, leusine-containing and lysine-containing peptides. *Bullet. of Exper. Biology and Medicine*, 2020, vol. 169, pp. 716-719 (In Russ.)].
4. Wilson K.R., Cruz M.J., Nicolas C., Belau L., Leone S.R., Ahmad M. Thermal vaporization of biological nanoparticles: fragment - free vacuum ultraviolet photoionization mass spectra of tryptophan, phenylalanine-glycine-glycine and beta-carotene. *J. Phys. Chem. A.*, 2006, vol. 110, no. 6, pp. 2106-2113.

5. Rena D., Valdes H., Vondrasek J., Hobza P. Abu-Riziq Ali, Crews Bridgit, Mattanjahs de Vries. Structure and IR spectrum of phenylalanyl-glycyl-glicine tripeptide in the gas-phass: IR/UV experiments, ab initio quantum chemical calculations, and molecular dynamic simulations. *Chemistry* 2005, vol. 11, no. 23, pp. 6803-6817.
6. Ivanova E.A., Sarycheva N.Yu., Dubynin V.A., Malyshev A.V. et al. Behavioral of Original Tetrapeptide an Analog of N-Terminal Nociceptin Fragment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, vol. 153, no. 2, pp. 177-181.
7. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjajev N.M. Program of the semi-empirical calculation of the conformations of the molecular complexes on the IBM. *Journal of structural chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148 (In Russ.)].
8. IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, vol. 39,
9. Akhmedov N.A., Gadjeva Sh.N., Abbasli R.M. Structural organization of Asp-Pro- Lys-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ molecule. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2009, vol. 10, pp. 57-62.
10. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
11. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Akhmedova S.R. Spatial structure of Octarphin Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
12. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β - Casomorphin-7 Molecule. *Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, iss. 5, pp. 62-67.
13. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA*, Baku, Azerbaijan, 2020, vol. I, pp. 218-221.
14. Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А. Структурная организация молекулы Gly-Pro-Arg-Pro. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 53-56. [Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Structural organization of the Gly-Pro-Arg-Pro molecule. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 53-56 (In Russ.)].

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE GLYPROLINE HEXAPEPTIDE MOLECULE

Ismailova L.I., Akhmedov N.A.

Baku State University, Institute of Physical Problems

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

Received 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0584

Abstract. Computer modeling based on the use of the method of theoretical conformational analysis and programs that allow obtaining a graphic image of the spatial structures of biomolecules was performed for a hexapeptide molecule – glyproline H-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Pro-OH. Glyprolines are short peptides whose amino acid sequences contain glycine and proline residues. Their mechanisms of action are currently poorly understood. Using the method of molecular mechanics, the spatial structure and conformational possibilities of this hexapeptide molecule were determined. Its potential energy was estimated as the sum of non-valente, electrostatic, torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. 9 low-energy structures were found for the glyproline hexapeptide, the values of the dihedral angles of the main and side chains of the amino acids included in the molecule. The energy of intra- and interresidual interactions was estimated. The calculation showed that the folded forms of the main chain are low-energy for the hexapeptide. In them, the side chains of amino acids phenylalanine and proline, which are conformationally rigid, carry out effective interactions with all parts of the hexapeptide molecule.

Key words: structure, conformation, hexapeptide, molecule.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ ЛАКТОФЕРРОКСИНОВ Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет
ул. Захида Халилова 23, г. Баку, Азербайджан
Азербайджанский государственный педагогический университет
ул. Узеира Гаджибекова 34, г. Баку, Азербайджан
Азербайджанский технический университет
ул. 3. Халилова 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: leylanamig@mail.ru
Поступила в редакцию 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0585

Аннотация. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы лактоферроксина А (Н-Tyr1-Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Tyr6-OH) и лактоферроксина В (Н-Arg1-Tyr2-Tyr3-Gly4-Tyr5-OH). Потенциальная энергия системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекул, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы лактоферроксина А представляется четырнадцатью формами основной цепи, а пространственная структура молекулы лактоферроксина В одинадцатью формами основной цепи. Сравнение полученных низкоэнергетических конформаций лактоферроксинов А и В показывает, что у них достаточно много общего. В маленький энергетический интервал 0-3,0 ккал/моль у этих молекул попадают много конформаций. Поэтому можно именно этим объяснить то, что обе молекулы выполняют общую биологическую функцию. Можно предположить, что в выполнении биологической функции участвуют триазинные аминокислотные остатки. В похожих конформациях их боковые цепи в пространстве находятся приблизительно в одинаковых положениях. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул лактоферроксинов.

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

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

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

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

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

Трехмерная структура молекулы лактоферроксина А (Н-Тур1-Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Тур6-ОН) была исследована фрагментарно. Сначала, на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков изучена пространственная структура N-концевого тетрапептидного фрагмента Н-Тур1-Leu2-Gly3-Ser4 молекулы лактоферроксина А и определены его стабильные конформации. На втором этапе, на основе низкоэнергетических конформаций N-концевого тетрапептидного фрагмента Н-Тур1-Leu2-Gly3-Ser4 и метиламида N-ацетил-глицина и метиламида N-ацетил L-тирозина была рассчитана пространственная структура молекулы лактоферроксина А (Н-Тур1-Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Тур6-ОН).

Для исследования пространственной структуры молекулы лактоферроксина А начальные приближения формировались на основе конформаций шестнадцати форм основной цепи N-концевого тетрапептидного фрагмента Н-Тур1-Leu2-Gly3-Ser4, четырех форм основной цепи Gly5 и трех форм основной цепи Тур6. Поэтому на первом этапе были рассчитаны несколько сот конформаций гептапептидной молекулы лактоферроксина А. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основных цепей и шейпами. В энергетический интервал (0-6,0) ккал/моль попадают конформации четырнадцати шейпов пептидного скелета. Эти шейпы представлены четырнадцатью формами основной цепи. Из каждого шейпа выбрана самая стабильная конформация, которые представлены в таблице 1. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий и относительная ($U_{отн.}$) энергия оптимальных конформаций молекулы лактоферроксина А. Геометрические параметры четырех конформаций, относительная энергия которых меньше 2,0 ккал/моль представлены в таблице 1. Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале (-23,8)–(-16,1) ккал/моль, электростатических взаимодействий (4,5)–(6,8) ккал/моль, торсионных взаимодействий (2,3)–(4,1) ккал/моль (табл. 1).

Глобальной конформацией молекулы лактоферроксина А является конформация $R_2R_{32}RR_{32}RR_3$ шейпа ffff. Конформация является выгодной по невалентным взаимодействиям, вклад которых наибольший (табл. 1). В этой конформации возникают водородные связи между атомом N-H Тур1 и C=O атомом боковой цепи Ser4, между атомом C=O основной цепи Leu2 и атомом N-H основной цепи Gly5 и между атомом C=O основной цепи Leu2 и атомом N-H основной цепи Тур6. Здесь образуется спиральная структура, при этом возникают эффективные взаимодействия между атомами основными и боковыми цепями аминокислотных остатков (рис. 1а). Тур1 эффективно взаимодействует с аминокислотными остатками Leu2, Ser4 и Gly5. Leu2 эффективно взаимодействует с аминокислотными остатками Ser4, Gly5, Тур6.

Вторая низкоэнергетическая конформация молекулы лактоферроксина А является конформация $B_2B_{21}BB_{32}RR_1$ шейпа eeeef с относительной энергией 0,9 ккал/моль. В этой структуре первые четыре аминокислотные остатки образуют развернутую основную цепь, последние два аминокислотные остатка свернутую форму основной цепи. В этой конформации возникает водородная связь между атомом основной цепи C=O Leu2 и атомом N-H основной цепи Ser4. Конформация $B_2B_{21}BB_{32}BB_3$ шейпа eeeee от предыдущего отличается формой основной цепи C-концевого дипептидного участка. Поэтому межостаточные взаимодействия в N-концевом тетрапептидном участке одинаковые. В обеих конформациях Тур1 эффективно взаимодействует с трипептидным участком Leu2-Gly3-Ser4. Leu2 эффективно взаимодействует дипептидным участком Gly3-Ser4. В конформациях $B_2B_{21}BB_{32}RR_1$ и $B_2B_{21}BB_{32}BB_3$ возникает эффективные взаимодействия между остатками Тур6-Ser4 (рис. 1в, 1д).

В конформации $B_1R_{21}RR_{32}LB_3$ шейпа effee с относительной энергией 1,4 ккал/моль второй, третий и четвертые аминокислотные образуют свернутую форму основной цепи, первый, пятый и шестой аминокислотные остатки имея развернутую форму основной отходят от них (рис. 1с). В этой конформации первый аминокислотный остаток Тур1 в прстрансве так расположен, что одновременно эффективно взаимодействует следующим пентапептидным фрагментом Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Тур6-ОН молекулы лактоферроксина А. Тур6 эффективно взаимодействует с аминокислотными остатками Ser4-Gly5. Относительные энергии низкоэнергетических конформации молекулы лактоферроксина А представленные в таблице 2 друг от друга резко не отличаются, потому что, в аминокислотный состав молекуле входят аминокислотные остатки с лабильными, полярными и многоатомными боковыми цепями, которые в разных конформациях способны создать эффективные межмолекулярные взаимодействия.

Таблица 1. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы лактоферроксина А

| № | Шейп | Конформация | $U_{нев}$ | $U_{эл}$ | $U_{торс}$ | $U_{общ}$ | $U_{отн}$ |
|----|-------|---|-----------|----------|------------|-----------|-----------|
| 1 | ffff | R ₂ R ₃₂ RR ₃₂ RR ₃ | -23,8 | 6,6 | 4,1 | -13,1 | 0 |
| 2 | fffee | R ₂ R ₃₂ RR ₃₂ LB ₃ | -21,7 | 6,8 | 3,9 | -11,0 | 2,1 |
| 3 | ffeff | R ₂ R ₂₁ BB ₃₂ PR ₁ | -19,3 | 5,3 | 3,4 | -10,5 | 2,5 |
| 4 | feeff | R ₂ B ₂₁ BB ₃₂ PR ₁ | -18,6 | 4,9 | 3,6 | -10,0 | 3,1 |
| 5 | feef | R ₂ B ₂₁ BB ₃₂ RR ₁ | -18,0 | 5,3 | 3,5 | -9,2 | 3,9 |
| 6 | feeee | R ₂ B ₂₁ BB ₃₂ BB ₃ | -16,1 | 4,9 | 3,0 | -8,2 | 4,9 |
| 7 | eeef | B ₂ B ₂₁ BB ₃₂ RR ₁ | -20,6 | 4,8 | 3,6 | -12,2 | 0,9 |
| 8 | eeeff | B ₂ B ₂₁ BB ₃₂ PR ₃ | -20,3 | 4,7 | 3,5 | -12,1 | 1,0 |
| 9 | effee | B ₁ R ₂₁ RR ₃₂ LB ₃ | -19,7 | 5,3 | 2,6 | -11,7 | 1,4 |
| 10 | eefee | B ₂ R ₂₁ PR ₃₂ LB ₃ | -19,3 | 5,2 | 2,7 | -11,4 | 1,7 |
| 11 | eeeee | B ₂ B ₂₁ BB ₃₂ BB ₃ | -19,0 | 4,5 | 3,2 | -11,4 | 1,7 |
| 12 | effef | B ₁ R ₂₁ RR ₃₂ RR ₃ | -19,1 | 5,2 | 2,6 | -11,2 | 1,9 |
| 13 | eefef | B ₂ R ₂₁ PR ₃₂ PR ₂ | -17,4 | 5,0 | 2,3 | -10,4 | 2,7 |
| 14 | eeefe | B ₂ B ₂₁ BB ₃₂ LB ₃ | -17,9 | 4,7 | 2,9 | -10,2 | 2,9 |

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы лактоферроксина А

| Остаток | R ₂ R ₃₂ RR ₃₂ RR ₃ | B ₂ B ₂₁ BB ₃₂ RR ₁ | B ₁ R ₂₁ RR ₃₂ LB ₃ | B ₂ R ₂₁ PR ₃₂ LB ₃ |
|-----------|---|---|---|---|
| Tyr1 | -71 -59 172 -176 84 0 | -64 149 174 171 77 0 | -72 66 -179 65 88 0 | -66 149 174 171 78 0 |
| Leu2 | -72 -49 175 -57 175 -175 180 | -121 130 178 177 65 178 176 | -96 -66 -174 173 61 179 176 | -122 127 177 176 65 179 176 |
| Gly3 | -60 -30 -177 | -72 81 179 | -93 -71 -172 | -71 84 180 |
| Ser4 | -75 -51 -175 -56 -179 | -107 151 174 -61 179 | -109 -57 -179 -62 180 | -108 146 180 -60 179 |
| Gly5 | -76 -52 180 | -67 -36 177 | 90 90 180 | -80 120 180 |
| Tyr6 | -91 -60 -180 -59 90 0 | -83 -37 180 65 85 0 | -100 140 180 -60 90 0 | -100 140 180 -60 90 0 |
| $U_{отн}$ | 0 | 0,9 | 1,4 | 1,7 |

Трехмерная структура молекулы лактоферроксина В (H-Arg1-Tyr2-Tyr3-Gly4-Tyr5-OH) была исследована фрагментарно. Сначала, на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков была изучена пространственная структура N-концевого трипептидного фрагмента H-Arg1-Tyr2-Tyr3 и C-концевого трипептидного фрагмента Tyr3-Gly4-Tyr5-OH молекулы лактоферроксина В и определены их стабильные конформации. Затем на основе низкоэнергетических конформаций N- и C-концевых трипептидных участков была рассчитана пространственная структура всей молекулы лактоферроксина В.

Для исследования пространственной структуры молекулы лактоферроксина В на первом этапе были рассчитаны несколько сот конформаций. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основной цепи и шейпами. В энергетический интервал (0-5,0) ккал/моль попадают конформации одиннадцати шейпов пептидного скелета. Из каждого шейпа выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в таблице 1. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{нев}$), электростатических ($U_{эл}$), торсионных ($U_{торс}$) взаимодействий и относительная (U_{rel}) энергия оптимальных конформаций молекулы лактоферроксина В. Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале (-18,2)–(-13,6) ккал/моль, электростатических взаимодействий (1,8)–(7,2) ккал/моль, торсионных взаимодействий (0,2)–(2,9) ккал/моль (табл. 1). Низкоэнергетические конформации по структуре N-концевого трипептидного фрагмента можно разделить на четыре группы. Первые четыре конформации относятся к шейпу ff, относительная энергия которых изменяется в энергетическом интервале (0–1,3) ккал/моль, две конформации шейпа ef, относительная энергия

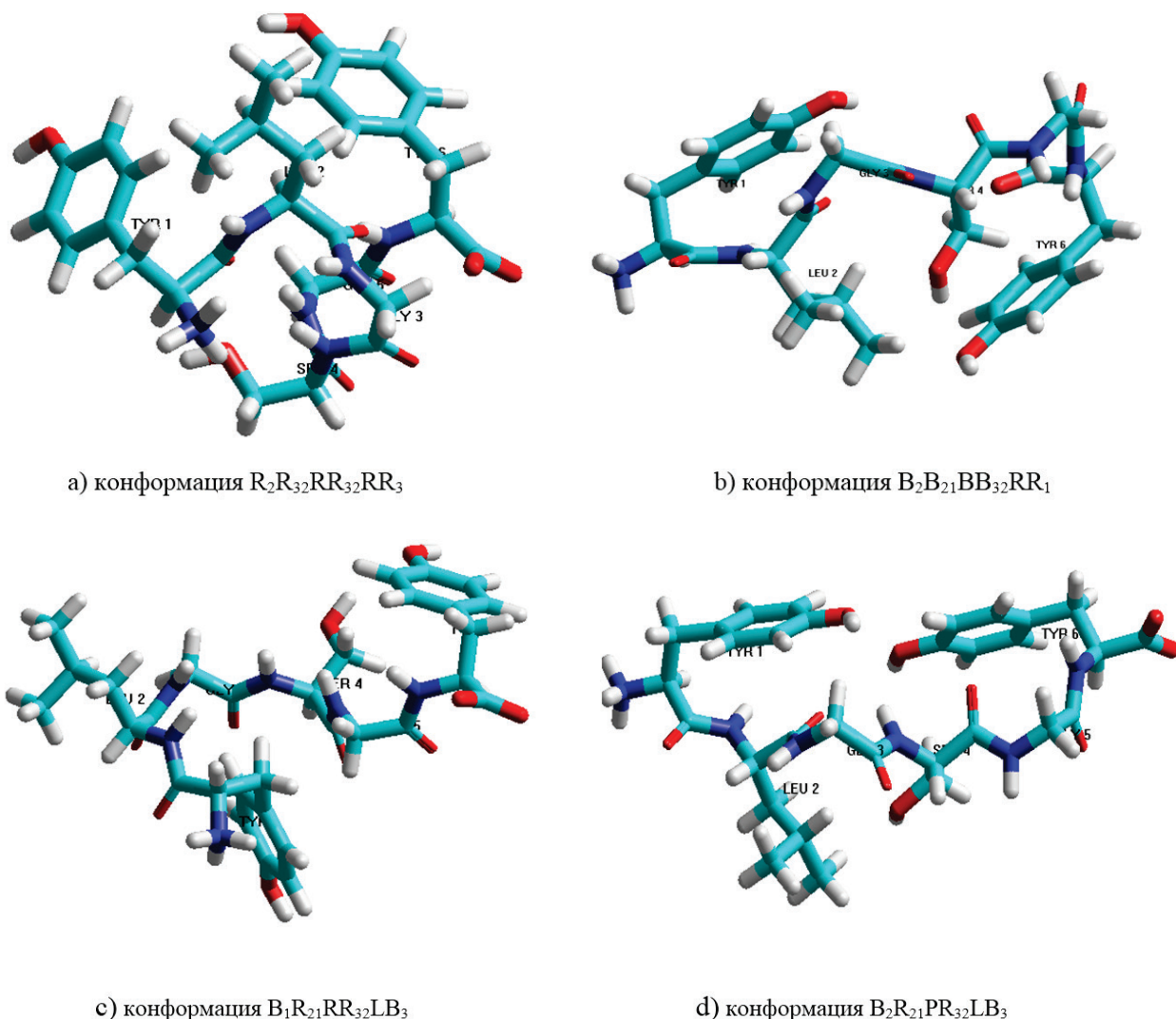


Рисунок 1. Стабильные конформации молекулы лактоферроксина А

которых изменяется в энергетическом интервале (0,9–2,5) ккал/моль, две конформации шейпа fe, относительная энергия которых изменяется в энергетическом интервале (2,1–3,9) ккал/моль и три конформации шейпа ee, относительная энергия которых изменяется в энергетическом интервале (1,7–3,0) ккал/моль (табл. 1).

Глобальной конформацией молекулы лактоферроксина В является конформация $R_{2221}R_1B_2PB_1$ шейпа ffff. В этой конформации возникают водородные связи между атомом N-H Arg1 и C=O атомом основной цепи Tyr5, между атомом C=O основной цепи Tyr3 и атомом N-H основной цепи Tyr5. Здесь образуется свернутая структура, при этом возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи и боковыми цепями аминокислотных остатков (рис. 1а). Второй низкоэнергетической конформацией молекулы лактоферроксина В является конформация $R_{2221}R_1R_2LR_3$ шейпа ffee с относительной энергией 0,4 ккал/моль. В этой структуре первые три аминокислотных остатка образуют свернутую основную цепь, последние два аминокислотных остатка образуют развернутую форму основной цепи. В этой конформации вклад невалентных взаимодействий наибольший. Конформация $B_{1221}R_1B_2LB_1$ шейпа efef имеет относительную энергию 0,9 ккал/моль выгодна по электростатическим взаимодействиям (табл. 1, рис. 1в).

Первичные структуры лактоферроксина А и В резко отличаются. Лактоферроксин А состоит из шести аминокислотных остатков, а лактоферроксин В включает пять аминокислотных остатков. У лактоферроксина А аминокислотная последовательность включает по два остатка Tyr и Gly, а у лактоферроксина В имеет место три остатка Tyr и один остаток Gly. Сравнение полученных низкоэнергетических конформаций лактоферроксинов А и В показывает, что у них достаточно много общего. В маленький энергетический интервал 0–3,0 ккал/моль у этих молекул попадают много конформаций (табл. 1, 3). Лактоферроксин А представлен 14-ю, а лактоферроксин В – 11-ю конформациями. В обеих молекулах глобальной является полностью свернутая конформация шепа ffff.

Таблица 3. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нв.}}$), электростатических ($U_{\text{эл.}}$), торсионных ($U_{\text{торс.}}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы лактоферроксина В

| № | Шейп | Конформация | $U_{\text{нв}}$ | $U_{\text{эл}}$ | $U_{\text{торс}}$ | $U_{\text{общ}}$ | $U_{\text{отн}}$ |
|----|-------|---|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | ffff | R ₂₂₂₂ R ₁ B ₂ PB ₁ | -15,6 | 3,7 | 0,2 | -10,2 | 0 |
| 2 | ffee | R ₂₂₂₁ R ₁ R ₂ LR ₃ | -18,2 | 6,2 | 2,2 | -9,8 | 0,4 |
| 3 | fffe | R ₂₂₂₁ R ₁ B ₂ LB ₁ | -16,8 | 4,9 | 2,9 | -9,0 | 1,2 |
| 4 | ffef | R ₂₂₂₁ R ₁ R ₁ PR ₁ | -17,0 | 5,9 | 2,3 | -8,9 | 1,3 |
| 5 | effe | B ₁₂₂₂ R ₁ B ₂ LB ₁ | -13,6 | 1,8 | 2,4 | -9,3 | 0,9 |
| 6 | efee | B ₁₂₂₁ R ₁ R ₂ LR ₃ | -13,9 | 4,5 | 1,7 | -7,7 | 2,5 |
| 7 | feee | R ₃₂₂₁ B ₁ R ₂ LB ₃ | -16,6 | 7,2 | 1,4 | -8,1 | 2,1 |
| 8 | feef | R ₃₂₂₁ B ₁ R ₁ PR ₁ | -14,9 | 6,7 | 1,9 | -6,3 | 3,9 |
| 9 | eeee | B ₁₂₂₁ B ₃ R ₃ LR ₃ | -15,7 | 5,8 | 1,5 | -8,5 | 1,7 |
| 10 | eeefe | B ₁₂₂₁ B ₃ B ₁ LB ₁ | -15,7 | 5,5 | 2,6 | -7,6 | 2,6 |
| 11 | eeff | B ₁₂₂₁ B ₃ B ₁ PB ₁ | -15,1 | 5,5 | 2,3 | -7,2 | 3,0 |

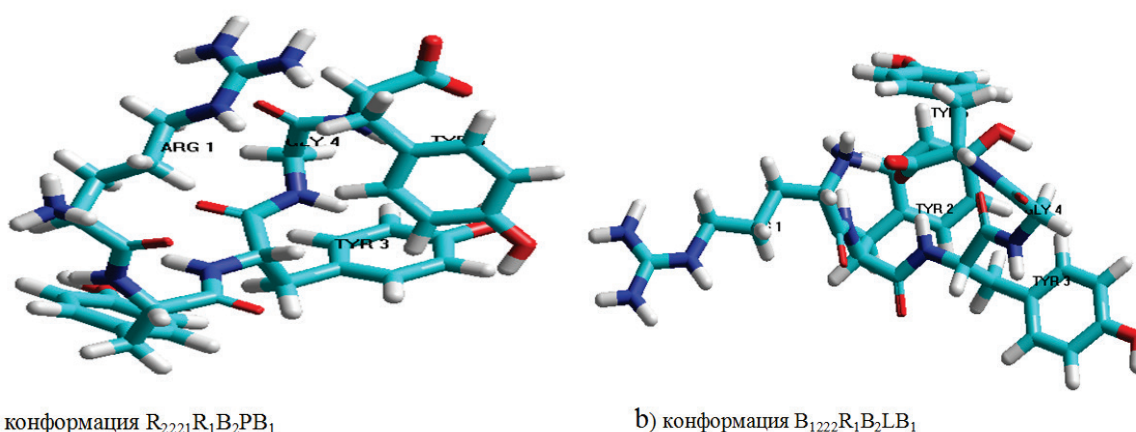


Рисунок 2. Стабильные конформации молекулы лактоферроксина В

Вторые низкоэнергетические конформации лактоферроксинов А и В тоже очень похожи (рис. 1, 2). В обеих молекулах N-конец имеет свернутую структуру, а С-конец молекул имеет развернутую форму. Следующие низкоэнергетические конформации молекул имеют полусвернутые формы основной цепи (табл. 1, 3, рис. 1, 2). Поэтому можно именно этим объяснить то, что обе молекулы выполняют общую биологическую функцию. Можно предположить, что в выполнении биологической функции участвуют тирозиновые аминокислотные остатки. В похожих конформациях их боковые цепи в пространстве находятся приблизительно в одинаковых положениях.

Таким образом, пространственную структуру молекулы лактоферроксина А (Н-Tyr1-Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Tyr6-OH) можно представить четырнадцатью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах, пространственную структуру молекулы лактоферроксина В (Н-Arg1-Tyr2-Tyr3-Gly4-Tyr5-OH) можно представить одиннадцатью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур можно предложить для данных молекул их синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ пентапептидной молекул лактоферроксинов А и В привел к таким структурным организациям молекул, которые не исключают реализацию этих молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46 (InRuss.)].
2. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с. 29-35 [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K.,

- Tarakanova Yu.N., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. The possible role of casomorphin in the pathogenesis of autism. *Psixiatriya*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 29-35 (In Russ.)]
3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.*, 2009, vol. 19, no. 4, pp. 258-263.
 4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул β -казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная Биология*, 1989, т. 23, с. 240-248 [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of β -casomorphin, valmucseptin and morphiceptin molecules. *Molecular. Biol.*, 1989, vol. 23, pp. 240-240 (In Russ.)].
 5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667 [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667 (In Russ.)].
 6. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590 [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590 (In Russ.)].
 7. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
 8. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA 2020, Baku, Azerbaijan*, vol. I, pp. 218-221.
 9. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akverdieva G.A., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2021, vol. 43, no. 05, pp. 500-504.
 10. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, iss. 5, ser. II (Sep.Oct.), pp. 62-67, doi: 10.9790/4861-1305026267.
 11. Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.A. Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 531-534.
 12. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorphin B5 molecule. *Conference proceedings Modern Trends In Physics*, 2019, pp. 201-104.
 13. IUPAC-IUB. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific, Oxford, 1993.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF LACTOFERROXIN MOLECULES
Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.F., Akhmedov N.A.

Baku State University

Zahid Khalilov str. 23, Baku, Azerbaijan

Azerbaijan State Pedagogical University

Uzeyir Hajibeyov str. 34, Baku, Azerbaijan

Azerbaijan Technical University

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

Received 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0585

Abstract. The conformational possibilities of lactoferroxin A (H-Tyr1-Leu2-Gly3-Ser4-Gly5-Tyr6-OH) and lactoferroxin B (H-Arg1-Tyr2-Tyr3-Gly4-Tyr5-OH) molecules were studied by theoretical conformational analysis. The potential energy of the system is chosen as the sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of molecules, the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues that make up the molecule were found, and the energy of intra- and interresidual interactions was estimated. It is shown that the spatial structure of the lactoferroxin A molecule is represented by fourteen forms of the main chain, and the spatial structure of the lactoferroxin B molecule by eleven forms of the main chain. Comparison of the obtained low-energy conformations of lactoferroxins A and B shows that they have quite a lot in common. In a small energy range of 0–3,0 kcal/mol, these molecules have many conformations. Therefore, it is precisely this that explains the fact that both molecules perform a common biological function. It can be assumed that tyrosine amino acid residues are involved in the performance of the biological function. In similar conformations, their side chains in space are approximately in the same positions. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of lactoferroxin molecules.

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

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ СОЙМОРФИНОВ

Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Исмаилова Л.И.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. 3. Халилова 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан, e-mail: Namiq.49@bk.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0586

Аннотация. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекул сойморфина-5 (Thr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-NH₂), сойморфина-6 (Tyr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-Asn6-NH₂) и сойморфина-7 (Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5-Asn6-Ala7-NH₂). Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекул сойморфина-5, сойморфина-6 и сойморфина-7, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекул, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекул сойморфина-5, сойморфина-6 и сойморфина-7 представлена конформациями восьми шейпов пептидного скелета. Таким образом, пространную структуру молекул сойморфина-5, сойморфина-6 и сойморфина-7 можно представить восемью структурными типами. Можно предположить, что молекулы свои физиологические функции осуществляет в этих структурах. Сравнение низкоэнергетических структур сойморфинов показывают, что во всех молекулах первые четыре низкоэнергетические конформации являются представителями структурных типов efef, efef, efff, effe у сойморфина-5, effff, efef, effe, effe у сойморфина-6, efffff, effefe, efffef, effeee у сойморфина-7. На основе этих структур можно предложить их искусственных аналогов для синтеза. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул сойморфинов.

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

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

Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Экзорфины были выделены из различных видов растений. Сойморфины-5, -6 и -7, производные β-коглицинина сои, были обнаружены сравнительно недавно. Сойморфины в заметных количествах образуются при переваривании сои: при расщеплении β-субъединицы β-коглицинина сои панкреатической эластазой *in vitro* сойморфин-5 составляет 9,1 % всех продуктов. По структуре сойморфины более всего сходны с человеческим β-казоморфином-4. Интересно, что сойморфины – первые известные экзорфины растительного происхождения, являющиеся селективными лигандами μ-рецепторов. Для других опиоидоподобных растительных пептидов характерно сродство к β-рецепторам. Опыты на препаратах подвздошной кишки морской свинки показали, что сойморфины даже в большей степени μ-селективны, чем β-казоморфины. Возможное нейротропное действие сойморфинов важно исследовать в связи с тем, что соевый белок широко используется в пищевой промышленности [1-3].

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

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекул сойморфинов

изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. В наших вышеупомянутых работах подробно описаны используемые потенциальные функции.

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

Пространственная структура сойморфина-5 (Thr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-NH₂) исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. Из рассчитанных для нее конформаций для каждой формы основной цепи была выбрана самая низкоэнергетическая и представлена в таблице 1. В таблице 2 показаны значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот для первых четырех конформаций.

Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между формами основной цепи и конформациями. В небольшой энергетический интервал 0-15 кДж/моль попадают конформации всех восьми шейпов основной цепи. В таблице 1 показаны энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и относительная энергия этих конформаций. В этих конформациях энергия

Таблица 1. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы сойморфина-5

| № | Шейп | Конформация | Энергетический вклад | | | $U_{отн}$ |
|---|------|--|----------------------|-----------|-------------|-----------|
| | | | $U_{нев.}$ | $U_{эл.}$ | $U_{торс.}$ | |
| 1 | efef | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ | -87,8 | 4,6 | 9,7 | 0 |
| 2 | efee | B ₃ RB ₃ B ₂ B ₂ | -83,6 | 3,8 | 10,1 | 3,4 |
| 3 | efff | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ | -87,8 | 7,1 | 13,4 | 5,9 |
| 4 | effe | B ₃ RR ₃ B ₂ B ₂ | -76,9 | 4,6 | 6,3 | 7,1 |
| 5 | eeee | B ₂ BB ₂ B ₂ B ₂ | -80,6 | 5,5 | 13,0 | 10,5 |
| 6 | eeef | B ₁ BB ₁ R ₂ R ₂ | -76,9 | 6,7 | 8,4 | 11,3 |
| 7 | eefe | B ₁ BR ₁ B ₂ B ₂ | -74,3 | 5,0 | 9,7 | 13,4 |
| 8 | eeff | B ₂ BR ₂ R ₂ R ₂ | -80,6 | 10,1 | 11,8 | 14,3 |

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы сойморфина-5. Значения двугранных углов даны в последовательности $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2$

| Остаток | Конформации | | | |
|------------|--|--|--|--|
| | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ | B ₃ RB ₃ B ₂ B ₂ | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ | B ₃ RR ₃ B ₂ B ₂ |
| Тур1 | -95 155 169 -71 107 0 | -73 149 174 -73 105 0 | -111 150 -174 -68 99 0 | -112 153 179 -70 107 0 |
| Pro2 | -60 -39 176 | -60 -47 180 | -60 -49 -173 | -60 -40 -179 |
| Phe3 | -89 166 178 59 78 | -100 176 177 -56 89 | -69 -32 177 69 87 | -88 -52 -179 -58 98 |
| Val4 | -92 -59 -178 178 -179 178 | -76 84 -176 180 -177 178 | -63 -45 179 171 179 179 | -92 96 -178 -179 -179 179 |
| Val5 | -95 -58 180 180 -179 178 | -108 97 179 180 -179 179 | -67 -45 179 172 180 179 | -98 99 179 180 180 179 |
| $U_{отн.}$ | 0 | 3,4 | 5,9 | 7,1 |

невалентных взаимодействий изменяются в энергетическом интервале (-87,8)–(-74,3) кДж/моль, электростатических взаимодействий (3,8)–(10,1) кДж/моль, торсионных взаимодействий (6,3)–(13,4) кДж/моль (табл. 1). Самой стабильной конформацией молекулы соймorfина-5 является $V_3RB_1R_2R_2$ шейпа *efef*. Она выгодна по невалентным и электростатическим взаимодействиям, боковые цепи $Tyr1$ и $Phe3$ эффективно взаимодействуют с атомами основной цепи.

Конформация $V_3RB_3V_2V_2$ шейпа *efee* имеет относительную энергию 3,4 кДж/моль. Она по невалентным взаимодействиям проигрывает 4,2 кДж/моль, а по электростатическим взаимодействиям выигрывает 0,8 кДж/моль (таблица 1). Почти свернутая конформация $V_3RR_1R_2R_2$ шейпа *efff* имеет относительную энергию 5,9 кДж/моль. Она выгодна по невалентным взаимодействиям, невалентные взаимодействия вносят такой же вклад, как и в глобальной конформации, но резко уступает по электростатическим и торсионным взаимодействиям (табл. 1). Как видно из аминокислотной последовательности соймorfина-5 объемные и лабильные боковые цепи имеют $Tyr1$ и $Phe3$. В полусвернутых формах основной цепи N-концевого трипептидного фрагмента боковая цепь $Tyr1$ направлена в сторону от молекулы, поэтому не может эффективно взаимодействовать с остальными остатками молекулы соймorfина-5. А когда боковая цепь $Tyr1$ направлена к C-концу молекулы, тогда между атомами боковой цепи $Tyr1$ и другими атомами молекулы соймorfина-5 возникают отталкивания. Только в конформациях шейпов *eeee*, *eeef*, *eeef*, *eeff* боковая цепь $Tyr1$ направлена к C-концу молекулы соймorfина-5. С другой стороны, боковая цепь $Pro2$ всегда имеет одинаковое положение, переход от одного торсионного минимума к другому резко не изменяет расположение боковых цепей $Val 4$ и $Val 5$ в пространстве. Поэтому не происходит резкая энергетическая дифференциация между шейпами. В принципе можно предположить, что все эти конформации восьми шейпов могут быть физиологически активными, могут взаимодействовать с другими молекулами и рецепторами.

Пространственная структура молекулы соймorfина-6 рассчитана на основе низкоэнергетических конформаций соймorfина-5 и метиламида N-ацетил-L-аспарагина. Низкоэнергетические конформации молекулы соймorfина-5 представлены в таблице 1. Результаты расчета молекулы соймorfина-6 показали, что происходит энергетическая дифференциация между формами основной цепи и конформациями. В энергетический интервал 0-30 кДж/моль попадают конформации восьми шейпов. Низкоэнергетические конформации каждого шейпа, энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и их относительная энергия показаны в таблице 3. В низкоэнергетических конформациях энергия невалентных взаимодействий изменяется в интервале (-127,3)–(-90,3) кДж/моль, электростатических взаимодействий (6,3)–(10,5) кДж/моль, торсионных взаимодействий (10,1)–(16,8) кДж/моль. Для первых четырех низкоэнергетических конформаций геометрические параметры (в градусах) показаны в таблице 4. На рисунке 1 (a, b, c, d) показаны расположения атомов в пространстве в этих конформациях.

Глобальной конформацией молекулы соймorfина-6 является $V_3RR_1R_2R_2R_{11}$ шейпа *effff*. В этой конформации только первый остаток $Tyr1$ находится в В-форме основной цепи, остальные остатки находятся в R-форме основной цепи и образуют спиральную структуру. Боковые цепи аминокислотных остатков направлены так, что возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи и между атомами основной и боковых цепей молекулы (рис. 1a). Образуются водородная связь между атомами $C=O$ $Pro2$ и $N-H$ $Val5$; между атомами $C=O$ $Phe3$ и $N-H$ C-концевой группы NH_2 .

Конформация $V_3RB_1R_2R_2V_{31}$ шейпа *effff* с относительной энергией 0,8 кДж/моль, от глобальной конформации отличается формой основной цепи $Pro2$ и расположением боковых цепей $Tyr1$ и $Phe3$ в пространстве (рис. 2). Она выгодна по электростатическим взаимодействиям, электростатические отталкивания составляет 5,9 кДж/моль, что на 4,6 кДж/моль меньше, чем в глобальной конформации; по невалентным взаимодействиям она 9,3 кДж/моль уступает глобальной конформации (таблица 3). Конформация $V_3RR_1R_2V_2R_{21}$ шейпа *efffe* имеет относительную энергию 11,3 кДж/моль. Здесь первый остаток $Tyr1$ и $Val5$ находятся в В-форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки находятся в R-форме основной цепи и образуют полусвернутую структуру (рис. 1б). В конформации $V_3RR_3V_2V_2V_{31}$ шейпа *effee* N-концевой дипептидных фрагмент $Tyr1-Pro2$ и C-концевой трипептидных участок $Val4-Val5-Asn6$ находятся в развернутой форме основной цепи, $Pro2-Phe3$ образует изгиб и между этими участками и создает эффективные взаимодействия. В конформации $V_2BV_2V_2V_2V_{31}$ все аминокислотные остатки находятся в развернутой форме, боковые цепи всех аминокислотных остатков, кроме $Asn6$ ориентированы в одном направлении. В конформации $V_1BV_2R_2R_2R_{33}$ шейпа *eeeff* с относительной энергией 27,3 кДж/моль первые три аминокислотных остатка $Tyr1-Pro2-Phe3$ находятся в полностью развернутой форме, а следующие три аминокислоты в полностью свернутой форме основной цепи. Конформация $V_1BR_2V_2V_2V_{31}$ шейпа *eefee* имеет относительную энергию 28,6 кДж/моль и от конформации с полностью развернутой формой отличается формой основной цепи остатка $Phe3$. N-концевой дипептидный и C-концевой трипептидный участки находятся в полностью развернутой форме и их друг от друга отделяет третий аминокислотный остаток фенилаланина.

Трехмерная структура молекулы соймorfина-7 ($Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5-Asn6-Ala7-NH_2$) была исследована фрагментарно. Сначала, на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков была изучена пространственная структура пентапептидной молекулы соймorfина-5 ($Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5-NH_2$) и определены ее стабильные конформации. На втором этапе, на основе низкоэнергетических конформаций молекулы соймorfина-5 и аминокислотного остатка $Asn6$ была рассчитана пространственная структура соймorfина-6 ($Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5-Asn6-NH_2$). На третьем этапе, на основе

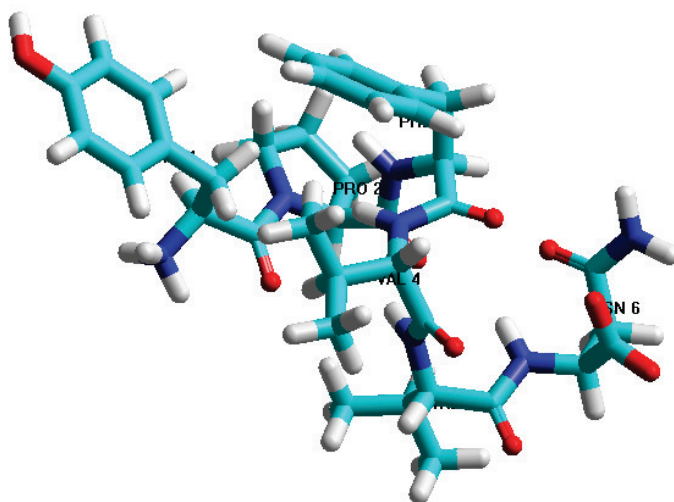


Рисунок 1а. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_3RR_1R_2R_2R_{11}R$ молекулы сойморфина-6

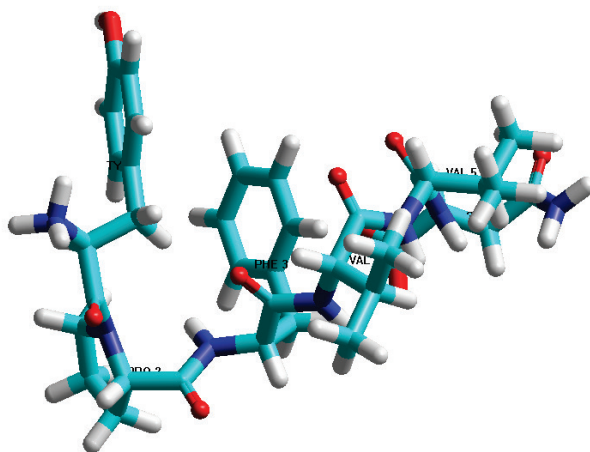


Рисунок 1б. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_3RB_1R_2R_2B_{31}R$ молекулы сойморфина-6

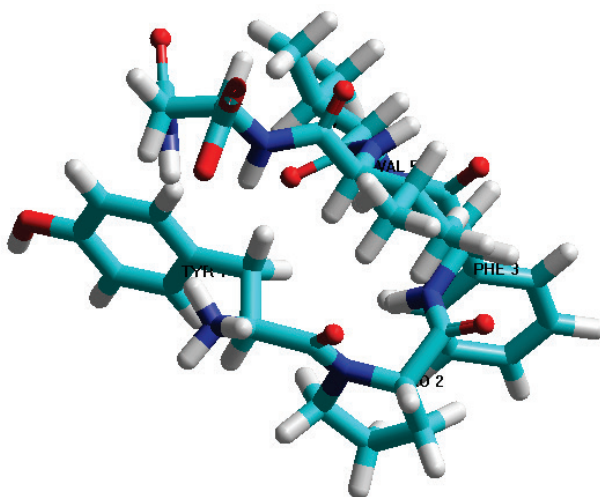


Рисунок 1с. Низкоэнергетическая пространственная структура $B_3RR_1R_2B_2R_{21}R$ молекулы сойморфина-6

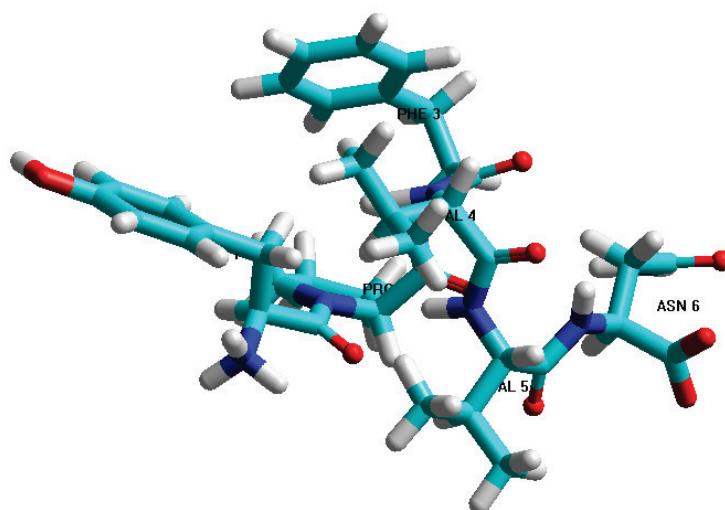


Рисунок 1d. Низкоэнергетическая пространственная структура B₂RR₃B₂B₂B₃1R молекулы сойморфина-6

оптимальных конформаций сойморфина-6 и аминокислотного остатка Ala7 была исследована трехмерная структура сойморфина-7. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основных цепей и шейпами. В энергетический интервал 0-43,0 кДж/моль попадают конформации восьми шейпов. Из каждого шейпа самые стабильные конформации представлены в таблице 5. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий и относительная ($U_{отн.}$) энергия оптимальных конформаций молекулы сойморфина-7. Геометрические параметры четырех конформаций, относительная энергия которых меньше 13,0 кДж/моль представлены в таблице 6. Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале (-131,0)–(-93,7) кДж/моль, электростатических взаимодействий 10,1–15,1 кДж/моль, торсионных взаимодействий 10,9–21,4 кДж/моль (табл. 5).

Глобальной конформацией молекулы сойморфина-7 является конформация B₃RR₁R₂R₂R₁1R шейпа efffff. Конформация является выгодной по невалентным взаимодействиям (табл. 5). Здесь только первый аминокислотный остаток Tyr1 находится в В форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки участка Pro2-Tyr3-Val4-Val5-Asn6-Ala7 свернуты в виде спирали. Поэтому, здесь возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи и между атомами боковых цепей. Возникают водородные связи между атомом С=О основной цепи Pro2 и N-H атомом основной цепи Val5; между атомом С=О основной цепи Phe3 и N-H атомом основной цепи Ala7; между атомом С=О основной цепи Phe3 и атомом N-H С-концевой группы, которые также в свою очередь стабилизируют глобальную структуру. В этой конформации боковые цепи аминокислотных остатков Tyr1, Phe3 и Asn6 направлены от молекулы к растворителю и легко могут взаимодействовать с другими молекулами и рецепторами.

Конформация B₃RB₁R₂R₂B₃1R шейпа efeffe с относительной энергией 0,4 кДж/моль образует такую структуру, что N-концевой тетрапептидный фрагмент и С-концевой трипептидный фрагмент образуют полусвернутую форму основной цепи. Поэтому в этой конформации Tyr1 эффективно взаимодействует с аминокислотными остатками Pro2-Phe3-Val4. Данная конформация по электростатическим взаимодействиям (2,7 кДж/моль), по торсионным взаимодействиям (6,7 кДж/моль) выгоднее, чем глобальная конформация (Таблица 5).

Таблица 3. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы сойморфина-6

| № | Шейп | Конформация | Энергетический вклад | | | $U_{отн.}$ |
|---|-------|---|----------------------|-----------|-------------|------------|
| | | | $U_{нев.}$ | $U_{эл.}$ | $U_{торс.}$ | |
| 1 | effff | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ R ₁ 1 | -127,3 | 10,5 | 16,8 | 0 |
| 2 | efeff | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ B ₃ 1 | -118,0 | 5,8 | 12,7 | 0,8 |
| 3 | efffe | B ₃ RR ₁ R ₂ B ₂ R ₂ 1 | -113,0 | 9,2 | 14,7 | 11,3 |
| 4 | effee | B ₃ RR ₃ B ₂ B ₂ B ₃ 1 | -102,1 | 7,0 | 10,1 | 15,0 |
| 5 | eeeee | B ₂ BB ₂ B ₂ B ₂ B ₃ 1 | -102,1 | 6,3 | 14,7 | 19,3 |
| 6 | efeee | B ₃ RB ₃ B ₂ B ₂ B ₃ 1 | -98,3 | 5,8 | 13,1 | 20,5 |
| 7 | eeeff | B ₁ BB ₂ R ₂ R ₂ R ₃ 3 | -95,3 | 9,2 | 13,0 | 27,3 |
| 8 | eefee | B ₁ BR ₂ B ₂ B ₂ B ₃ 1 | -90,3 | 6,7 | 11,8 | 28,6 |

Таблица 4. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы сойморфина-6. Значения двугранных углов даны в последовательности $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2$

| Остаток | Конформации | | | |
|------------|--|--|--|--|
| | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ R ₁₁ | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ B ₃₁ | B ₃ RR ₁ R ₂ B ₂ R ₂₁ | B ₃ RR ₃ B ₂ B ₂ B ₃₁ |
| Tyr1 | -110 151 -176 -69 101 0 | -90 155 168 -72 108 0 | -109 152 180 -70 103 0 | -110 155 178 -68 107 0 |
| Pro2 | -60 -48 -171 | -60 -41 176 | -60 -49 -173 | -60 -41 -179 |
| Phe3 | -65 -28 180 70 85 | -86 167 179 62 80 | -72 -30 173 72 88 | -86 -54 179 -57 97 |
| Val4 | -65 -40 -170 172 178 178 | -95 -63 -178 -179 -179 180 | -68 -56 179 170 179 178 | -94 99 -173 -178 -179 |
| Val5 | -62 -47 -177 172 180 178 | -102 -69 -175 -178 -177 179 | -94 63 -179 -172 -179 172 | -90 105 -178 179 179 179 |
| Asn6 | -87 -44 -177 61 94 | -100 114 179 -61 91 | -92 -59 180 179 87 | -88 119 180 -60 95 |
| ΔU | 0 | 0,8 | 11,3 | 15,1 |

Таблица 5. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных ($U_{нев.}$), электростатических ($U_{эл.}$), торсионных ($U_{торс.}$) взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы сойморфина-7

| № | Шейп | Конформация | Энергетический вклад | | | $U_{отн}$ |
|---|---------|--|----------------------|-----------|-------------|-----------|
| | | | $U_{нев.}$ | $U_{эл.}$ | $U_{торс.}$ | |
| 1 | efffff | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ R ₁₁ R | -131,0 | 13,0 | 21,4 | 0 |
| 2 | efeffe | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₂ B ₃₁ R | -122,2 | 11,3 | 14,7 | 0,4 |
| 3 | efffef | B ₃ RR ₁ R ₂ B ₂ R ₂₁ R | -122,1 | 15,1 | 16,0 | 5,5 |
| 4 | effeee | B ₂ RR ₃ B ₂ B ₂ B ₃₁ R | -106,3 | 12,2 | 10,9 | 12,6 |
| 5 | eeeeeee | B ₂ BB ₂ B ₂ B ₂ B ₃₁ R | -108,8 | 12,2 | 16,0 | 16,0 |
| 6 | efeeee | B ₃ RB ₃ B ₂ B ₂ B ₃₁ B | -105,4 | 10,1 | 12,6 | 13,9 |
| 7 | eeefff | B ₁ BB ₁ R ₂ R ₂ R ₃₃ R | -93,7 | 15,1 | 24,4 | 42,4 |
| 8 | eefeee | B ₁ BR ₂ B ₂ B ₂ B ₃₁ R | -96,2 | 12,2 | 13,4 | 26,0 |

Таблица 6. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы сойморфина-7. Значения двугранных углов даны в последовательности $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2$

| Остаток | Конформации | | | |
|------------|--|--|--|--|
| | B ₃ RR ₁ R ₂ R ₂ R ₁₁ R | B ₃ RB ₁ R ₂ R ₃ B ₃₁ R | B ₃ RR ₁ R ₂ B ₂ R ₂₁ R | B ₂ RR ₃ B ₂ B ₂ B ₃₁ R |
| Tyr1 | -109 151 -176 -70 102 0 | -89 155 169 -72 108 0 | -109 152 180 -70 103 0 | -110 155 178 -68 107 0 |
| Pro2 | -60 -48 -171 | -60 -41 176 | -60 -49 -173 | -60 -42 180 |
| Phe3 | -65 -30 -179 71 84 | -85 159 178 60 81 | -72 -30 173 72 88 | -87 -54 178 -57 97 |
| Val4 | -63 -37 -171 171 177 177 | -104 -65 -178 -175 -179 -179 | -68 -56 179 170 179 178 | -94 99 -173 -178 -179 180 |
| Val5 | -64 -49 -171 172 180 178 | -104 -68 -172 -177 -175 179 | -94 63 -179 -172 -179 172 | -90 105 -172 179 179 179 |
| Asn6 | -89 -49 -176 59 95 | -98 116 -179 -61 91 | -92 -59 180 179 87 | -88 119 180 -60 95 |
| Ala7 | -94 -53 180 179 | -89 -51 180 -178 | -90 -50 180 180 | -90 -50 180 180 |
| ΔU | 0 | 0,4 | 5,5 | 12,6 |

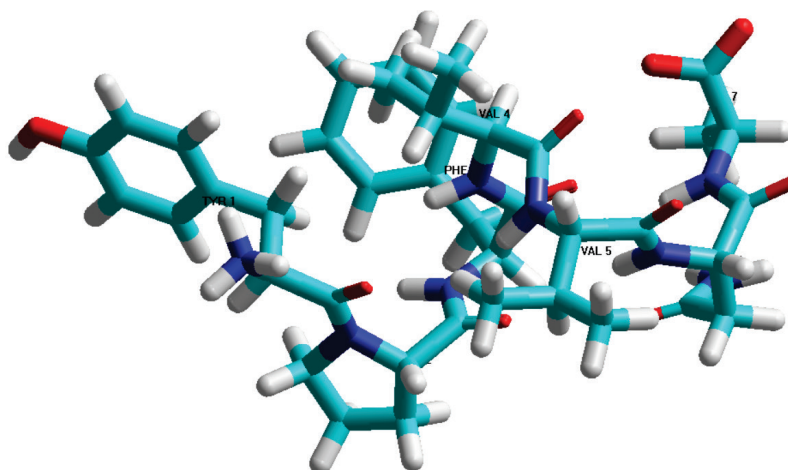


Рисунок 2а. Низкоэнергетическая пространственная структура B₃RR₁R₂R₂R₁₁R молекулы соймorfина-7

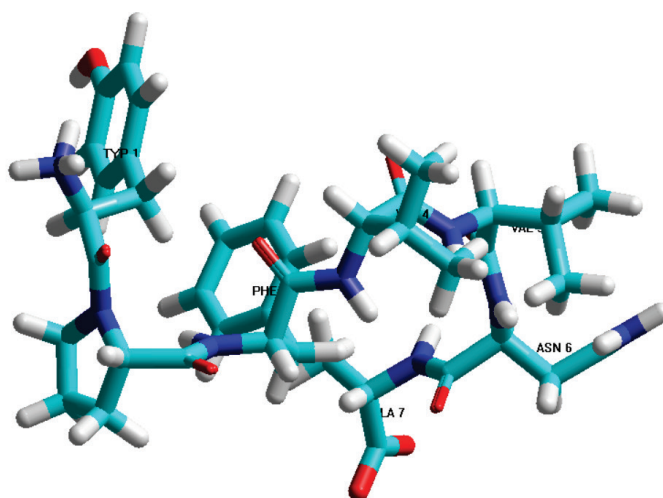


Рисунок 2б. Низкоэнергетическая пространственная структура B₃RB₁R₂R₃B₃₁R молекулы соймorfина-7

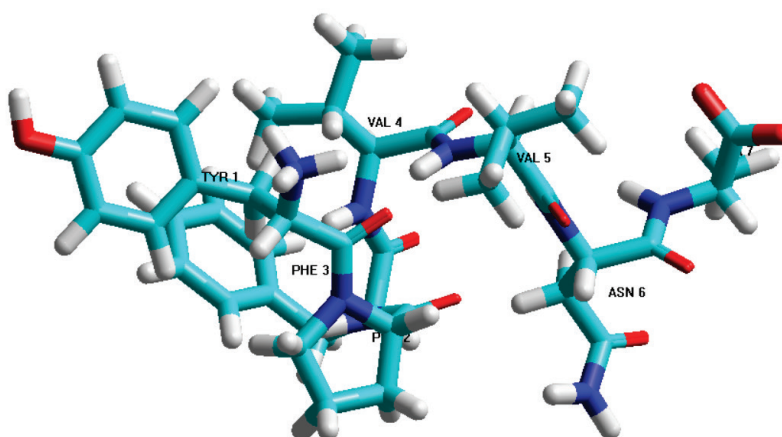


Рисунок 2с. Низкоэнергетическая пространственная структура B₃RR₁R₂B₂R₂₁R молекулы соймorfина-7

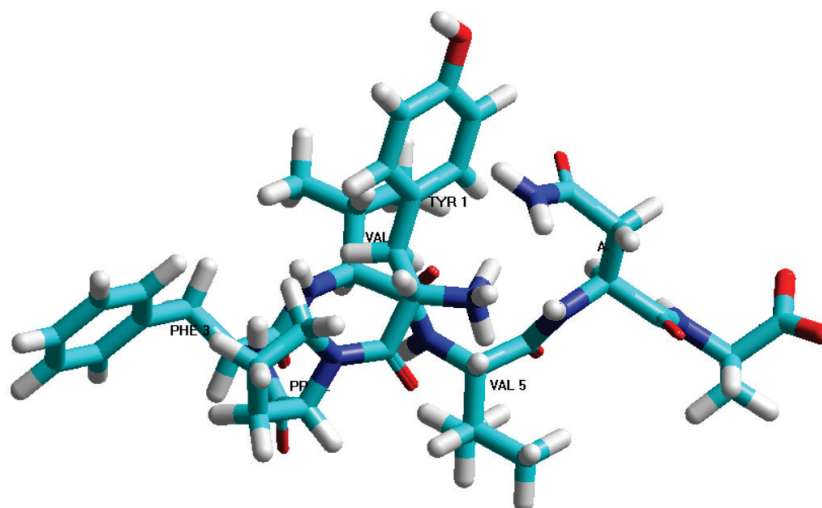


Рисунок 2d. Низкоэнергетическая пространственная структура B₂RR₃B₂B₂B₃₁R молекулы сойморфина-7

В конформации B₃RR₁R₂B₂R₂₁R шейпа efffeff трипептидный участок Pro2-Phe3-Val4 и дипептидный участок Asp6-Ala7 образуют свернутую структуру, их друг от друга отделяет изгиб между остатками Val5 и Asp6. При формировании этой структуры молекулы сойморфина-7 основную роль играют взаимодействия между атомами остатков Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5. Относительные энергии выше описанных конформаций не отличаются резко друг от друга, поэтому можно предположить, что в зависимости от условий могут участвовать во взаимодействиях с другими молекулами и рецепторами.

Конформация B₂RR₃B₂B₂B₃₁R шейпа efffee имеет относительную энергию 12,6 кДж/моль. В этой конформации N-концевой дипептидный фрагмент и C-концевой трипептидный участок образуют свернутую форму основной цепи, их друг от друга отделяет изгиб между остатками Phe3 и Val4. В этой структуре Tyr1 находится в центре структуры и эффективно взаимодействует с другими аминокислотными остатками.

Таким образом, пространную структуру молекул сойморфина-5, сойморфина-6 и сойморфина-7 можно представить восемью структурными типами. Можно предположить, что молекулы свои физиологические функции осуществляет в этих структурах. Сравнение низкоэнергетических структур сойморфинов показывают, что во всех молекулах первые четыре низкоэнергетические конформации являются представителями структурных типов efef, efef, efff, effe у сойморфина-5, effff, effff, efffe, effee у сойморфина-6, efffff, effffe, efffef, efffee у сойморфина-7. На основе этих структур можно предложить их искусственных аналогов для синтеза.

Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in Physiological Sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46 (In Russ.)].
2. Соколов О.Ю., Кост Н. В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, 2010, т. 45, № 3, с. 29-35 [Sokolov O.Yu., Kost N.V., Andreeva O.O., Korneeva E.V., Meshavkin V.K., Tarakanova Yu.N., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A., Grachev S.A., Mikheeva I.G., Zozulya A.A. The possible role of casomorphin sinpathogenesis of autism. *Psixiatriya*, 2010, vol. 46, no. 3, pp.29-35 (In Russ.)].
3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.*, 2009, vol. 19, no. 4, pp. 258-263.
4. Ахмедов Н.А. Теоретический конформационный анализ молекул β-казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекулярная Биология*, 1989, т. 23, с. 240-248. [Akhmedov N.A. Theoretical conformation analysis of β-casomorphin, valmuceptin and morphiceptin molecules. *Molecular. Biol.*, 1989, 23, 240-240(In Russ.)].
5. Ахмедов Н.А., Годжаев Н.М., Сулейманова Е.В., Попов Е.М. Структурная организация молекул [Met] энкефалина и эндорфинов. *Биоорганическая химия*, 1990, т. 16, с. 649-667 [Akhmedov N.A., Godjaev N.M., Suleymanova E.V., Popov E.M. Structural organization of the [Met] enkephalin and endorphins molecules. *Bioorganic chemistry*, 1990, vol. 16, pp. 649-667 (In Russ.)].
6. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т.58, вып. 4, с. 587-590 [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590 (In Russ.)].
7. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M. et al. Spatial Structure of Octarphin molecule. *IOSR J. Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2016, vol. 8, pp.66-70.
8. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. *COIA 2020*, Baku, Azerbaijan, vol. I, pp. 218-221.

9. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akverdieva G.A., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2021, vol. 43, no. 05, pp. 500-504.
10. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Akhmedova S.R., Abbasli R.M., Ismailova L.I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol.13, iss. 5, ser. II, pp. 62-67, doi: 10.9790/4861-1305026267.
11. Agayeva L.N., Abdinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.A. Spatial Structure of the ACTH-(7-10) Molecule. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 531-534.
12. Akhmedov N.A., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Ismailova L.I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. *Conference proceedings Modern Trends in Physics*, 2019, pp. 201-104.
13. IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford 1993.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF SOYMORPHIN MOLECULES

Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Ismailova L.I.

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov Str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan, e-mail: Namiq.49@bk.ru

Received 23.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2023.0585

Abstract. The conformational capabilities of soymorphine-5 (Thr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-NH₂), soymorphine-6 (Tyr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-Asn6-NH₂) and soymorphine-7 (Tyr1-Pro2-Tyr3-Val4-Val5-Asn6-Ala7-NH₂) molecules have been studied by the method of theoretical conformational analysis. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of soymorphine-5, soymorphine-6 and soymorphine-7 molecules were found, the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues that make up the molecule were found, and the energy of intra- and interresidual interactions was estimated. Thus, the spatial structure of soymorphine-5, soymorphine-6 and soymorphine-7 molecules can be represented by eight structural types. It can be assumed that the molecules perform their physiological functions in these structures. Comparison of the low-energy structures of soymorphins shows that in all molecules the first four low-energy conformations are representatives of the structural types efef, efee, efff, effe for soymorphine-5, effff, efeff, efffe, effee for soymorphine-6, effffff, efeffe, efffef, effeee for soymorphine-7. On the basis of these structures, it is possible to propose their artificial analogues for synthesis. It was shown that the spatial structure of soymorphine-5, soymorphine-6 and soymorphine-7 molecules is represented by the conformations of eight shapes of the peptide skeleton. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of soymorphine molecules.

Key words: *exorpin, soymorphin, opioid, structure, conformation.*

ИЗМЕНЕНИЯ В СИНТЕЗЕ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ У САМЦОВ КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Тимохина Е.П.

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

Абрикосовский пер., 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: yaglova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0587

Аннотация. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) является наиболее распространенным системным поллютантом и эндокринным дисраптором. Проведено исследование влияния пренатального и постнатального воздействия ДДТ в низких дозах, соответствующих потреблению ДДТ человеком с продуктами питания с учетом максимально допустимых уровней содержания ДДТ в пищевой продукции на параметры синтеза мужских половых гормонов в гонадах и надпочечниках у половозрелых самцов крыс. Установлено, что после достижения половой зрелости у самцов отмечается пониженный уровень общего тестостерона и андростендиона в сыворотке крови. Исследование механизмов снижения синтеза половых гормонов показало, что у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в развитии, отмечается высокий уровень прогестерона и пониженный уровень 17-оксипрогестерона, являющегося непосредственным предшественником синтеза андрогенов. Таким образом, воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм не влияло на синтез прогестерона, но вызывало снижение его гидроксиглирования, что обуславливало накопление прогестерона в системном кровотоке и приводило к уменьшению продукции мужских половых гормонов как в семенниках, так и в надпочечниках самцов крыс. Полученные в настоящем исследовании данные впервые демонстрируют новый механизм антиандрогенного действия эндокринного дисраптора ДДТ.

Ключевые слова: половые стероиды, андрогены, эндокринный дисраптор, ДДТ.

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие эндокринных дисрапторов на организм является серьезной медико-социальной проблемой, связанной с их массовым распространением в окружающей среде [1]. Большинство эндокринных дисрапторов являются липофильными соединениями, накапливающимися в органах и тканях и негативно влияющими на функционирование органов и систем. Вторая опасность эндокринных дисрапторов обусловлена их способностью проникать через фетоплацентарный барьер и влиять на развитие плода [2].

Одним из наиболее распространенных на планете дисрапторов является пестицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), активно применявшийся в прошлом веке и продолжающийся использоваться и в настоящее время [3,4]. Длительный период распада и накопление в организмах способствуют его персистенции в экосистемах [5]. Фоновые дозы ДДТ регулярно обнаруживаются в природных источниках воды, почве, биомассе, продуктах питания [3].

Как эндокринный дисраптор ДДТ обладает широким спектром действия, нарушая функционирование надпочечников, щитовидной железы и половых желез [6-8]. Исследования показали, что он обладает антиандрогенным действием, конкурентно связываясь с рецепторами андрогенов в клетках-мишенях и блокируя сигнальный каскад гормонов [8,9]. Другие механизмы действия ДДТ на секрецию половых гормонов не известны. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм с момента оплодотворения вызывает комплекс изменений в половом развитии самцов, что проявляется задержкой адренархе и гонадархе [10,11].

Целью настоящего исследования было установление параметров синтеза половых стероидов у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, после наступления половой зрелости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на половозрелых самцах крыс Вистар в возрасте 10-ти недель. Опытную группу (n=10) составило потомство самок, потреблявших вместо питьевой воды раствор *o,n*-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л в течении всей беременности и лактации. Затем самцы крыс самостоятельно потребляли аналогичный раствор. Расчет потребляемой дозы ДДТ производили согласно требованиям к определению низких доз, с учетом пороговых значений низких доз для ДДТ (50 мкг/кг/сут) [12] и нормативам содержания ДДТ в пищевой продукции согласно Техническому регламенту Таможенного Союза [13]. Среднесуточное потребление ДДТ составило $2,7 \pm 0,2$ мкг/кг. Потомство интактных самок мужского пола соответствующего возраста (n=11) использовалось в качестве контрольной группы. Отсутствие в корме и воде ДДТ и его метаболитов было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила.

В сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа определяли концентрации общего тестостерона, андростендиона, прогестерона и 17-оксипрогестерона с помощью наборов реактивов («Cusabio», Китай, «DBC», «Monobind», США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, после наступления половой зрелости были выявлены отличия в содержании мужских половых стероидов в системном кровотоке. Концентрация связанного с белками плазмы тестостерона на четверть ниже, чем у крыс контрольной группы (рис. 1а). Концентрация андростендиона также была понижена по сравнению с контролем, но в большей степени, чем тестостерона и составляла менее 60% от значений контрольной группы (рис. 1б).

Определение предшественника стероидных гормонов прогестерона показало, что его содержание в системном кровотоке было выше на треть, чем в контрольной группе (рис. 2а), а уровень его производного 17-оксипрогестерона был значительно снижен (рис. 2б).

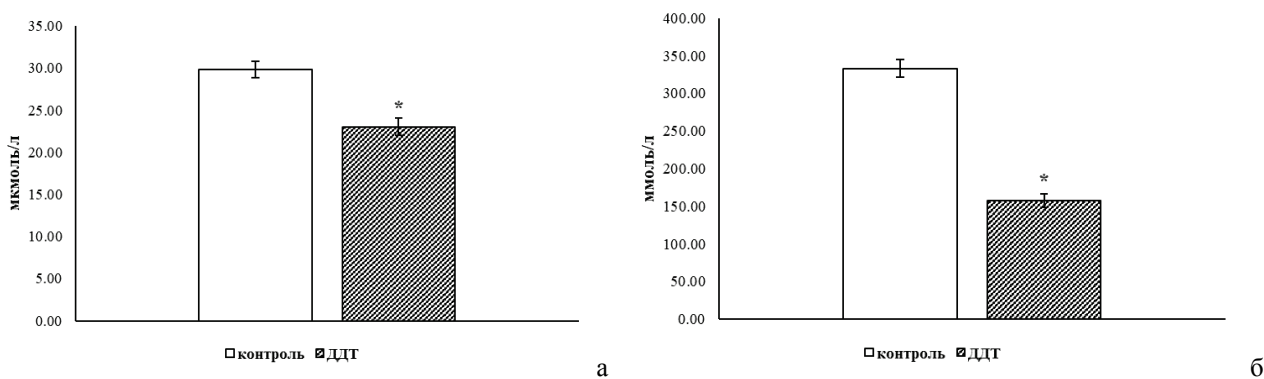


Рисунок 1. Изменения концентрации общего тестостерона (а) и андростендиона (б) в сыворотке крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии ($M \pm m$).
* – статистически значимые отличия от значений контрольной группы

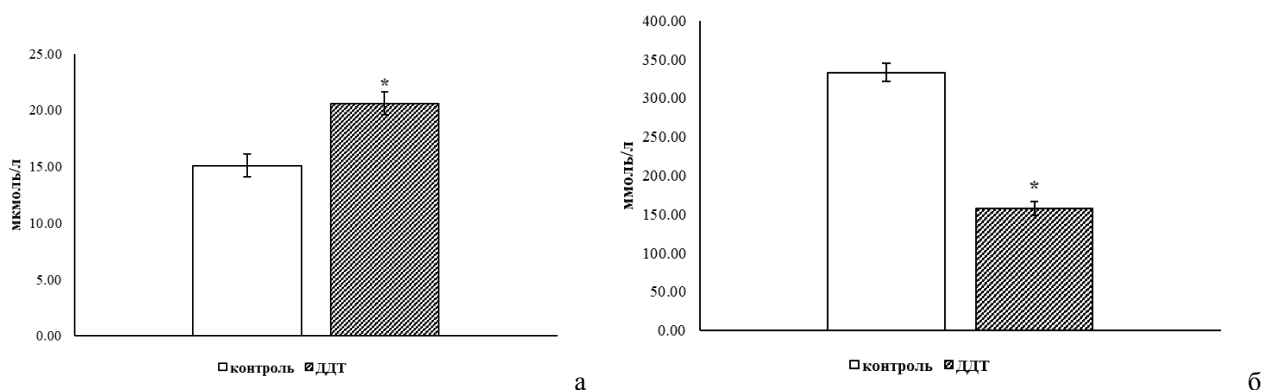


Рисунок 2. Изменения концентрации прогестерона (а) и 17-оксипрогестерона (б) в сыворотке крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии ($M \pm m$).
* – статистически значимые отличия от значений контрольной группы

Тестостерон у половозрелых особей синтезируется преимущественно в семенниках, в то время как основная доля андростендиона вырабатывается в сетчатой зоне коркового вещества надпочечников [14]. Проведенное исследование показало, что воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза приводит к снижению продуцируемых гонадами, так и сетчатой зоной надпочечников мужских половых стероидов. Концентрации половых стероидов были снижены в разной степени. Наибольшее снижение синтеза обнаружено у андростендиона, что согласуется с ранее полученными данными о выраженной задержке развития сетчатой зоны в надпочечниках крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии [11]. При этом уровень общего предшественника стероидных гормонов прогестерона не только не был снижен, но и статистически значимо повышен. Эти данные свидетельствуют, что в организме, развивающемся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, не нарушен синтез основного источника

стероидных гормонов, а, следовательно, нарушения начинаются на более поздних этапах синтеза половых гормонов. 17-оксипрогестерон является непосредственным предшественником половых стероидов. Его синтез повышается на 8-й неделе постнатального развития, что знаменует собой гонадархе [15]. Пониженное содержание в системном кровотоке 17-оксипрогестерона наряду с избытком прогестерона указывает на замедление гидроксилирования прогестерона у 17 атома углерода, что в свою очередь влечет за собой снижение синтеза половых гормонов в организме. Полученные данные позволяют рассматривать ингибирование гидроксилирования прогестерона как еще один механизм антиандрогенного действия ДДТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии нарушает синтез половых гормонов у крыс после достижения ими половой зрелости и в надпочечниках, и в семенниках. Основным механизмом является уменьшение гидроксилирования прогестерона. Следовательно, ДДТ оказывает дисрапторное действие не только за счет блокады рецепторов андрогенов, но и за счет снижения синтеза самих половых гормонов.

Работа выполнена по госзаданию № FGFZ-2022-0035.

Список литературы / References:

1. Bergman A., Heindel J., Jobling S., Kidd K., Zoeller R.T. *State of the Science of Evidence for endocrine disruption in humans and wildlife*. World Health Organization, Eds.: WHO: Geneva, Switzerland, 2012, 260 p.
2. *Endocrine disruptors and child health - Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health*. World Health Organization, WHO: Geneva, Switzerland, 2012, 93 p.
3. *Pesticide residues in food - 2018. Toxicological evaluations*. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO: Geneva, Switzerland, 2019, 780 p.
4. *The use of DDT in malaria vector control*. World Health Organization. WHO: Geneva, Switzerland, 2011, 16 p.
5. Mansouri A., Cregut M., Abbes C., Durand M.-J., Landoulsi A., Thouand G. The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2017, vol. 181, pp. 309-339, doi: 10.1007/s12010-016-2214-5.
6. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Mechanisms of disruptive action of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the function of thyroid follicular epitheliocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, vol. 162, no. 5, pp. 699-702, doi: 10.1007/s10517-017-3691-4.
7. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2017, т. 163, № 4, с. 415-418, doi: 10.1007/s10517-017-3819-6. [Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Effect of prenatal and postnatal exposure to low doses of DDT on catecholamine secretion in rats in different period of ontogeny. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, vol. 163, no. 4, pp. 422-424 (In Russ.)].
8. De Falco M., Forte M., Laforgia V. Estrogenic and anti-androgenic disrupting chemicals and their impact on the male re-productive system. *Front. Environ. Sci.*, 2015, no. 3, art. 3, doi: 10.3389/fenvs.2015.00003.
9. Maness S.C., McDonnell D.P., Gaido K.W. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, vol. 151, pp. 135-142, doi: 10.1006/taap.1998.8431.
10. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии. *Биомедицинская химия*, 2017, т. 63, № 4, с. 306-311, doi: 10.18097/PBMC20176304306. [Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Differences in Production of Adrenal Steroid Hormones in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of the Endocrine Disruptor DDT during Prenatal and Postnatal Development. *Biochemistry, Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2018, vol. 12, no. 1, pp. 80-86 (In Russ.)].
11. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Развитие и функционирование сетчатой зоны коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ. *Известия РАН. Серия биологическая*, 2022, № 3, с. 227-236, doi: 10.31857/S1026347022030179. [Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Timokhina E.P., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Development and Function of the Adrenal Zona Reticularis in Rats Prenatally and Postnatally Exposed to the Endocrine Disruptor DDT. *Biology Bulletin*, 2022, vol. 49, no. 3, pp. 227-236 (In Russ.)].
12. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D. Jr., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller T., Myers J. *Endocrine Reviews*, 2012, vol. 33, no. 3, pp. 378-455, doi: 10.1210/er.2011-1050.
13. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб: ГИОРД, 2015, 176 с. [Technical regulation of the Customs Union TR CU 021/2011 "On safety of food products". SPb.: GIORД, 2015, 176 p. (In Russ.)].
14. Яглов В.В., Яглова Н.В. *Основы частной гистологии*. М.: КолосС, 2011, 431 с. [Yaglov V.V., Yaglova N.V. *Fundamentals of histology*. М.: KolosS, 2011, 421 p. (In Russ.)].
15. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira, J., Vinson G. Adrenarche in the rat. *J. Endocrinol.*, 2006, vol. 191, pp. 301-308, doi: 10.1677/joe.1.06972.

DEVELOPMENTAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ALTERS PARAMETERS OF SEX STEROID PRODUCTION IN MALE RATS**Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Timokhina E.P.**A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution
“Petrovsky National Research Centre of Surgery”*Abrikosovskiy side-street, 2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: yaglova@mail.ru*

Received 28.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0587

Abstract. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is the most widespread systemic pollutant and endocrine disruptor. The effect of prenatal and postnatal exposure to DDT in low doses corresponding to human dietary intake of DDT, considering maximum allowable levels of DDT in food, on the synthesis parameters of male sex hormones in the gonads and adrenal glands of mature male rats was studied. It has been found that after maturation, a reduced level of total testosterone and androstenedione in blood serum is observed in male rats. An investigation into the mechanisms of decreased synthesis of sex hormones showed that rats exposed to low doses of DDT in ontogeny show higher levels of progesterone and reduced levels of 17-oxyprogesterone, a direct precursor of androgen synthesis. Thus, exposure of the developing organism to low doses of DDT did not affect progesterone synthesis, but decreased its hydroxylation, which resulted in progesterone accumulation in the systemic bloodstream and decreased production of male sex hormones in both testes and adrenal glands of male rats. The data obtained in the present study demonstrate for the first time a new mechanism of anti-androgenic action of the endocrine disruptor DDT.

Key words: *sex steroids, androgens, endocrine disruptor, DDT.*

АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1, СОЕДИНЕНИЕ BD-1063, ПОДАВЛЯЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ МОЛИКСАНОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹,
Симомян А.О.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

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

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

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

Поступила в редакцию 30.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0588

Аннотация. Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации. Фармакологический аналог окисленного глутатиона препарат моликсан® используется как иммуномодулятор и цитопротектор в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний; эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Для выявления участия рецепторов сигма-1 во влиянии моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах в целом, исследовали влияние избирательного антагониста рецепторов сигма-1, соединения BD-1063, на Ca^{2+} -ответы, вызываемые моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что соединение BD-1063 значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетки, индуцируемые моликсаном в перитонеальных макрофагах. Полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: соединение BD-1063, рецепторы сигма-1, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикулума, на границе с митохондриями (МММ – mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) [1-5]. Они могут также транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с другими рецепторами и ионными каналами; встречаются и в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции [2]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая иммунные [3,5-7]. Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты (флувоксамин, сертралин, имипрамин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин, трифлуоперазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противокашлевые (декстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) [8-10].

Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами в плазмалемме и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации [2,4,5,11,12]. В плазмалемме они взаимодействуют с потенциалзависимыми Ca^{2+} -, Na^{+} - и K^{+} -каналами, протон-активируемыми ионными каналами (ASICs), Ca^{2+} -проницаемыми каналами TRPA1, TRPV1 и TRPM8, NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, μ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами), рецепторными тирозинкиназами и другими белками-мишенями [2,4-6,13-15]. В мембране эндоплазматического ретикулума рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, с другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) [16] и Ca^{2+} -сенсором белком STIM1 [17]. Обнаружено, что, взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -сигнализации в клетках: мобилизацию Ca^{2+} из депо [18] и вход Ca^{2+} из наружной среды [11,12,19]. Выявлено их участие в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетках [17,20,21].

Фармакологический аналог окисленного глутатиона препарат моликсан® («ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) используется как иммуномодулятор и цитопротектор в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [22,23]. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Приводит к более быстрому регрессу тяжести

заболевания в более легкую форму [24]. Ранее нами было впервые показано, что моликсан увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [25]. Для выявления участия рецепторов сигма-1 во влиянии моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах в целом, исследовали влияние лиганда рецепторов сигма-1, соединения BD-1063, на Ca^{2+} -ответы, вызываемые моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Соединение BD-1063 - 1-[2-(3,4-дихлорофенил)этил]-4-метилпиперазин дигидрохлорид – является эффективным и избирательным антагонистом рецепторов сигма-1 [26].

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20 - 22°C через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны нами ранее [27]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотоблещения измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [28]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $P \leq 0,05$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [29,30].

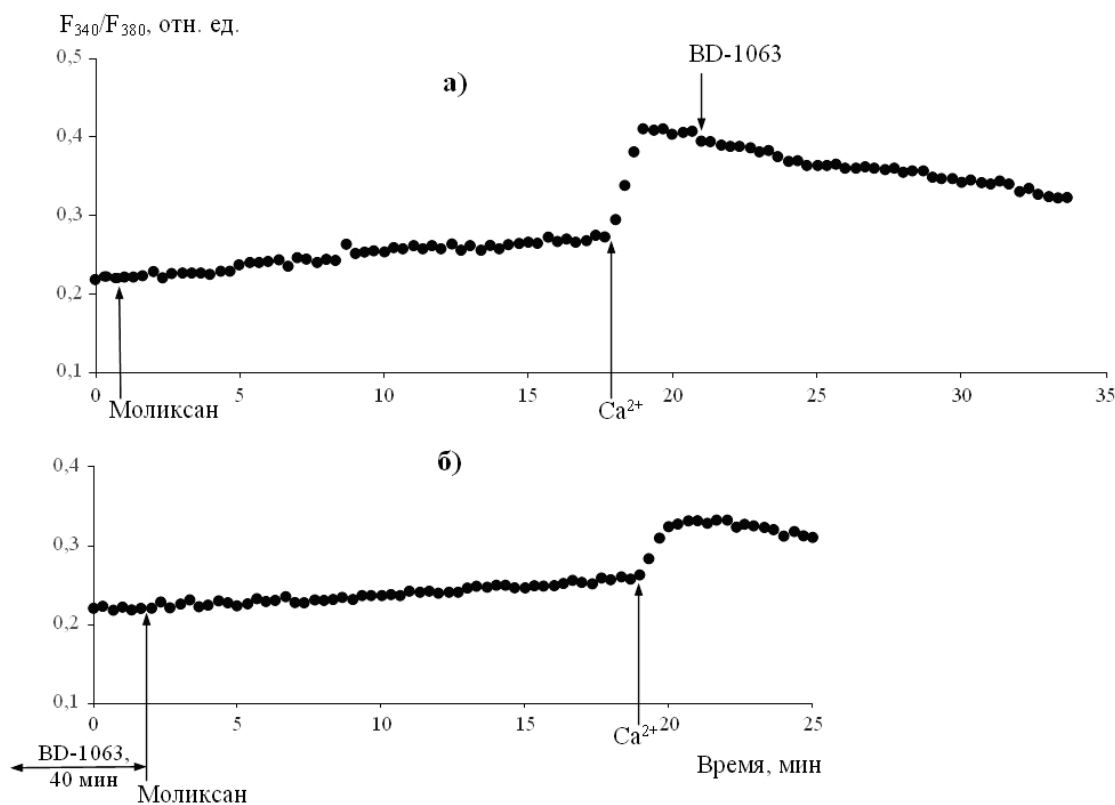


Рисунок 1. Влияние соединения BD-1063 на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время (мин). а – клетки инкубировали в течение 17 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 60 мкМ BD-1063; б – макрофаги предварительно инкубировали в течение 40 мин с 60 мкМ BD-1063 в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 17 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6-8 независимых экспериментов

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 17 мин со 100 мкг/мл моликсана (рис. 1а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Через 17 мин после добавления моликсана $[Ca^{2+}]_i$ в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 92 ± 10 нМ, до 134 ± 14 нМ ($n = 6$; $P < 0,05$). При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а). В среднем увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 241 ± 21 нМ ($n = 6$; $P < 0,05$).

Впервые обнаружено, что антагонист рецепторов сигма-1, соединение BD-1063, подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых моликсаном в перитонеальных макрофагах. Показано, что предварительная инкубация макрофагов с 60 мкМ BD-1063 в течение 40 мин до введения 100 мкг/мл моликсана приводит к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (на $50,8 \pm 9,3\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетки (на $54,0 \pm 10,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), индуцируемых моликсаном (рис. 1б). Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого моликсаном, в макрофагах.

Кроме того, нами было выявлено, что добавление 60 мкМ BD-1063 на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного моликсаном, вызывает значительное (на $63,1 \pm 8,5\%$, $n = 12$; $P < 0,05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 1а). Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что избирательный антагонист рецепторов сигма-1, соединение BD1063, значительно подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых моликсаном в перитонеальных макрофагах. Это подтверждает полученные нами ранее данные о том, что антагонисты рецепторов сигма-1, типичные нейролептики галоперидол, хлорпромазин и трифлуоперазин, ингибируют Ca^{2+} -ответы, индуцируемые моликсаном в макрофагах [31].

Результаты также согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что антагонисты рецепторов сигма-1 хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [32,33]. Показано также, что хлорпромазин ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) [34], а преинкубация клеток с трифлуоперазином приводит к существенному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) [35]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (соединения BD1063 и BD1047) ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [36], а в клетках аденокарциномы молочной железы человека (линия MCF7) BD1063 значительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином [37], и подавляет Ca^{2+} -ответы, вызываемые брадикинином [38].

Кроме того, известно, что антагонисты сигма-1 рецепторов ингибируют Ca^{2+} -проницаемые каналы суперсемейства TRP (Transient Receptor Potential channels) в клетках разных типов. Так, BD1063 и BD1047 ингибируют каналы TRPC5 и TRPM3 в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [36]. В клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) соединение BD1063 подавляет активность каналов TRPV1 [13] и каналов TRPA1 [39].

Результаты настоящей работы и ранее [31] о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca^{2+} -ответов, вызываемых моликсаном в макрофагах, свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом моликсаном и приводящем к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс.

Полученные нами данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами, в перитонеальных макрофагах крыс и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход Ca^{2+} , модулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа Ca^{2+} – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме [17].

Кроме того, полученные результаты могут иметь значение для терапии заболеваний, опосредованных нарушением функционирования рецепторов сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций рецепторов сигма-1 приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека [3-5,40]. Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии нейропсихиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции) [41-46], нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза) [47-52], онкологических [11,53] и сердечнососудистых [5] заболеваний, болевых синдромов [54], ретинопатий [55] и COVID-19 [56]. Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

Установлено также участие рецепторов сигма-1 в возникновении и поддержании нейропатической боли [57]. В связи с этим, антагонисты сигма-1 рецепторов, включая соединение BD-1063, рассматриваются как

перспективные агенты для терапии этого болевого синдрома. Так, выявлен антигипералгезический и антиаллодинический эффекты антагониста сигма-1 рецепторов BD-1063 в модели хронического сужения седалищного нерва у крыс [58]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов BD-1063, BD-1047 и NE-100 ингибируют механическую аллодинию, вызванную капсаицином у мышей [59]. Кроме того, избирательные антагонисты BD-1063 и S1RA предотвращают или полностью обращают холодovou и механическую аллодинию, вызываемую паклитакселем у мышей [60,61].

Таким образом, полученные нами данные о подавлении избирательным антагонистом рецепторов сигма-1, соединением BD-1063, обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащим иммуномодулятором моликсаном в перитонеальных макрофагах крыс, дополнительно подтверждают многогранность эффектов лигандов рецепторов сигма-1 и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала.

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

Список литературы / References:

1. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
2. Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., Tsai S.-Y. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 262-278.
3. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ R]: Biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2016, vol. 36, no. 4, pp. 327-388.
4. Schmidt H.R., Kruse A.C. The molecular function of σ receptors: past, present, and future. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, vol. 40, no. 9, pp. 636-654.
5. Aishwarya R., Abdullah C.S., Morshed M., Remex N.S., Bhuiyan M.S. Sigmar1's molecular, cellular, and biological functions in regulating cellular pathophysiology. *Front. Physiol.*, 2021, vol. 12, p. 705575, doi: 10.3389/fphys.2021.705575.
6. Munguia-Galaviz F.J., Miranda-Diaz A.G., Cardenas-Sosa M.A., Echavarria R. Sigma-1 receptor signaling: In search of new therapeutic alternatives for cardiovascular and renal diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, 1997, doi: 10.3390/ijms24031997.
7. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
8. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, no. 4, pp. 344-366.
9. Maurice T., Su T.-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2009, vol. 124, no. 2, pp. 195-206.
10. Chu U.B., Ruoho A.E. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2016, vol. 89, pp. 142-153.
11. Pontisso I., Combettes L. Role of sigma-1 receptor in calcium modulation: possible involvement in cancer. *Genes*, 2021, vol. 12, no. 2, p. 139, doi: 10.3390/genes12020139.
12. Shi M., Chen F., Chen Z., Yang W., Yue S., Zhang J., Chen X. Sigma-1 receptor: a potential therapeutic target for traumatic brain injury. *Front. Cell. Neurosci.*, 2021, vol. 15, p. 685201, doi: 10.3389/fncel.2021.685201.
13. Ortiz-Renteria M., Juarez-Contreras R. et al. TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2018, vol. 115, pp. E1657-E1666, doi: 10.1073/pnas.1715972115.
14. Morales-Lázaro S.L., González-Ramírez R., Rosenbaum T. Molecular interplay between the sigma-1 receptor, steroids, and ion channels. *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 419, doi: 10.3389/fphar.2019.00419.
15. Cortés-Montero E., Sánchez-Blázquez P., Onetti Y., Merlos M., Garzón J. Ligands exert biased activity to regulate sigma 1 receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1 and TRPM8 channels. *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 634, doi: 10.3389/fphar.2019.00634.
16. Hayashi T., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell*, 2007, vol. 131, pp. 596-610.
17. Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., Vistal G., Edwardson J. M., Taylor C.W., Murrell-Lagnado R.D. Sigma 1 receptors inhibit store-operated Ca^{2+} entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J. Cell Biol.*, 2016, vol. 213, no. 1, pp. 65-79.
18. Hayashi T., Maurice T., Su T.-P. Ca^{2+} signalling via σ 1-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 2000, vol. 293, pp. 788-798.
19. Monnet F.P. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca^{2+} : clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell.*, 2005, vol. 97, pp. 878-883.
20. Brailoiu G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., Soboloff J., Abood M.E., Unterwald E.M., Brailoiu E. Cocaine inhibits store-operated Ca^{2+} entry in brain microvascular endothelial cells: Critical role for sigma-1 receptors. *Biochem. J.*, 2016, vol. 473, pp. 1-5.
21. Berlansky S., Humer C., Sallinger M., Frischauf I. More than just simple interaction between STIM and Orai proteins: CRAC channel function enabled by a network of interactions with regulatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 471, doi: 10.3390/ijms22010471.

22. Борисов А.Е., Кожемякин Л.А. и др. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов группы тиопозтинов при циррозе печени. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.*, 2001, т. 4, № 2, с. 32-38 [Borisov A.E., Kozhemyakin L.A. et al. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoeitin group medicines for cirrhosis of the liver. *Vestnic hirurgii im. I.I. Grekova*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 32-38 (In Russ.)].
23. Толстой О.А., Цыган В.Н., Климов А.Г., Степанов А.В., Антушевич А.Е. Экспериментальная оценка эффективности препарата моликсан по восстановлению работоспособности вирусинфицированных лабораторных животных. *Известия Рос. военно-мед. акад.*, 2019, т. 38, № 1, с. 271-277 [Tolstoy O.A., Tsygan V.N., Klimov A.G., Stepanov A.V., Antushevich A.E. Experimental evaluation of the efficiency of the drug molixan on restoring the operation of virus-infected laboratory animals. *Bull. Russ. Military Med. Acad.*, 2019, vol. 38, no. 1, pp. 271-277 (In Russ.)].
24. Dubina M.V., Gomonova V.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V., Sayganov S.A. *Pathogenesis-based pre-exposure prophylaxis associated with low risk of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a designated COVID-19 hospital.* 2020, doi: 10.1101/2020.09.25.20199562.
25. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние препарата моликсан на процессы Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах. *Цитология*, 2011, т. 53, № 9, с. 708 [Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of drug molixan on Ca^{2+} signaling processes in macrophages. *Tsitologiya*, 2011, vol. 53, p. 708 (In Russ.)].
26. Matsumoto R.R., Bowen W.D., Tom M.A., Vo V.N., Truong D.D., De Costa B.R. Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, vol. 280, pp. 301-310.
27. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, № 2, с. 116-121 [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 315-322 (In Russ.)].
28. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
29. Bruce J.I.E., Elliott A.C. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.*, 2000, vol. 131, pp. 761-771.
30. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566, doi: 10.1074/jbc.M109518200.
31. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И., Симонян А.О. Нейролептики подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 127-136. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I., Badulina V.I., Simonyan A.O. Neuroleptics attenuate Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Russ. J. Biol. Phys. Chem.*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 127-136. (In Russ.)]
32. Harper J.L., Shin Y., Daly J.W. Loperamide: A positive modulator for store-operated calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, vol. 94, pp. 14912-14917.
33. Harper J.L., Daly J.W. Inhibitors of store-operated calcium channels: Imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Dev. Res.*, 1999, vol. 47, pp. 107-117.
34. Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., Kim K.-T. Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British J. Pharmacol.*, 2001, vol. 132, pp. 411-418.
35. Wang L., Zhang L., Li S., Zheng Y., Yan X., Chen M., Wang H., Putney J.W., Luo D. Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated Ca^{2+} entry by calsequestrin. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, pp. 1-12.
36. Amer M.S., McKeown L. et al. Inhibition of endothelial cell Ca^{2+} entry and transient receptor potential channels by sigma-1 receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.*, 2013, vol. 168, pp. 1445-1455.
37. Gasparre G., Abate C., Carlucci R., Berardi F., Cassano G. The σ_1 receptor agonist (+)-pentazocine increases store-operated Ca^{2+} entry in MCF7 σ_1 and SK-N-SH cell lines. *Pharmacol. Rep.*, 2017, vol. 69, pp. 542-545.
38. Wu Z., Bowen W.D. Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation. Constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 28198-28215.
39. Marcotti A., Fernández-Trillo J. et al. TRPA1 modulation by Sigma-1 receptor prevents oxaliplatin-induced painful peripheral neuropathy. *Brain*, 2023, vol. 146, pp. 475-491.
40. Pergolizzi J., Varrassi G., Coleman M., Frank Breve F., Christo D.K., Christo P.J., Moussa Ch. The Sigma Enigma: A narrative review of sigma receptors. *Cureus*, 2023, vol. 15, no. 3, e35756, doi: 10.7759/cureus.35756.
41. Tsai S.-Y., Hayashi T., Mori T., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 184-189.
42. Tsai S.-Y., Pokrass M.J., Klauer N.R., De Credico N.E., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2014, vol. 18, no. 12, pp. 1461-1476.
43. Ishikawa M., Hashimoto K. The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J. Receptor, Ligand, Channel Res.*, 2010, vol. 3, pp. 25-36.

44. Hayashi T. Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotherapeutic drugs. *J. Pharmacol. Sci.*, 2015, vol. 127, no. 1, pp. 2-5.
45. Salaciak K., Pytka K. Revisiting the sigma-1 receptor as a biological target to treat affective and cognitive disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2022, vol. 132, pp. 1114-1136.
46. Voronin M.V., Vakhitova Y.V., Seredenin S.B. Chaperone Sigma1R and antidepressant effect. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 19, 7088, doi: 10.3390/ijms21197088.
47. Ryskamp D., Wu J., Geva M., Kusko R., Grossman I., Hayden M., Bezprozvanny I. The sigma 1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.*, 2017, vol. 97, pp. 46-59.
48. Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.*, 2019, vol. 13, p. 862, doi: 10.3389/fnins.2019.00862.
49. Yang K., Wang C., Sun T. The roles of intracellular chaperone proteins, sigma receptors, in Parkinson's disease (PD) and major depressive disorder (MDD). *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 528, doi: 10.3389/fphar.2019.00528.
50. Herrando-Grabulosa M., Gaja-Capdevila N., Vela J.M., Navarro X. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.*, 2020, vol. 178, no. 6, pp. 1336-1352.
51. Lachance V., Belanger S.-M. et al. of Sigma-1R subcellular specific biological functions and role in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 1971, doi: 10.3390/ijms24031971.
52. Malar D.S., Thitilertdecha P., Ruckvongacheep K.S., Brimson S., Tencomnao T., Brimson J.M. Targeting sigma receptors for the treatment of neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *CNS Drugs*, 2023, doi: 10.1007/s40263-023-01007-6.
53. Kim F.J., Maher C.M. Sigma1 pharmacology in the context of cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2017, vol. 244, pp. 237-308.
54. Merlos M., Burgueno J., Portillo-Salido E., Plata-Salaman C.R., Vela J.M. Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 964, pp. 85-107.
55. Smith S.B., Wang J., Cui X., Mysona B.A., Zhao J., Bollinger K.E. Sigma 1 receptor: a novel therapeutic target in retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2018, vol. 67, pp. 130-149.
56. Vela J.M. Repurposing sigma-1 receptor ligands for COVID-19 therapy? *Front. Pharmacol.*, 2020, vol. 11, p. 582310, doi: 10.3389/fphar.2020.582310.
57. Romero L., Merlos M., Vela J.M. Antinociception by sigma-1 receptor antagonists: Central and peripheral effects. *Adv. Pharmacol.*, 2016, vol. 75, pp. 179-215.
58. Espinosa-Juarez J.V., Jaramillo-Morales O.A., Deciga-Campos M., Moreno-Rocha L.A., Lopez-Munoz F.J. Sigma-1 receptor antagonist (BD-1063) potentiates the antinociceptive effect of quercetin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Drug Dev. Res.*, 2021, vol. 82, no. 2, pp. 267-277.
59. Entrena J.M., Cobos E.J., Nieto F.R., Cendan C.M., Gris G., Del Pozo E., Zamanillo D., Baeyens J.M. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain*, 2009, vol. 143, pp. 252-261.
60. Nieto F.R., Cendan C.M. et al. Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *J. Pain*, 2012, vol. 13, pp. 1107-1121.
61. Nieto F.R., Cendan C.M., Canizares F.J., Cubero M.A., Vela J.M., Fernandez-Segura E., Baeyens J.M. Genetic inactivation and pharmacological blockade of sigma-1 receptors prevent paclitaxel-induced sensory-nerve mitochondrial abnormalities and neuropathic pain in mice. *Molecular Pain*, 2014, vol. 10, p. 11.

SIGMA-1 RECEPTOR ANTAGONIST, COMPOUND BD-1063, ATTENUATES Ca²⁺ RESPONSES INDUCED BY MOLIXAN IN MACROPHAGES**Milenina L.S.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹, Simonyan A.O.¹**¹ Saint-Petersburg State University*Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru*² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University*ul. Litovskaya, 2, Saint-Petersburg, 194100, Russia*

Received 30.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0588

Abstract. Sigma-1 receptors are ubiquitous multifunctional ligand-operated molecular chaperones in the endoplasmic reticulum membrane with a unique history, structure, and pharmacological profile. Acting as chaperones, sigma-1 receptors modulate a wide range of cellular processes in health and disease, including Ca²⁺ signaling processes. The pharmacological analogue of oxidized glutathione, drug molixan®, is used as an immunomodulator and cytoprotector in the complex therapy of bacterial, viral and oncological diseases; effective in the prevention and treatment of coronavirus infection COVID-19. To elucidate the involvement of sigma-1 receptors in the effect of molixan on the intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages and in the regulation of Ca²⁺ signaling processes in macrophages in general, the effect of the sigma-1 receptor selective antagonist, compound BD-1063, on Ca²⁺ responses induced by molixan in rat peritoneal macrophages was investigated. Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown for the first time that compound BD-1063 significantly suppresses both Ca²⁺ mobilization from intracellular Ca²⁺ stores and subsequent store-dependent Ca²⁺ entry, induced by molixan in peritoneal macrophages. The data obtained indicate the involvement of sigma-1 receptors in the complex signaling cascade triggered by molixan and leading to intracellular Ca²⁺ concentration increase in macrophages. The results also suggest the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca²⁺ entry in macrophages.

Key words: *compound BD-1063, sigma-1 receptors, intracellular Ca²⁺ concentration, macrophages.*

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПАПАИНА Королева В.А.^{1,2}, Панкова С.М.^{1,2}, Редько Ю.А.¹, Холявка М.Г.^{1,3}, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394006, РФ

³ Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0589x

Аннотация. Папаин (КФ 3.4.22.2) является эндолитической цистеиновой протеазой, которую получают из латекса папайи (*Carica papaya L.*). На сегодняшний день данный фермент рассматривается в качестве противовоспалительного, антикоагулянтного и гемолитического средства, также субстанции, ускоряющей восстановление тканей. Хитозан относят к универсальному сорбенту, который связывает широкий ряд веществ органического и неорганического происхождения. Он обладает антимикробной активностью, биоразлагаемостью, нетоксичностью и биоадгезивными свойствами. Целью нашей работы является изучение сочетанного действия УФ-излучения и температуры на активность свободного и иммобилизованного на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов папаина. В качестве объекта исследования был выбран папаин, субстратами для гидролиза служили бычий сывороточный альбумин (БСА) и азоказеин, носителями для иммобилизации – средне- (Mг = 200 кДа, степень деацетилирования (СД) 82 %) и высокомолекулярный (Mг = 350 кДа, СД = 94,85 %) хитозаны. Показано, что энзим становится более устойчивым к изменению температурного режима, а также к УФ-облучению после его иммобилизации. При 90 °С нативный папаин полностью инактивируется, в то время как сорбированный фермент на средне- и высокомолекулярном хитозанах сохраняет 45 и 57 % своей начальной активности, соответственно. После сорбции папаина на матрице полисахаридов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. Протеолитическая способность иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане биокатализатора после УФ-облучения даже увеличивалась на 13-27 % от первоначального уровня.

Ключевые слова: папаин, иммобилизация, хитозан, УФ-облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты широко используются для различных медицинских целей, таких как обработка ран, а также удаление некротизированных и инфицированных тканей в ранах или ожогах. Протеазы растений обладают некоторыми общими преимуществами по сравнению с протеазами млекопитающих из-за более низкого риска передачи заболеваний [1-5]. Среди них папаин (КФ 3.4.22.2), фермент эндолитической цистеиновой протеазы из латекса папайи (*Carica papaya L.*), в настоящее время рассматривается в качестве противовоспалительного, антикоагулянтного и гемолитического средства, также вещества, ускоряющего восстановление тканей [6-9]. Кроме того, сообщалось, что папаин является субстанцией против биопленки, зубного налета и гингивита.

Папаин – полипептид, состоящий из 212 аминокислотных остатков, на N-конце молекулы которого расположен изолейцин, на C-конце – аспарагин. Он активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах (диапазон pH 3-12, оптимум pH 5-8). Папаин сохраняет активность в температурном диапазоне до 50-60 °С, обладает относительно широкой специфичностью.

Хитозан, продукт деацетилирования хитина, является универсальным сорбентом, связывающим большой спектр веществ как органического, так и неорганического происхождения, что делает его отличным кандидатом для целей иммобилизации ферментов [10,11]. Низкая стоимость, широкая доступность, антимикробная активность, биоразлагаемость, нетоксичность и биоадгезивные свойства делают хитозан перспективным носителем многих энзимов для получения высокоактивных и термостабильных иммобилизованных катализаторов. Свойства хитозана могут быть модифицированы, например, путем воздействия ультрафиолетового облучения.

Использование ультрафиолетового света коротковолнового спектра для лечения ожоговых ран оказалось эффективным способом благодаря выраженному антибактериальному эффекту УФ-облучения. Показано, что применение УФ-света может стимулировать активность компонентов иммунной системы.

Комплексное использование действия УФ-излучения, папаина и хитозана, возможно, будет востребовано в ожоговой терапии из-за более быстрого восстановления тканей, заживления кожных покровов, поэтому целью нашей работы было изучить влияние сочетанного действия УФ-излучения и температуры на активность папаина, свободного и иммобилизованного на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран папаин (Sigma-Aldrich), субстратами для гидролиза служили бычий сывороточный альбумин (БСА) и азоказеин (Sigma-Aldrich), носителями для иммобилизации – средне- (СМхтз, Мг = 200 кДа, степень деацетилирования (СД) 82 %) и высокомолекулярный (ВМхтз, Мг = 350 кДа, СД = 94,85 %) хитозаны. Иммобилизацию папаина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом с использованием 0.05 М глицинового буфера со значением pH 9,0 [12].

Зависимость каталитической способности нативного и иммобилизованного фермента от температуры исследовали в диапазоне от 25 до 90 °С.

Определение каталитической активности протеаз при использовании азоказеина в качестве субстрата. К 200 мкл раствора свободного фермента в 50 мМ трис-НСl буфере с pH 7,5, содержащему 1 мМ раствор цистеина (или к суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 200 мкл 50 мМ трис-НСl буфера с pH 7,5, содержащей 1 мМ раствор L-цистеина,), добавляли 400 мкл 1 % раствора азоказеина (в 50 мМ трис-НСl буфере, pH 7,5) и инкубировали 30 минут при температуре при 60 °С. После инкубации добавляли 800 мкл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 5 минут при -4 °С, а затем центрифугировали в течение 3 минут при 13 000 об/мин для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % раствора NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 400 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ; 50 мг образца и 200 мкл буфера вносили после инкубации в течение 30 минут при температуре при 60 °С [13].

Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора или суспензии в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20±1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимальная температура для функционирования папаина, иммобилизованного на хитозанах 200 и 350 кДа, была аналогична таковой для растворимого фермента – 60 °С. При 80 °С ферментативная активность нативного папаина снижалась на 68 % от исходной, а полная инактивация наблюдалась при 90 °С (рис. 1). Напротив, папаин, иммобилизованный на обоих типах хитозана, сохранял соответственно 80 и 98 % своей активности при 80 °С, а также 45 и 57 % своей начальной каталитической способности при 90 °С. Эти данные свидетельствуют о том, что адсорбция на хитозане повышает термостабильность папаина, по-видимому, путем ограничения конформационной подвижности белка, что предотвращает его преждевременную денатурацию.

После воздействия дозы УФ-света 453 Дж/м² на раствор папаина выявлено снижение каталитической способности энзима на 32 % по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При повышении дозы

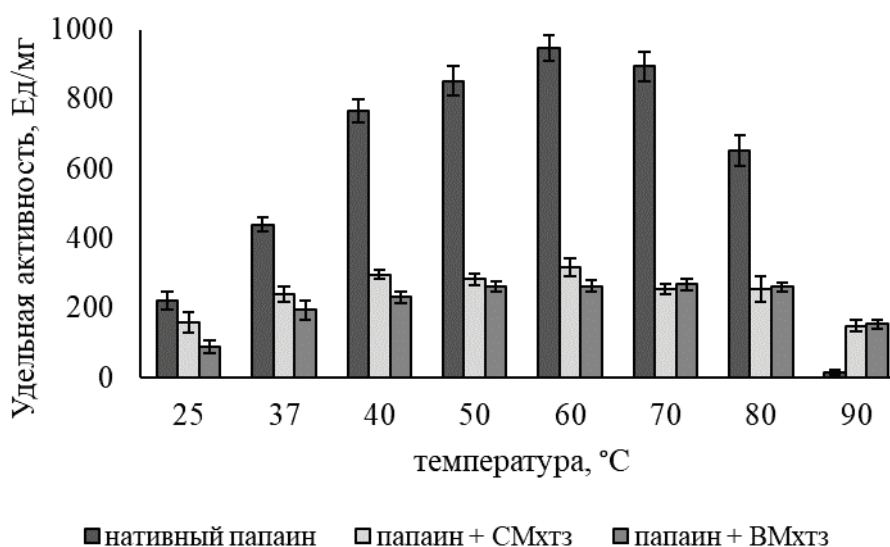


Рисунок 1. Зависимость удельной каталитической активности (в Ед/мг белка) свободного и иммобилизованного на средне- (СМхтз) и высокомолекулярном (ВМхтз) хитозанах папаина от температуры

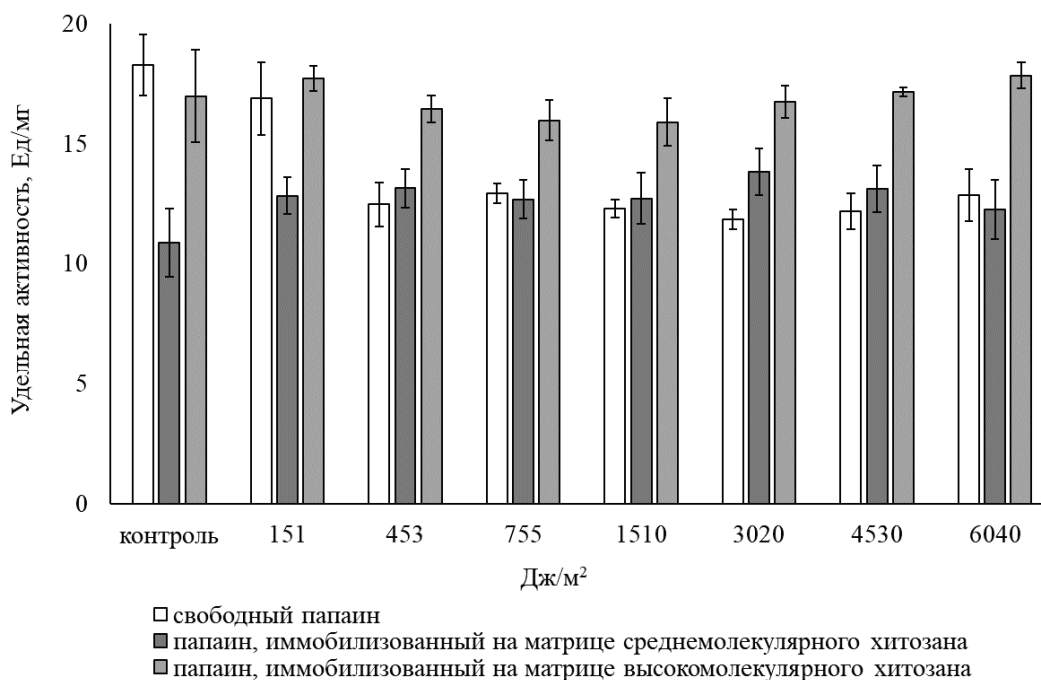


Рисунок 2. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (Ед/мг белка) свободного и иммобилизованного на средне- и высокомолекулярном хитозане папаина

облучения от 755 Дж/м² до 6040 Дж/м² фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне 65-75 % от первоначального значения.

После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. В частности, после адсорбции на среднемолекулярном хитозане при воздействии УФ-света во всем изучаемом нами диапазоне доз активность папаина колебалась в пределах ~ 5 %, а после образования комплекса с высокомолекулярным хитозаном активность биокатализатора даже увеличивалась на 13-27 % от его первоначального уровня (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах папаин имеет ряд преимуществ по сравнению с его свободной формой. Показано, что фермент становится более устойчивым к изменению температурного режима, а также к УФ-облучению. При 90 °С нативный папаин полностью инактивируется, в то время как фермент, сорбированный на средне- и высокомолекулярном хитозанах, сохраняет 45 и 57 % своей начальной активности. После адсорбции папаина на матрице носителя при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. Протеолитическая способность иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане биокатализатора даже увеличивалась после УФ-облучения на 13-27 % от первоначального уровня.

Список литературы / References:

- Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, vol. 180, pp. 161-176.
- Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. *Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ*. Учебное пособие, Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. *Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannye biologicheskie ob"ekty v sisteme laboratornykh rabot*. Uchebnoe posobie, Voronezh, 2017 (In Russ.)].
- Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение*. Учебное пособие, Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilizovannye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primeneniye*. Uchebnoe posobie, Voronezh, 2017 (In Russ.)].
- Baidamshina D.R., Trizna E.Y. et al. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 4205-4217.
- Fileti A.M.F., Fischer G.A., Tambourgi E.B. Neural modeling of bromelain extraction by reversed micelles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010, vol. 53, pp. 455-463, doi: 10.1590/S1516-89132010000200026.

6. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczek W. Cysteine proteases. *Industrial Enzymes*, Springer, New York. *J. Polaina*, 2007, pp. 181-195.
7. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*, 2004, vol. 37, pp. 370-378, doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01968.x.
8. Khanna N., Panda P.C. The effect of papain on tenderization and functional properties of spending hen meat cuts. *Indian Journal of Animal Research*, 2007, vol. 41, pp. 55-58.
9. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain. *Marine Drugs*, 2021, vol. 19, p. 197.
10. Silva D.F., Rosa H., Carvalho A.F.A., Neto P.O. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries. *Enzyme Research*, 2015, art. id 573721, doi: 10.1155/2015/573721.
11. Albuquerque P.B.S., de Oliveira W.F., dos Santos Silva P.M., dos Santos Correia M.T., Kennedy J.F., Coelho L.C.B.B. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 156, pp. 51-66, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.046.
12. Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М., Тимошилова А.А., Олыпанникова С.С. Разработка методики иммобилизации фичина на матрицах кислоторастворимых хитозанов. В сборнике: *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Межрегиональный сборник научных работ. Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I. Воронеж, 2015, с. 99-102* [Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Timoshilova A.A., Olypannikova S.S. *Razrabotka metodiki immobilizacii ficina na matricah kislotorastvorimyh hitozanov. V sbornike: Organizaciya i regulyaciya fiziologo-biohimicheskikh processov. Mezhhregional'nyj sbornik nauchnyh robot. Voronezhskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet im. Imperatora Petra I. Voronezh, 2015, pp. 99-102 (In Russ.)*].
13. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, no. 21, pp. 4419-4425, doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.049.

EFFECT OF UV RADIATION AND TEMPERATURE ON PAPAIN ACTIVITY
Koroleva V.A.^{1,2}, Pankova S.M.^{1,2}, Redko Yu.A.¹, Holyavka M.G.^{1,3}, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

² Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Student st., 10, Voronezh, 394006, Russia

³ Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0589

Abstract. Papain (EC 3.4.22.2) is an endolytic cysteine protease derived from papaya latex (*Carica papaya* L.). Today, this enzyme is considered as an anti-inflammatory, anticoagulant and hemolytic agent, as well as a substance that accelerates tissue repair. Chitosan is classified as a universal sorbent that binds a wide range of substances of organic and inorganic origin. It has antimicrobial activity, biodegradability, non-toxicity and bioadhesive properties. The aim of our work is to study the combined effect of UV-radiation and temperature on the activity of free papain and papain immobilized on a matrix of medium and high molecular weight chitosan. Papain was chosen as the object of study, bovine serum albumin (BSA) and azocasein served as substrates for hydrolysis, medium- ($M_r = 200$ kDa, degree of deacetylation (DD) 82%) and high molecular weight ($M_r = 350$ kDa, DD = 94.85%) chitosan were used as carriers for immobilization. It has been shown that the enzyme becomes more resistant to changes in the temperature regime, as well as to UV irradiation after its immobilization. At 90°C, native papain is completely inactivated, while the sorbed enzyme on medium and high molecular weight chitosan retains 45 and 57% of its initial activity, respectively. After the sorption of papain on the polysaccharide matrix at doses from 151 to 6040 J/m², the catalytic ability of the enzyme changed to a lesser extent than that of its soluble form. The proteolytic ability of the biocatalyst immobilized on high molecular weight chitosan after UV irradiation even increased by 13-27% of the initial level.

Key words: papain, immobilization, chitosan, UV-irradiation.

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

Федорова М.В.¹, Вознесенский В.И.², Созарукова М.М.³, Харченко А.А.², Соснова Е.А.⁴,
Проскурнина Е.В.⁵

¹ ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора»

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

² ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д. Плетнёва Департамента здравоохранения города Москвы»

ул. Вешняковская, д.2., Москва, 111539, РФ

³ ФГБУН «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН»

Ленинский просп., 31, г. Москва, 119991, РФ

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)»

ул. Трубецкая, д.8, стр. 2., Москва, 119991, РФ

⁵ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ

Поступила в редакцию 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0590

Аннотация. При раке яичников перитонеальная жидкость является активным участником канцерогенеза и свободнорадикального гомеостаза, являясь материалом для исследования локального окислительного стресса. В обсервационное одномоментное неконтролируемое моноцентровое пилотное исследование были включены 48 пациенток 25–74 лет с гистологически подтвержденным раком яичников и доброкачественными новообразованиями яичника. При помощи оригинальной методики, основанной на методе активированной кинетической хемилюминесценции, оценены антиоксидантные профили перитонеальной жидкости с раком яичника и доброкачественными новообразованиями. Для каждого случая из хемилюминограммы рассчитывали два параметра: «уратную» антиоксидантную емкость перитонеальной жидкости S_p , обусловленную сильными антиоксидантами, а так же «альбуминовую» емкость ΔI_b и ΔI_r , обусловленную меркаптоальбумином В перитонеальной жидкости антиоксидантная емкость значимо нарастала в ряду доброкачественные опухоли < высокодифференцированные < умеренно- и низкодифференцированные аденокарциномы, приводя к состоянию антиоксидантной избыточности в случае умеренно- и низкодифференцированных аденокарцином. В этом же ряду снижается «альбуминовая» емкость, что свидетельствует об нарастании окислительного стресса в системе глутатиона. Таким образом, при раке яичников прогрессирование опухоли приводит к сдвигу в сторону избытка антиоксидантов за счет, возможно, метаболитов самой опухоли.

Ключевые слова: антиоксидантная емкость, перитонеальная жидкость, рак яичников.

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников является социально значимой проблемой в большинстве стран мира, занимая лидирующую позицию среди причин смерти от гинекологических заболеваний [1,2], что обусловлено поздним диагностированием этого заболевания, низким процентом пятилетней выживаемости (менее 35–45%), а также высокой долей химиорезистентных опухолей [1-3].

Канцерогенез является сложным многокомпонентным и до конца не изученным процессом, одним из важнейших звеньев которого является свободнорадикальный гомеостаз — совокупность разнородных веществ — свободных радикалов, индукторов, катализаторов, активаторов ферментов и антиоксидантов — и их взаимопревращений, находящихся в состоянии равновесия. Активные формы кислорода (АФК), являясь как сигнальными, так и эффекторными молекулами, играют ведущую роль в опухолевой прогрессии и противоопухолевой защите [4,5]. Их избыточная активность, проявляющаяся в окислительном стрессе, влияет на все стадии канцерогенеза, включая инициацию, промоцию, уклонение и прогрессию. Окислительный стресс активирует различные транскрипционные факторы: ядерный фактор NF-κB, активирующий белок AP-1, транскрипционный фактор p53, индуцируемый гипоксией фактор HIF-1α, рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами PPAR-γ, β-катенин/Wnt, а также ядерный фактор Nrf2, которые вовлечены в экспрессию многочисленных генов иммунного и воспалительного ответа, ремоделирования ткани и фиброза, канцерогенеза и метастазирования [6]. С другой стороны, АФК необходимы для индукции гибели клеток и действуют как противоопухолевые агенты, причем эти эффекты определяются концентрацией АФК в среде [7]. Особенностью опухолевого процесса является выраженное нарушение внутриклеточного АФК-гомеостаза. В раковых клетках выявляется высокий уровень окислительного стресса как следствие гипоксии и анаэробного гликолиза [8]. При раке меняется экспрессия важнейших регуляторов редокс-статуса клетки глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы [9]. Экспрессия каталазы и супероксиддисмутазы может как повышаться,

так и понижаться в зависимости от опухоли [9-11]. В целом, локальный АФК-гомеостаз опухолевой ткани является чрезвычайно сложным и уникальным.

Одним из участников патофизиологии канцерогенеза при раке яичников является перитонеальная жидкость. Раковые клетки, попадая в перитонеальную жидкость, создают специальные условия для своего выживания, пролиферации и метастазирования [12,13]. В асцитической жидкости при раке яичников содержатся в повышенных концентрациях такие биологически активные молекулы как HGF (фактор роста гепатоцитов), TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста бета-1) и GRO-1 (связанный с ростом окоген-1); при этом HGF и GRO-1 способствуют старению клеток мезотелия и увеличению продукции гиалуроновой кислоты, u-PA (урокиназный активатор плазминогена), IL-8 и MCP-1 (моноцитарный хемотаксический протеин-1), стимулирующих адгезию, пролиферацию и миграцию клеток рака яичников [12]. Старение клеток мезотелия при раке яичников связывают с окислительным повреждением ДНК и липидов в связи с повышенной выработкой АФК в этих клетках [14], при этом снижается активность митохондриальных ферментов цитохром *c* оксидазы и НАДН-дегидрогеназы, уменьшается потенциал внутренней мембраны митохондрий [14]. Клетки высокоагрессивных серозных и недифференцированных опухолей в перитонеальной жидкости способны в большей степени к метастазированию, чем клетки светлоклеточного и эндометриоидного рака, что связано с выработкой этими клетками АФК, опосредованной митоген-активируемой протеинкиназой p38 и ядерным фактором NF- κ B [13].

Задачей исследования явилось изучение антиоксидантной емкости перитонеальной жидкости у пациенток с аденокарциномой яичников по сравнению с доброкачественными новообразованиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В обсервационное одномоментное неконтролируемое моноцентровое пилотное исследование были включены 48 пациенток 25–74 лет с гистологически подтвержденным раком яичников (низкодифференцированная серозная аденокарцинома, умереннодифференцированная светлоклеточная аденокарцинома, серозная папиллярная карцинома, от T1aN0M0 до pT3cNXM1) и доброкачественными новообразованиями яичника (дермоидные кисты, текома, серозно-муцинозная цистаденома) при условии добровольного подписания информированного согласия.

Оперативное вмешательство и наблюдение пациентов проводили в ГКБ им. Д.Д. Плетнёва Департамента здравоохранения Москвы. Морфологическая верификация диагноза была выполнена в патологоанатомическом отделении ГКБ им. Д.Д. Плетнёва ДЗМ. Пациенткам с раком яичников было проведено оперативное лечение в объеме экстирпации матки с придатками, экстирпации большого сальника и лимфаденэктомии.

Материалом для исследования служила перитонеальная жидкость, полученная в день операции. Образцы перитонеальной жидкости транспортировали в вакутейнере с Li-гепарином при температуре +4°C, анализировали не позднее чем через 2 часа после взятия материала. Эксперименты по оценке антиоксидантной емкости проводили в Медико-генетическом центре имени академика Н.П. Бочкова.

Определение антиоксидантной емкости перитонеальной жидкости. Регистрацию хемилюминесценции проводили на хемилюминиметре «Lum 1200» (ООО «ДИСофт», Россия) по адаптированной методике [15] Хемилюминесценцию регистрировали при температуре 37°C в системе, содержащей генератор свободных радикалов 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП) и активатор свечения люминол в фосфатном буферном растворе (100 мМ, pH 7,4) (все реагенты «Sigma-Aldrich», США). Регистрировали начальное свечение до достижения плато, далее добавляли 10 мкл перитонеальной жидкости, предварительно разбавленной фосфатным буферным раствором (100 мМ, pH 7,4) в 10 раз, и проводили регистрацию в течение примерно 30 минут до достижения нового стационарного уровня. Из хемилюминограммы определяли площадь подавления свечения S и разность между начальным и конечным стационарными уровнями свечения ΔI (рис. 1).

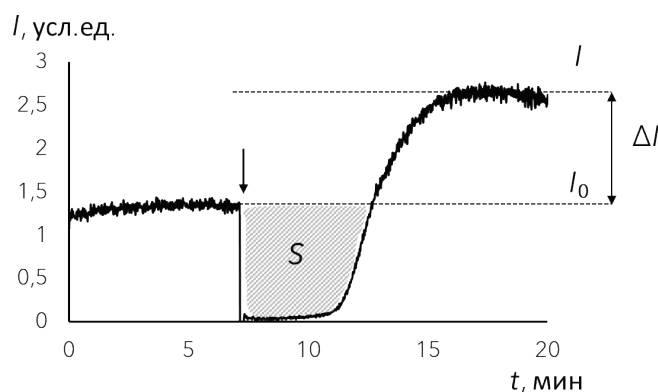


Рисунок 1. Антиоксидантный профиль перитонеальной жидкости пациентки с доброкачественным новообразованием яичников (цистаденома); S – площадь подавления свечения, ΔI – разность между конечным и начальным стационарными уровнями хемилюминесценции. Стрелкой показан момент добавления перитонеальной жидкости

Для выяснения вклада мочевой кислоты в антиоксидантную емкость перитонеальной жидкости проводили эксперименты с уриказой. Исходный раствор готовили следующим образом: 5 мг уриказы (Uricase from *Bacillus fastidiosus*, #94310, 13.4 U/mg, Sigma, США) растворяли в 500 мкл фосфатного буферного раствора (100 mM, pH 7,4). Рабочий раствор уриказы получали разбавлением исходного в 100 раз фосфатным буферным раствором. Добавляли к перитонеальной жидкости 10 мкл рабочего раствора уриказы (0,013 ME), встряхивали, инкубировали в течение 15 мин в защищенном от света месте, далее анализировали, как указано выше.

Статистическая обработка. Для статистической обработки данных использовали программный пакет Statistica, версия 10.0 («StatSoft Inc.», США). Проверку нормальности распределения проводили по критерию Шапиро-Уилка. Сравнительный анализ двух независимых групп по количественному признаку проводили с помощью *U*-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при значении $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антиоксидантная емкость перитонеальной жидкости. Для каждого случая рассчитывали два параметра: «уратную» антиоксидантную емкость перитонеальной жидкости S_p , обусловленную сильными антиоксидантами, «альбуминовую» емкость ΔI_b и ΔI_p , обусловленную меркаптоальбумином (табл. 1).

Средние значения «альбуминовой» емкости ΔI_b имела тенденцию к снижению и была значимо ниже нормы для подгрупп умереннодифференцированных и низкодифференцированных аденокарцином.

Активность нейтрофилов $A_{ФМЛФ}$ в отдельных случаях могла быть выше или ниже пределов референтного интервала, но в среднем соответствовала референтным значениям.

Референтных значений по показателям перитонеальной жидкости не может быть получено по этическим причинам, поэтому сравнивали данные по подгруппам с группой контроля, что имеет определенные ограничения, связанные с тем, что при доброкачественных новообразованиях АФК-гомеостаз тоже может изменяться. Для доброкачественных новообразований «уратная» емкость S_p оставалась в пределах референтных значений для крови. Для группы рака яичников этот показатель был значимо выше (антиоксидантный стресс), причем случаи умеренно- и низкодифференцированные опухолей характеризовались значимо более высокой емкостью, чем высокодифференцированные аденокарциномы. Следовательно, для умеренно- и низкодифференцированных опухолей локальный антиоксидантный статус отличается от системного (рис. 2). «Альбуминовая» емкость ΔI_p также имела тенденцию к снижению в ряду доброкачественные \approx высокодифференцированные $>$ умереннодифференцированные $>$ низкодифференцированные опухоли яичников.

В плазме крови основную часть антиоксидантной емкости S_p обеспечивает мочевая кислота. Нарастание «уратной» антиоксидантной емкости S_p в перитонеальной жидкости в случае рака яичников может быть обусловлено как собственно мочевой кислотой, так и метаболитами опухолевой ткани, обладающими сильными антиоксидантными свойствами. Добавление уриказы к перитонеальной жидкости пациенток с умеренно- и низкодифференцированными аденокарциномами привело к неполному подавлению антиоксидантной активности (рис. 3), следовательно, дополнительная емкость обеспечивалась иными веществами, вероятно, метаболитами опухолевой ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

К основным результатам работы следует отнести тот факт, что изменения в «альбуминовой» емкости в перитонеальной жидкости коррелирует со снижением дифференцировки опухоли, «альбуминовая емкость» имеет тенденцию к снижению и выходит за рамки референтного интервала для умеренно- и низкодифференцированных опухолей (рис. 4).

Таблица 1. Параметры антиоксидантного профиля перитонеальной жидкости для изученных подгрупп, данные приведены в виде среднего и среднеквадратичного отклонения.

* — значимые различия с контрольной группой

| Объект исследования параметры Группы | Перитонеальная жидкость | |
|---|-------------------------|------------------------|
| | S_p , усл.ед. | ΔI_p , усл.ед. |
| Доброкачественные новообразования ($n = 10$), группа контроля | 245 (130) | 1,26 (0,38) |
| Высоккодифференцированная аденокарцинома ($n = 6$) | 422* (231) | 1,31 (0,44) |
| Умеренно дифференцированная аденокарцинома ($n = 8$) | 658* (243) | 1,01 (0,27) |
| Низкодифференцированная аденокарцинома ($n = 24$) | 579* (260) | 0,90* (0,44) |

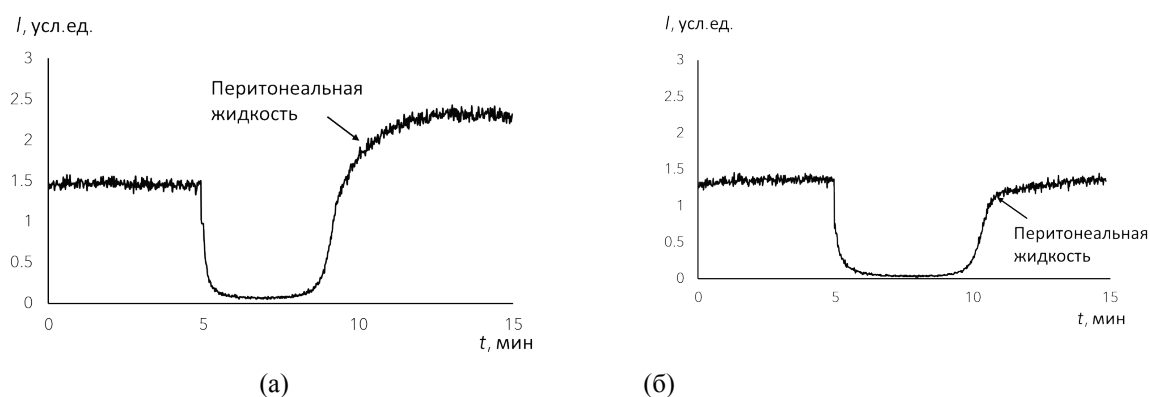


Рисунок 2. Антиоксидантные профили перитонеальной жидкости пациенток с доброкачественным новообразованием (а) и низкодифференцированной аденокарциномой (б)

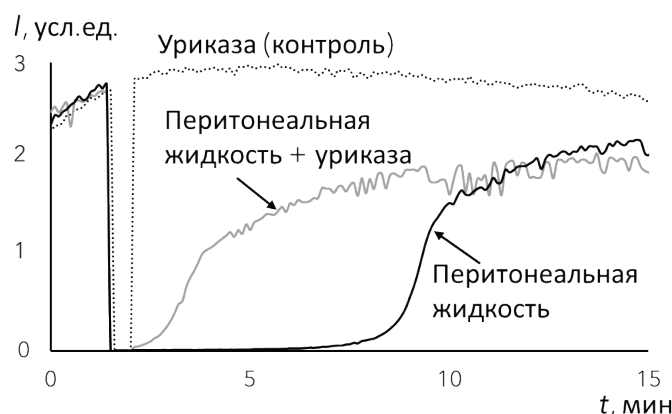


Рисунок 3. Влияние уриказы на антиоксидантный профиль перитонеальной жидкости пациентки с низкодифференцированной аденокарциномой. Пунктирная линия – добавление уриказы (контроль), черный контур – перитонеальная жидкость, серый контур – перитонеальная жидкость в смеси с уриказой

| | Доброкачественные опухоли (группа сравнения) | Высокодифференцированные аденокарциномы | Умереннодифференцированные аденокарциномы | Низкодифференцированные аденокарциномы |
|--------------|--|---|---|--|
| S_p | Соответствие референтному интервалу для плазмы крови | Незначительное превышение РИ | Превышение РИ (более 1,5N) | Превышение РИ (1,4N) |
| ΔI_p | Соответствие РИ | Соответствие РИ | Соответствие РИ | ниже референтного интервала (0,9N) |

Рисунок 4. Закономерности изменения параметров, характеризующих антиоксидантный профиль перитонеальной жидкости, в изученных подгруппах, РИ – референтный интервал

При онкологических заболеваниях варианты локальных и системных изменений крайне разнообразны и зависят от опухоли и стадии канцерогенеза. В перитонеальной (асцитической) жидкости изменение антиоксидантной емкости было значимым, причем этот показатель изменялся не в сторону окислительного стресса, а наоборот, антиоксидантной избыточности. Нарастание антиоксидантной емкости может быть как компенсаторной реакцией организма на окислительный стресс, так и результатом продукции опухолью метаболитов с сильными антиоксидантными свойствами.

Компенсаторное увеличение антиоксидантной емкости может произойти прежде всего за счет повышения уровня мочевой кислоты. Гипотеза о том, что мочевая кислота как сильный антиоксидант защищает от окислительного повреждения при раке, была высказана давно [16]. Есть экспериментальные подтверждения — уровень мочевой кислоты в сыворотке крови был ниже у пациентов с раком полости рта по сравнению со здоровыми добровольцами [17]. Более высокие уровни мочевой кислоты были связаны с более низким риском смертности от любого рака [18]. Лучшая выживаемость совпала с низкими уровнями маркеров повреждения ДНК в совокупности с высоким уровнем мочевой кислоты в плазме при колоректальном раке [19]. Более высокие уровни альбумина и мочевой кислоты связаны с более низким риском развития рака молочной железы и

смертности от него [20]. Низкий уровень мочевой кислоты в сыворотке и повышенные маркеры воспаления были определены как факторы риска рака простаты [21].

В литературе, однако, встречаются работы, которые противоречат этой гипотезе. Не было найдено влияния уровня мочевой кислоты на смертность от рака [22]. В исследовании повышение уровня мочевой кислоты считают предиктором летального исхода у безнадежно больных [23]. На большой выборке (более 83 тысяч мужчин и 28 тысяч женщин) было показано, что высокий уровень мочевой кислоты независимым образом связан со смертностью от рака, что противоречит гипотезе о предполагаемом защитном действии мочевой кислоты [24,25]. Аналогичный результат был получен для пациенток с сахарным диабетом, повышенный уровень мочевой кислоты у которых приводил к большей смертности от рака [26]. Большой мета-анализ привел к выводу, что мужчины с высокими уровнями мочевой кислоты имели более высокий риск заболеть раком. Высокие уровни мочевой кислоты связаны с повышенным риском общей смертности у рака, особенно у женщин, что также не подтверждает гипотезу о защитной роли мочевой кислоты [27].

Предположительно, мочевая кислота может способствовать воспалению как в кристаллической форме, которая распознается TLR4 рецепторами, так и в растворимой, которая проникает в клетки и активирует MAP киназы и путь NF-κB, возможно, через НАДФН-оксидазу [28]. Предложена гипотеза, согласно которой внутриклеточное воспаление, связанное с мочевой кислотой, способствует злокачественной трансформации, в то время как повышенный уровень внеклеточной мочевой кислоты способствует выживанию раковых клеток и стимулирует их пролиферацию, т.е. развитию высокоагрессивного рака. Негативную роль мочевой кислоты в канцерогенезе подтверждают и современные исследования [29-32]. Исследований по роли мочевой кислоты при раке яичников найти не удалось.

Метаболизм раковой ткани существенно отличается от метаболизма нормальных клеток. Росту эпителиального рака яичников способствует гипергликемия [33], с раком яичников связано нарушение системного липидного обмена [34-36], метаболизма холина [37], железа [38], сфинголипидов [39], фолиевой кислоты [40]. Раковые клетки используют метаболическое перепрограммирование для адаптации к изменениям окружающей среды и удовлетворения растущей потребности в питательных веществах. Такое перепрограммирование затрагивает биоэнергетику, воспалительные реакции и устойчивость к лекарственной терапии. Эффект Варбурга – повышенная потребность раковых клеток в глюкозе – долгое время считался основной метаболической особенностью раковых клеток, однако последние исследования указывают на митохондриальный окислительный метаболизм как движущую силу опухолевого роста [41]. Апоптоз – программируемая гибель клеток – реализуется с участием активных форм кислорода [42-44]. Отмечается двойственная роль антиоксидантов в отношении канцерогенеза, которые, с одной стороны, подавляют его, предотвращая окислительное повреждение ДНК, с другой стороны, способствуют выживанию клеток [45]. Не исключено, что в нашем случае антиоксидантная среда, создаваемая в перитонеальной жидкости, является вариантом метаболического перепрограммирования и защиты от апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при операбельном раке яичников в перитонеальной жидкости наблюдается увеличение «уратной» антиоксидантной емкости в ряду высокодифференцированные <умереннодифференцированные и низкодифференцированные аденокарциномы за счет не только мочевой кислоты, но, вероятно, метаболитов опухоли, обладающих антиоксидантными свойствами. В этом же ряду снижается «альбуминовая» емкость, что свидетельствует об нарастании окислительного стресса в системе глутатиона. В перспективе целесообразно выявить природу антиоксидантных компонентов в перитонеальной жидкости и их биохимическую роль в канцерогенезе.

Список литературы / References:

1. Colombo N., Sessa C., du Bois A., Ledermann J., McCluggage W.G., McNeish I., Morice P., Pignata S., Ray-Coquard I., Vergote I. et al. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Ann. Oncol.*, 2019, vol. 30, pp. 672-705, doi: 10.1093/annonc/mdz062.
2. Webb P.M., Jordan S.J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2017, vol. 41, pp. 3-14, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.
3. Jayson G.C., Kohn E.C., Kitchener H.C., Ledermann J.A. Ovarian cancer. *Lancet*, 2014, vol. 384, pp. 1376-1388, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62146-7.
4. Moloney J.N., Cotter T.G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev. Biol.*, 2018, vol. 80, pp. 50-64, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
5. Aggarwal V., Tuli H.S., Varol A., Thakral F., Yerer M.B., Sak K., Varol M., Jain A., Khan M.A., Sethi G. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, doi: 10.3390/biom9110735.
6. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 2010, vol. 49, pp. 1603-1616, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
7. Wang J., Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 2008, vol. 7, pp. 1875-1884, doi: 10.4161/cbt.7.12.7067.

8. Hileman E.O., Liu J., Albitar M., Keating M.J., Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, vol. 53, pp. 209-219, doi: 10.1007/s00280-003-0726-5.
9. Fletcher N.M., Belotte J., Saed M.G., Memaj I., Diamond M.P., Morris R.T., Saed G.M. Specific point mutations in key redox enzymes are associated with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Free Radic Biol Med*, 2017, vol. 102, pp. 122-132, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.028.
10. Belotte J., Fletcher N.M., Saed M.G., Abusamaan M.S., Dyson G., Diamond M.P., Saed G.M. A Single Nucleotide Polymorphism in Catalase Is Strongly Associated with Ovarian Cancer Survival. *PLoS One*, 2015, vol. 10, e0135739, doi: 10.1371/journal.pone.0135739.
11. Belotte J., Fletcher N.M., Awonuga A.O., Alexis M., Abu-Soud H.M., Saed M.G., Diamond M.P., Saed G.M. The role of oxidative stress in the development of cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci*, 2014, vol. 21, pp. 503-508, doi: 10.1177/19337191113503403.
12. Mikula-Pietrasik J., Uruski P., Matuszkiewicz K., Szubert S., Moszynski R., Szperek D., Sajdak S., Tykarski A., Ksiazek K. Ovarian cancer-derived ascitic fluids induce a senescence-dependent pro-cancerogenic phenotype in normal peritoneal mesothelial cells. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, vol. 39, pp. 473-481, doi: 10.1007/s13402-016-0289-1.
13. Mikula-Pietrasik J., Uruski P., Szubert S., Szperek D., Sajdak S., Tykarski A., Ksiazek K. Malignant ascites determine the transmesothelial invasion of ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, vol. 92, pp. 6-13, doi: 10.1016/j.biocel.2017.09.002.
14. Pakula M., Mikula-Pietrasik J., Stryczynski L., Uruski P., Szubert S., Moszynski R., Szperek D., Sajdak S., Tykarski A., Ksiazek K. Mitochondria-related oxidative stress contributes to ovarian cancer-promoting activity of mesothelial cells subjected to malignant ascites. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, vol. 98, pp. 82-88, doi: 10.1016/j.biocel.2018.03.011.
15. Alekseev A.V., Proskurnina E.V., Vladimirov Y.A. Determination of Antioxidants by Sensitized Chemiluminescence Using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2012, vol. 67, pp. 127-132, doi: 10.3103/S0027131412030029.
16. Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, vol. 78, pp. 6858-6862, doi: 10.1073/pnas.78.11.6858.
17. Lawal A.O., Kolude B., Adeyemi B.F. Serum uric Acid levels in oral cancer patients seen at tertiary institution in Nigeria. *Ann Ib Postgrad Med*, 2012, vol. 10, pp. 9-12.
18. Taghizadeh N., Vonk J.M., Boezen H.M. Serum uric acid levels and cancer mortality risk among males in a large general population-based cohort study. *Cancer Causes Control*, 2014, vol. 25, pp. 1075-1080, doi: 10.1007/s10552-014-0408-0.
19. Dziaman T., Banaszkiwicz Z., Roszkowski K., Gackowski D., Wisniewska E., Rozalski R., Foksinski M., Siomek A., Speina E., Winczura A. et al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients. *Int J Cancer*, 2014, vol. 134, pp. 376-383, doi: 10.1002/ijc.28374.
20. Kuhn T., Sookthai D., Graf M.E., Schubel R., Freisling H., Johnson T., Katzke V., Kaaks R. Albumin, bilirubin, uric acid and cancer risk: results from a prospective population-based study. *Br J Cancer*, 2017, vol. 117, pp. 1572-1579, doi: 10.1038/bjc.2017.313.
21. Benli E., Cirakoglu A., Ayyildiz S.N., Yuce A. Comparison of serum uric acid levels between prostate cancer patients and a control group. *Cent European J Urol*, 2018, vol. 71, pp. 242-247, doi: 10.5173/ceju.2018.1619.
22. Wu C.Y., Hu H.Y., Chou Y.J., Huang N., Chou Y.C., Lee M.S., Li C.P. High Serum Uric Acid Levels Are Associated with All-Cause and Cardiovascular, but Not Cancer, Mortality in Elderly Adults. *J Am Geriatr Soc*, 2015, vol. 63, pp. 1829-1836, doi: 10.1111/jgs.13607.
23. Shin H.S., Lee H.R., Lee D.C., Shim J.Y., Cho K.H., Suh S.Y. Uric acid as a prognostic factor for survival time: a prospective cohort study of terminally ill cancer patients. *J Pain Symptom Manage*, 2006, vol. 31, pp. 493-501, doi: 10.1016/j.jpainsymman.2005.11.014.
24. Strasak A.M., Rapp K., Hilbe W., Oberaigner W., Ruttman E., Concin H., Diem G., Pfeiffer K.P., Ulmer H. et al. Serum uric acid and risk of cancer mortality in a large prospective male cohort. *Cancer Causes Control*, 2007, vol. 18, pp. 1021-1029, doi: 10.1007/s10552-007-9043-3.
25. Strasak A.M., Rapp K., Hilbe W., Oberaigner W., Ruttman E., Concin H., Diem G., Pfeiffer K.P., Ulmer H. et al. The role of serum uric acid as an antioxidant protecting against cancer: prospective study in more than 28 000 older Austrian women. *Ann Oncol*, 2007, vol. 18, pp. 1893-1897, doi: 10.1093/annonc/mdm338.
26. Deng Z., Gu Y., Hou X., Zhang L., Bao Y., Hu C., Jia W. Association between uric acid, cancer incidence and mortality in patients with type 2 diabetes: Shanghai diabetes registry study. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, vol. 32, pp. 325-332, doi: 10.1002/dmrr.2724.
27. Yan S., Zhang P., Xu W., Liu Y., Wang B., Jiang T., Hua C., Wang X., Xu D., Sun B. Serum Uric Acid Increases Risk of Cancer Incidence and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mediators Inflamm*, 2015, vol. 2015, p. 764250, doi: 10.1155/2015/764250.
28. Fini M.A., Elias A., Johnson R.J., Wright R.M. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. *Clin Transl Med*, 2012, vol. 1, p. 16, doi: 10.1186/2001-1326-1-16.

29. Yiu A., Van Hemelrijck M., Garmo H., Holmberg L., Malmstrom H., Lambe M., Hammar N., Walldius G., Jungner I., Wulaningsih W. Circulating uric acid levels and subsequent development of cancer in 493,281 individuals: findings from the AMORIS Study. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, pp. 42332-42342, doi: 10.18632/oncotarget.16198.
30. Yue C.F., Feng P.N., Yao Z.R., Yu X.G., Lin W.B., Qian Y.M., Guo Y.M., Li L.S., Liu M. High serum uric acid concentration predicts poor survival in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*, 2017, vol. 473, pp. 160-165, doi: 10.1016/j.cca.2017.08.027.
31. Dai X.Y., He Q.S., Jing Z., Yuan J.Q. Serum uric acid levels and risk of kidney cancer incidence and mortality: A prospective cohort study. *Cancer Med*, 2020, vol. 9, pp. 5655-5661, doi: 10.1002/cam4.3214.
32. Huang C.F., Huang J.J., Mi N.N., Lin Y.Y., He Q.S., Lu Y.W., Yue P., Bai B., Zhang J.D., Zhang C. et al. Associations between serum uric acid and hepatobiliary-pancreatic cancer: A cohort study. *World J Gastroenterol*, 2020, vol. 26, pp. 7061-7075, doi: 10.3748/wjg.v26.i44.7061.
33. Kellenberger L.D., Bruin J.E., Greenaway J., Campbell N.E., Moorehead R.A., Holloway A.C., Petrik J. The role of dysregulated glucose metabolism in epithelial ovarian cancer. *J Oncol*, 2010, vol. 2010, p. 514310, doi: 10.1155/2010/514310.
34. Tania M., Khan M.A., Song Y. Association of lipid metabolism with ovarian cancer. *Curr Oncol*, 2010, vol. 17, pp. 6-11, doi: 10.3747/co.v17i5.668.
35. Kouba S., Ouldamer L., Garcia C., Fontaine D., Chantome A., Vandier C., Goupille C., Potier-Cartereau M. Lipid metabolism and Calcium signaling in epithelial ovarian cancer. *Cell Calcium*, 2019, vol. 81, pp. 38-50, doi: 10.1016/j.ceca.2019.06.002.
36. Ji Z., Shen Y., Feng X., Kong Y., Shao Y., Meng J., Zhang X., Yang G. Deregulation of Lipid Metabolism: The Critical Factors in Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 2020, vol. 10, p. 593017, doi: 10.3389/fonc.2020.593017.
37. Bagnoli M., Granata A., Nicoletti R., Krishnamachary B., Bhujwalla Z.M., Canese R., Podo F., Canevari S., Iorio E., Mezzanzanica D. Choline Metabolism Alteration: A Focus on Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 2016, vol. 6, p. 153, doi: 10.3389/fonc.2016.00153.
38. Rockfield S., Raffle J., Mehta R., Rehman N., Nanjundan M. Iron overload and altered iron metabolism in ovarian cancer. *Biol Chem*, 2017, vol. 398, pp. 995-1007, doi: 10.1515/hsz-2016-0336.
39. Kreitzburg K.M., van Waardenburg R., Yoon K.J. Sphingolipid metabolism and drug resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resist*, 2018, vol. 1, pp. 181-197, doi: 10.20517/cdr.2018.06.
40. Rizzo A., Napoli A., Roggiani F., Tomassetti A., Bagnoli M., Mezzanzanica D. One-Carbon Metabolism: Biological Players in Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*, 2018, vol. 19, doi: 10.3390/ijms19072092.
41. Amoroso M.R., Matassa D.S., Agliarulo I., Avolio R., Maddalena F., Condelli V., Landriscina M., Esposito F. Stress-Adaptive Response in Ovarian Cancer Drug Resistance: Role of TRAP1 in Oxidative Metabolism-Driven Inflammation. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, vol. 108, pp. 163-198, doi: 10.1016/bs.apcsb.2017.01.004.
42. Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, vol. 32, pp. 157-170, doi: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.
43. Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res*, 2000, vol. 20, pp. 4115-4139.
44. Stojnev S., Ristic-Petrovic A., Jankovic-Velickovic L. Reactive oxygen species, apoptosis and cancer. *Vojnosanit Pregl*, 2013, vol. 70, pp. 675-678, doi: 10.2298/vsp1307675s.
45. Poljsak B., Milisav I. The neglected significance of "antioxidative stress". *Oxid Med Cell Longev*, 2012, vol. 2012, p. 480895, doi: 10.1155/2012/480895.

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PERITONEAL FLUID IN OVARIAN CANCER

Fedorova M.V.¹, Voznesensky V.I.², Sozarukova M.M.³, Kharchenko A.A.², Sosnova E.A.⁴, Proskurnina E.V.⁵¹ Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing*Novogireevskaya str., 3a, Moscow, 111123, Russia; e-mail: theklazontag@yandex.ru*² Pletnev City Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow*Veshnyakovskaya str., 2., Moscow, 111539, Russia*³ Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, RAS*Leninsky prosp., 31, Moscow, 119991, Russia*⁴ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)*Trubetskaya str., 8-2, Moscow, 119991, Russia*⁵ Research Centre for Medical Genetics*Moskvorechye str., 1, Moscow, 115522, Russia*

Received 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0590

Abstract. In ovarian cancer, peritoneal fluid is an active participant in carcinogenesis. The study included 48 patients aged 25–74 years with histologically confirmed ovarian cancer and benign ovarian neoplasms. Using an original technique based on the method of enhanced kinetic chemiluminescence, the antioxidant profiles of peritoneal fluid with ovarian cancer and benign neoplasms were evaluated. In the peritoneal fluid, the antioxidant capacity significantly increased in the series benign tumors > highly differentiated > moderately and poorly differentiated adenocarcinomas, leading to a state of antioxidant excess in the case of moderately and poorly differentiated adenocarcinomas. Thus, in ovarian cancer, tumor progression leads to a shift towards an excess of antioxidants, possibly due to metabolites of the tumor itself.

Key words: *antioxidant capacity, peritoneal fluid, ovarian cancer.*

О СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *NEONOTHOPANUS NAMBI*

Могильная О.А., Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Бондарь В.С.

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

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

Поступила в редакцию 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0591

Аннотация. Из мицелия высшего гриба *Neonothopanus nambi* с помощью мягкой обработки биомассы β -глюкозидазой выделен внеклеточный фермент с оксидазной активностью. В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные о субстратной специфичности и некоторых свойствах выделенного фермента. Как показали эксперименты, внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* проявляла активность с большинством ароматических соединений, выбранных в качестве модельных субстратов. При этом следует отметить, что фермент проявлял каталитическую функцию без добавки в реакционную смесь пероксида водорода и иных дополнительных медиаторов. Наибольшая активность фермента наблюдалась при использовании в качестве субстратов вератрилового спирта и двухатомных фенолов – гидрохинона и гваякола. Меньший уровень активности изучаемой оксидазы зарегистрирован в реакциях с ароматическими азосоединениями (АБТС, диаминобензидин, о-дианизидин). В реакции с двухатомным фенолом резорцином и монофенолом каталитическая эффективность фермента была существенно ниже. Для наиболее эффективно окисляемых субстратов были определены кинетические параметры ферментативных реакций. Было показано, что добавки хелатора двухвалентных ионов металлов (ЭДТА) не влияли на активность фермента. В то же время, добавки SH реагента (ДТТ) увеличивали каталитическую эффективность изучаемой оксидазы. Совокупность полученных данных свидетельствует, что внеклеточная оксидаза гриба *N. nambi* катализирует окисление широкого спектра ароматических соединений в слабых и нейтральных условиях без добавления дополнительных медиаторов (в частности, пероксида водорода). Это создает предпосылки для изучения применимости данного фермента в биомедицинской аналитике.

Ключевые слова: высшие грибы, базидиомицет *Neonothopanus nambi*, внеклеточная оксидаза, вератриловый спирт, фенольные соединения.

Базидиальные грибы обладают уникальными ферментными системами, участвующими в разложении растительных биополимерных материалов (лигнин, целлюлоза). Благодаря значительной окислительно-восстановительной способности грибных ферментных систем, исследователи интенсивно изучают возможности их применения для деградации ксенобиотиков и биоремедиации загрязненных природных объектов. Высокая селективность, образование малотоксичных продуктов в ходе катализируемых реакций, сохранение функциональной активности в широком диапазоне pH, температур, концентраций поллютантов и, что важно, без привлечения медиаторов, позволяют говорить о перспективности использования грибных ферментов (и грибных ферментных систем) в разработке «зеленых» биотехнологий [1-5]. Например, для конструирования сенсорных и аналитических систем активно исследуют применимость секретируемых ферментов высших грибов, в частности, ФАД-, гем- и медьсодержащих оксидоредуктаз [6-8].

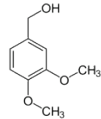


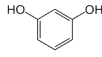

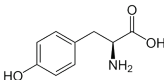
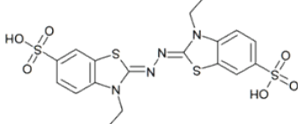
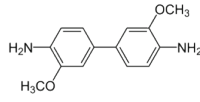
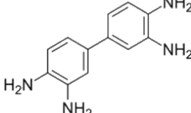
Однако ряде случаев применение в аналитических приложениях секретируемых грибных оксидаз затруднено из-за их недостаточной стабильности, что стимулирует исследования, направленные на поиски новых видов базидиомицетов в качестве перспективных источников получения оксидоредуктаз, изучение возможностей увеличения продукции этих ферментов в грибной биомассе, выявление грибных оксидаз с новыми свойствами [9-12]. Разрабатываются и совершенствуются методы выделения этих ферментов из грибной биомассы и способы их иммобилизации на разных носителях с целью повышения резистентности к действию негативных факторов и сохранения каталитической функции при многократном использовании [13-15]. При этом следует сказать, что одна из особенностей грибных секретируемых оксидоредуктаз заключается в большом количестве изоформ этих ферментов. В свою очередь, это открывает возможности для пополнения пула известных оксидоредуктаз новыми секретируемыми высшими грибами ферментами с окислительными свойствами, как для научных исследований, так и для практического применения в аналитике и биокатализе [16-20]. В представляемой работе приводятся экспериментальные данные о некоторых свойствах оксидазы, секретируемой базидиомицетом *Neonothopanus nambi*, и ее каталитической эффективности при окислении ароматических соединений.

Для исследований использовали мицелий высшего гриба *N. nambi* (штамм IBSO 2391 из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами мицелия диаметром 2-7 мм (рис. 1), которые получали при глубинном культивировании гриба в жидкой питательной среде PDB («HiMedia Laboratory», Индия). Методические подробности выделения внеклеточных ферментов из биомассы мицелия базидиомицета *N. nambi* представлены нами в предыдущих работах [21,22]. В кратком изложении схему выделения изучаемой оксидазы можно представить следующим образом. После культивирования пеллеты мицелия извлекали из питательной среды и

многократно промывали деионизированной (ДИ) водой (Milli-Q system, «Millipore», США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Внеклеточные ферменты (в том числе изучаемую оксидазу) получали обработкой биомассы β -глюкозидазой («Serva», Германия). Отмытые пеллеты помещали в свежий объем ДИ воды, содержащий β -глюкозидазу в концентрации 0,5 МЕ/мл, и инкубировали при 25 °С в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-20 («BIOSAN», Латвия). После инкубации жидкую часть отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр и диализовали через мембрану Amicon 30 кДа («Merk Millipore», Германия) для концентрирования выделенных внеклеточных ферментов и удаления низкомолекулярных соединений. Полученный ферментный концентрат использовали для разделения белковых компонентов и выделения изучаемой внеклеточной оксидазы с помощью колоночной хроматографии на Sephadex G-200 («Pharmacia», Швеция). Наличие оксидазной активности в хроматографических пробах оценивали спектральным методом (спектрофотометр UV-1800, «Shimadzu», Япония) по уровню поглощения при 309 нм, отражающему выход продукта реакции окисления вератрилового спирта («Sigma», США). Раствор реагента готовили *in situ* в ДИ воде, при скрининге хроматографических проб его концентрация в реакционной смеси составляла 1 мМ. Хроматографические фракции с наибольшей оксидазной активностью объединяли и концентрировали диализом через мембрану 30 кДа. Сконцентрированный ферментный препарат использовали в исследованиях.

При оценке субстратной специфичности внеклеточной оксидазы, выделенной из мицелия базидиомицета *N. nambi*, в качестве модельных субстратов использовали ряд ароматических соединений, имеющих структурные отличия (табл. 1). Выбор ароматических соединений определялся тем, что их широко используют в научных

Таблица 1. Ароматические соединения, использованные в качестве модельных субстратов для оценки эффективности их окисления внеклеточной оксидазой из высшего гриба *N. nambi*

| Ароматическое соединение | Структурная формула | Длина волны регистрации продукта реакции (нм) |
|---|--|---|
| Ароматические спирты: вератриловый (3,4-диметоксибензиловый) спирт («Sigma-Aldrich», США) |  | 309 |
| Одно- и двухатомные фенолы: фенол (гидроксибензол) («Fluka», Германия) |  | 506 |
| гидрохинон (бензол-1,4-диол) («Реахим», РФ) |  | 246 |
| резорцин (бензол-1,3-диол) («Реахим», РФ) |  | 273 |
| Метоксифенолы: гваякол (2-метоксифенол) («Sigma-Aldrich», США) |  | 467 |
| Ароматические амины: Тирозин (2-амино-3-(4-гидроксифенил)пропановая кислота) («Fluka», Германия) |  | 478 |
| Ароматические азосоединения: АБТС (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) («AppliChem», Германия) |  | 420 |
| о-дианизидин (3,3'-диметокси-4,4'-бензидин) («Fluka», Германия) |  | 442 |
| ДАБ (3,3'-диаминобензидин) («AppliChem», Германия) |  | 462 |

исследованиях и практической аналитике для диагностики и идентификации оксидазных ферментов [3-6,13,20]. Каталитическую эффективность фермента с модельными субстратами оценивали спектрофотометрически (UV-1800) по выходу продуктов реакций, регистрируемому по величине поглощения при соответствующих длинах волн (таблица 1), и выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах фермента определяли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта. Концентрацию ароматических соединений в реакционных смесях варьировали для определения зависимостей выхода продуктов и кинетических характеристик ферментативных реакций. Определение температурного оптимума каталитической активности выделенной оксидазы проводили в диапазоне температур реакционной среды от 20 до 50 °С. Выход продукта оценивали после инкубации содержащих фермент и субстрат реакционных смесей в течение 15 мин при разных температурах (термостат ТВ-85 Thermo Batch, «Shimadzu», Япония). При изучении эффективности функционирования фермента в зависимости от pH среды использовали серию 50 мМ Na-ацетатных буферов со значениями pH от 3 до 8. В экспериментах проводили также оценку каталитической эффективности оксидазы гриба *N. nambi* при воздействии хелатора двухвалентных ионов металлов ЭДТА («Serva», Германия) и SH реагента ДТТ («AppliChem», Германия). Для обработки фермента использовали диапазон концентраций указанных реагентов от 0,1 до 1 мМ.

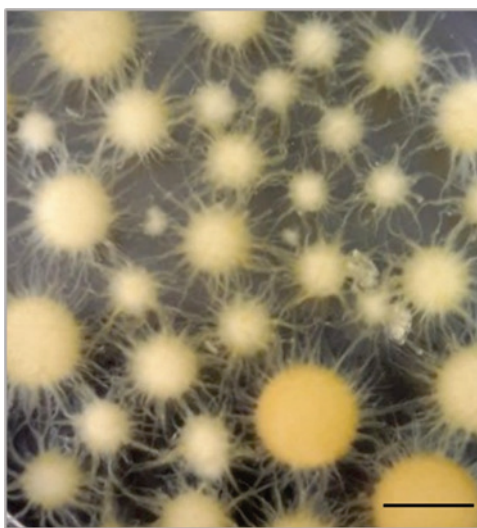


Рисунок 1. Внешний вид пеллет мицелия базидиомицета *N. nambi*, выращенных при глубинном культивировании гриба в жидкой питательной PDB среде. Изображение получено с помощью фотокамеры PowerShot S50 («Canon», Япония). Масштабная линейка – 5 мм

Как показали исследования, при гель-фильтрационной хроматографии ферментного концентрата на Sephadex G-200 катализирующая окисление вератрилового спирта внеклеточная оксидаза из гриба *N. nambi* обнаруживается в белковой фракции с нативной молекулярной массой белка 80 кДа. Спектральные исследования белковой фракции, содержащей данный фермент, не выявили в белке каких-либо хромофорных компонентов. Следует сказать, что представленные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований [21].

В экспериментах было показано, что выделенная из базидиомицета *N. nambi* внеклеточная оксидаза функционирует в широких интервалах температур и pH среды (рис. 2). Как видно из представленных данных, фермент эффективно катализирует окисление вератрилового спирта в диапазоне температур от 20 до 45 °С, проявляя максимальную активность при температурах 22–35 °С. Видно также, что оксидаза наиболее эффективно функционирует при нейтральных и слабокислых значениях pH среды, проявляя максимальную активность при pH 6,0.

В исследованиях было установлено, что внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* катализирует окисление большинства ароматических соединений, выбранных в качестве модельных субстратов (рис. 3), что указывает на ее широкую субстратную специфичность. При этом следует отметить, что фермент проявлял каталитическую функцию без добавки в реакционную смесь пероксида водорода и иных дополнительных медиаторов. Как видно из представленных данных (рис. 3), наибольшая каталитическая активность фермента наблюдалась при использовании в качестве субстратов вератрилового спирта и двухатомных фенолов – гидрохинона и гваякола. Меньший уровень активности изучаемой оксидазы зарегистрирован в реакциях с ароматическими азосоединениями (АБТС, ДАБ, о-дианизидин). В то же время, из представленных данных видно, что в реакциях с двухатомным фенолом резорцином и монофенолом каталитическая эффективность фермента была существенно ниже и он совсем не проявлял каталитическую активность в реакции с тирозином (рис. 3).

Для наиболее эффективно окисляемых ароматических соединений (рис. 3) были получены зависимости скоростей ферментативных реакций от концентрации соответствующих субстратов (зависимости Михаэлиса - Ментен). Из полученных кинетических параметров ферментативных реакций (табл. 2) следует, что изучаемая оксидаза обладает наилучшим сродством к вератриловоому спирту и окисляет его с наибольшей эффективностью. С меньшей эффективностью фермент окисляет гидрохинон и гваякол.

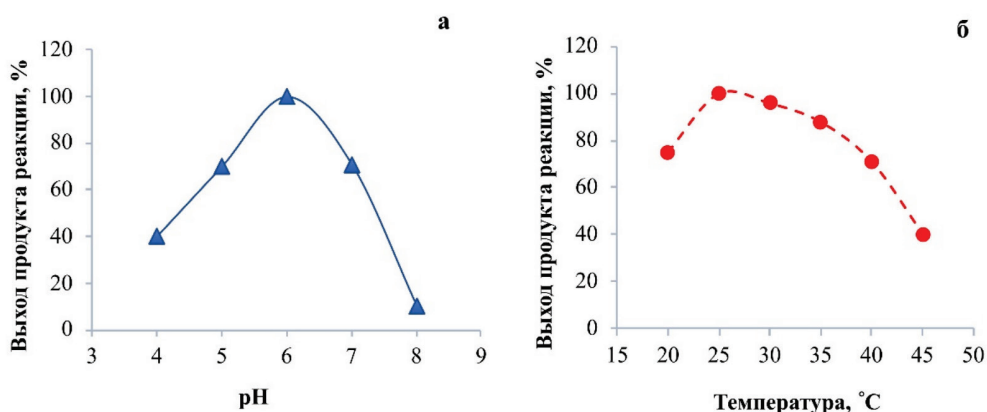


Рисунок 2. Выход продукта реакции окисления вератрилового спирта, катализируемого внеклеточной оксидазой из базидиомицета *N. nambi*, в зависимости от рН (а) и температуры (б) реакционной среды. Представленные данные нормированы на максимальные значения выхода продукта в рядах измерений

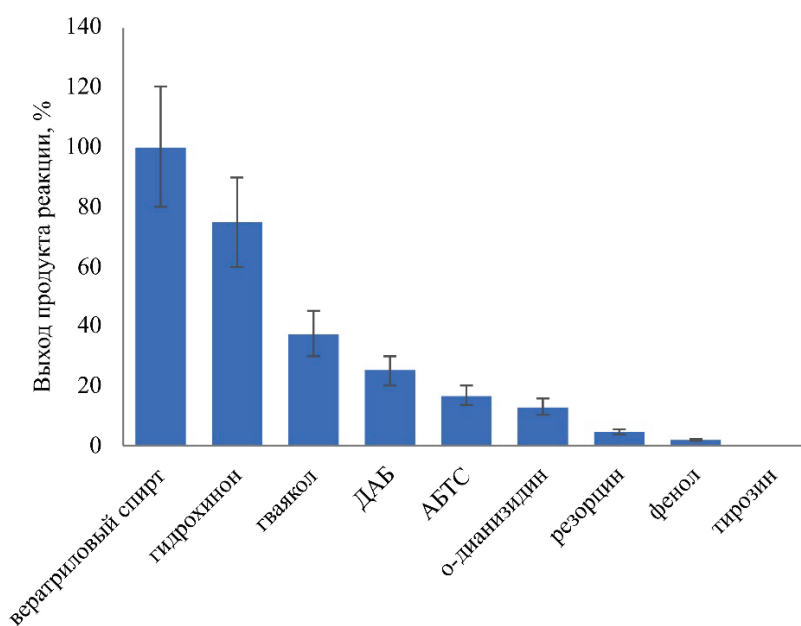


Рисунок 3. Выход продуктов реакций, отражающих эффективность окисления ароматических субстратов внеклеточной оксидазой из базидиомицета *N. nambi*. Данные нормированы на значение максимального выхода продукта в ряду измерений

В исследованиях с использованием в качестве субстратов выбранных ароматических соединений (табл. 1) была проведена сравнительная оценка субстратной специфичности внеклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* с широко применяемыми в биомедицинских приложениях ферментами лакказы и пероксидазы [3,8,23]. Для экспериментов использовали высокочистые ферменты, производимые фирмой «Sigma» (США) – лакказу из гриба *Agaricus bisporus* и пероксидазу из корней хрена (HRP). Как показали исследования, в субстратной специфичности к ароматическим соединениям у всех ферментов наблюдаются значительные различия (рис. 4). Из представленных данных следует, что лакказа из гриба *A. bisporus* с наибольшей эффективностью окисляет только двухатомный фенол резорцин. В значительно меньшей степени фермент проявляет активность с монофенолом и не катализирует окисление вератрилового спирта и двухатомных фенолов гидрохинона и гваякола. В то же время, субстратная специфичность HRP гораздо шире и по этому показателю она сопоставима

Таблица 2. Кинетические характеристики ферментативных реакций, отражающие каталитическую эффективность внеклеточной оксидазы гриба *N. nambi* при окислении ароматических соединений

| Модельный субстрат | K_m , мМ | k_{cat} , с ⁻¹ | k_{cat}/K_m , с ⁻¹ мМ ⁻¹ |
|--------------------|------------|-----------------------------|--|
| Вератриловый спирт | 0,52 | 97 | 186 |
| Гидрохинон | 0,67 | 88 | 132 |
| Гваякол | 0,72 | 47 | 65 |

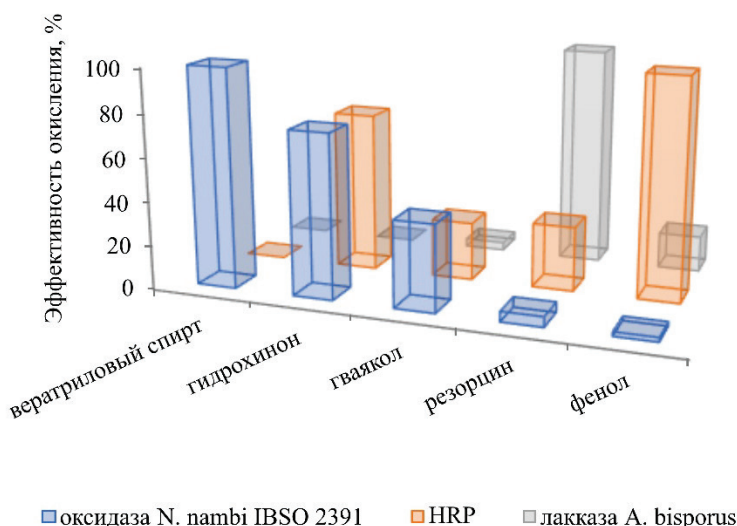


Рисунок 4. Эффективность окисления ароматических соединений внеклеточной оксидазой из гриба *N. nambi*, лакказы из гриба *A. bisporus* и пероксидазой из корней хрена (HRP). Данные нормированы на значения максимальных выходов продуктов в рядах измерений

с внеклеточной оксидазой из гриба *N. nambi*, однако у этих ферментов наблюдаются заметные различия в эффективности окисления ряда субстратов (рис. 4). При этом следует отметить также, что HRP катализировала окисление ароматических соединений только после добавки в реакционную смесь пероксида водорода, а внеклеточная оксидаза из гриба *N. nambi* проявляла высокую каталитическую активность без добавления этого медиатора.

В дополнительных экспериментах упомянутые выше коммерческие ферменты были использованы для выяснения того, является ли оксидаза из базидиомицета *N. nambi* металл содержащим ферментом. Поскольку в структуре лакказы и HRP содержатся ионы меди и железа, соответственно, была проведена оценка их каталитической активности после обработки хелатором двухвалентных ионов металлов ЭДТА и SH реагентом ДТТ. Было показано, что инкубация обоих ферментов с данными реагентами при их концентрациях 0,1-1 мМ приводила к значительной утрате их функциональной активности и снижению эффективности образования продуктов реакций до единиц или долей процентов, по сравнению с контролем (без обработки ЭДТА и ДТТ). В то же время, было установлено, что аналогичная обработка ЭДТА внеклеточной оксидазы из гриба *N. nambi* не оказывала влияния на функциональную активность фермента. Это может свидетельствовать об отсутствии двухвалентных ионов металлов в молекуле данного фермента. Кроме того, при обработке изучаемой оксидазы ДТТ наблюдалось значительное (на 20-25% и более) увеличение ее каталитической эффективности, по сравнению с контролем. Механизм этого феномена пока непонятен и требует отдельного исследования.

Таким образом, совокупность полученных в проведенных исследованиях результатов свидетельствует о том, что внеклеточная оксидаза из базидиомицета *N. nambi* функционирует в широких интервалах температур и pH реакционной среды, проявляя наибольшую каталитическую эффективность при нейтральных и слабощелочных условиях и температурах от 22 до 35 °C; катализирует окисление широкого спектра ароматических соединений без добавления дополнительных медиаторов (в частности, пероксида водорода); не содержит в своей структуре хромофорных соединений и ионов двухвалентных металлов. Это создает предпосылки для получения данной оксидазы в гомогенном виде для установления ее структуры и механизма каталитической функции и изучения применимости фермента в биомедицинской аналитике.

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

Список литературы / References:

1. Zhang D., Gersberg R.M., Ng W.J., Tan S.K. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 2014, vol. 184, doi: 10.1016/j.envpol.2013.09.009.
2. Wang X., Yao B., Su X. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, doi: 10.3390/ijms19113373.
3. Morsi R., Bilal M., Iqbal H.M.N., Ashraf S.S. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of The Total Environment*, 2020, vol. 714, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136572.
4. Savino S., Fraaije M.W. The vast repertoire of carbohydrate oxidases: An overview. *Biotechnology advances*, 2021, vol. 51, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107634.

5. Sousa A.C., Martins L.O., Robalo M.P. Laccases: Versatile biocatalysts for the synthesis of heterocyclic cores. *Molecules*, 2021, vol. 26, doi: 10.3390/molecules26123719.
6. Martinkova L., Kotik M., Markova E., Homolka L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere*, 2016, vol. 149, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.01.022.
7. Martinez A.T., Ruiz-Duenas F.J., Camarero S. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*, 2017, vol. 35, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.06.003.
8. Li F., Ma W., Wu X., Wang Y., He J. Luminol, horseradish peroxidase, and glucose oxidase ternary functionalized graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, vol. 410, doi: 10.1007/s00216-017-0752-5.
9. Nikolavits E., Dimarogona M., Karagiannaki I., Chalima A., Fishman A., Topakas E. Versatile fungal polyphenol oxidase with chlorophenol bioremediation potential: characterization and protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, vol. 84, doi: 10.1128/AEM.01628-18.
10. Tu T., Wang Y., Huang H., Wang Y., Jiang X., Wang Z., Yao B., Luo H. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution. *Food Chemistry*, 2019, vol. 281, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.099.
11. Jankowski N., Koschorreck K., Urlacher V.B. High-level expression of aryl-alcohol oxidase 2 from *Pleurotus eryngii* in *Pichia pastoris* for production of fragrances and bioactive precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, vol. 104, doi: 10.1007/s00253-020-10878-4.
12. Shebanova A.D., Chernykh A.M., Baskunov B.P., Gaidina A.S., Myasoedova N.M., Renfeld Z.V., Ponamoreva O.N., Kolomytseva M.P. Novel biocatalyst from *Microthielavia ovispora* VKM F-1735 for industrial dye decolorization in the absence of mediators. *Process Biochemistry*, 2021, vol. 109, doi: 10.1016/j.procbio.2021.07.009.
13. Tamaru Y., Umezawa K., Yoshida M. Characterization of an aryl-alcohol oxidase from the plant saprophytic basidiomycete *Coprinopsis cinerea* with broad substrate specificity against aromatic alcohols. *Biotechnology Letters*, 2018, vol. 40, no. 7, doi: 10.1007/s10529-018-2534-3.
14. Wang N., Ren K., Jia R., Chen W., Sun R. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. *BMC Biotechnology*, 2016, vol. 16, no. 87, doi: 10.1186/s12896-016-0317-2.
15. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: a comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, vol. 258, doi: 10.1016/j.cis.2018.07.004.
16. Athamneh K., Alneyadi A., Alsadik A., Wong T.S., Ashraf S.S. Efficient degradation of various emerging pollutants by wild type and evolved fungal DyP4 peroxidases. *PLOS ONE*, 2022, vol. 17, doi: 10.1371/journal.pone.0262492.
17. Liu X., Deng W., Yang Y. Characterization of a novel laccase LAC-Yang1 from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* strain Yang1 with a strong ability to degrade and detoxify chlorophenols. *Molecules*, 2021, vol. 26, doi: 10.3390/molecules26020473.
18. Cleveland M., Lafond M., Xia F.R., Chung R., Mulyk P., Hein J.E., Brumer H. Two *Fusarium* copper radical oxidases with high activity on aryl alcohols. *Biotechnology and Biofuels*, 2021, vol. 14, doi: 10.1186/s13068-021-01984-0.
19. Kimani V., Ullrich R., Buttner E., Herzog R., Kellner H., Jehmlich N., Hofrichter M., Liers K. First Dye-decolorizing peroxidase from an ascomycetous fungus secreted by *Xylaria grammica*. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, doi: 10.3390/biom11091391.
20. Ferreira P., Carro J., Balcells B., Martinez A.T., Serrano A. Expanding the physiological role of aryl-alcohol flavooxidases as quinone reductases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, vol. 89, doi: 10.1128/aem.01844-22.
21. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Extracellular oxidases of basidiomycete *Neonothopanus nambi*: isolation and some properties. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2020, vol. 490, no. 1, doi: 10.1134/S1607672920010135.
22. Mogilnaya O., Ronzhin N., Posokhina E., Bondar V. Extracellular oxidase from the *Neonothopanus nambi* fungus as a promising enzyme for analytical applications. *The Protein Journal*, 2021, vol. 40, no. 5, doi: 10.1007/s10930-021-10010-z.
23. Maryskova M., Linhartova L., Novotny V., Rysova M., Cajthaml T., Sevcu A. Laccase and horseradish peroxidase for green treatment of phenolic micropollutants in real drinking water and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, vol. 28, doi: 10.1007/s11356-021-12910-0.

ON THE SUBSTRATE SPECIFICITY AND SOME PROPERTIES OF THE EXTRACELLULAR OXIDASE FROM THE *NEONOTHOPANUS NAMBI* BASIDIOMYCETE**Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Bondar V.S.**

Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

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

Received 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2023.0591

Abstract. An extracellular enzyme with oxidase activity was isolated from the mycelium of the higher fungus *Neonothopanus nambi* by mild treatment of the biomass with β -glucosidase. A substrate specificity and some properties of the isolated extracellular oxidase were studied in the present work. Experiments revealed that the extracellular oxidase exhibited activity with most phenolic compounds chosen as model substrates. It is important to note that the enzyme exhibited a catalytic function in the reactions without the addition of exogenous hydrogen peroxide and other mediators. The highest catalytic activity of the enzyme was observed with veratryl alcohol and dihydric phenols, hydroquinone and guaiacol. The enzyme showed lower activity with aromatic azo compounds (ABTS, DAB, o-dianisidine). In reactions with dihydric phenol resorcinol and monophenol, the enzyme efficiency was extremely low. The kinetic parameters of the enzymatic reactions with actively oxidized substrates were determined. The addition of a divalent metal ion chelator (EDTA) did not affect the activity of the enzyme, while the addition of the SH reagent (DTT) increased the catalytic efficiency of the studied oxidase. The totality of the data obtained indicates that the extracellular oxidase of the *N. nambi* fungus catalyzes the oxidation of a wide range of aromatic compounds under slightly acidic and neutral conditions without the addition of additional mediators (in particular, hydrogen peroxide). This creates the prerequisites for studying the applicability of the enzyme in biomedical analytics.

Key words: higher fungi, basidiomycete *Neonothopanus nambi*, extracellular oxidase, veratryl alcohol, phenolic compounds.

КОФЕЙНАЯ КИСЛОТА СТИМУЛИРУЕТ СВЕЧЕНИЕ МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ *NEONOTHOPANUS NAMBI*, *ARMILLARIA BOREALIS* *IN VIVO***Ронжин Н.О.¹, Посохина Е.Д.¹, Ле В.М.², Могильная О.А.¹, Захарова Ю.В.³,
Сухих А.С.², Бондарь В.С.¹**¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

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

² Кемеровский государственный университет

ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, РФ

³ Кемеровский государственный медицинский университет

ул. Ворошилова, 22а, г. Кемерово, 650056, РФ

Поступила в редакцию 07.07.2023. DOI: 10.29039/tusjbpс.2023.0592

Аннотация. В экспериментах *in vivo* установлено, что добавки кофейной кислоты к пеллетам светящегося мицелия высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis* стимулируют быстрое и значительное (на порядок и более) увеличение интенсивности их световой эмиссии. Высказано предположение, что наблюдаемый эффект активации грибного свечения может быть опосредован окислением кофейной кислоты ферментами лигнинолитического комплекса базидиомицетов (в частности, пероксидазами) с излучением квантов видимого света. При этом в параллельных экспериментах *in vivo* было показано, что добавки гиспидина (предшественник люциферина реакции светоизлучения высших грибов) не влияли на интенсивность световой эмиссии мицелия. В то же время, в исследованиях *in vitro* установлено, что кофейная кислота существенным образом подавляет активированную НАДФН и гиспидином реакцию излучения люминесцентных систем, выделенных из мицелия базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis*. Ингибирующий эффект кофейной кислоты рассматривается и обсуждается в работе с позиций понятия классической биохимии об ингибировании фермента продуктом реакции по принципу обратной отрицательной связи. В целом, результаты проведенных исследований развивают и дополняют представления о механизмах светоизлучения высших грибов и свидетельствуют в пользу того, что генерация квантов видимого света в базидиомицетах может осуществляться разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем). Установление механизма стимуляции биолюминесценции высших грибов *in vivo* кофейной кислотой является приоритетной задачей дальнейших исследований.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, базидиомицеты, светящийся мицелий, грибные люминесцентные системы, кофейная кислота, гиспидин, восстановленные пиридиновые нуклеотиды.

Излучение видимого света живыми организмами (биолюминесценция) – широко распространенное явление в царстве грибов [1-3]. В настоящее время известно более 100 видов базидиомицетов, обладающих видимым в темноте свечением [4]. В исследованиях грибной биолюминесценции за последнее десятилетие достигнуты заметные успехи, однако молекулярные механизмы этого феномена, по-прежнему, недостаточно понятны и требуют дополнительного изучения. К настоящему моменту считается доказанным, что прекурсором люциферина светящихся грибов является гиспидин (ГП), трансформируемый НАДФН-зависимой гидроксилазой в люциферин (3-гидрокси-гиспидин), который окисляется люциферазой с излучением кванта видимого света [5]. Образующийся в результате катализируемой люциферазой реакции нестабильный высокоэнергетический компонент излучает свет и превращается в окслюциферин, который преобразуется в 3,4-дигидроксикоричную (кофейную) кислоту под действием кофеилпируват-гидролазы [4,6]. В свою очередь, известно, что ГП образуется из кофейной кислоты (КК) в ее цикле под действием гиспидин-синтазы [7]. При этом следует отметить, что до сих пор остается неясно: какой фермент (или ферментный комплекс) выполняет в светящихся высших грибах функцию люциферазы, так как он не выделен в чистом виде и не охарактеризован; является ли люциферин-люциферазный механизм единственным механизмом грибного светоизлучения; является ли 3-гидрокси-гиспидин единственным субстратом люминесцентной реакции грибов. Надо сказать, что в недавних исследованиях нами были получены экспериментальные факты в пользу участия в видимом свечении высших грибов ассоциированной с мембранами ЭПР системы цитохрома Р450 с вовлечением в этот процесс электронно-транспортных ферментных систем: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома Р450 – цитохром Р450 и НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома b5 – цитохром b5 – цитохром Р450 [8]. В свою очередь, это позволило сделать вывод о том, что в светящихся базидиомицетах генерация квантов видимого света может обеспечиваться разными биохимическими путями – функционированием системы НАДФН-зависимая гидроксилаза – люцифераза [5] и системы цитохрома Р450 [8]. Необходимо также отметить, что в экспериментах с плодовыми телами светящегося базидиомицета *Muscena chlorophos* было обнаружено увеличение интенсивности свечения живых пластинок шляпки гриба под действием КК [9]. Автор этой работы в дальнейших исследованиях с плодовыми телами *M. chlorophos* высказал предположение, что активация свечения живых пластинок КК не связана с образованием ГП, поскольку добавки ГП не влияли на уровень их световой эмиссии [10,11]. В

предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные об эффектах кофейной кислоты *in vivo* и *in vitro* на биолюминесценцию высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis*.

В исследованиях использовали мицелий высших грибов *N. nambi* (штамм IBSO 2391) и *A. borealis* (штамм IBSO 2328) из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами светящегося мицелия, которые получали при культивировании базидиомицетов в погруженных условиях в жидкой питательной среде PDB («HiMedia Laboratory», Индия) [12,13]. Выращенные пеллеты извлекали из питательной среды, многократно промывали деионизированной (ДИ) водой (Milli-Q system, «Millipore», США), инкубировали в ДИ воде в течение 10-12 часов при медленном перемешивании со скоростью 60-80 rpm (шейкер OS-10, «BIOSAN», Латвия) для более полного удаления остатков питательной среды и метаболитов. Отмытые пеллеты мицелия использовали для исследований. Методические особенности получения из биомассы мицелия изучаемых грибов «холодных» экстрактов, содержащих ферментные люминесцентные системы, подробно изложены нами в предыдущих работах [14,15]. Для проверки функциональной активности выделенных систем использовали НАДФН («Sigma-Aldrich», США) и «горячие» экстракты из мицелия несветящегося гриба *Pholiota squarrosa* (штамм IBSO 2376), поскольку известно, что в биомассе данного гриба содержится ГП [5]. Выше уже сообщалось, что ГП является предшественником субстрата реакции светоизлучения высших грибов и преобразуется НАД(Ф)Н-зависимой гидроксилазой в 3-гидроксигиспидин (люциферин), который окисляется люциферазой с излучением квантов видимого света [5]. Исходя из этого, световую эмиссию проверяемых люминесцентных систем активировали последовательными добавками восстановленного пиридинового нуклеотида, необходимого для их функционирования [16,17], и «горячего» экстракта из *P. squarrosa*, содержащего ГП. После этого протестированные «холодные» экстракты, содержащие активные люминесцентные системы, лиофильно высушивали (сушилка лиофильная ЛС-500, Россия) и хранили сухие препараты при -40 °С до момента использования. Показано, что ферменты люминесцентных систем высших грибов проявляют высокую активность после хранения сухих экстрактов в течение трех лет [15]. Для исследований высушенные препараты растворяли в ДИ воде и использовали в экспериментах. Эффекты КК на грибное свечение оценивали в экспериментах *in vivo* (на пеллетах мицелия) и *in vitro* (с использованием люминесцентных систем). КК выделяли из корневищ дикорастущего бодяка девясилويدного (*Cirsium helenioides* (L.) Hill) с помощью водно-спиртового извлечения с последующим разделением и очисткой компонентов на сефадексе LH-20 («Sigma-Aldrich», США), модифицированном ванкомицином, доочисткой целевого продукта в условиях ВЭЖХ (хроматограф LC-20 Prominence «Shimadzu», Япония) на колонке Gemini 5 мкм C18 («Phenomenex», США) с подтверждением чистоты выделенного компонента ГХ-МС (газовый хроматограф Agilent 7000 В, «Agilent», США). Влияние КК на свечение пеллет мицелия оценивали следующим образом. Индивидуальные пеллеты помещали в прозрачные пластиковые пробирки объемом 1.5 мл («Erppendorf», Германия), содержащие 300 мкл ДИ воды. Пробирки устанавливали в измерительную камеру люменометра (Glomax® 20/20, «Promega BioSystems Sunnyvale, Inc.», США) и регистрировали исходный уровень свечения пеллет. После этого в образцы аккуратно (без перемешивания) вносили 5 мкл водных растворов КК с концентрацией вещества от 0,02 до 1,0 мг/мл и вновь регистрировали интенсивность и динамику световой эмиссии пеллет. В сравнительных исследованиях вместо КК к образцам пеллет мицелия добавляли 5 мкл водного раствора ГП высокой степени чистоты («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 33 мкМ, который готовили *in situ* последовательными разведениями ДИ водой исходного раствора ГП, приготовленного в метаноле. Эффекты КК на люминесцентные системы базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis* оценивали следующим образом. Прозрачные пробирки («Erppendorf»), содержащие 50 мкл препарата системы, устанавливали в люменометр и регистрировали начальный уровень ее световой эмиссии. Затем к препарату добавляли 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН, приготовленного *in situ* в ДИ воде, и повторно регистрировали интенсивность и динамику свечения. Световые сигналы, регистрируемые после добавки НАДФН, с одной стороны указывают на наличие в тестируемых препаратах люминесцентных систем *N. nambi* и *A. borealis* эндогенного ГП, который утилизируется в ходе реакции светоизлучения, с другой – являются показателем активности ферментов люминесцентной системы [18]. После снижения иницированного НАДФН светового сигнала до стационарного уровня к препарату системы добавляли 5 мкл экстракта *P. squarrosa*, содержащего ГП, вновь регистрируя интенсивность и динамику световой эмиссии. В данном случае, после выхода светового сигнала на максимальный уровень к препарату системы добавляли 5 мкл раствора КК, оценивая ее эффект по изменению интенсивности и динамики свечения. Во всех рассматриваемых выше случаях тестирования люминесценции, интенсивность и динамику световых сигналов регистрировали на люменометре (Glomax® 20/20) в режиме одно измерение в секунду и выражали уровень световой эмиссии в относительных единицах.

В работе было показано, что при использованных экспериментальных условиях погруженного культивирования (объем питательной среды, объем инокулята, постоянное радиальное перемешивание культивируемого объема, температура и время выращивания) рост мицелия базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis* наблюдается в виде шарообразных пеллет с большим количеством поверхностных выростов – гиф (рис. 1). Как видно из представленных данных, выращенные в погруженных условиях пеллеты мицелия изучаемых грибов, после их отмывки ДИ водой и инкубации в течение длительного времени в ДИ воде для удаления остатков питательной среды и метаболитов обладают регистрируемым свечением. Для полученных

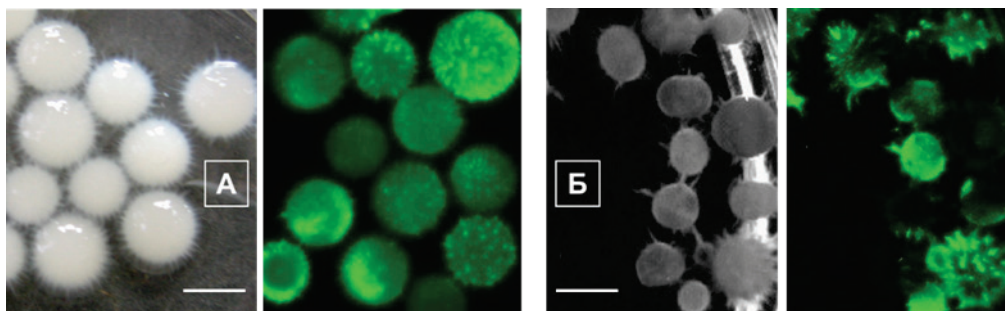


Рисунок 1. Внешний вид (слева) и свечение (справа) пеллет мицелия высших грибов *N. nambi* (А) и *A. borealis* (Б), полученных при культивировании в погруженных условиях. Изображения получены с помощью системы визуализации ChemiDoc™ XRS System («Bio-Rad», США). Масштабная линейка – 5 мм

индивидуальных пеллет мицелия наблюдаются различия в размерах, количестве поверхностных выростов и интенсивности свечения (рис. 1), что согласуется с результатами наших предыдущих работ по глубинному культивированию базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis* [12,13].

В исследованиях *in vivo* было установлено, что добавки КК (содержание вносимого в тестируемую пробу вещества от 0,1 до 5 мкг) к пеллетам светящегося мицелия грибов *N. nambi* и *A. borealis* стимулируют быстрое увеличение уровня их световой эмиссии, который может значительно (на порядок и более) превышать исходный уровень свечения (рис. 2). Как видно из представленных данных, повышение интенсивности светоизлучения пеллет регистрируется уже в течение первой минуты после добавления КК. В экспериментах было установлено, что стимулирующий свечение эффект КК является дозозависимым и нарастает с увеличением ее количества, добавляемого к пеллетам. Это следует из анализа максимального уровня свечения пеллет, стимулированного добавками разных количеств КК, и площадей под кривыми регистрируемых люминесцентных сигналов, отражающих суммарный квантовый выход. В то же время, в сравнительных экспериментах было показано, что добавки к пеллетам мицелия базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis* коммерческого высокоочищенного ГП, не вызвали сколько-нибудь заметных изменений в уровнях их световой эмиссии. По крайней мере, не было зарегистрировано каких-либо изменений в интенсивности свечения пеллет при добавках к образцам 5 мкл водного раствора высокоочищенного ГП с концентрацией 33 мкМ.

Данные, полученные нами в исследованиях *in vivo* со светящимся мицелием двух видов высших грибов (*N. nambi* и *A. borealis*) (рис. 2), согласуются с результатами активации КК свечения живых пластинок шляпки гриба *M. chlorophos* [9,10]. С одной стороны, это позволяет с большой долей уверенности предполагать, что стимулирующий свечения *in vivo* эффект КК является общим для всех видов базидиальных грибов, обладающих биолюминесценцией. В то же время, быстрая (в пределах одной минуты) кинетика развития люминесцентных сигналов при добавках КК к пеллетам мицелия *N. nambi* и *A. borealis* (рис. 2) указывает на то, что она может взаимодействовать с ферментами (или ферментными системами), находящимися на поверхности или в поверхностных структурах клеточной стенки грибов, например, с оксидазными ферментами лигнинолитического комплекса. В свою очередь, это позволяет нам высказать требующую дальнейшего изучения гипотезу, что эффект активации свечения высших грибов *in vivo* может быть опосредован окислением КК оксидазами лигнинолитического комплекса (в частности, пероксидазами) с излучением квантов видимого света.

В экспериментах *in vitro* было показано, что в препаратах люминесцентных систем, выделенных из биомассы мицелия базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis*, наблюдается увеличение уровня световой эмиссии

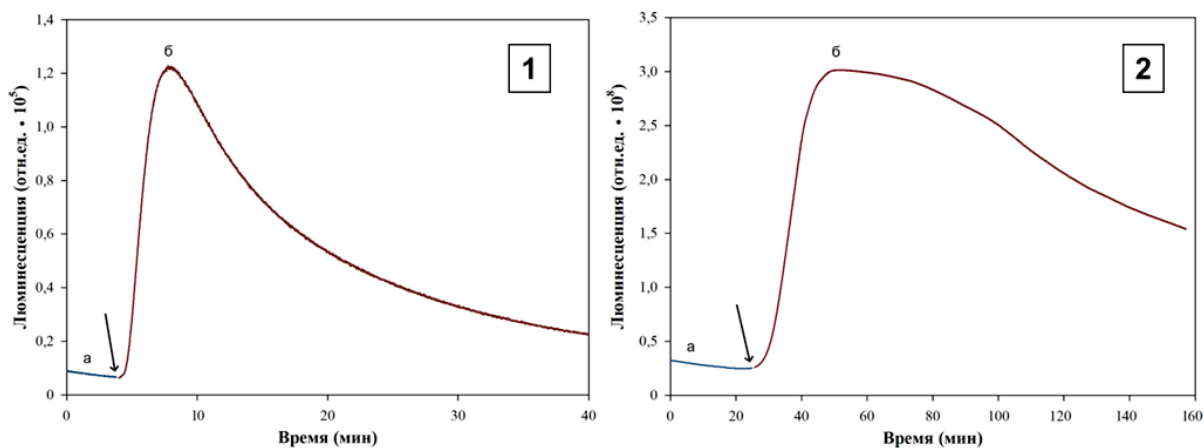


Рисунок 2. Стимуляция свечения пеллет мицелия базидиомицетов *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2) кофейной кислотой: а – исходный уровень свечения пеллет, б – интенсивность и динамика световой эмиссии пеллет после добавления кофейной кислоты. Стрелками показаны моменты добавки в тестируемые пробы 5 мкл водного раствора кофейной кислоты (количество вносимого вещества 5 мкг)

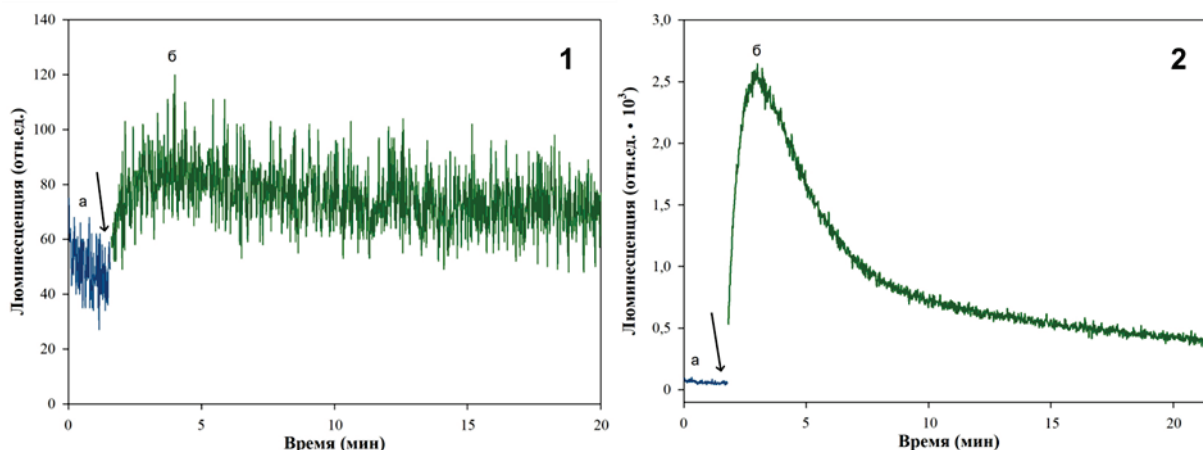


Рисунок 3. Стимуляция свечения люминесцентных систем из мицелия высших грибов *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2) добавкой НАДФН: а – исходный уровень свечения, б – интенсивность и динамика светового сигнала после добавления восстановленного пиридинового нуклеотида. Стрелками показаны моменты внесения 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН в тестируемые пробы

после добавки НАДФН (рис. 3). Регистрируемые после добавления восстановленного пиридинового нуклеотида световые сигналы указывают на наличие в препаратах люминесцентных систем эндогенного ГП, который утилизируется в реакции излучения. При этом из амплитуды и кинетики световых сигналов видно, что в препарате люминесцентной системы из мицелия *A. borealis* эндогенного ГП содержится существенно больше, по сравнению с препаратом системы из мицелия *N. nambi* (рис. 3). В то же время, наличие световых сигналов свидетельствует также о функциональной активности ферментов обеих систем, которые обеспечивают реакцию светоизлучения. Это подтверждается результатами оценки интенсивности световой эмиссии при последовательной добавке к системам НАДФН и содержащего ГП экстракта из *P. squarrosa* (рис. 4). Как видно из представленных данных, добавление экстракта к системам вызывает развитие люминесцентных сигналов, амплитуда которых превышает уровни свечения на фоне добавленного НАДФН на 2 порядка и более.

В то же время, в исследованиях *in vitro* было установлено, что КК подавляет светоизлучение люминесцентных систем из мицелия базидиомицетов *N. nambi* и *A. borealis*, активированных НАДФН и содержащим ГП экстрактом из мицелия гриба *P. squarrosa* (рис. 5). В экспериментах было показано, что ингибирующий свечение эффект КК нарастает от ее количества, вносимого в пробу в диапазоне 0,1 – 5 мкг. Мы полагаем, что экспериментально наблюдаемое ингибирование активности люминесцентных систем КК может объясняться с точки зрения классической биохимии, поскольку согласуется с понятием об ингибировании фермента продуктом реакции по принципу обратной отрицательной связи. В нашем случае, такой механизм действия КК представляется вполне правомочным, поскольку она является конечным продуктом трансформации ГП в светоизлучении высших грибов [4,6].

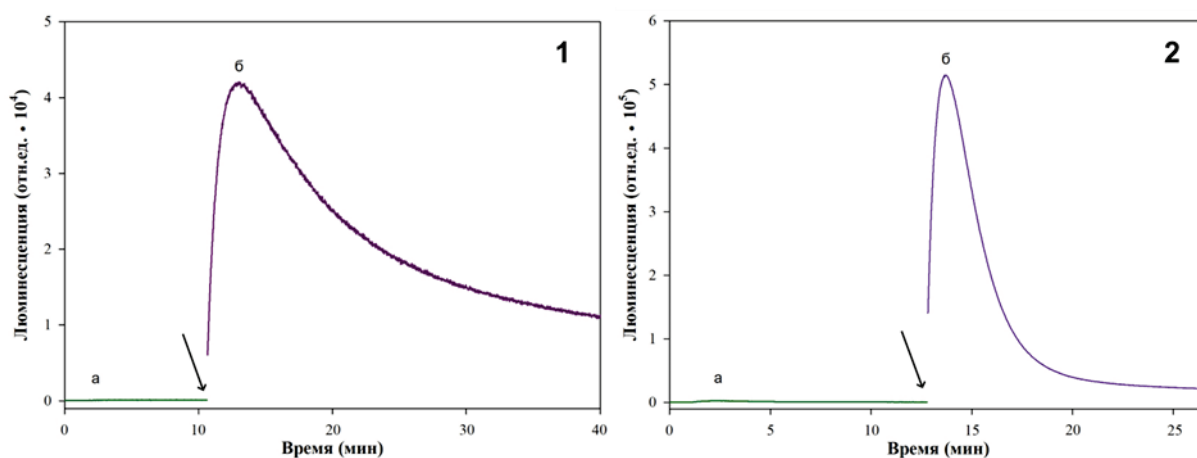


Рисунок 4. Стимуляция свечения люминесцентных систем из мицелия высших грибов *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2) последовательными добавками НАДФН и «горячего» экстракта из мицелия несветящегося гриба *P. squarrosa*: а – уровень свечения систем после добавки 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН, б – амплитуда и динамика светового сигнала после добавления экстракта. Стрелками показаны моменты внесения 5 мкл экстракта в тестируемые пробы

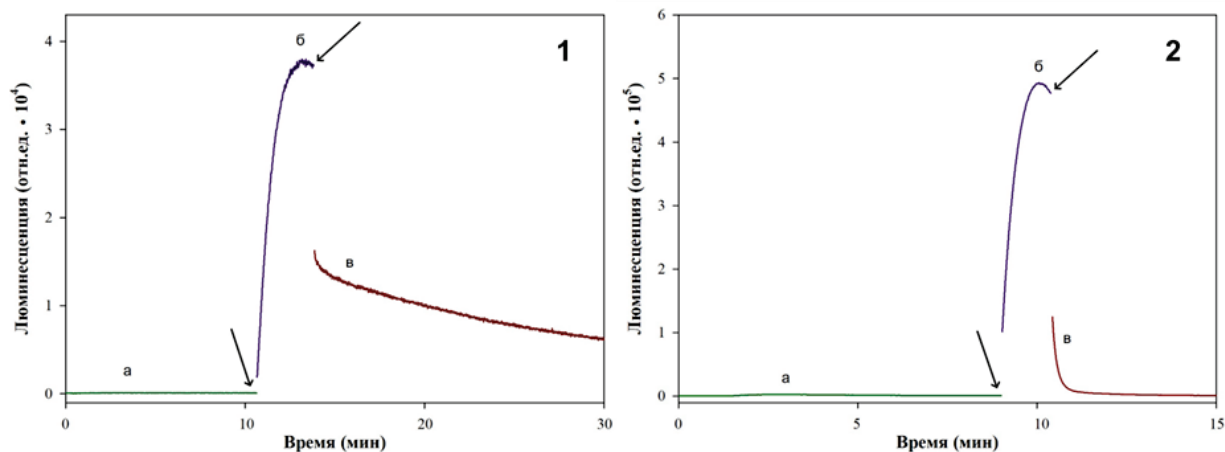


Рисунок 5. Эффект ингибирования кофейной кислотой свечения люминесцентных систем из мицелия базидиомицетов *N. nambi* (1) и *A. borealis* (2), активированного НАДФН и экстрактом из мицелия гриба *P. squarrosa*: а – уровень свечения систем после добавки 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН, б – интенсивность световой эмиссии систем после добавки 5 мкл экстракта, в – динамика светового сигнала после добавления 5 мкл водного раствора кофейной кислоты (количество вносимого вещества 5 мкг). Стрелками показаны моменты внесения в тестируемые пробы экстракта и кофейной кислоты, соответственно

В целом, результаты проведенных исследований развивают и дополняют представления о механизмах светоизлучения высших грибов. Они свидетельствуют в пользу того, что генерация квантов видимого света в базидиомицетах может осуществляться разными биохимическими путями с участием разных ферментов (или ферментных систем) и разных субстратов. Это дает основания рассматривать регистрируемое (и визуально наблюдаемое) светоизлучение высших грибов, как интегральный показатель функционирования нескольких ферментных систем, в частности, системы НАД(Ф)Н-зависимая гидроксилаза – люцифераза [5], системы цитохрома P450 [8] и, по-видимому, оксидазных ферментов лигнинолитического комплекса. Исходя из этого, установление механизма стимуляции свечения базидиомицетов *in vivo* кофейной кислотой является одной из приоритетных задач дальнейших исследований.

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

Список литературы / References:

1. Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006, 470 p.
2. Desjardin D.E., Oliveira A.G., Stevani C.V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2008, vol. 7, no. 2, doi: 10.1039/b713328f.
3. 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.
4. Ke H.-M., Tsai I.J. Understanding and using fungal bioluminescence – recent progress and future perspectives. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2022, vol. 33, art. 100570, doi: 10.1016/j.cogsc.2021.100570.
5. Purtov K.V., Petushkov V.N. et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, vol. 54, no. 28, doi: 10.1002/anie.201501779.
6. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S. et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, no. 50, doi: 10.1073/pnas.1803615115.
7. Mitiouchkina T., Mishin A.S. et al. Plants with genetically encoded autoluminescence. *Nature Biotechnology*, 2020, vol. 38, no. 8, doi: 10.1038/s41587-020-0500-9.
8. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Puzyr A.P., Gitelson J.I., Bondar V.S. Cytochrome P450 system may be involved in the light emission of higher fungi. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 2, doi: 10.29039/rusjbp.2022.0522.
9. Teranishi K. Second bioluminescence-activating component in the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, 2017, vol. 32, no. 2, doi: 10.1002/bio.3165.
10. Teranishi K. A combination of NADHP and hispidin is not essential for bioluminescence in luminous fungal living gills of *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, 2017, vol. 32, no. 5, doi: 10.1002/bio.3265.
11. Teranishi K. Trans-3-hydroxyhispidin is not an actual bioluminescence substrate in pileus gills of the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, vol. 504, no. 1, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.153.
12. 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.

13. Mogilnaya O., Ronzhin N., Posokhina E., Bondar V. Extracellular oxidase from the *Neonothopanus nambi* fungus as a promising enzyme for analytical applications. *The Protein Journal*, 2021, vol. 40, no. 5, doi: 10.1007/s10930-021-10010-z.
14. 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, no. 1, doi: 10.1134/S1607672914020045.
15. 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 and Applied Mycology*, 2017, vol. 7, doi: 10.5943/cream/7/3/9.
16. 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.
17. 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.
18. Puzyr A.P., Medvedeva S.E., Burov A.E., Zernov Yu.P., Bondar V.S. Detection of hispidin by a luminescent system from basidiomycete *Armillaria borealis*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2018, vol. 480, no. 1, doi: 10.1134/S1607672918030146.

CAFFEIC ACID STIMULATES *IN VIVO* LUMINESCENCE OF THE MYCELIA OF THE HIGHER FUNGI
NEONOTHOPANUS NAMBI AND *ARMILLARIA BOREALIS*

Ronzhin N.O.¹, Posokhina E.D.¹, Le V.M.², Mogilnaya O.A.¹, Zakharova Ju.V.³, Sukhikh A.S.², Bondar V.S.¹

¹Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

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

²Kemerovo State University

Krasnaya str., 6, Kemerovo, 650000, Russia

³Kemerovo State Medical University

Voroshilova str., 22a, Kemerovo, 650056, Russia

Received 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0592

Abstract. *In vivo* experiments have shown that the addition of caffeic acid to the luminous mycelia of the higher fungi *Neonothopanus nambi* and *Armillaria borealis* stimulates a rapid and significant (by an order of magnitude or more) increase in the intensity of their light emission. It has been suggested that the observed effect of fungal luminescence activation may be mediated by the oxidation of caffeic acid by enzymes of the ligninolytic complex of basidiomycetes (in particular, by peroxidases) with the emission of visible light quanta. Comparative *in vivo* experiments showed that the addition of hispidin (the precursor of luciferin in the light emission reaction of higher fungi) did not affect the intensity of bioluminescence of the mycelia. At the same time, *in vitro* studies found that caffeic acid significantly suppressed the NADPH-hispidin-activated emission reaction of luminescent systems isolated from the mycelia of *N. nambi* and *A. borealis*. The inhibitory effect of caffeic acid is considered and discussed in the work from the standpoint of the classical biochemistry concept on enzyme inhibition by the reaction product according to the negative feedback principle. In general, the results obtained develop and supplement the understanding of the mechanisms of light emission in higher fungi and testify in favor of the fact that the generation of visible light quanta in basidiomycetes can be carried out by different biochemical pathways involving different enzymes (or enzyme systems). Clarifying the mechanism of stimulation of *in vivo* bioluminescence of higher fungi by caffeic acid is a priority for further research.

Key words: *luminous higher fungi, basidiomycetes, luminous mycelium, fungal luminescent systems, caffeic acid, hispidin, reduced pyridine nucleotides.*

**ОБ ИНФОРМАТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ И РЕЗУЛЬТАТАХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГРВ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ
БЕЛОК-ИНДУЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ВОДНЫХ
РАСТВОРАХ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИТЕЛА
К ИНТЕРФЕРОНУ- γ**

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

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации
ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина
ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ

³ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru
Поступила в редакцию 10.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0593

Аннотация. Методом газоразрядной визуализации изучен характер изменений позиционного порядка в расположении белок-индуцированных водных ассоциатов в водных растворах таблетированных лекарственных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . В качестве объектов исследования использовали водные растворы таблетированных форм, которые были получены нанесением растворов антител (концентрацией 10^{-24} мг/мл) на носитель (89 % сырьевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Рассмотрены информативные возможности метода газоразрядной визуализации при анализе данных об энтропии, фрактальности и длине изолиний свечений, обусловленных киловольтными электронами, вышедшими из водных растворов таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . Показано, что активация растворов антителами к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов. В целом полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения.

Ключевые слова: газоразрядная визуализация, антитела к интерферону- γ , сверхнизкая концентрация, водные ассоциаты.

ВВЕДЕНИЕ

Дисперсные системы, возникающие при разведении в водном растворе белковых наночастиц (в частности, антител к интерферону- γ), являются интересными объектами для наблюдения белок-индуцированных кластеров, а также трансформации их позиционного порядка под влиянием внешних воздействий при изменении концентрации раствора [1]. Существующие методы исследования позиционного порядка в таких средах зачастую малоэффективны, так как базируются на фиксации изменений их структурно-чувствительных свойств. Так как терапевтическая эффективность многих лекарственных средств лимитируется интенсивностью процессов переноса зарядов ионами и электронами, которые определяются особенностями ближнего порядка молекулярных комплексов, для их изучения может быть использован метод каналирования медленных ионов или электронов [2]. Метод позволяет изучать особенности каналов облегченного движения заряженных частиц и, как следствие, определить параметры состояния молекулярных комплексов, формирующих стенки таких каналов. Этот подход реализован в методе газоразрядной визуализации (ГРВ) [3]; см. также [4-6] и литературу там же. В этом методе киловольтные электроны (с энергией порядка единиц килоэлектронвольт) проходят через каплю изучаемого раствора (объемом порядка единиц кубического миллиметра), после чего выходят в воздушную среду и её ионизируют. Возникающее при этом рекомбинационное излучение воздушной среды регистрируется и свечение воздуха даёт картины стереографических проекций, анализируя которые, можно оценить характер движения электронов через объёмную часть капли раствора и её поверхность, а, значит, и получить возможность оценки геометрических параметров молекулярных комплексов, формирующих каналы облегченного движения, зарядового состояния водных ассоциатов, их ближнего порядка – см. [4-6] и литературу там же. Ранее методы ГРВ с использованием информации, основанной на анализе угловых распределений свечения, использовались для исследований следующих биомедицинских объектов: структурных особенностей компонентов крови [7], для оценки эффективности препаратов при лечении сердечно-сосудистой патологии [8], для оценки характера упорядочения белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ [9]. В настоящей работе такие исследования продолжены, однако основное внимание уделено возможностям использования информативных возможностей метода ГРВ при анализе данных об энтропии, фрактальности и длине изолиний свечений, обусловленных киловольтными электронами, вышедшими из водных растворов таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ .

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе методом ГРВ изучен характер изменений позиционного порядка в расположении белок-индуцированных водных ассоциатов в водных растворах таблетированных лекарственных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . В качестве объектов исследования использовали водные растворы таблетированных форм, которые были получены нанесением растворов антител (концентрацией 10^{-24} мг/мл) на носитель (89 % сырьевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Образцы предоставлены компанией ООО НПФ «Материя Медика Холдинг», Россия.

Исследования выполнены на приборе «ГРВ-камера» медицинского назначения [3,10]. ГРВ-изображения фиксировались чувствительной фото-видео камерой в диапазоне световых частот с расширением чувствительности в фиолетовой и ультрафиолетовой областях с использованием кварцевого стекла. Анализ параметров картин ГРВ-изображений растворов выполнялся с использованием программы GDV Scientific Laboratory. ГРВ-граммы в программе GDV Scientific Laboratory фиксировались в различных режимах псевдоокрашивания, что позволяло точнее изучить особенности развития газового разряда. При записи ГРВ-граммы сохранялись в исходной палитре из 256 оттенков серого. В энергетической палитре точки изображения окрашивались в один из девяти цветов (9 уровней интенсивности в логарифмической шкале). Самые яркие точки свечения (центральная часть ГРВ-грамм) окрашивались в оттенки голубого (уровни: 256-128, 128-64, 64-32, 32-16 бит), менее яркие точки окрашивались в оттенки фиолетового (16-8, 8-4) красного (4-2), и оранжевого (2-1, 1-0) цветов. Все точки изображения, удаленные алгоритмом фильтрации шума, отображались белым цветом. ГРВ-граммы позволяли определить следующие параметры, характеризующие особенности состояния каналов облегченного движения электронов и, как следствие, параметры молекулярных ассоциатов, образующих стенки каналов: энтропию (по Шенону) S , отображающую специфику пространственного расположения и конфигурацию ближнего порядка молекулярных ассоциатов; фрактальность по изолинии F , определяемую уровнем пространственного самоподобия, лимитируемого спецификой процессов самоорганизации в растворе; длину изолинии L , пропорциональную свободной энергии Гиббса. Изолинии рассчитывались для средней интенсивности свечения (находится в фиолетовой области энергетической палитры). Энтропия и фрактальность рассчитывались по изолинии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усреднённая ГРВ-грамма для растворов (рис. 1, левая часть) и стереографическая проекция углового распределения электронов (рис. 1, правая часть), проходящих через каплю раствора таблетированного образца антител к интерферону- γ и вспомогательных веществ представлены на рисунке 1.

Концентрационные зависимости отклонений параметров ГРВ-грамм для растворов, содержащих белковые антитела, от аналогичных параметров для очищенной воды приведены на рисунке 2 (рис. 2, а-в).

Видно, что с ростом концентрации вещества таблетированных образцов наблюдается изменение энтропии (рис. 2а). При этом относительные изменения энтропий dS для образцов с антителами больше изменения dS для растворов, их не содержащих, а сами зависимости для обеих кривых довольно близки к линейным. Это указывает на специфическое влияние антител на пространственное расположение водных ассоциатов в растворах, что находится в согласии с концентрационным изменением параметра фрактальности по изолинии dF (рис. 2б). Повышение концентрации антител в растворе (кривая 1) обеспечивает интенсификацию кооперативных

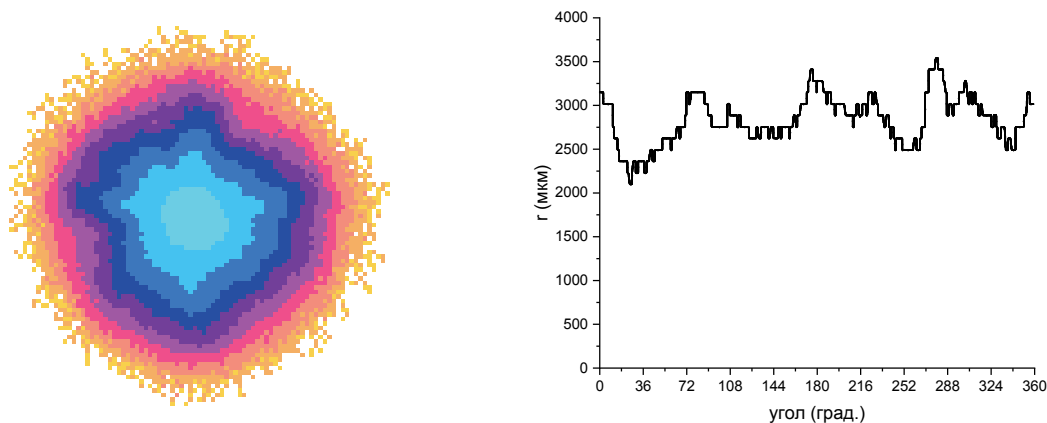


Рисунок 1. Усреднённая ГРВ-грамма для растворов (левый рисунок) и стереографическая проекция углового распределения электронов (правый рисунок), проходящих через каплю раствора таблетированного образца антител к интерферону- γ и вспомогательных веществ

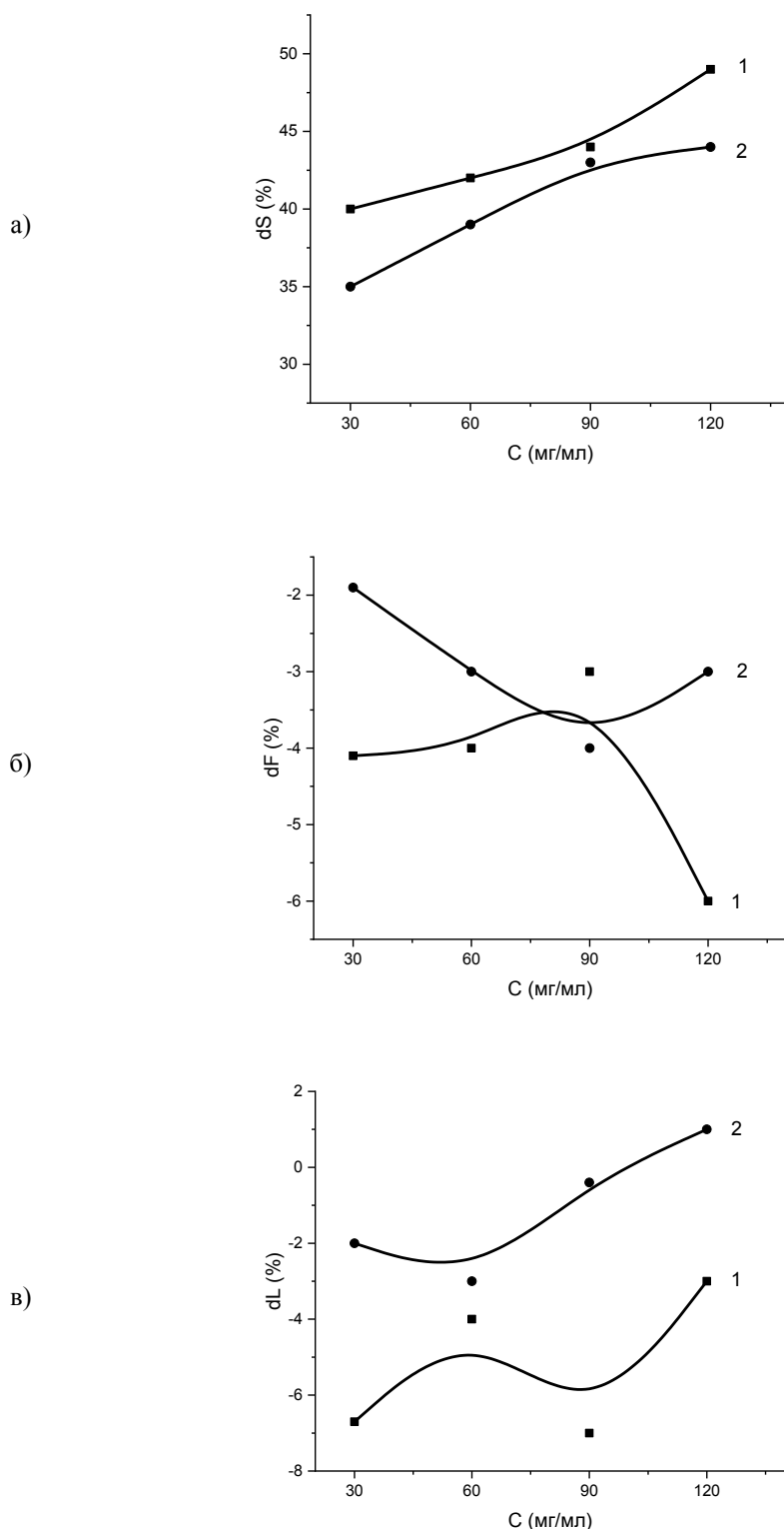


Рисунок 2. Экспериментальные значения и соответствующие им кривые зависимостей относительных значений отклонений параметров картин ГРВ растворов таблетированных образцов с различной концентрацией вещества от аналогичных параметров для очищенной воды: а – энтропия dS , б – фрактальность dF , в – длина изолинии dL . Кривые 1 – содержащие антитела; кривые 2 – не содержащие антитела

межмолекулярных взаимодействий между водными ассоциатами. Это может быть связано со специфической структурной организацией раствора на микроуровне, лимитирующей процессы самоорганизации [11]. Следовательно, несмотря на низкую концентрацию антител в растворах (около 10^{-24} мг/мл), недостаточную для существенных изменений в его материально-энергетическом балансе, наличие молекулярных комплексов растворителя обеспечили формирование специфических водных ассоциатов, изменяющих свободную энергию Гиббса dL (рис. 2в). С учетом изменений энтропии активация растворов антителами к интерферону- γ связана с

интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов [12]. Полученные результаты подтверждают данные о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация растворов антителами к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов. В целом полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Правительства Калужской области № 23-21-10069, <https://rscf.ru/project/23-21-10069/>, <https://rscf.ru/en/project/23-21-10069/>.

Список литературы/References:

1. Epstein O. The Spatial Homeostasis Hypothesis. *Symmetry*, 2018, vol. 10, iss. 4, art. no. 103, doi: 10.3390/sym10040103.
2. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71 [Vysotsky V.I., Karlash A.Yu. Features of selective transport and channeling of ions in the aquatic environment in the channels of biological membranes. *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2010, no. 12, pp. 64-71 (In Russ.)].
3. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Изв. вузов, Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46 [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Application of the gas discharge imaging method for the analysis of various liquids. *Izv. vuzov, Priborostroyeniye*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 40-46 (In Russ.)].
4. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Смирнова А.И., Степович М.А., Габдулсадыкова Г.Ф. Влияние импульсных электромагнитных полей на позиционный и ориентационный порядок в водных растворах цетилтриметиламмония бромистого. *Жидкие кристаллы и их практическое использование*, 2018, т. 18, № 1, с. 47-54, doi: 10.18083/LCAppl.2018.1.47 [Shipko M.N., Usol'tseva N.V., Sibirev A.L., Maslennikova O.M., Smirnova A.I., Stepovich M.A., Gabdulsadykova G.F. Influence of pulsed electromagnetic fields on positional and orientational ordering in aqueous solutions of cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ). *Liquid Crystals and their Application. Russian Journal*, 2018, no. 18, no. 1, pp. 47-54 (In Russ.)].
5. Шипко М.Н., Степович М. А., Сибирев А.Л., Мельникова О.С., Смирнова А.И., Усольцева Н.В. Ориентационные эффекты при каналировании киловольтных электронов в жидких средах. *Известия РАН. Серия физическая*, 2020, т. 84, № 7, с. 994-997, doi: 10.31857/S0367676520070273 [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Melnikova O.S., Smirnova A.I., Usoltzeva N.B. Orientational Effects of Kilovolt Electron Channeling in Liquid Media. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2020, vol. 84, no. 7, pp. 820-823 (In Russ.)].
6. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Криштоп В.В., Шипко М.Н., Степович М.А., Ленчер О.С. Исследование эффективности транспорта ионов K^+ по каналам ионных обменников в присутствии лекарственных средств – активаторов калиевых каналов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 269-274 [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Krishtop V.V., Shipko M.N., Stepovich M.A., Lencher O.S. Study of the efficiency of K^+ ion transport through ion exchanger channels in the presence of drugs-potassium channel activators. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 269-274 (In Russ.)].
7. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Chrishtop V.V. The Use of Gas Discharge Visualization for Identifying Structured Peculiarities of Blood Components: Plasma, Platelets, and Erythrocytes. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Therapy*, March 2018, vol. 9, iss. 4, art. no. 555770.
8. Масленникова О.М., Шипко М.Н., Сибирев А.А., Степович М.А., Никонорова В.Г. О диагностическом потенциале метода газоразрядной визуализации в оценке эффективности препаратов для лечения сердечно-сосудистой патологии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*, 2021, № 4, с. 91-96 [Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Stepovich M.A., Nikonorova V.G. On a diagnostic potential of gas-discharge imaging technique in evaluating the effectiveness of pharmpreparations in cardiovascular diseases. *Kremlin medicine journal*, 2021, no. 4, pp. 91-96 (In Russ.)].
9. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Шипко М.Н., Степович М.А. Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ . *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 3, с. 467-475, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0546 [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Shipko M.N., Stepovich M.A. Features of protein-induced associates at superhigh dilution of antibodies to interferon- γ . *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 467-475 (In Russ.)].
10. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Principles of analysis of GDV bioelectrography*. St. Petersburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)].

11. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза «пространственного» гомеостаза. *Успехи физиологических наук*, 2013, т. 44, № 3, с. 54-76. [Epstein O.I. The phenomenon of release activity and the hypothesis of “spatial” homeostasis. *Uspexhi fiziologicheskikh nauk*, 2013, vol. 44, no. 3, pp. 54-76 (In Russ.)].

12. Don E., Van der Meide N., Egorov V., Putilovskiy M., Tarasov S. The level of natural anionantibodies to IFN-gamma in varicella infection treated with antiviral drug Anaferon for children: A pilot Study. *Immunology Letters*, 2020, vol. 222, pp. 90-94, doi: 10.1016/j.imlet.2019.10.015.

ABOUT INFORMATIONAL OPPORTUNITIES AND RESULTS OF EXPERIMENTAL STUDIES OF GDV VISUALIZATION PROTEIN-INDUCED MOLECULAR COMPLEXES IN AQUEOUS SOLUTIONS OF TABLETS, CONTAINING ANTIBODIES TO INTERFERON- γ

Maslennikova O.M.¹, Sibirev A.L.², Shipko M.N.², Stepovich M.A.³

¹ Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs
st. Marshal Timoshenko, 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia

² Lenin Ivanovo State Power Engineering University
Rabfakovskaya st. 34, Ivanovo, 153025, Russia

³ Tsiolkovsky Kaluga State University

Stepan Razin st. 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

Received 10.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0593

Abstract. The character of changes in the positional order in the arrangement of protein-induced water associates in aqueous solutions of tableted drugs containing antibodies to interferon- γ was studied by the method of gas-discharge visualization. As objects of study, we used aqueous solutions of tablet forms, which were obtained by applying antibody solutions (with a concentration of 10–24 mg/ml) onto a carrier (89% raw lactose, 10% microcrystalline cellulose, 1% magnesium stearate). The informative possibilities of the gas-discharge visualization method in the analysis of data on the entropy, fractality, and length of emission isolines caused by kilovolt electrons released from aqueous solutions of tablet preparations containing antibodies to interferon- γ are considered. It has been shown that the activation of solutions by antibodies to interferon- γ is associated with the intensification of associative processes accompanied by the ordering of protein-induced molecular complexes. In general, the obtained results indicate the preservation of water associates formed in the process of ultrahigh dilution in solutions of tableted samples with antibodies to interferon.

Key words: *gas discharge imaging, antibodies to interferon- γ , ultra-low concentration, water associates.*

ВЛИЯНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Ибрагимова Ж.М., Мухтаров М.М., Шукюрова П.А., Байрамова С.Д.

Институт физиологии им. А.И. Караева Национальной академии наук Азербайджана
ул. Аббаса Мирзы Шарифзаде, 78, г. Баку, Азербайджан; e-mail: jaluzi2009@gmail.com

Поступила в редакцию 09.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0594

Аннотация: В представляемой работе рассматривается влияние оксидативного стресса, индуцированного электромагнитным излучением в раннем периоде постэмбрионального развития, а также было рассмотрено влияние изучаемого нами электромагнитного облучения на динамику внутриклеточных окислительных-антиокислительных отношений в более позднем развитии организма (в нашем случае по истечении двух месяцев). В исследованиях биологического действия неионизирующих излучений чаще рассматриваются, и это, по-видимому, обоснованно для живых систем, процессы, следующие после начальной стадии поглощения электромагнитного излучения. В связи с прогрессирующим внедрением этого излучения во многие сферы жизнедеятельности в лаборатории «Физиология радиации» были проведены ряд экспериментов, где целью работы было исследование влияния окислительного стресса, индуцированного электромагнитным излучением с частотой 460 МГц, на динамику интенсивности перекисного окисления липидов в хрусталике глаза в период полового созревания у новорожденных белых крыс. Таким образом, настоящее исследование показало, что в хрусталике глаз испытуемых, подвергаемых облучению ЭМИ происходят изменения в протекании процессов ПОЛ. Однако, необходимы дополнительные исследования для доказательства обнаруженных тенденций и выдвигаемых объяснений.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, электромагнитное облучение, крысы, хрусталик глаза.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий бурное развитие научно-технического развития привело к чрезмерному увеличению плотности электромагнитных (ЭМИ) полей в окружающей среде, которые имеют очень широкий частотный и амплитудный диапазоны. На сегодняшний день важнейшими источниками неионизирующего ЭМИ-излучения, непосредственно проникающего в жизнь человека, являются устройства мобильной связи: люди постоянно подвергаются воздействию ЭМИ -излучения, генераторами которого являются стационарные базовые станции мобильной связи в их домах, а миллионы людей, пользующихся мобильными телефонами, добровольно подвергаются воздействию излучения, испускаемого устройством. До сих пор ни одна специализированная научная организация не может сказать, что электромагнитное излучение этого вида связи в первую очередь безопасно для его пользователей. Многочисленные исследования, проводимые в мире, своими результатами оставляют больше вопросов, чем дают на них ответы. ВОЗ указывает в своих документах, что результаты воздействия ЭМИ мобильной связи на отдельных людей или же на человеческую популяцию пока не ясны, поэтому необходимо активно продолжать исследования в этом направлении и соблюдать принцип раннего оповещения в целях обеспечения безопасности [1]. Изучение механизмов действия высокочастотного ЭМИ, применяемого при лечении различных заболеваний в физиотерапии также остаётся актуальным вопросом [2]. Влияние ЭМИ (диапазонов УФЧ, СВЧ, КВЧ) с длинами волн от метров до долей миллиметра на биологические объекты изучаются свыше 50-ти лет, в основном изучая их тепловое воздействие. Однако наблюдение в последние годы лечебно-регуляторных эффектов очень низкоинтенсивного и высокочастотного ЭМИ излучения, не связанных с тепловым воздействием, дает основу для изучения механизмов действия неионизирующего фактора на уровне молекулярных, клеточных и сложных организмов [3]. В одном из положений международной научной программы Всемирной организации здравоохранения о биологическом воздействии электромагнитного излучения, на 1996-2005 годы говорится: «Такие случаи, как рак, нарушения кровообращения, потеря памяти, болезни Паркинсона и Альцгеймера, СПИД, рост суицидов связывают с воздействием электромагнитных полей» [4]. При исследованиях воздействия неионизирующего электромагнитного излучения на организм, который облучается массовыми средствами мобильной связи, выявляются признаки его окислительного стрессового фактора в ограниченные промежутки времени. Об этом свидетельствуют результаты экспериментальных исследований, проводимых в этом направлении более 10 лет в лаборатории «Физиология радиации» [5]. Конечно, приводит ли ЭМИ радио- и СВЧ-диапазона, а также излучения мобильных телефонов к заболеваниям и

патологиям, сопровождающиеся окислительным стрессом в различных тканях и органах, пока говорить рано. Тем не менее нельзя исключать, что индукция окислительного стресса, вызванная облучением в разные периоды развития организма (пренатальный период, препубертатный или пубертатный период), а также при разных функциональных состояниях (стрессы, физическая нагрузка и др.) вполне может приводить к физиологическим и биохимическим сдвигам, вредными для здоровья.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование влияния окислительного стресса, индуцированного электромагнитным излучением с частотой 460 МГц, на динамику интенсивности перекисного окисления липидов в хрусталике глаза в период полового созревания у новорожденных белых крыс. Двухмесячные крысы подвергались воздействию ЭМИ с частотой 460 МГц (относительно малой интенсивности (10 мВт/см²) в течение 20 мин. Эксперименты проводились в течение 60-ти дней. Животные были разделены на 4 группы. Первая группа оставалась полностью интактной и необлучаемой (условно называемой контрольно-интактной группой), вторая группа условно называлась контрольной, (где облучение проходило в день резки), третью группу составили крысы, облученные только в день рождения, и, наконец, четвертую группу облучали после дня рождения и через 60 дней после рождения. Изучена динамика концентрации малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов, в хрусталике этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крыс облучали в металлической камере с помощью физиотерапевтического аппарата «Волна-2», где выходная мощность аппарата была 60 Вт, а плотность потока энергии 10 мВт/см², в течение 20 минут. 8 крыс были выделены в качестве контрольно-интактной группы и подвергались «ложному» облучению (их помещали в камеру с выключенным аппаратом) на 1-й и 60-й дни эксперимента. В другие группы было включено по 8 животных. 2-я группа облучалась однократно в день забоя (контрольная группа), 3-я группа - однократно в день рождения, 4-я группа - дважды - в день рождения и через 60 дней после рождения. В этом эксперименте животных забивали через 60 дней после рождения. После забоя, извлекали хрусталики и уровень ПОЛ в хрусталиках оценивали на основе измерений концентрации малонового диальдегида. Достоверность результатов рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После проведённых опытов мы получили определённые численные показатели. С учётом этих результатов были построены гистограммы представленные ниже (рис. 1).

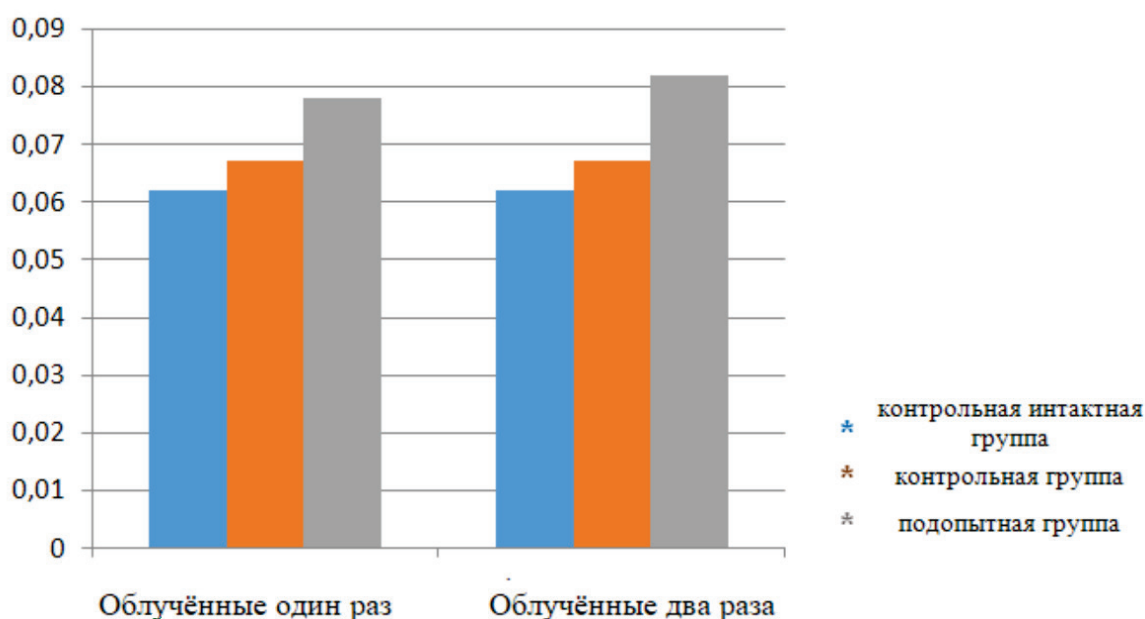


Рисунок 1. Результаты исследования

Концентрация МДА в контрольной интактной группе и у облученных в день забоя животных (контрольная группа) была практически одинаково и близка к базовым значениям. Но в 3-й и 4-й группах (в обоих опытах) показатель концентрации МДА выше, чем в контрольных группах. Концентрация МДА у животных, облученных в день рождения, увеличилась примерно на 26 % по сравнению с контрольно-интактной группой и более чем на 32 % у крыс, облученных как в день рождения, так и в день забоя (разница достоверна, $p < 0,05$). У дважды облученных животных, концентрация МДА составила на 22,4% больше, чем контрольная группа (где облучение проходило в день резки). Разница достоверна при $P < 0,05$. Экспериментальные данные показали, что под действием ЭМИ меняется реакция перекисного окисления липидов (ПОЛ) у новорожденных крыс и вов сём организме наступает новое оксидант-антиоксидантное состояние. То есть механизм, запущенный во внутриутробной стадии жизни, продолжает негативно сказываться в постнатальном периоде. Результаты работы являются серьезным посылом для проведения дальнейших исследований.

Список литературы / References:

1. Григорьев Ю.Г. Отдаленные последствия биологического действия электромагнитных полей. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2000, т. 40, № 2, с. 217-225 [Grigoriev Yu.G. Long-term consequences of the biological action of electromagnetic fields. *Radiats. biology. Radioecology*, 2000, vol. 40, no. 2, pp. 217-225 (In Russ.)].
2. Зубкова С.М. Биофизические и физиологические механизмы лечебного действия электромагнитных излучений. *Физиотерапия, бальнеология и реабилитация*, 2002, № 2, с. 3-9 [Zubkova S.M. Biophysical and physiological mechanisms of the therapeutic effect of electromagnetic radiation. *Physiotherapy, balneology and rehabilitation*, 2002, no. 2, pp. 3-9 (In Russ.)].
3. Девятков Н.Д., Бецкий О.В., Гельвич Е.А. и др. Воздействие электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона волн на биологические системы. *Радиобиология*, 1981, т. 21, № 2, с. 163-171 [Devyatkov N.D., Betsky O.V., Gelvich E.A. et al. Effects of electromagnetic oscillations of the millimeter wave range on biological systems. *Radiobiology*, 1981, vol. 21, no. 2, pp. 163-171 (In Russ.)].
4. Григорьев Ю.Г. Отдаленные последствия биологического действия электромагнитных полей. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2000, т. 40, № 2, с. 217-225 [Grigoriev Yu.G. Long-term consequences of the biological action of electromagnetic fields. *Radiats. biology. Radioecology*, 2000, vol. 40, no. 2, pp. 217-225 (In Russ.)].
5. Гаджиев А.М., Юсифов Э.Ю., Аббасова М.Т. и др. Изучение оксидативного действия микроволнового излучения на организм. *Современные проблемы сравнительной физиологии и биохимии*, Сборн. статей, Баку, 2005, с. 278-290 [Gadzhiev A.M., Yusifov E.Yu., Abbasova M.T. et al. Study of the oxidative effect of microwave radiation on the body. *Modern problems of comparative physiology and biochemistry*, Collection articles, Baku, 2005, pp. 278-290 (In Russ.)].

INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS INDUCED BY ELECTROMAGNETIC RADIATION IN THE EARLY PERIOD OF POSTEMBRYONIC DEVELOPMENT**Ibragimova Zh.M., Mukhtarov M.M., Shukyurova P.A., Bairamova S.D**

Institute of Physiology. A.I. Karaev of Azerbaijan National Academy of Sciences

Abbas Mirza Sharifzade str. 78, Abbas Mirza Sharifzade, Baku, Azerbaijan; e-mail: jaluzi2009@gmail.com

Received 09.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0594

Abstract. In the present work, the influence of oxidative stress induced by electromagnetic radiation in the early period of postembryonic development is considered, and also the influence of the electromagnetic irradiation studied by us on the dynamics of intracellular oxidant-antioxidant relations in the later development of the organism (in our case after two months) was considered. In studies of the biological action of non-ionizing radiation, the processes following the initial stage of absorption of electromagnetic radiation are more often considered, and this, apparently, is justified for living systems. In connection with the progressive introduction of this radiation into many spheres of life, a number of experiments were carried out in the laboratory "Physiology of Radiation", where the aim of the work was to study the effect of oxidative stress induced by electromagnetic radiation with a frequency of 460 MHz on the dynamics of the intensity of lipid peroxidation in the lens of the eye during puberty in newborn white rats. Thus, the present study showed that in the lens of the eyes of subjects exposed to EMR, changes occur in the course of lipid peroxidation processes. However, more research is needed to substantiate the observed trends and put forward explanations.

Key words: *lipid peroxidation, electromagnetic irradiation, rats, lens of the eye.*

СООТНОШЕНИЕ БИОМАССЫ ЖЕЛТЕЛОГО И КОРМОВОГО ЗООПЛАНКТОНА В МИРОВОМ ОКЕАНЕ

Пионтковский С.А., Минский И.А., Мегер Я.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 20.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0595

Аннотация. Пространственно-временная изменчивость ряда фундаментальных биофизических характеристик океана (интенсивности биолюминесценции, звукорассеивающих слоев и др.) во многом зависит от величины и характера распределения биомассы зоопланктона в нем. В свою очередь, кормовая фракция зоопланктона (представленная в основном ракообразными входящими в рацион мелких пелагических рыб) и его желетелая фракция (представленная гребневиками, медузами и некоторыми другими организмами) играют важную, но разную роль в трансформации вещества и энергии в пелагиали Мирового океана. Кормовой зоопланктон выступает в роли передаточного звена, связывающего продуцентов (фитопланктон) с консументами более высоких трофических уровней. Желетелый зоопланктон направляет поток органического углерода в детритную цепь экосистемы. На основе анализа международных баз данных (JeDI и COPEPOD) и опубликованных исследований (1951-2004 гг.) рассчитано соотношение биомассы желетелого и кормового зоопланктона в 43-х регионах. Показано, что по величине соотношения (в единицах углерода) желетелые доминируют в верхнем 200-метровом слое на большей части акватории северного полушария Мирового океана. Такое соотношение может отрицательно сказываться на воспроизводстве рыбных промысловых запасов, т.к. желетелый зоопланктон изымает часть потока углерода из пищевой цепи и направляет ее в детритную.

Ключевые слова: биомасса зоопланктона, пелагические экосистемы, Мировой океан.

ВВЕДЕНИЕ

Пространственно-временная изменчивость ряда фундаментальных биофизических характеристик океана (интенсивности биолюминесценции, звукорассеивающих слоев и др.) во многом зависит от величины и характера распределения биомассы зоопланктона в нем. В трофической структуре морских экосистем зоопланктон является важным промежуточным звеном, регулирующим эффективность трансформации вещества и энергии от продуцентов (фитопланктона) к консументам высоких порядков [1]. Зоопланктон неоднороден по таксономическому составу, размерам организмов и занимаемым ими экологическим нишам. Наиболее заметно эти и другие различия проявляются при сопоставлении кормового и желетелого зоопланктона (последний представлен гребневиками, медузами и другими организмами с характерной желеобразной консистенцией). Термин «кормовой зоопланктон» (forage zooplankton) используют для характеристики той его фракции, которая входит в рацион мелких пелагических рыб [2,3].

По сравнению с кормовым зоопланктоном, трансформирующим потоки вещества и энергии по пастбищной пищевой цепи, желетелые потребляются в значительно меньшей степени или не потребляются вообще (что различается регионально). Это означает, что проходящие через них потоки направлены в детритную цепь, частью которой они сами становятся, после отмирания. Расчеты на основе моделей и имеющихся данных показывают ~40% вклад желетелых в глобальный поток взвешенного органического вещества в верхнем 100-метровом слое Мирового океана [4].

Накопление материала по оценкам биомассы и таксономического состава зоопланктона в разных регионах и совершенствование международных баз данных содержащих материалы этих исследований делает возможным анализ и сопоставление биомасс кормового и некормового (желетелого) зоопланктона в масштабах Мирового океана, что и являлось целью наших исследований. Она представляется актуальной в связи с тем, что обзоры литературы и новые данные подчеркивают возрастающую роль желетелых организмов в пелагиали Мирового океана в связи с глобальным потеплением и антропогенным воздействием [5-11]. Оценки соотношения биомасс этих двух фракций, рационов организмов их формирующих и скоростей потребления пищи способствуют более глубокому пониманию направленности потоков вещества и энергии в пелагических экосистемах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы рассчитали соотношение биомассы желетелых организмов к биомассе организмов кормового зоопланктона (Бжз/Бкз), используя их среднегодовые величины. Международные базы данных по пространственному распределению желетелого и кормового зоопланктона (JeDI и COPEPOD) и опубликованные статьи (с осреднением данных за 1951-2004 гг.) дают возможность рассчитать это соотношение для различных регионов Мирового океана. В этих базах и публикациях на них основанных, оба параметра представлены в единицах углерода, для верхнего 200-метрового слоя [12-14]. Пример наполненности базы данных COPEPOD

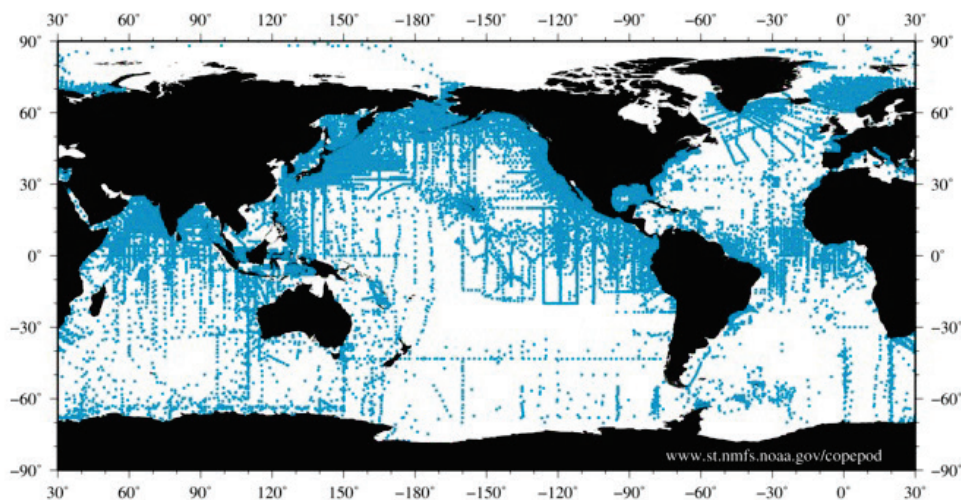


Рисунок 1. Карта станций с измерениями биомассы зоопланктона в базе данных COPEPOD [14]

измерениями биомассы зоопланктона, выполненных в более чем 150 экспедициях разных стран, показан на рисунке 1. Биомасса конвертирована в единицы углерода администратором базы данных [14] по соответствующим уравнениям [15].

В указанных массивах измерений нам не доставало современных материалов по Черному морю, в связи с чем соотношение биомасс Бжз/Бкз для этого региона было рассчитано по более обширным данным [16].

Основу кормового зоопланктона (как рациона мелких пелагических рыб) формируют организмы размерного диапазона 0,2-2,0 мм, среди которых наиболее многочисленными являются мелкие ракообразные- *Copepoda*. Что же касается желетелой фракции, то в базе данных JeDI желетелый зоопланктон представлен тремя основными таксономическими группами: *Cnidaria*, *Stenophora*, и *Thaliacea*, суммарная биомасса которых была использована в расчетах соотношения Бжз/Бкз.

В статистической обработке использованы программные пакеты “Statistica v.9” и “PAST v.3.25”, позволяющие применять методы линейной и нелинейной статистики в оценках пространственно-временного распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выборка рассчитанных нами соотношений Бжз/Бкз равна 43, при средней величине соотношения равной 13. Однако, распределение в выборке отличалось от нормального, поэтому, в качестве осредненной оценки, мы использовали медиану, которая, как известно, при нормальном распределении совпадает со средней. В данном случае, медиана равна 2, т.е. ее величина указывает на 2х-кратное доминирование биомассы желетелых над кормовым зоопланктоном. Величины соотношения Бжз/Бкз варьируют в широком диапазоне: 0,02–150. При этом, малые величины (0,02–10) наиболее часто встречаемы (рис. 2).

Добиться географически равномерного распределения расчетных точек соотношения Бжз/Бкз по акватории океана нам не удалось, в связи с недостатком данных, которые были бы комплементарны по обеим фракциям зоопланктона, по регионам. Распределение биомассы зоопланктона и величин соотношения Бжз/Бкз на картах отражают этот недостаток (рис. 3): данные отсутствуют для значительной части акватории, особенно в южном полушарии и для открытых районов, в целом. Тем не менее, построенная разведочная карта пространственного распределения соотношения биомассы желетелого и кормового зоопланктона выявляет два его характерных свойства: значительное варьирование величины соотношения и доминирование высоких величин в водах северного полушария.

Так, диапазон варьирования Бжз/Бкз составил почти 2 порядка. Наибольшие его величины отмечены в бореальных и полярных широтах северного полушария, в частности, в Баренцевом море, в восточной части Северного Ледовитого океана и в Восточно-Китайском море. Воды последнего примечательны обилием в нем среднеразмерных медуз *Aurelia aurita*, *Cyanea nozakii* и гигантских *Nemopilema nomurai*, с размером около 1 м и весом до 200 кг [17,18].

Как было отмечено, выборка по расчету соотношения Бжз/Бкз, нанесенного на карту, состоит из 43 значений, для которых медиана распределения указывает на 2х-кратное преобладание желетелых. При этом, в крупномасштабном пространственном распределении суммарной биомассы желетелых Мирового океана, 92% приходится на тип *Cnidaria*, к которому относят множество видов сцифоидных медуз [12].

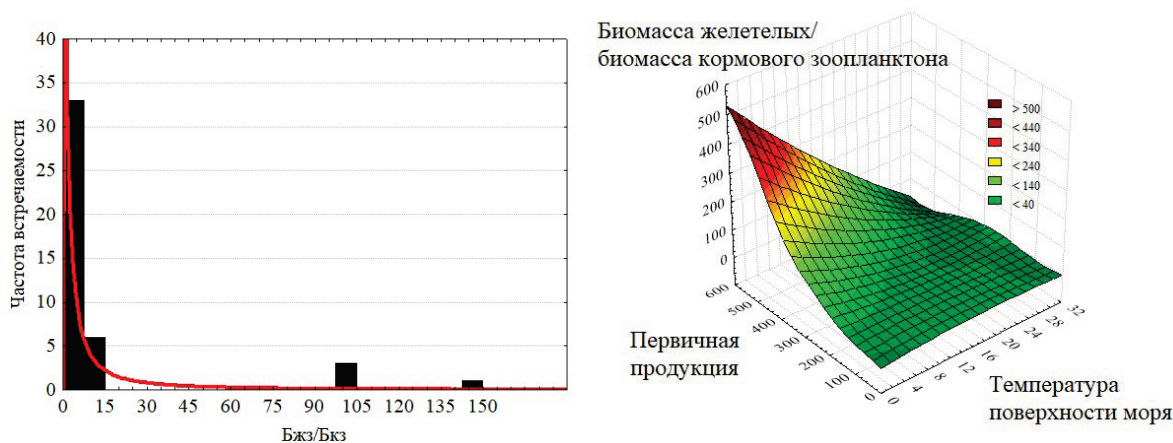


Рисунок 2. Структурно-функциональные соотношения в пелагиали. Слева: гистограмма распределения частот встречаемости величин Бжз/Бкз в выборке (n = 43; min = 0,02; max = 150, медиана = 2; коэффициент асимметрии = 3,10; коэффициент эксцесса = 8,79). Красная кривая характеризует логнормальное распределение частот встречаемости величин Бжз/Бкз. Справа: соотношение Бжз/Бкз, представленное как функция первичной продукции ($г\ C\ м^{-2}\ год^{-1}$) и температуры поверхности океана ($^{\circ}C$). Поверхность диаграммы сглажена кубическим сплайном

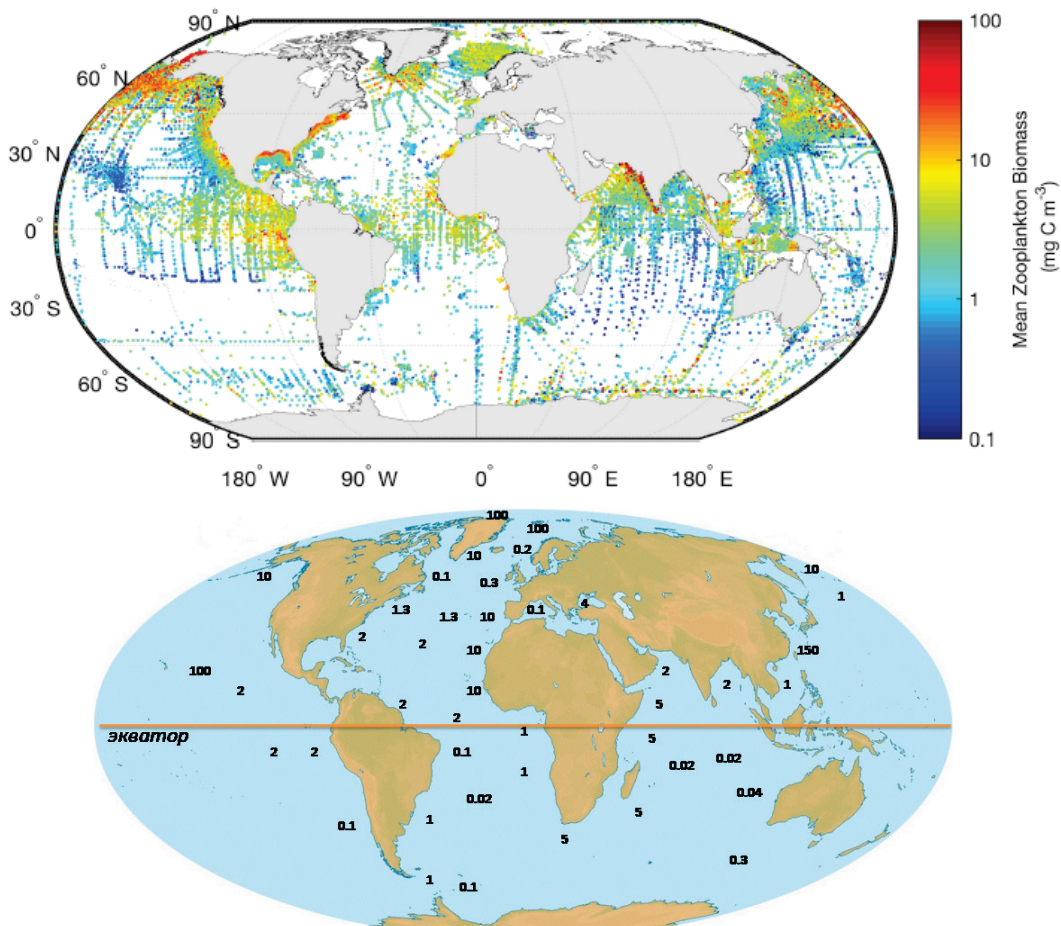


Рисунок 3. Распределение биомассы зоопланктона в слое 0–200 м (верхний рисунок, по [14]) и соотношения биомассы ($mg\ C\ м^{-3}$) желетелого и кормового зоопланктона в том же слое. Фоновая карта на нижнем рисунке (https://www.printablee.com/post_continents-and-oceans-map-printable_154623) дана с изменениями

Первичная продукция и температура являются экологически важными драйверами пространственно-временной изменчивости биомассы желетелого и кормового зоопланктона [12,20,21]. В связи с этим, мы провели анализ взаимосвязи этих четырех переменных (рис. 2). В частности, соотношение Бжз/Бкз было аппроксимировано как функция чистой первичной продукции эвфотического слоя (1996–2014 гг.) и температуры поверхности океана. Два последних параметра были взяты из соответствующих баз данных и публикаций, характеризующих глобальные тренды [30, <https://www.sciencelearn.org.nz/images/780-sea-surface-temperature>]. Очевидно, что трехмерная диаграмма (рис. 2) имеет «перелом» по ее диагонали. Она показывает достаточно

выраженную зависимость соотношения Бжз/Бкз от первичной продукции и температуры в левой части диаграммы и ее отсутствие в правой; т.е. максимальные величины Бжз/Бкз наблюдаются при высокой первичной продукции и низких температурах (что характерно для бореальных и полярных широт), в то время как в области низкой первичной продукции и высоких температур (т.е. в тропических широтах) зависимость соотношения Бжз/Бкз от первичной продукции и температуры поверхности отсутствует. Область трехмерной диаграммы, представленная в желто-красных тонах, является экстраполяцией данных за пределы полученных значений Бжз/Бкз, поскольку этот диапазон, предположительно, существует в неисследованных районах, или же он может появиться, в связи с воздействием факторов, обсуждаемых ниже.

Состояние базы данных по желетелым не позволило нам построить временные серии, характеризующие многолетнюю изменчивость их биомассы по всем тем регионам, для которых рассчитано соотношение Бжз/Бкз. В свою очередь, это не позволило оценить тенденцию его многолетней изменчивости, хотя, увеличение биомассы желетелых в связи с антропогенным воздействием, глобальным потеплением и ростом температуры в океане, в литературе обсуждается [5,10,19]. В целом же, величины соотношения Бжз/Бкз >1 , т.е. преобладание биомассы желетелых, косвенно указывает на прохождение основного потока органического углерода не через пастбищную пищевую цепь, а через детритную. Таким образом, желетелые изымают часть потока углерода из классической пастбищной трофической цепи, что может отрицательно сказываться на воспроизводстве рыбных промысловых запасов Мирового океана.

Существенный вклад биомассы желетелого зоопланктона в суммарный годовой поток взвешенного органического углерода, проходящего через эвфотическую зону, отражен статистически значимым коэффициентом корреляции между этими параметрами ($n = 77$, $r = 0,63$; при уровне значимости 95%). Мы вычислили его по биомассе желетелого зоопланктона [12] и величинам потока на нижней границе эвфотической зоны Мирового океана [31]. В целом, поток взвешенного органического углерода выше в умеренных (особенно северных) широтах, по сравнению с тропическими. На масштабах многолетней изменчивости, экологическая значимость детритной цепи, вероятно, увеличивается. На это указывают конечные продукты пастбищной цепи: многолетняя динамика биомассы зоопланктона и уловов пелагических рыб в Мировом океане демонстрирует отрицательные тренды [20,21], а биомасса желетелых – положительные [5,26].

Региональная оценка соотношения Бжз/Бкз представляется особенно важной при мониторинге состояния Больших морских экосистем океана [22,23]. Например, в прибрежных (крымских) водах Черного моря, биомасса желетелых в несколько раз превосходит таковую кормового зоопланктона (в углеродных единицах). При этом, в единицах сырой биомассы, желетелые превосходят кормовой зоопланктон, приблизительно, в 170 раз, а в прибрежье северо-западной части моря в 200-300 раз [16]. Такие соотношения целесообразно учитывать при планировании размещения объектов марикультуры и рекреационных комплексов вдоль черноморского побережья.

Аналогичный подход применим и к другим географическим районам, особенно к тем, в которых желетелые составляют значительную часть биомассы зоопланктона. В этом плане, экосистемы уже ранжируют по индексу обилия медуз, и в этом ранжировании, из 45 Больших морских экосистем мирового океана, Восточно-Китайское и Черное моря демонстрируют самые высокие индексы [5]. Примечательно, что в упомянутом ранжировании, в десятку первых попал ряд регионов, для которых на нашей карте (рис. 3) тоже приведены высокие величины Бжз/Бкз, хотя методы оценки обилия желетелых были разные.

В целом, выполненный нами анализ углубляет и расширяет дискуссию о глобальном увеличении биомассы желетелых и постепенном превращении Мирового океана в «желетелый океан» [5-7,10,11,25]. Следует отметить и несколько иное видение этой проблемы, акцентированное на возможном существовании долгопериодных (20-летних) глобальных колебаний биомассы желетелых, модулируемых климатическими аномалиями [26]. При этом, авторы констатируют и наличие ее слабого, но статистически значимого многолетнего увеличения.

Что же касается прогноза многолетней изменчивости соотношения Бжз/Бкз, то, если исходить из свойств трехмерной диаграммы, представленной на рисунке 2, то он должен учитывать три упомянутых тренда: 1) уменьшение биомассы кормового зоопланктона в океане, многолетний отрицательный тренд которой отмечен для многих районов северного полушария – как неритических, так и океанических [27-29,31]; 2) уменьшение первичной продукции в пелагиали открытого океана [24]; 3) увеличение температуры в поверхностном слое, в связи с глобальным потеплением (<https://marine.copernicus.eu/access-data/ocean-monitoring-indicators/global-ocean-trend-map-sea-surface-temperature>). Совокупный эффект этих трендов, в многолетнем аспекте, неясен. С одной стороны, согласно диаграмме, представленной на рисунке 2, уменьшение первичной продукции и увеличение температуры могут способствовать уменьшению величины соотношения биомассы желетелых к кормовому зоопланктону; с другой, уменьшение биомассы кормового зоопланктона в океане должно вызвать противоположный эффект. При этом, следует учитывать, что сила воздействия каждого из факторов на величину обсуждаемого соотношения недостаточно ясна. Это предполагает дальнейшие исследования их совокупного воздействия, в разных регионах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расчет соотношения биомассы желетелого и кормового зоопланктона (в единицах углерода) показал, что желетелые доминируют в верхнем 200-м слое, на большей части акватории северного полушария Мирового океана. В нем же, как известно, расположены районы интенсивного мирового рыболовства. Доминирование

биомассы желетелых в пелагиали океана косвенно указывает на прохождение основного потока углерода в пелагической экосистеме не через пастбищную пищевую цепь, а через детритную. Это должно отрицательно сказываться на возобновлении промыслового запаса пелагиали, в связи с тем, что желетелые организмы изымают часть потока углерода из пастбищной трофической цепи.

Список литературы / References:

1. Buitenhuis E., Le Que' re' C., Aumont O., Beaugrand G., Bunker B., Hirst A., Ikeda T. et al. Biogeochemical fluxes through mesozooplankton. *Glob. Biogeochem. Cycles*, 2006, no. 20, p. GB2003, doi: 10.1029/2005GB002511.
2. Finenko G.A., Abolmasova G.I., Romanova Z.A., Datsyk N.A., Anninski B.E. Population dynamics of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its impact on the zooplankton in the coastal regions of the Black Sea of the Crimean coast in 2004-2008. *Oceanol.*, 2013, vol. 53, no. 1, pp. 80-88.
3. Nydenko S.V., Khoruzhiy A.A. The food supply for nekton in the epipelagic layer of Pacific waters at the Kuril Islands in the summer seasons of the 2000s. *Rus. J. Mar. Biol.*, 2014, no. 40, pp. 502-518.
4. Luo J.Y., Condon R.H., Stock C.A. et al. Gelatinous zooplankton-mediated carbon flows in the global oceans: a data-driven modeling study. *Glob. Biogeochem. Cycles*, 2020, vol. 34, no. 9, e2020GB006704.
5. Brotz L., Cheung W.W.L., Kleisner K. et al. Increasing jellyfish populations: trends in Large Marine Ecosystems. *Hydrobiol.*, 2012, no. 690, pp. 3-20.
6. Duarte C.M., Pitt K.A., Lucas C.H. et al. Is global ocean sprawl a cause of jellyfish blooms? *Front. Ecol. Environm.*, 2012, vol. 11, no. 2, pp. 91-97.
7. Duarte A.K., Kinan P.G., Muxagata E. et al. Zooplankton biomass distribution in the Subtropical Southwestern Atlantic Ocean: relationships with environmental factors and chlorophyll *a*. *Pan-American J. Aquat. Sci.*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. 239-261.
8. Heneghan R., Everett J., Blanchard J. et al. Climate driven zooplankton shifts could cause global declines in food quality for fish. *Res. Square*, 2021, doi: 10.2123/rs.3rs-953268/v1.
9. Pauly D., Graham W.M., Libralato S. et al. Jellyfish in ecosystems, online databases, and ecosystem models. *Hydrobiol.*, 2009, vol. 616, pp. 67-85.
10. Purcell J.E., Uye S., Lo W.T. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 2007, vol. 350, pp. 153-174.
11. Richardson A.J., Bakun A., Hays G.C. et al. The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends Ecol. Evolut.*, 2009, no. 24, pp. 312-322.
12. Lucas C.H., Jones D.O.B., Hollyhead C.J. et al. Gelatinous zooplankton biomass in the global oceans: geographic variation and environmental drivers. *Global Ecol. Biogeogr.*, 2014, doi: 10.1111/geb.12169.
13. Moriarty R., O'Brien T.D. Distribution of mesozooplankton biomass in the global ocean. *Earth Syst. Sci. Data*, 2013, no. 5, pp. 45-55.
14. O'Brien T.D. *COPEPOD: A global plankton database*. U.S. Dep. Commerce, NOAA Tech. Memo., 2005, NMFS-F/SPO-73, 136 p.
15. Wiebe P. H. Functional regression equations for zooplankton displacement volume, wet weight, dry weight, and carbon. A correction. *Fish. Bull.*, 1988, no. 86, pp. 833-835.
16. Zagorodnyaya Yu.A., Piontkovski S.A., Gubanov V. Pelagic ecosystem of the Black Sea goes gelatinous. *Mar. Biol. Res.*, 2023 (In Press).
17. Oh S., Kim K-Y, Oh H-J. et al. Spatio-temporal distribution of giant jellyfish *Nenopilema nomurai*. *Water*, 2022, vol. 14, no. 8, p. 2883, doi: 10.3390/w14182883.
18. Yoon E.A., Cha C.P., Hwang D.J. et al. Inter-annual occurrence variation of the large jellyfish *Nemopilema nomurai* due to the changing marine environment in the East China Sea. *Bull. Korean Soc. Fish. Technol.*, 2012, no. 48, pp. 242-255.
19. Mills C.E. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiol.*, 2001, no. 451, pp. 55-62.
20. Chust G., Allen I., Bopp L. et al. Biomass changes and trophic amplification of plankton in a warmer ocean. *Glob. Change Biol.*, 2014, vol. 20, no. 7, pp. 2124-2139.
21. Lotze H.K., Tittensor D.P., Bryndum-Buchholz A. et al. Global ensemble projections reveal trophic amplification of ocean biomass declines with climate change. *PNAS*, 2019, vol. 116, no. 26, pp. 12907-12912.
22. Sherman K. Toward Ecosystem-Based Management (EBM) of the World's Large Marine Ecosystems During Climate Change. *Envir. Developm.*, 2014, iss. 11, pp. 43-66.
23. Fanning L., Mahon R., Baldwin K. et al. Transboundary Waters Assessment Programme (TWAP) Assessment of Governance Arrangements for the Ocean, Transboundary Large Marine Ecosystems. IOC-UNESCO, Paris. *IOC Techn. Ser.*, 2015, vol. 1, no. 119, 80 p.
24. Behrenfeld M.J., O'Malley R.T., Boss E.S. et al. Reevaluating ocean warming impacts on global phytoplankton. *Nature Climate Change*, 2015, no. 6, pp. 323-330.
25. Boero F., Brotz L., Gibbons M.J. et al. Impacts and effects of ocean warming on jellyfish. In: Laffoley D, Baxter J.M. (Eds.). *Explaining Ocean Warming: Causes, Scale, Effects and Consequences*. Gland, IUCN, 2016, pp. 213-237.
26. Condon R.H., Duarte C.M., Pitt K.A. et al. Recurrent jellyfish blooms are a consequence of global oscillations. *PNAS*, 2013, vol. 110, no. 3, pp. 1000-1005.

27. Piontkovski S.A., Serikova I.M. Fading bioluminescence of the tropical Atlantic Ocean. *Luminescence*, 2022, no. 1, doi: 10.1002/bio.4188.
28. Roemmich D., McGowan J. Climatic warming and the decline of zooplankton in the California Current. *Sci. New Ser.*, 1955, vol. 267, no. 5202, pp. 1324-1326.
29. O'Brien T.D., Wiebe P.H., Falkenhaus T. Introduction. Time series data analysis and visualization. *ICES Coop. Rep.*, 2013, no. 318, pp. 1-208.
30. O'Rielly J. Status and trends in primary productivity and chlorophyll from 1996 to 2014 in Large Marine Ecosystems and the Western Pacific Warm Pool, based on data from satellite ocean color sensors. *IOC Techn. Ser.*, 2017, no. 120, pp. 1-122.
31. Capuzzo E., Lynam C.P., Barry J. et al. A decline in primary production in the North Sea over 25 years, associated with reductions in zooplankton abundance and fish stock recruitment. *Global Change Biol.*, 2018, no. 24, e352-364.
32. Xie F., Tao Z., Zhou X. et al. Spatial and temporal variations of particulate organic carbon sinking flux in Global Ocean from 2003 to 2018. *Remote Sensing*, 2019, vol.11, no. 24, 2941, doi: 10.3390/rs11242941.

THE GELATINOUS-TO-FORAGE ZOOPLANKTON BIOMASS RATIO OF THE WORLD OCEAN

Piontkovski S.A., Minsky I.A., Meger Y.V.

Sevastopol State University

33 Universitetskaya Str., Sevastopol, 299053, Russia; email: spiontkovski@mail.ru

Received 20.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0595

Abstract. The spatiotemporal variability of ocean profound biophysical characteristics (i.e. the intensity of bioluminescence, sound scattering layers and etc.) gradually depends on the zooplankton biomass distribution pattern. In turn, the forage zooplankton fraction (which is represented basically by crustaceans contributing to a small pelagic fish diet) and the gelatinous zooplankton fraction (which is characterized by jellyfish, ctenophores, and some other organisms), both play important but different roles in matter and energy transfer in the pelagic World Ocean. Forage zooplankton is the transformer that links producers to high trophic-level consumers. The gelatinous zooplankton channels the organic carbon towards a detrital pathway. The ratio of forage-to-gelatinous zooplankton biomass inferred out of international databases (JeDI and COPEPOD) and published papers (with data averaged for 1951-2014), was calculated. The dominance of gelatinous biomass (in carbon units) over the forage biomass in the upper 200 m layer across the World Ocean's northern hemisphere was shown. This dominance can negatively impact fish stock recruitment.

Key words: zooplankton biomass, pelagic ecosystems, World Ocean.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАНКТОНА С ПОМОЩЬЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ И ПОСТРОЕНИЕ ПИРАМИД БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Савицкий М.А.¹, Кузнецов А.В.^{1,2,3}

¹ ГБОУ «Центр дополнительного образования «Малая академия наук»

г. Севастополь, РФ

² ФИЦ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

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

³ Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 30.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0596

Аннотация. Модели хищник-жертва Лотки–Вольтерры используются для изучения экологии сообществ, но их способность генерировать пирамиды Элтона в сравнении с полевыми данными подробно не исследовалась. В данной работе вместо систем обыкновенных дифференциальных уравнений (ODE – ordinary differential equation) использовали агентно-ориентированное программирование (ABM – agentbased modeling). Показано, что двухкомпонентная система продуцент-консумент нестабильна, тогда как трёхкомпонентная система с консументами 1-го и 2-го порядка стабильна при длительной симуляции. Временные срезы по ходу выполнения программы могут порождать как пирамиды Элтона, так и каскады. Результаты моделирования согласуются с экспериментами по разделению черноморского планктона из района м. Фиолент (Крым) на фракции размером от 2 мм до 2 мкм. Хотя биоразнообразие в отдельных пробах в разные моменты времени, как и обилие варьируют в широких пределах, оба показателя предсказуемо снижаются с повышением трофического уровня в случае увеличения числа экспериментов с течением времени.

Ключевые слова: модель Лотки–Вольтерры, пирамида Элтона, агентно-ориентированное программирование, последовательная фильтрация, микропланктон.

ВВЕДЕНИЕ

Под биоразнообразием понимают разнообразие форм жизни на трёх уровнях её организации: генетическое разнообразие, видовое разнообразие и экосистемное биоразнообразие, то есть разнообразие самих экосистем. Поэтому, видовое богатство в данной среде обитания можно принять как один из аспектов биоразнообразия. Чем больше разнообразие видов, тем обширнее взаимодействие между ними. В свою очередь, организмы связаны между собой в пищевые сети. При этом, чем выше связность сети, тем больше стабильность экосистемы [1], т.к. у каждого организма есть выбор. Существенным моментом является связь между биоразнообразием и функционированием экосистемы [2]. Последствия уменьшения биоразнообразия для функционирования экосистем вызывают значительную тревогу. Так, изучение коралловых рифов показывает, что как биоразнообразие, так и биомасса являются показателями здоровья рифов [3]. Традиционно исследования сосредоточены на видовом разнообразии в пределах отдельных трофических уровней. На большом количестве материала показано, что видовое богатство последовательно уменьшается в ряду трофических уровней [4], а структура трофического разнообразия морских местообитаний в целом имеет пирамидальную форму [5]. Распределение видового богатства по трофическим уровням зависит от внешних факторов [6], общего числа видов в сообществе [7] и рассматриваемого пространственного масштаба [8].

Фитопланктон является первичным продуцентом органического вещества в морских экосистемах, находясь в основании пищевых цепей, что обуславливает интерес к его исследованию [9-11]. Изучение фитопланктона Севастопольской бухты было начато Н.В. Морозовой-Водяницкой [12] и продолжено другими исследователями. Было показано, что количество видов в планктонном сообществе варьирует от 150 до 200 [13]. В течение года в бухте наблюдается сезонная динамика фитопланктона, т.е. последовательная и закономерная смена одних видов другими на определённом участке во времени [14]. Так, зимой, весной и осенью в Севастопольской бухте доминируют диатомовые, летом – динофитовые водоросли, в январе-феврале регулярно наблюдается интенсивное развитие *Skeletonema costatum*, а в апреле-мае – различных видов из рода *Chaetoceros*. Выявлено несколько циклов в развитии фитопланктона в течение года с периодичностью от 0,5 до 2 месяцев. Интересно, что максимумы численности водорослей и концентрации хлорофилла-а в основном формируются либо одним, либо двумя-тремя доминирующими видами, а в холодный период наблюдалась более быстрая смена доминирующих видов, чем в тёплое время года [15,16].

Обычно динамические смены объясняют тем, что экологическое сообщество лимитировано питательными веществами для отдельных видов [17]. Для описания конкурентных отношений в сообществах были разработаны соответствующие математические модели, начиная с канонических уравнений экспоненциального [18] и логистического [19,20] роста, включая системы линейных дифференциальных уравнений хищник-жертва [21,22], матричные популяционные модели [23,24] и более сложные многокомпонентные модели «вольтерровского» типа

[25]. К этому можно добавить регуляцию численности популяции по кворум-механизму, впервые открытому у бактерий [26], а ныне известному и у планктонных организмов [27]. Показано, что биообъекты способны регулировать как собственный рост и размножение, так и оказывать влияние на членов сообщества. Знание молекулярных механизмов таких процессов чрезвычайно важно и интенсивно исследуется [28,29].

С другой стороны, для общего описания функционирования экосистемы необходимы интегральные оценки сообщества организмов, а также характеристики взаимодействий живого и косного вещества. Наглядным примером такого подхода является экологическая пирамида, впервые разработанная Ч. Элтоном [30], которая представляет графическое изображение соотношения между продуцентами и консументами всех уровней. Различают несколько типов экологических пирамид: видов, чисел, биомассы, энергии и т. д. В силу правила Р. Линдемана [31], согласно которому на каждом этапе передачи по пищевой цепи теряется примерно 90% вещества и энергии и только 10% переходит к очередному потребителю, количество трофических уровней конечно. Данное обстоятельство позволяет изучать пищевые цепи реальных сообществ. Так, с целью оценки морского планктона была разработана линейка устройств последовательной фильтрации Viber и испытана в акватории г. Севастополь [32]. Обнаружено, что распределение числа «морфотипов» по разным размерным фракциям может трансформироваться в каскады [33]. Мы предполагаем, что искажение пирамид разнообразия видов [5], наблюдаемое в отдельных пробах, происходит в результате конкурентных отношений между организмами. Представляет несомненный интерес всесторонне исследовать существующую проблему. Данная работа посвящена изучению организмов размером от 2 мм до 2 мкм на примере модельной станции в районе пляжа Каравелла на м. Фиолент в районе г. Севастополь (Крым, Чёрное море).

ПОСТАНОВКА ЦЕЛИ И ЗАДАЧ

Нами предпринята попытка анализа размерной структуры и трофических связей в локальном планктонном сообществе Чёрного моря путём сопоставления натурных данных с результатами имитационного моделирования. Исходили из того, что понятия «численность» (число особей) и «разнообразие» (в данном случае – число «морфотипов» в пробе) теоретически сопоставимы [5], хотя на материале из близкого района не было показано, что число видов и численность планктона коррелируют [13]. В силу того, что экологические пирамиды отражают не только распределение интегральных характеристик сообщества, таких как численность, биомасса или продукция по трофическим уровням, но и могут визуализировать разнообразие видов на трофических уровнях [5], в данной работе, как в статье Уфимцевой и Кузнецова (2022), рассматривается распределение числа «морфотипов» по разным размерным фракциям, которые предполагаются эквивалентными трофическим уровням, что позволяет конструировать «пирамиды Элтона» для биоразнообразия. Рассматриваются причины нарушения формы пирамид в отдельных пробах, что обозначено, как «каскады», которые преобразуются обратно в пирамиды при суммировании данных по длительным интервалам времени. Исследуются размерные спектры разнообразия в отдельных пробах и сравниваются со спектрами обилия особей, полученными при компьютерном моделировании в отдельные моменты времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор и сепарацию планктона осуществляли во второй половине лета 2022 г. в районе пляжа Каравелла с географическими координатами 44°30'43.3"N 33°28'44.0"E на м. Фиолент. Для этого использовали установку последовательной фильтрации Viber-6 диаметром 11 см и длиной 98 см, состоящую из 5 вставляемых друг в друга секций, между которыми прокладывались нейлоновые сетки различной ячеистости. Диаметр отверстий входного сита составлял 2 мм, последующих – 300, 150 и 84 мкм, размер пор последнего волоконного фильтра EN14683 был 1–5 мкм. Вся конструкция в сборе скреплялась репшнуром. Сепаратор Viber-6 в сборе без поплавков и грузил показан на рисунке 1а. Устройство позволяет изучать нано- (2–20 мкм), микро- (20–200 мкм) и мезо- (200 мкм – 20 мм) планктон. Применяли два способа отбора проб: стационарную фильтрацию и сбор планктона из поверхностного горизонта протягиванием пробоотборника (горизонтальный лов). В первом случае образцы собирали в поверхностном слое воды, забрасывая ведро с верёвкой со скалы; заливали по 100 л воды. Место сбора прибрежного планктона находилось правее пляжа Каравелла на скале с глубиной под ней более 2 м (рис. 1б). Во втором случае применяли горизонтальный лов с надувной весельной лодки на глубине 50 см. Лов начинали с пляжа Каравелла в направлении арки Диана, потом до острова Звериный (наше обозначение) недалеко от м. Броневой, и далее обратно к пляжу. Таким образом, сбор планктона вдали от берега осуществляли со скоростью ~5 км/ч на дистанции около 1500 м (рис. 1б). Было проведено три экспедиции: 13.07.22, 03.08.22 и 31.08.22, причём, в первой поездке испытывали установку Viber-6 в двух режимах – стационарного отбора и горизонтального лова, а в остальных случаях только протягиванием пробоотборника.

Обработка проб. Образцы смывали с фильтров 5 мл искусственной морской воды с солёностью 18‰, фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом и хранили при 4 °С. Аликвоты по 200 мкм исследовали на часовом стекле под бинокулярной лупой ZEISS Stemi 305 при увеличениях от 8 до 40 раз. Препараты фотографировали на предметном стекле под микроскопом Nikon Eclipse Ts2R при увеличении 400 раз. Так как у многих видов диагностические признаки малозаметны, проводили идентификацию с точностью до рода и использовали понятие «морфотип», т.е. сводили в одну категорию все объекты, обладающие визуально схожими морфологическими признаками [33].

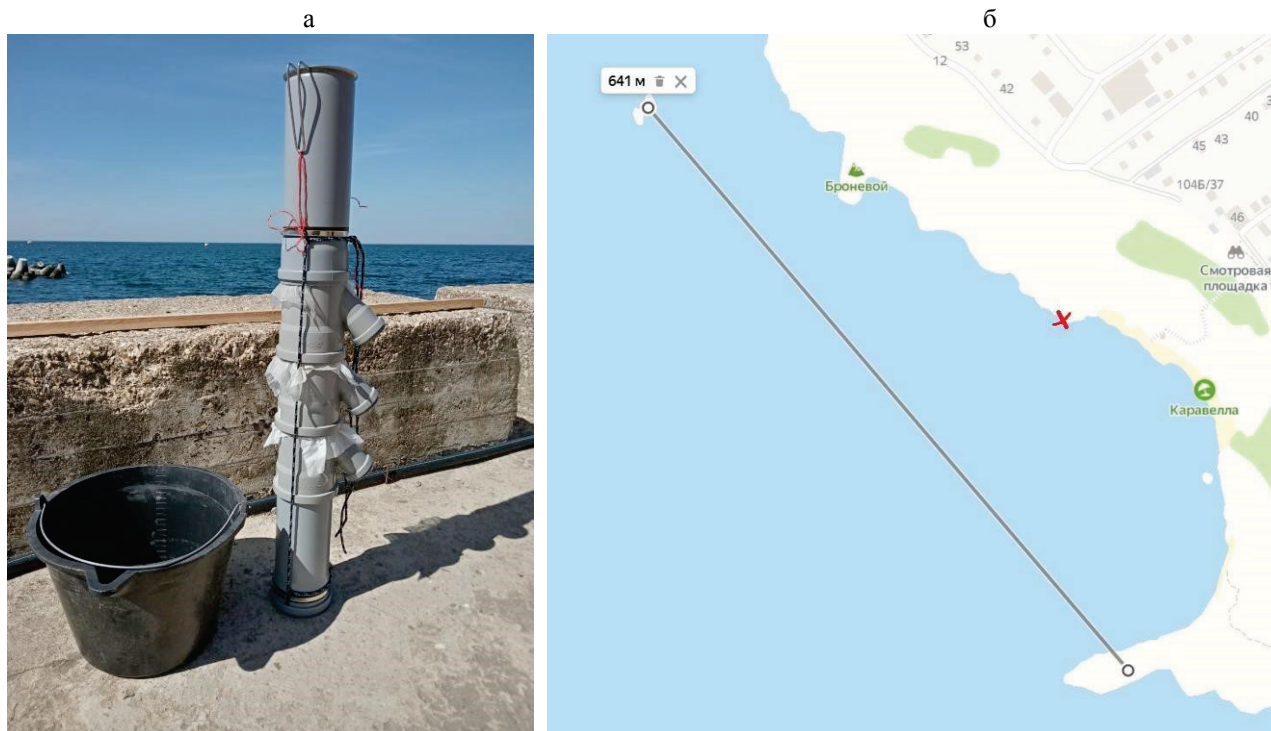


Рисунок 1. Устройство Viber-6 (а) и место сбора проб на м. Фиолент (б), где крестиком обозначено место сбора планктона возле берега, а линией горизонтальный лов вдали от берега

Имитационное компьютерное моделирование проводили в среде NetLogo. Применяли программу Wolf Sheep Predation (Docked Hybrid).nlogo для изучения двухкомпонентной системы в терминах обыкновенных дифференциальных уравнений (ODE) и агентно-ориентированного моделирования (ABM), а также программу WolfSheepPredation.nlogo для ABM-анализа двухкомпонентной и трёхкомпонентной систем [34-36]. В простейшем случае использовали аналитическую модель Лотки–Вольтерры:

$$\frac{dx}{dt} = (\alpha - \beta y)x, \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dt} = (-\gamma + \delta x), \quad (2)$$

где x – количество жертв; y – количество хищников; t – время; α , β , γ , δ – коэффициенты, отражающие взаимодействия между видами, которая была проинтегрирована численным методом. Асимптотическая устойчивость стемы зависела от параметров модели, обрисовывая устойчивый фокус или предельный цикл на фазовой плоскости, выражающийся в колебаниях численности популяции от времени (рис. 3а). Модель системной динамики представляла собой систему конечно-разностных уравнений. В ходе моделирования агенты беспорядочно бродили по экрану, где хищники случайно встречались с добычей. Каждый шаг стоил энергии, поэтому они должны были питаться. Когда энергия заканчивалась, они умирали. Чтобы популяция продолжала существовать, каждый агент обладал фиксированной вероятностью размножения на очередном временном шаге. Варьировали начальный размер популяции каждого агента от 0 до 100. Количество энергии, получаемое хищником за каждую съеденную жертву, и вероятность воспроизводства агентов на очередном временном шаге оставались постоянными по умолчанию. После того, как продуценты были съедены, они вырастали только через определённое время [37]. Исследовали системы продуцент-консумент с разным числом консументов. Стабильной считалась система, агенты которой не вымирали как минимум в трёх независимых длительных симуляциях (более 2000 шагов), квазистабильной, если результат имитационного моделирования зависел от начального положения агентов в пространстве, и нестабильной, если кто-то из консументов вымирал при любых условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Различие между зачерпыванием прибрежного планктона и горизонтальным ловом вдали от берега с помощью устройства Viber-6. При анализе проб от 13.07.22 обнаружено, что образцы, взятые возле берега, несколько отличаются по разнообразию видов от тех, что собрали вдали от берега. Так, в суммарной фракции

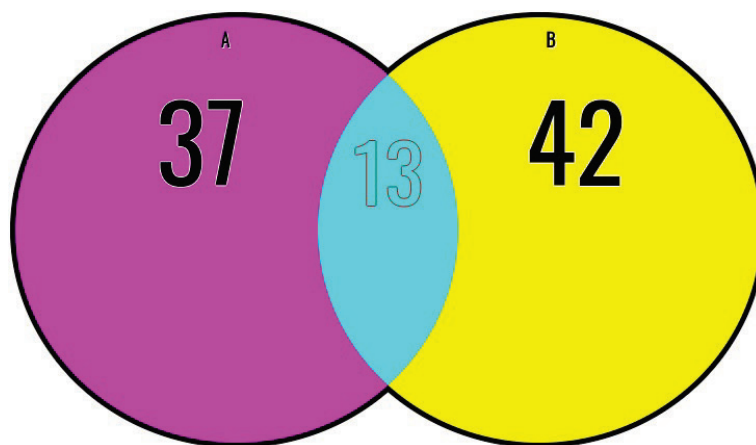


Рисунок 2. Круги Эйлера для числа морфотипов суммарных фракций при зачерпывании (А) и тралении (В)

прибрежного планктона было идентифицировано 50 морфотипов (А), а после траления – 55 морфотипов (В), причём 13 из них принадлежали обеим группам (рис. 2). Качество отбора планктонных организмов на сетках при заливке воды в сепаратор и при тралении было удовлетворительным, что позволило продолжить исследования.

Двухкомпонентная экологическая система хищник-жертва. Сравнительные эксперименты были проведены и в ходе компьютерного моделирования. Оказалось, что в отличие от аналитической модели Лотки–Вольтерры (рис. 3а), результаты агентно-ориентированного моделирования (АВМ) отличаются. А именно, двухкомпонентная АВМ-модель является нестабильной (рис. 4а), что приводит к гибели всех участников (рис. 3б).

Трёхкомпонентная система. В свою очередь, в отличие от двухкомпонентной системы хищник-жертва, трёхкомпонентная система с консументами первого и второго порядка, проявляет стабильность (рис. 5а) в большей части параметрического пространства (рис. 4б). Стабильность сохранялась на протяжении длительного вычислительного эксперимента, несмотря на значительные флуктуации численности агентов (рис. 5б). Это обстоятельство позволяет сравнивать найденную минимальную модель с данными полевых исследований.

Сравнение временных диаграмм, построенных на реальных и модельных данных. Образцы, смытые с фильтров в опытах от 13.07.22 и 03.08.22, были проанализированы на богатство морфотипов отдельно для каждой размерной фракции. Число морфотипов для каждого фильтра в отдельных опытах отложено по оси ординат и затем осуществлена линейная аппроксимация между числом морфотипов для соответствующих размерных фракций в промежутке между опытами (рис. 6а). Для дальнейшего анализа был выбран временной срез I между 13 июля и 3 августа. Помимо этого, был определён временной срез II от 3.08.22. Затем выбрали два временных среза III и IV на графиках модельной экологической системы из одного продуцента и двух консументов разного порядка (рис. 5а, рис. 6б).

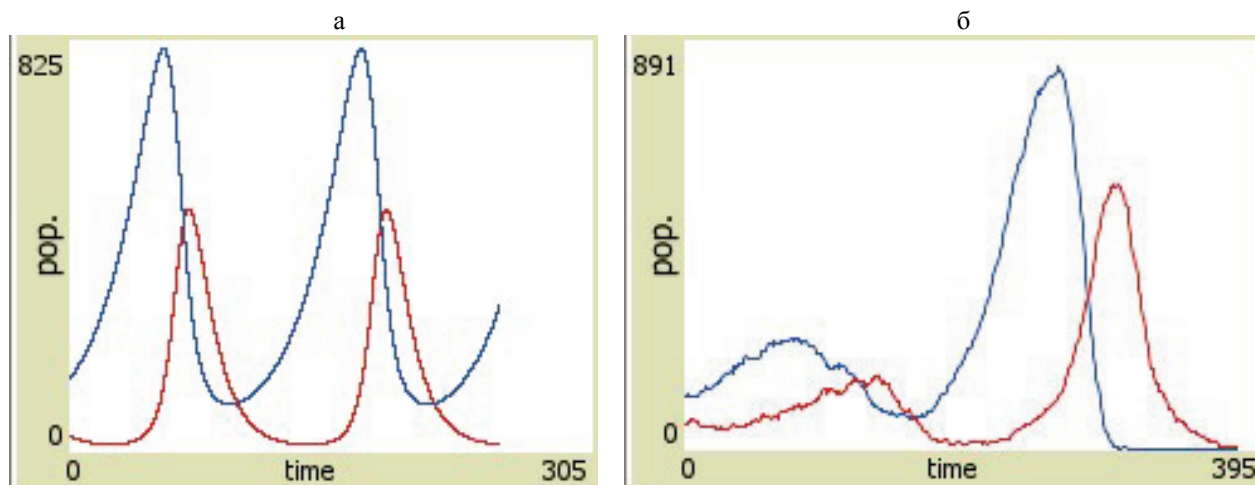


Рисунок 3. Нестабильность двухкомпонентной системы в агентно-ориентированном моделировании, а) классическая модель Лотки–Вольтерры, б) АВМ (agent-based modeling), где по абсциссе время симуляции, по ординате количество агентов, красный цвет – хищник, синий – жертва

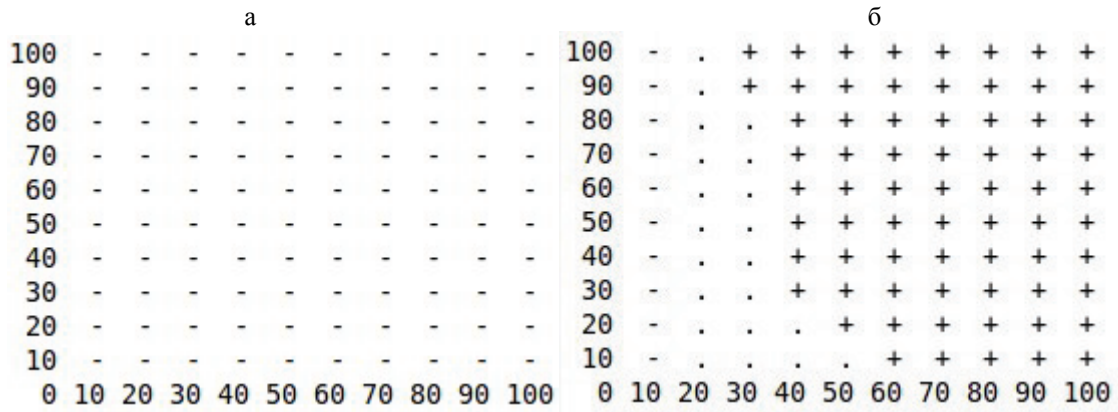


Рисунок 4. Области стабильности и нестабильности модели а) двухкомпонентной системы продуцент - консумент, б) трёхкомпонентной системы продуцент - консументы 1-го и 2-го порядка, где «+» – стабильность, «-» нестабильность, «.» – квазистабильное состояние.

Ось у – число консументов число консументов 2-го порядка.
Ось х – число продуцентов число консументов 1-го порядка

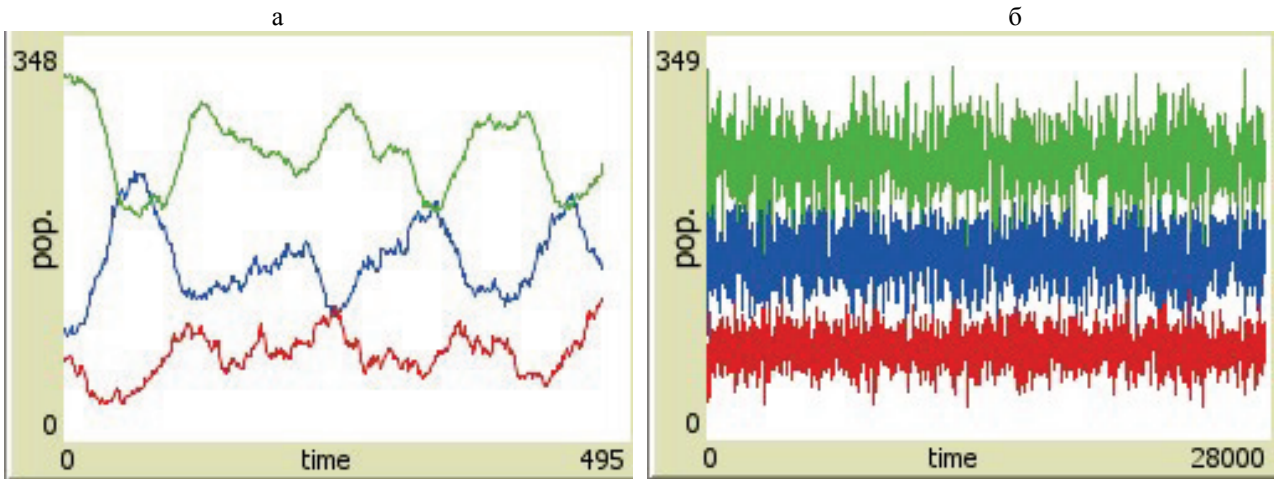


Рисунок 5. Стабильность трёхкомпонентной системы, а) кратковременная симуляция, б) долгосрочная симуляция, где по абсциссе время симуляции, по ординате количество агентов, зелёный цвет – продуцент, синий и красный – консументы первого и второго порядка, соответственно

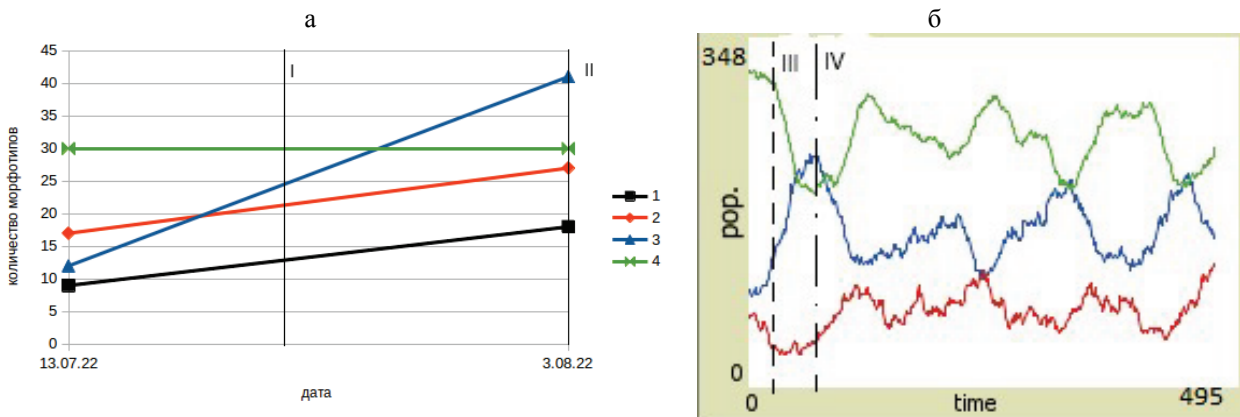


Рисунок 6. Временные профили количества планктона, а) полученные на основе данных горизонтального лова, где 1–4 номера фильтров с размером ячеек 300, 150, 84 и 2 мкм, соответствующие фракции обозначены чёрным, красным, голубым и зелёным цветом, б) построенные с помощью моделирования, где зелёный цвет – это продуцент, а голубой и красный консументы первого и второго порядков; I, II, III и IV обозначают срезы в разное время

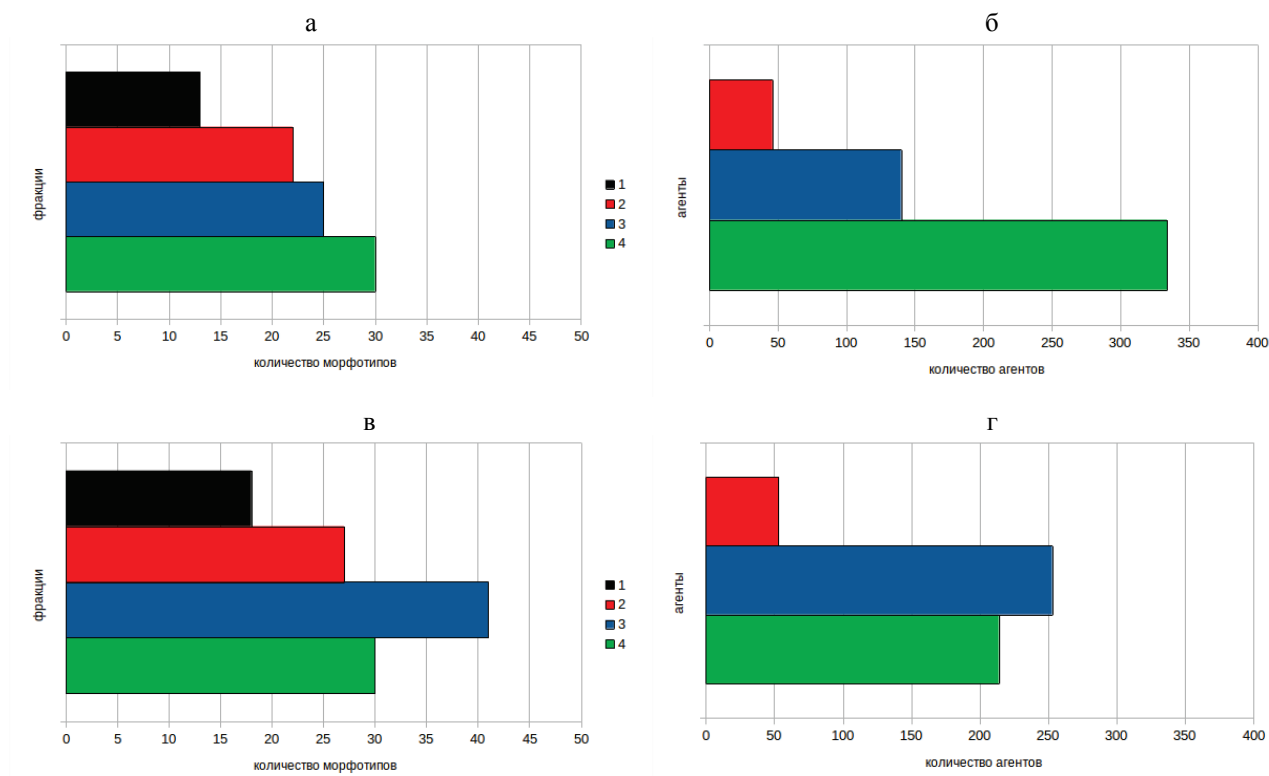


Рисунок 7. Пирамиды Элтона для планктона, построенные по данным горизонтального лова (а – временной срез I; в – 3.08.22, и на основе моделирования (б – временной срез III, г – срез IV), канонические пирамиды (а, б), каскады (в, г), где цифры 1, 2, 3 и 4 на (а) и (в) означают номера фильтров, цвета в (б) и (г) соответствуют цветам рис. 6б

Сравнение пирамид Элтона, построенных на реальных и модельных данных. Численные значения, полученные для временных срезов, использовали для построения пирамид Элтона, где визуализируется количество морфотипов для последовательно уменьшающихся ячеек фильтров либо данные численного эксперимента. Как можно видеть, временной срез I между 13 июля и 3 августа (рис. 6а), а также временной срез III графиков численного моделирования (рис. 6б) представляют канонические пирамиды Элтона (рис. 7а, 7б, соответственно). В отличие от этого, срез II для пробы от 3 августа 2022 г. (рис. 6а) и срез IV численного моделирования (рис. 6б) демонстрируют искажённые пирамиды Элтона, представляющие каскады (соответственно, рис. 7в, 7г).

Распределение планктона по размерным фракциям. Результаты подсчёта морфотипов на фильтрах с уменьшающейся ячеистостью для экспериментов от 13 июля и 3 августа показаны на рисунках 8а и 8б, соответственно, и представляют собой каскады. Объединение данных по дням ведёт к получению пирамиды Элтона (рис. 8в).

Ранжировка видов планктона по встречаемости. Во второй половине лета возле пляжа Каравелла доминировали мелкие одноклеточные водоросли *Nitzschia tenuirostris* (рис. 9а), реже встречались микроводоросли *Licmophora abbreviata* (рис. 9б), панцирные жгутиконосцы *Ceratium tripos* (рис. 9в) и динофлагелляты *Protoperidinium depressum* (рис. 9г). В порядке убывания частоты встречаемости можно далее расположить крупнейший род морских планктонных диатомей *Chaetoceros*, диатомовую водоросль *Pseudosolenia calcar-avis*, представителей рода динофлагеллят *Dinophysis*, колониальный вид диатомовых водорослей *Bacillaria paxillifer*, одноклеточные диатомовые водоросли *Navicula* sp., диатомеи *Achnanthes* sp. и *Bacteriastrium* sp., из зоопланктона находили циклопов *Cyclopidae* sp. и веслоногих ракообразных *Harpacticoida* sp.

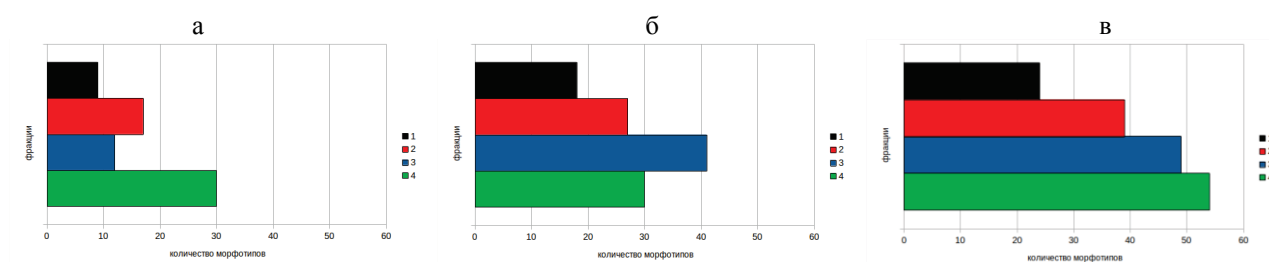


Рисунок 8. Пирамиды Элтона для планктона второй половины лета 2022 г. на м. Фиолент, а) каскад от 13.07.22, б) каскад от 03.08.22, в) объединённые данные обеих проб

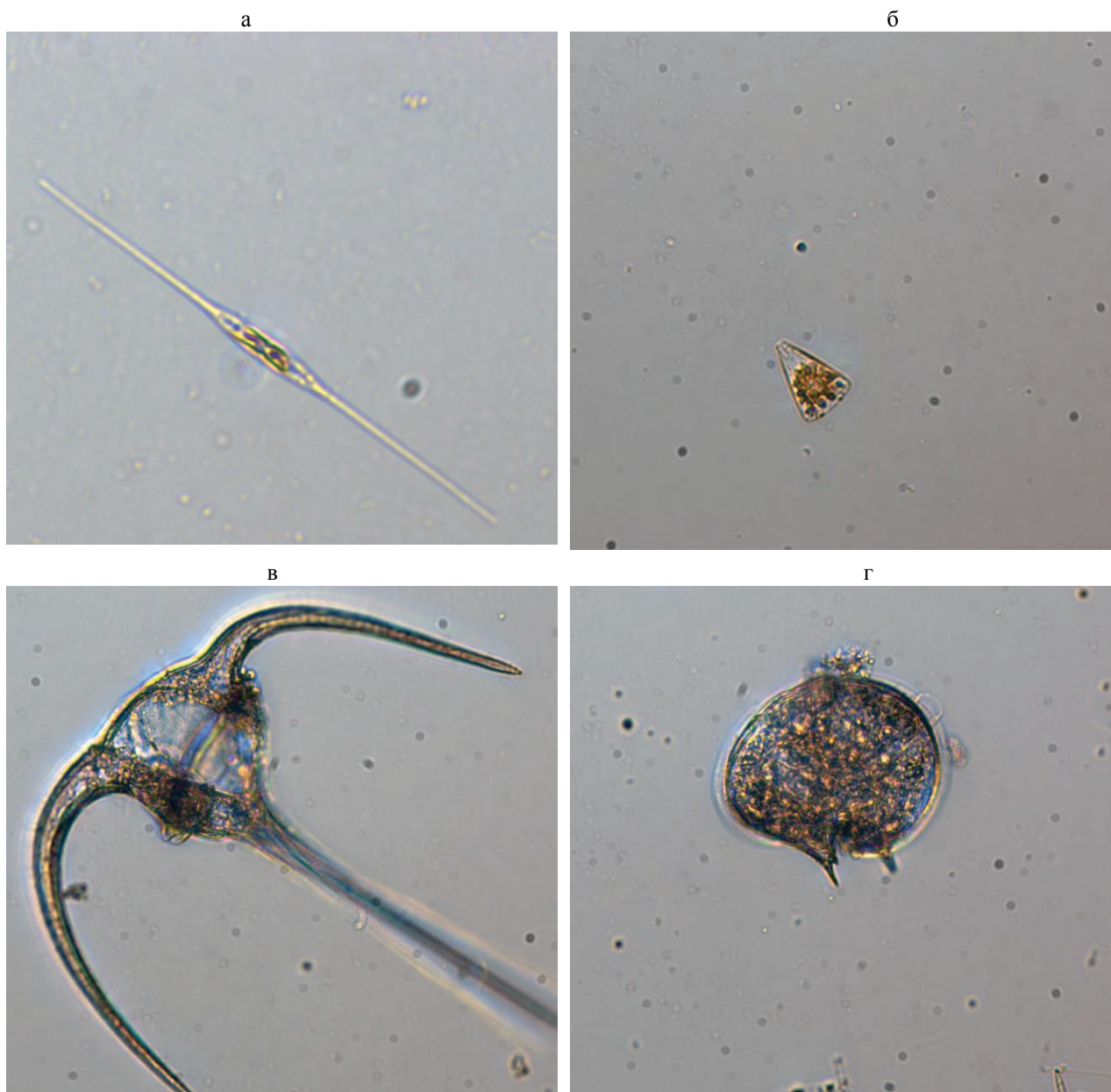


Рисунок 9. Представители наиболее часто встречающихся видов, предположительно, а) *Nitzschia tenuirostris*, б) *Licmophora abbreviata*, в) *Ceratium tripos*, г) *Protoperidinium depressum*, где (а) увеличение 800 раз, (б, в, г) – 400 раз

Изменение числа морфотипов и видов во второй половине лета. Объединяли количество морфотипов или идентифицированных видов из размерных фракций планктона по дням. Так, 13.07.22 было выявлено 55 морфотипов и 11 отдельных видов, 3.08.22 определили 90 морфотипов и 19 видов, а 31.08.22 – 53 морфотипа и 12 видов. Таким образом, максимум биоразнообразия соответствует 3 августа 2022 г. (рис. 10).

Выявление возможных пищевых отношений в экологическом сообществе планктона м. Фиолент второй половины лета 2022 г. Анализ полученных размерных фракций микро- и нано-планктона явно свидетельствует в пользу обобщенной двухзвенной пищевой цепочки: морской фитопланктон → веслоногие рачки, где веслоногие рачки имплицитно питаются фитопланктоном. Можно также предположить, что протоперидиниумы поедают ликмофор, а веслоногие рачки – копеподы в свою очередь поглощают протоперидиниумов. Следовательно, допускается выделить и более длинную пищевую цепь: ликмофоры → протоперидиниумы → копеподы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В экологических сообществах потребители (за исключением паразитов) в целом крупнее и менее многочисленны, чем их ресурс. Теория пищевых сетей, в целом, объясняет пирамиды чисел [30], осцилляции потребитель-ресурс [21,22] и каскады [38], тем не менее остаётся предметом споров. Поэтому резонно

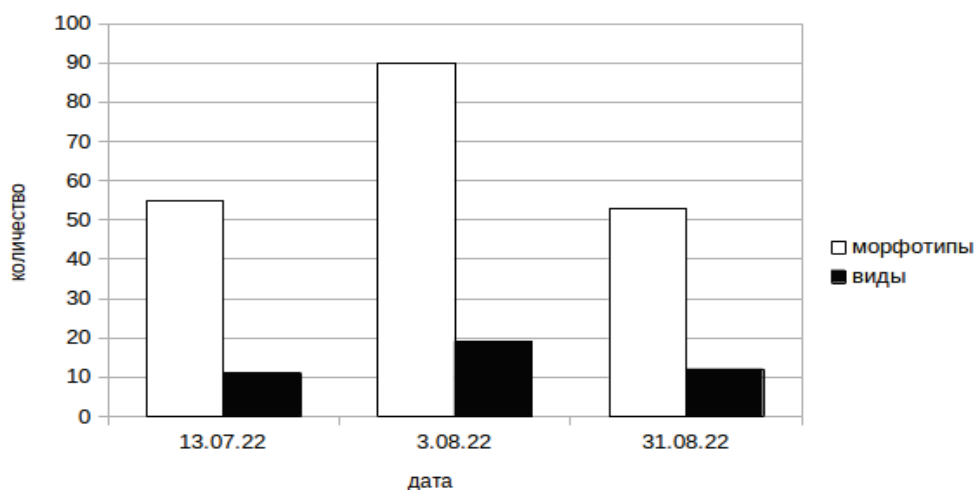


Рисунок 10. Временная диаграмма биоразнообразия планктона второй половины лета

рассматривать не каждое явление в отдельности, а понимать их вместе [39,40]. Напомним, что энергетическая парадигма [31] основана на потоке энергии по пищевой цепи и связана с крупномасштабными экспериментами, особенно в морских исследованиях [41-43]. Она объясняет, как виды распределяются по трофическим уровням или размеру тела [44,45]. Динамическая парадигма [21,22] описывает поведение хищников и жертв, но теория и эксперимент редко совпадают [46]. Энергетические аргументы приводят к пирамидальным распределениям, тогда как динамические модели часто их не дают [38]. Терамото [47] первый проанализировал условия для пирамидальности в линейных пищевых цепях с динамикой Лотки–Вольтерры. Позже была предпринята попытка объединить две парадигмы в теоретическом исследовании [40].

Следует обратить внимание на последовательное развитие теоретических представлений об экосистемах с акцентом на трофические взаимодействия [48], энергетический [49], физиологический [50] и минеральный обмен [51]. Модифицированные модели Лотки–Вольтерры применялись к многовидовым системам для изучения динамических и стабильных свойств пищевых сетей [52,53]. Мы сравнивали собственные теоретические расчёты и полученные экспериментальные данные. В случае использования АВМ, двухкомпонентная система хищник-жертва оказалась нестабильной (рис. 3б), тогда как уже трёхкомпонентная система с консументами 1-го и 2-го порядка демонстрировала стабильность на длительном отрезке времени симуляции (рис. 5б), что дополняет работу [54]. В этом случае численности популяций имеют тенденцию колебаться в предсказуемом темпе при неизменных параметрах [37].

Ч. Элтон [30] обратил внимание на то, что "... животные в основании пищевой цепи относительно многочисленны, в то время как те, что находятся в конце, относительно малочисленны...". Концепция Элтона также подразумевает форму пирамиды в распределении численности видов (т.е. пирамиду видов), что хорошо согласуется с нашими результатами. Срез I временного профиля роста планктона с 13 июля по 3 августа 2022 г. (рис. 6а), а также срез III результата соответствующего численного моделирования (рис. 6б) продемонстрировали классические пирамиды Элтона (рис. 7а, 7б). Наоборот, проба от 3 августа 2022 г. (срез II, рис. 6а) и срез IV во время численного моделирования (рис. 6б) выявили искажения пирамиды Элтона в виде каскадов (рис. 7б, рис. 7г, соответственно). Как каскад выглядела и проба от 13 июля 2022 г., однако объединение данных обоих дней приводило к выравниванию результирующей пирамиды Элтона (рис. 8). Заметим, что в литературе отмечены исключения из пирамидального представления трофической структуры экосистемы, как бочкообразное распределение биомассы в пресноводной пищевой сети [55] или перевёрнутые пирамиды биомассы в некоторых морских системах [56].

В наших пробах второй половины лета превалировали микроводоросли *Nitzschia tenuirostris* (рис. 9а), что дополняет наблюдения [16]. Реже встречались микроводоросли рода *Licmophora* (рис. 9б), динофитовая водоросль *Seratium tripos* (рис. 9в) и динофлагелляты рода *Protoperidinium* (рис. 9г), а также всё реже обнаруживались представители фитопланктона, как *Chaetoceros* sp., *Pseudosolenia calcar-avis*, *Dinophysis* sp., *Vacillaria raхillifer*, *Navicula* sp., *Achnanthes* sp., *Bacteriastrium* sp. и зоопланктона, как *Cyclopidae* sp., *Harpacticoida* sp. Пик биоразнообразия, выраженный в виде числа морфотипов или идентифицированных видов пришёлся на 3 августа (рис. 10). В силу того, что динофлагелляты могут поедать мелких водорослей [57,58], можно предположить, что протоперидиниумы питаются ликмофорой, а копеподы протоперидиниумами. Значит, возможно предложить следующую гипотетическую пищевую цепочку:

ликмофоры → протоперидиниумы → копеподы.

ВЫВОДЫ

Агентно-ориентированное моделирование позволяет естественным путём описывать отношения между отдельными организмами.

Причиной вариаций разнообразия и численности организмов являются пищевые отношения в экологической нише.

Пищевые сети имеют наивысшее видовое богатство на базальном трофическом уровне и все меньшее видовое богатство по мере увеличения трофического уровня.

Уменьшение биоразнообразия с трофическим уровнем соответствует известным пирамидам численности и биомассы, впервые представленным Элтоном (1927) и обусловлено потерей энергии на каждом трофическом уровне, которое было отмечено Линдеманом (1942).

Установлена логическая связь между пирамидами чисел и биомассы с распределением биоразнообразия по трофическим уровням в пирамидах видового богатства. Полученные локальные результаты согласуются с метаданными Терни и Баддл [5].

ОСТАВШИЕСЯ ВОПРОСЫ

Приведённые в статье сведения неполны. Скажем, размерная фракция <80 мкм может включать в себя самые разные группы авто-, миксо- и гетеротрофов: бактерии, водоросли, инфузории, жгутиконосцы и мелкий зоопланктон (особенно ювенильные формы). Точно также и более крупные фракции могут содержать как фитофагов, так и хищников. Как заметил один из рецензентов, это делает «атрибуцию» трофического статуса фракций ненадёжной. Наконец, копеподы питаются преимущественно диатомовыми, а не динофлагеллятами, так что реальные трофические взаимодействия в этой системе заведомо сложнее предполагаемой цепи «кликмофоры → протоперидиниумы → копеподы». Поэтому недостаток экспериментальных данных компенсировали результатами компьютерного моделирования, при котором значения параметров имели существенные черты, а не были взяты из натуральных экспериментов.

К сожалению, даже когда прогнозы согласуются с эмпирическими данными, их бывает недостаточно для установления трофической структуры [59]. Тем более, когда предсказанные закономерности не наблюдаются, часто неясно, кроется ли проблема в теории и её применении или во влиянии других факторов. Многие модели пищевых сетей, не допускают явного саморегулирования в виде зависящей от плотности смертности, однако они часто содержат вмешательство хищников, что подтверждается эмпирическими данными. Внешние энергетические источники, например, приток органического вещества, могут быть также ответственны за выраженные каскады. По мнению акад. РАН В.Н. Егорова "учёт трофических закономерностей В.С. Ивлева наряду с моделированием вещественного, метаболического, энергетического и минерального баланса экосистем позволит продвинуться в понимании трофодинамических процессов, а также уточнении характеристик пирамиды Элтона", что естественным образом имплементируется в агентно-ориентированном подходе.

Авторы благодарят Суглобова А.С., Баутину О.В., Курченко В.М., Зейналова А.И. и Бебиаишвили А.В. за практическую помощь, Губанова В.В., Челядину Н.С., Поспелову Н.В. и Подзорову Д.В. за содействие, Скуратовскую Е.Н., Довгала И.В. и Сергееву Н.Г. за ценные советы, Егорова В.Н. за любезный экскурс в моделирование экосистем, анализ работы и расстановку акцентов, Акимову О.А. за доступ к библиографии, рецензентов за полезные замечания и структуризацию работы. Работа выполнена в рамках проектов Сирисус..Лето № 100220220512058031 и ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. MacArthur R. Fluctuations of Animal Populations and a Measure of Community Stability. *Ecology*, 1955, vol. 36, no. 3, pp. 533-536.
2. Thebault E., Loreau M. Food-web constraints on biodiversity-ecosystem functioning relationships. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, no. 25, pp. 14949-14954.
3. Bellwood D.R., Hughes T.P., Folke C., Nystrom M. Confronting the coral reef crisis. *Nature*, 2004, vol. 429, pp. 827-833.
4. Pimm S.L., Lawton J.H., Cohen J.E. Food web patterns and their consequences. *Nature*, 1991, vol. 350, pp. 669-674.
5. Turney S., Buddle C.M. Pyramids of species richness: the determinants and distribution of species diversity across trophic levels. *Oikos*, 2016, vol. 125, pp. 1224-1232.
6. Vermaat J.E., Dunne J.A., Gilbert A.J. Major dimensions in food-web structure properties. *Ecology*, 2009, vol. 90, no. 1, p. 278282.
7. Martinez N.D., Lawton J.H. Scale and food-web structure: from local to global. *Oikos*, 1995, pp. 148-154.
8. Wood S.A., Russell R., Hanson D., Williams R.J., Dunne J.A. Effects of spatial scale of sampling on food web structure. *Ecol Evol.*, 2015, vol. 5, no. 17, pp.3769-3782.
9. D'Alelio D., Libralato S., Wyatt T., Ribera d'Alcalá M. Ecological-network models link diversity, structure and function in the plankton food-web. *Sci Rep.*, 2016, vol. 17, no. 6, p. 21806.

10. Brierley A.S. Plankton. *Curr Biol.*, 2017, vol. 27, no. 11, pp. R478-R483.
11. Ho P.C., Chang C.W., Shiah F.K., Wang P.L., Hsieh C.H., Andersen K.H. Body Size, Light Intensity, and Nutrient Supply Determine Plankton Stoichiometry in Mixotrophic Plankton Food Webs. *Am Nat.*, 2020, vol. 195, no. 4, pp. E100-E111.
12. Морозова-Водяницкая Н.В. Фитопланктон Чёрного моря. I. Фитопланктон в районе г. Севастополя и общий обзор фитопланктона Чёрного моря. *Тр. Севастоп. биол. ст. АН СССР*, 1948, т. 6, с. 39-172 [Morozova-Vodyanitskaya N.V. Phytoplankton of the Black Sea. I. Phytoplankton in the area of Sevastopol and a general overview of phytoplankton of the Black Sea. *Tr. Sevastop. biol. art. of the USSR Academy of Sciences*, 1948, vol. 6, pp. 39-172 (In Russ.)].
13. Поликарпов И.Г., Сабурова М.А., Манжос Л.А., Павловская Н.А., Гаврилова Н.А. Биологическое разнообразие микропланктона прибрежной зоны Черного моря в районе Севастополя (2001-2003 гг.). *Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (черноморский сектор)*. Под ред. В.Н. Еремеева, А.В. Гаевской. НАН Украины, ИнБИОМ. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003, с. 16-43 [Polikarpov I.G., Saburova M.A., Manzhos L.A., Pavlovskaya N.A., Gavrilova N.A. Biological diversity of microplankton of the coastal zone of the Black Sea near Sevastopol (2001-2003). *The current state of biodiversity of the coastal waters of the Crimea (Black Sea sector)*. Edited by V.N. Eremeev, A.V. Gayevskaya. NAS of Ukraine, InBUM. Sevastopol: EKOSI-Hydrophysics, 2003, pp. 16-43 (In Russ.)].
14. Сеничева М.И. Сезонная динамика численности, биомассы и продукции фитопланктона Севастопольской бухты. *Экология моря*, 1980, вып. 1, с. 3-11 [Senicheva M.I. Seasonal dynamics of abundance, biomass and phytoplankton production of the Sevastopol Bay. *Ecology of the Sea*, 1980, iss. 1, pp. 3-11 (In Russ.)].
15. Финенко З.З., Крупаткина Д.К. Первичная продукция и размерная структура фитопланктона в зимне-весенний период. *Планктон Черного моря*, 1993, гл. 2, с. 74-92 [Finenko Z.Z., Krupatkina D.K. Primary production and size structure of phytoplankton in winter and spring. *Plankton of the Black Sea*, 1993, ch. 2, pp. 74-92 (In Russ.)].
16. Финенко З.З., Стельмах Л.В., Мансурова И.М., Георгиева Е.Ю., Цилинский В.С. Сезонная динамика структурных и функциональных показателей фитопланктонного сообщества в Севастопольской бухте. *Системы контроля окружающей среды*, 2017, № 9(29), с. 73-82 [Finenko Z.Z., Stelmakh L.V., Mansurova I.M., Georgieva E.Yu., Tsilinsky V.S. Seasonal dynamics of structural and functional indicators of phytoplankton community in Sevastopol Bay. *Environmental Control Systems*, 2017, no. 9(29), pp. 73-82 (In Russ.)].
17. Стельмах Л.В., Губанов В.И., Бабич И.И. Сезонные изменения скорости роста и лимитирование фитопланктона питательными веществами в прибрежных водах Чёрного моря в районе Севастополя. *Морской экологический журнал*, 2004, т. 3, № 4, с. 55-73 [Stelmakh L.V., Gubanov V.I., Babich I.I. Seasonal changes in the growth rate and restriction of phytoplankton by nutrients in the coastal waters of the Black Sea near Sevastopol. *Marine Ecological Journal*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 55-73 (In Russ.)].
18. Malthus T.R. An Essay on the Principle of Population. *J. Johnson, in St. Paul's Church-Yard*, 1798, pp. 15-130.
19. Verhulst P.F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp. Math. Phys.*, 1838, vol. 10, pp. 113-121.
20. Pearl R., Reed L.J. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *PNAS*, 1920, vol. 6, pp. 275-288.
21. Lotka A.J. Elements of Physical Biology. *Williams and Wilkins Company*, 1925, p. 495.
22. Volterra V. In Animal Ecology (ed R.N. Chapman). *McGraw-Hill*, 1926, pp. 409-448.
23. Leslie P.H. On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika*, 1945, vol. 33, no. 3, pp. 183-212.
24. Leslie P.H. Some further notes on the use of matrices in population mathematics. *Biometrika*, 1948, vol. 35, no. 3/4, p. 213-245.
25. Свирежев Ю.М., Логофет Д.О. Устойчивость биологических сообществ. М.: Наука, 1978, 352 с. [Svirezhev Yu.M., Logofet D.O. *Stability of biological communities*. М.: Nauka, 1978, 352 p. (In Russ.)].
26. Neilson K.H., Platt T., Hastings J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.*, 1970, vol. 104, no. 1, pp. 313-322.
27. Stock F., Bilcke G., De Decker S., Osuna-Cruz C.M., Van den Berge K., Vancaester E., De Veylder L., Vandepoele K., Mangelinckx S., Vyverman W. Distinctive Growth and Transcriptional Changes of the Diatom *Seminavis robusta* in Response to Quorum Sensing Related Compounds. *Front Microbiol.*, 2020, vol. 11, p. 1240.
28. Abisado R.G., Benomar S., Klaus J.R., Dandekar A.A., Chandler J.R. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, 2018, vol. 9, no. 3, e02331-17.
29. Суглобов А.С., Кузнецов А.В. Описание специфических для смерти белков диатомовых водорослей *Thalassiosira pseudonana* и *Skeletonema costatum*. *Биофизика сложных многокомпонентных систем. Математическое моделирование. Биоинформатика*. VII Съезд биофизиков России, 17-23 апреля 2023, т. 1, с. 293-294 [Suglobov A.S., Kuznetsov A.V. Description of death-specific proteins of *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum* diatoms. *Biophysics of complex multicomponent systems. Mathematical modeling. Bioinformatics*. VII Congress of Biophysicists of Russia, April 17-23, 2023, vol. 1, pp. 293-294 (In Russ.)].
30. Elton C.S. *Animal Ecology*. Sidgwick and Jackson, London, 1927.
31. Lindemann R.L. Experimental stimulation of winter anaerobiosis in a senescent lake. *Ecology*, 1942, vol. 23, pp. 1-13.

32. Баздырев Д.А. *Исследование прибрежной акватории г. Севастополя с помощью набора сит с уменьшающимися размерами отверстий «Biber-1»*. Департамент образования и науки города Севастополя Государственное бюджетное образовательное учреждение Центр дополнительного образования «Малая академия наук», 2021, 17 с. [Bazdyrev D.A. *Investigation of the coastal water area of Sevastopol using a set of sieves with decreasing hole sizes "Biber-1"*. Department of Education and Science of the city of Sevastopol State Budgetary educational institution Center for Additional Education "Small Academy of Sciences", 2021, 17 p. (In Russ.)].
33. Уфимцева М.А., Кузнецов А.В. Экспресс-оценка размерных фракций планктона в акватории г. Севастополь зимой 2021-2022 гг: модельные исследования. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 4, с. 640-644 [Ufimtseva M.A., Kuznetsov A.V. Express assessment of the size fractions of plankton in the water area of Sevastopol in the winter of 2021-2022. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4, pp. 640-644 (In Russ.)].
34. Wilensky U. NetLogo Voting model. *Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling*, 1998. Northwestern University, Evanston, IL.
35. Wilensky U. NetLogo. *Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling*, 1999. Northwestern University, Evanston, IL.
36. Liu J. Autonomous agents and multi-agent systems: explorations in learning, self-organization and adaptive computation. *World Scientific*, 2001.
37. Wilensky U., Reisman K. Connected Science: Learning Biology through Constructing and Testing Computational Theories - an Embodied Modeling Approach. *International Journal of Complex Systems*, 1999, vol. 234, pp. 1-12.
38. Jonsson T. Conditions for Eltonian pyramids in Lotka-Volterra food chains. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, p. 10912.
39. Fretwell S.D. Food chain dynamics: the central theory of ecology? *Oikos*, 1987, vol. 50, pp. 291-301.
40. Barbier M., Loreau M. Pyramids and cascades: a synthesis of food chain functioning and stability. *Ecol Lett.*, 2019, vol. 22, no. 2, pp. 405-419.
41. Hemmingsen A.M. Energy metabolism as related to body size and respiratory surface, and its evolution. *Rep Steno Memorial Hospital*, 1960, vol. 13, pp. 1-110.
42. Sheldon R., Prakash A., Sutcliffe W. The size distribution of particles in the ocean. *Limnol Oceanography*, 1972, vol. 17, pp. 327-340.
43. Andersen K.H., Jacobsen N.S., Farnsworth K.D. The theoretical foundations for size spectrum models of fish communities. *Can J Fish Aquat Sci.*, 2015, vol. 73, pp. 575-588.
44. Banse K., Mosher S. Adult body mass and annual production/biomass relationships of field populations. *Ecol Mono.*, 1980, vol. 50, pp. 355-379.
45. Sprules W.G., Barth L.E. Surfing the biomass size spectrum: some remarks on history, theory, and application. *Can J Fish Aquat Sci.*, 2015, vol. 73, pp. 477-495.
46. Shurin J.B., Borer E.T., Seabloom E.W., Anderson K., Blanchette C.A., Broitman B., Cooper S.D., Halpern B.S. A crossecosystem comparison of the strength of trophic cascades. *Ecol Lett.*, 2002, vol. 5, pp. 785-791.
47. Teramoto E. Dynamical structure of energy trophic levels. *Ecological Modelling*, 1993, vol. 96, pp. 135-147.
48. Ивлев В.С. Биология и математика. *Вопр. философии*, 1956, № 6, с. 76-79 [Ivlev V.S. Biology and mathematics. *Vopr. of Philosophy*, 1956, no. 6, pp. 76-79 (In Russ.)].
49. Меншуткин В.В. *Математическое моделирование популяций и сообществ водных животных*. АН СССР. Сов. нац. ком. по междунар. биол. программе. Ин-т эволюц. физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. Ленинград: Наука. Ленингр. отд-ние, 1971, 196 с. [Menshutkin V.V. *Mathematical modeling of populations and communities of aquatic animals*. USSR Academy of Sciences. Soviet National Com. by international. biol. the program. In-t evolution. physiology and biochemistry named after I.M. Sechenov. Leningrad: Nauka. Leningr. publishing house, 1971, 196 p. (In Russ.)].
50. Хайлов К.М. *Экологический метаболизм в море*. Киев: Наукова думка, 1971, 252 с. [Khaylov K.M. *Ecological metabolism in the sea*. Kiev: Naukova dumka, 1971, 252 p. (In Russ.)].
51. Егоров В.Н. *Теория радиоизотопного и химического гомеостаза морских экосистем*. В.Н. Егоров; Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН". Севастополь: ФИЦ ИНБИОМ, 2019, 355 с. [Egorov V.N. *Theory of Radioisotope and chemical homeostasis of marine ecosystems*. V.N. Egorov; Federal Research Center "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences". Sevastopol: FITZ Inbyum, 2019, 355 p. (In Russ.)].
52. Otto S.B., Rall B.C., Brose U. Allometric degree distributions facilitate food-web stability. *Nature*, 2007, vol. 450, pp. 1226-1227.
53. Yodzis P. The stability of real ecosystems. *Nature*, 1981, vol. 289, pp. 674-676.
54. Салтыков М.Ю., Барцев С.И., Ланкин Ю.П. Зависимость устойчивости моделей замкнутых экосистем от числа видов. *Журнал СВУ серия «Биология 2»*, № 4, 2011, с. 197-208 [Saltykov M.Yu., Bartsev S.I., Lankin Yu.P. Dependence of the stability of models of closed ecosystems on the number of species. *SIBFU Journal series "Biology 2"*, no. 4, 2011, pp. 197-208 (In Russ.)].
55. Jonsson T., Cohen J.E., Carpenter S.R. Food webs, body size and species abundance in ecological community description. *Advances in Ecological Research*, 2005, vol. 36, pp. 1-83.
56. Harvey H.W. On the production of living matter in the sea off Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1950, vol. 29, pp. 97-137.

57. Jacobson D.M., Anderson D.M. Thecate heterotrophic dinoflagellates: feeding behavior and mechanisms. *J. Phycol.*, 1986, vol. 22, pp. 249-258.
58. Naustvoll L.J. Prey size spectra in naked heterotrophic dinoflagellates. *Phycologia*, 2000, vol. 39, pp. 448-455.
59. Кан В.А., Жданов В.С., Жданова О.Л., Неверова Г.П. Математическая модель динамики планктонного сообщества с трофической функцией Ардити-Гинзбурга. *Региональные проблемы*, 2022, т. 25, № 3, с. 164-167 [Kan V.A., Zhdanov V.S., Zhdanova O.L., Neverova G.P. Mathematical model of plankton community dynamics with Ardit-Ginzburg trophic function. *Regional Problems*, 2022, vol. 25, no. 3, p. 164-167 (In Russ.)].

PLANKTON FRACTIONATION BY SEQUENTIAL FILTRATION AND CONSTRUCTION OF BIODIVERSITY PYRAMIDS

Savitsky M.A.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2,3}

¹ State Budgetary Educational Institution "Center for Additional Education "Small Academy of Sciences" Sevastopol, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, RAS
Nakhimov Avenue, 2, Sevastopol, 299011, Russia

³ Sevastopol State University
Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 30.06.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0596

Abstract. Lotka-Volterra predator-prey models are used to study community ecology, but their ability to generate ecological pyramids compared to field data has not been investigated in detail. In this paper, agent-based modeling (ABM) was used instead of systems of ordinary differential equations (ODE). It was shown that the two-component producer-consumer system is unstable, whereas the three-component system with consumers of the 1st and 2nd order is stable under prolonged simulation. Time slices as the program progresses can generate both ecological pyramids and cascades. Simulation results are consistent with experiments on separation of the Black Sea plankton from the area of Cape Fiolent (Crimea) into fractions ranging in size from 2 mm to 2 microns. Although biodiversity in individual samples at different points in time as well as abundance vary widely, both predictably decline with rising trophic levels in cases where the number of tests increases over time.

Key words: Lotka-Volterra model, ecological pyramid, agent-based programming, sequential filtration, microplankton.

МЕХАНИЗМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПИДОВ

Шишкина Л.Н., Белецкая П.Д., Дубовик А.С., Машукова А.В., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Ул. Косыгина, 4., г. Москва, 119334, РФ: e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0597

Аннотация. Изучено влияние двухвалентных ионов меди и железа на их способность образовывать комплексы с фосфолипидами и интенсивность процессов перекисного окисления липидов, воздействовать на спонтанную агрегацию природных липидов в водной среде и дзета-потенциал сформированных частиц в широком диапазоне концентрации ионов металлов. Математический анализ УФ-спектров водных растворов лецитина, ионов металлов и их смесей по методу Гаусса показал, что ионы меди и железа образуют комплексы с фосфолипидами и оказывают влияние на содержание продуктов окисления лецитина. При этом масштаб эффекта зависит от концентрации иона, его природы и степени окисляемости лецитина. Обнаружено отсутствие линейной зависимости величины дзета-потенциала частиц лецитина от концентрации ионов металлов в водной среде и существенные различия их способности влиять на размер сформированных лецитином агрегатов. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что качество природной воды обусловлено как концентрацией ионов тяжелых металлов, так и их способностью оказывать влияние на параметры физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов присутствующих в воде биологических объектов.

Ключевые слова лецитин, двухвалентные ионы меди и железа, УФ-спектрометрия, метод Гаусса, мицеллообразование, дзета-потенциал.

Высокая диэлектрическая проницаемость воды обуславливает ее уникальные свойства как растворителя и создает условия для присутствия в природной воде огромного количества соединений, среди которых ионы тяжелых металлов и биологические объекты. Поэтому закономерно, что природная вода представляет собой сложную многокомпонентную систему [1]. Выраженная способность молекул воды к самоорганизации вследствие образования водородных связей является одним из основных факторов, обуславливающих воздействие различных биологически активных веществ даже в малых дозах на физико-химические свойства мембран присутствующих в ней биологических объектов [2,3].

В настоящее время не вызывает сомнения, что нормальное функционирование биологических систем зависит от протекания в них окислительных процессов, играющих важную роль как в оценке качества воды, так и в регуляции метаболизма в системах разной сложности [4,5]. Нормальное функционирование сложных биологических объектов обуславливает физико-химическая система регуляции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6,7]. Показано, что состояние параметров этой системы играет важную роль в экологическом мониторинге, а нарушения регуляции ПОЛ приводит к гибели клеток и обуславливает токсичность соединений при их поступлении в организм [8-10]. Поскольку фосфолипиды являются одними из основных компонентов биологических мембран, а среди компонентов природной воды, как правило, присутствуют двухвалентные ионы меди и железа, то возникает необходимость более детального анализа природы иона на физико-химические свойства фосфолипидов. Однотипность функционирования физико-химической системы регуляции ПОЛ на разных уровнях организации биообъектов [11] позволяет использовать различные модельные системы для изучения механизма воздействия компонентов водной среды на биообъекты. Ранее нами было показано, что водные растворы соевого лецитина могут быть использованы для первичной оценки качества природной воды и прогнозирования последствий влияния ее компонентов на организм [8-10].

Целью работы являлся сравнительный анализ влияния двухвалентных ионов меди и железа в широком диапазоне концентраций на способность образовывать комплексы с фосфолипидами и воздействовать на спонтанную агрегацию лецитина в водной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соевый лецитин, представляющий собой смесь природных липидов, доля фосфолипидов (ФЛ) в составе которых не менее 40%, был использован как модель природных ФЛ. Высокая лабильность липидного компонента любых природных объектов обуславливает необходимость контролировать состав липидов конкретных образцов. Качественный состав липидов использованных в работе образцов лецитина определяли методом ТСХ, используя стеклянные пластинки размером 90×120 мм, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: дистиллированная вода в объемном соотношении 12,5: 7,5: 2: 1 в качестве мобильной фазы [12]. Хроматограммы проявляли в парах йода. После удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их хлорной кислотой до неорганического фосфора (Р) количественный анализ состава ФЛ проводили спектрофотометрически по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой

кислоты при длине волны 815 нм (ПЭ 5400ВИ, Россия). Для каждой пробы анализировали 5 хроматографических дорожек. Подробности методики приведены в работе [10].

Помимо количественного соотношения фракций ФЛ оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доля (%) ФЛ и отношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ($\Sigma\text{ЛЮФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$), характеризующее способность липидов к окислению [7]. Отношение $\Sigma\text{ЛЮФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ вычисляли по формуле: $(\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ})$, где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы ФЛ, СЛ – сфинголипиды, ФХ – фосфатидилхолин.

Концентрация ионов металлов в водных растворах опытных образцов варьировала от 10^{-6} до 10^{-4} М, использовали хлорид двухвалентной меди и соль Мора.

УФ-спектры водных растворов лецитина, ионов металлов и их смесей регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Полученные УФ-спектры подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver при условии совпадения контура исходного спектра с расчетным после аппроксимации на уровне $10^{-3} - 10^{-5}$.

Размер и дзета-потенциал (ζ -потенциал) наночастиц лецитина в дистиллированной воде и в присутствии ионов металлов определяли методом динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при температуре 25°C и угле рассеяния 173° . Источником света являлся гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Исследуемый раствор объемом около 1 мл помещали в предварительно обеспыленную квадратную кювету толщиной 1 см. Концентрация лецитина составляла $4,3 \times 10^{-5}$ М. Сбор данных и первичную обработку осуществляли программой Zetasizer Software 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Каждое измерение повторяли не менее 5 раз.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [13]. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и следовало ожидать, разные партии лецитина различались как значениями обобщенных показателей состава липидов, так и количественным соотношением фракций ФЛ. Так, доли ФЛ в составе общих липидов лецитина оказались равными $40,3 \pm 1,7\%$ ($n=7$) и $73,6 \pm 2,1\%$ ($n=7$), а способность липидов к окислению $0,0107 \pm 0,0011$ ($n=5$) и $0,0509 \pm 0,0005$ ($n=5$) для образцов 1 и 2 соответственно. Существенные различия выявлены и в количественном соотношении фракций ФЛ в образцах лецитина, что следует из данных таблицы 1.

Типичный УФ-спектр водного раствора лецитина и его гауссианы представлен на рисунке 1.

Таблица 1. Количественное соотношение фракций фосфолипидов (%P) образцов лецитина

| Образец | ЛФХ | СЛ | ФХ | ФИ+ФС | ФЭ | КЛ+ФК |
|---------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| №1 | $5,05 \pm 0,95$ | $8,58 \pm 0,29$ | $85,3 \pm 1,0$ | $0,22 \pm 0,01$ | $0,21 \pm 0,02$ | $0,63 \pm 0,21$ |
| №2 | $0,92 \pm 0,23$ | $7,65 \pm 0,70$ | $86,60 \pm 0,37$ | $1,13 \pm 0,45$ | $2,60 \pm 0,45$ | $1,11 \pm 0,15$ |

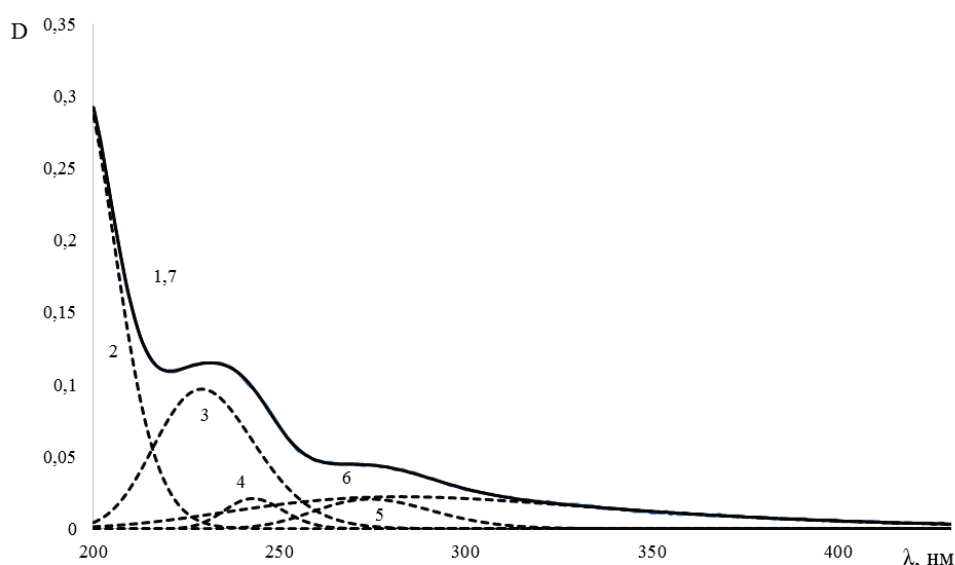


Рисунок 1. УФ-спектр лецитина и его гауссианы в водном растворе: 1,7 – исходный и расчётный спектры, 2 – 195,5 нм, 3 – 229,1 нм, 4 – 242,8 нм, 5 – 274,3 нм, 6 – 282,4 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М

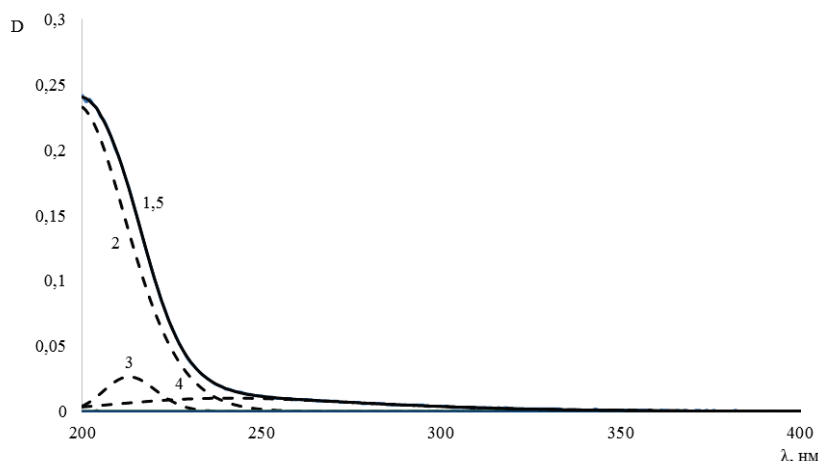


Рисунок 2. УФ-спектр растворов лецитина в присутствии ионов меди и их гауссианы: 1,5 – исходный и расчетный спектры, 2 – 198,5 нм, 3 – 213,0 нм, 4 – 241,1 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, $[\text{Cu}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-5}$ М

Максимум полосы поглощения при длинах волн в области 195 нм характерен для сложных эфиров и соединений с несопряженными двойными связями. По величине оптической плотности (D) данной полосы обычно судят о содержании липидов в биологическом объекте. Полоса поглощения в области 225–230 нм обусловлена наличием соединений с сопряженными двойными связями, так называемых диеновых конъюгатов. Полосу поглощения в области 265–275 нм связывают преимущественно с наличием соединений с карбонильными группами (кетодиенов), поэтому по величине D данной полосы поглощения судят о степени окисленности липидов. Появление в УФ-спектрах использованных образцов лецитина полосы поглощения в области 235–240 нм, характеризующейся наиболее низкой величиной D, обусловлено присутствием в ФЛ образцов лецитина относительно высокой доли N-содержащих фракций ФЛ: СЛ, ФЭ, ФС (табл. 1).

Присутствие в растворе ионов железа и меди вызывает как сдвиги максимумов полос поглощения лецитина и изменение величин их оптической плотности, так и появление новых полос поглощения в УФ-спектрах смесей, что свидетельствует об образовании комплексов ионов металлов с фосфолипидами и их влиянием на окисление лецитина. Однако эффект зависит от природы иона (рис. 2, 3).

Как следует из данных, представленных на рисунке 2, в присутствии ионов меди в растворе при близких к эквимольным концентрациям с лецитином существенно уменьшается D полосы поглощения в области 240 нм, которая характерна для N-содержащих соединений, и обнаружена дополнительная полоса поглощения в области 213 нм, что свидетельствует о наличии в растворе свободных жирных кислот. При этом отсутствуют полосы поглощения диеновых конъюгатов и кетодиенов. Следовательно, ионы меди активно участвуют в процессах окисления лецитина и образуют комплекс с N-содержащими фракциями ФЛ лецитина.

В аналогичных условиях в присутствии ионов железа выявлены сдвиги максимумов полос поглощения лецитина, определенный рост оптической плотности полос поглощения диеновых конъюгатов и кетодиенов и отсутствие полосы поглощения N-содержащих компонентов ФЛ, появление дополнительных полос поглощения в более длинноволновой области, что связывают с наличием P-содержащих соединений ионов железа (рис. 3). Следовательно, ионы железа образуют комплексы и с N-, и с P-содержащими фракциями ФЛ и интенсифицируют окисление лецитина.

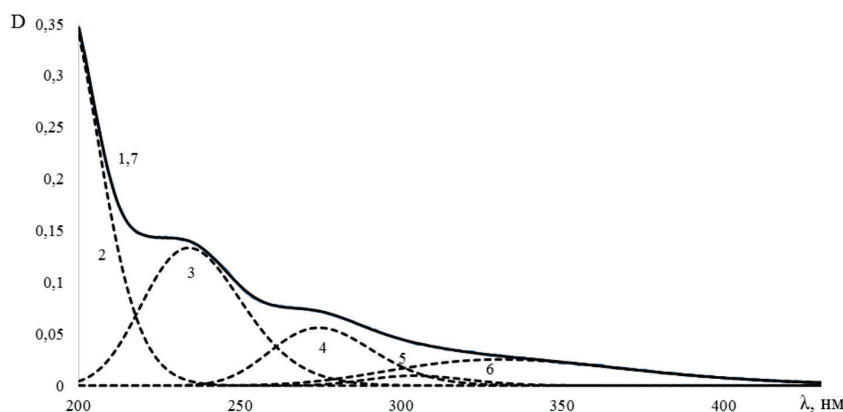


Рисунок 3. УФ-спектр растворов лецитина в присутствии ионов железа и их гауссианы: 1,7 – исходный и расчетный спектры, 2 – 194,7 нм; 3 – 232,2 нм; 4 – 275,2 нм; 5 – 304,0 нм, 6 – 330,9 нм; [лецитин] = $4,3 \times 10^{-5}$ М, $[\text{Fe}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-5}$ М

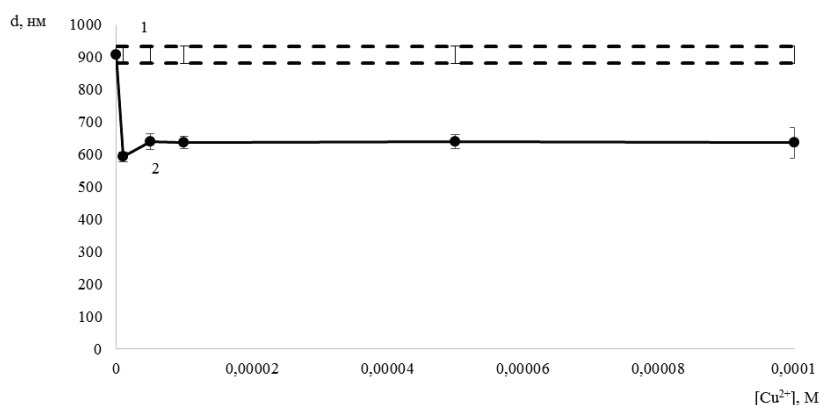


Рисунок 4. Зависимость среднего динамического диаметра основной фракции частиц лецитина от концентрации ионов Cu^{2+} в растворе. $[\text{лецитин}] = 4,3 \times 10^{-5}$ М, Пунктирная линия указывает интервал точности анализа размера частиц основной фракции лецитина

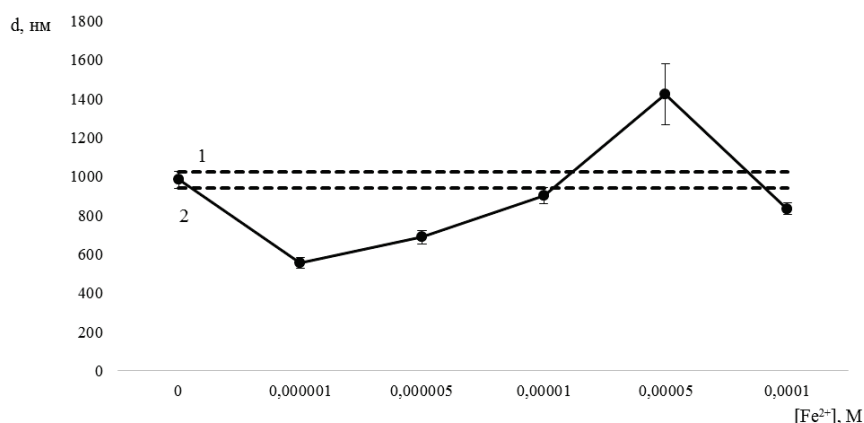


Рисунок 5. Зависимость среднего динамического диаметра основной фракции частиц лецитина от концентрации ионов Fe^{2+} в растворе. $[\text{лецитин}] = 4,3 \times 10^{-5}$ М, Пунктирная линия указывает интервал точности анализа размера частиц основной фракции лецитина

Существенные различия выявлены и при исследовании способности ионов меди и железа влиять на мицеллообразование лецитина в водной среде и электрофоретические свойства образующихся агрегатов в зависимости от концентрации ионов. Однако нельзя исключать и влияние состава липидов лецитина, так как эксперименты с ионами железа были проведены на образце лецитина № 1, а с ионами меди на образце № 2, для которых выше уже отмечались достоверные различия в количественном соотношении фракций ФЛ и обобщенных показателей состава липидов: %ФЛ в составе общих липидов и способности липидов лецитина к окислению. Несмотря на то, что размер основной фракции частиц лецитина, доля которых составляет 85,3–90,7%, в зависимости от состава его липидов различался незначительно (985±40 нм и 905±25 нм для образцов №1 и №2 соответственно), более крупные агрегаты лецитина обладали достоверно менее отрицательным ξ -потенциалом: $-24,8 \pm 0,9$ мВ и $-32,9 \pm 1,8$ мВ соответственно. Влияние концентрации ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} на мицеллообразование лецитина приведено на рисунках 4 и 5.

Сравнительный анализ представленных результатов свидетельствует о существенных различиях динамика влияния исследованных ионов металлов от их концентрации воздействовать на способность лецитина к мицеллообразованию. Это выявляется и при определении величин ξ -потенциала сформированных агрегатов лецитина (табл. 2).

Возможно, столь существенные различия Cu^{2+} и Fe^{2+} в зависимости от их концентрации оказывать воздействие на структурное состояние мембран и их электрофоретические свойства, образовывать комплексы с природными ФЛ и участвовать в регуляции окислительных процессов, выявленные уже на уровне модельных систем, обуславливают и различия их участия в регуляции клеточного метаболизма в организме [14,15].

Таблица 2. Влияние двухвалентных ионов меди и железа на величины ξ -потенциала частиц лецитина в дистиллированной воде

| Ионы металлов | Концентрации ионов, М | | | | |
|------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | 10^{-6} | 5×10^{-6} | 10^{-5} | 5×10^{-5} | 10^{-4} |
| Cu^{2+} | $-32,6 \pm 0,8$ | $-31,7 \pm 0,7$ | $-30,8 \pm 0,4$ | $-19,2 \pm 0,6$ | $-16,8 \pm 0,5$ |
| Fe^{2+} | $-35,0 \pm 0,8$ | $-30,0 \pm 0,6$ | $-30,7 \pm 0,7$ | $-25,3 \pm 1,2$ | $13,0 \pm 0,9$ |

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что качество природной воды обусловлено как концентрацией ионов тяжелых металлов, так и их способностью оказывать влияние на параметры физико-химической системы регуляции ПОЛ присутствующих в воде биологических объектов.

Список литературы / References:

1. Гуриков Ю.В., Бондаренко Н.Ф. Природная вода как окислительная среда. *Журнал физической химии*, 2001, т. 75, № 7, с. 1221-1224 [Gurikov YU.V., Bondarenko N.F. Natural water as an oxidizing system. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2001, vol. 75, no. 7, p. 1103-1006 (In Russ.)].
2. Коновалов А.И., Рыжкина И.С. Образование наноассоциатов - ключ к пониманию физико-химических и биологических свойств высокоразбавленных водных растворов. *Известия АН. Серия химическая*, 2014, № 1, с. 1-14 [Konovalov A.I., Ryzhkina I.S. Formation of nanoassociates as a key to understanding of physicochemical and biological properties of highly dilute aqueous solutions. *Russ Chem Bull*, 2014, vol. 63, pp. 1-14 (In Russ.)].
3. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Часовская Т.Е. Действие разбавленных растворов биологически активных веществ на клеточные мембраны. *Биофизика*, 2014, т. 59, № 4, с. 704-716 [Palmina N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E. Effect of dilute solutions of biologically active substances on cell membranes. *Biophysics*, 2014, vol. 59, pp. 577-587 (In Russ.)].
4. Vigo Pelfrey C. *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. Boston: CRC Press, 1991, vol. III, 300 p.
5. Shvydkiy V.O., Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I., Vichutinskaya E.V., Zaitseva N.I., Semenyak L.V. Intoxication of the Natural Aqueous Medium Resulting from Disbalan of Redox and Free Radical Intrabacin Processes. *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2017, vol. 11, no. 4, pp. 643-651, doi: 10.1134/S1990793117040248.
6. Burlakova Ye.B., Pal'mina N.P., Mal'tseva Ye.L. A physicochemical system regulating lipid peroxidation in membrane during tumor growth. *Membrane Lipid Oxidation*, 1991, vol. III, pp. 209-237.
7. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах *Радиаци. биология. Радиоэкология*, 2004, т. 44, № 3, с. 289-295 [Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. A new approach to assessment of biological consequences of exposure to low-dose radiation. *Radiat. Biologiya. Radioekologiya*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 189-295 (In Russ.)].
8. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.Ю. Роль перекисного окисления липидов в оценке последствий воздействия химических токсикантов на биообъекты. *Химическая физика*, 2021, т. 40, № 8, с. 57-63, doi: 10.1134/S19907931210500880 [Shishkina L.N., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Role of lipid peroxidation in the assessment of the consequences of exposure to chemical toxicants on bio-objects. *Russ. J. Phys. Chemistry B*, 2021, vol. 15, no 5, pp. 57-63 (In Russ.)].
9. Shvydkiy V., Dolgov S., Dubovik A., Kozlov M., Povkh A., Shishkina L., Duca G. New Aspects for the Estimation of the State of the Natural Water. *Chemistry Journal of Moldova*, 2022, vol. 17, no. 2, pp. 35-42, doi: 10.19261/cjm.2022.973.
10. Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О. Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 160-165 [Shishkina L.N., Dubovik A.S., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Model systems for the estimation of action of compobebts of the water medium on the biological objects. *Russian Journal of Biological Physics and Chemisrty*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 160-165 (In Russ.)].
11. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. Similarity Functioning of the Physicochemical Regulatory System on the Membrane and Organ Levels. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspective*, N.Y.: Nova Science Publishers, 2013, pp. 151-157.
12. Финдлея Дж.Б.С., Эванза В.Х. *Биологические мембраны: методы*. М.: Мир, 1990, 423 с. [Findley J.B.C., Evanz W.H. *Biological membranes: methods*. Moscow, 1990, 423 p. (In Russ.)].
13. Брин Э.Ф., Травин С.О. Моделирование механизма химических реакций. *Химическая физика*, 1991, т. 10, № 6, с. 830-837 [Brin E.F., Travin S.O. Modeling of mechanisms of chemical reactions. *Khimicheskaya fizika*, 1991, vol. 10, no. 6, pp. 830-837 (In Russ.)].
14. Ohgami R.S., Campagna D.R., VcDonald A., Fleming M.D. The Steap proteins are metalloredutases. *Blood*, 2006, vol. 108, no 4, pp. 1388-1394.
15. Shawki A., Anthony S.R., Nose Y., Engevik M.A., Niespodzany E.J. Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper and manganese. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physio*, 2015, vol. 309, pp. G635-G647, doi: 10.1152/ajpgi.00160.2015.

MECHANISM OF ACTION OF THE HEAVY METAL IONS ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF PHOSPHOLIPIDS

Shishkina L.N., Beletskaya P.D., Dubovik A.S., Mashukova A.V., Shvydkiy V.O.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

Kosygin str., 4, Moscow, 119334. Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Received 07.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0597

Abstract. Effect of the divalent copper and iron ions on their ability to form complexes with phospholipids and the lipid peroxidation processes intensity, to affect the self-aggregation of the natural lipids in the water medium and ζ -potential of formed particles are studied in the wide range of the metal ion concentrations. Mathematical analysis of UV-spectra of the water solutions of lecithin, metal ions and their mixtures by Gauss method is revealed that copper and iron ions form complexes with phospholipids and act on content of the oxidation products. Besides, the scale of effect depends on the ion concentration, its nature and the lipid oxidizability. The absence of the linear dependence of the ζ -potential value for the lecithin particles on the ion concentration in the water medium and the essential differences of their ability to act on size of formed by lecithin aggregates are obtained. The obtained data allow us to conclude that quality of the natural water is due to both concentrations of the heavy metal ions and their ability to act on the lipid peroxidation regulatory system parameters of the inherent in water bio-objects.

Key words: lecithin, divalent copper and iron ions, UV-spectrometry, Gauss method, formation of micelles, ζ -potential.