

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 8, № 4
2023**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 8, № 4
2023**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 8, No. 4, 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, № 4, 2023

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

А.С. Лелеков, В.С. Ключкова, А.Ю. ПоплавскаяПродукционные характеристики накопительной культуры *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin при фотоадаптации.....365**И.В. Головченко, В.Д. Ратников**

Анализ приведённой модели четырёхкомпонентной системы с учётом теории интерцепторно-протекторного действия373

В.С. Ключкова, Д.М. Шумейко, А.С. ЛелековРазмерная структура популяций *Porphyridium purpureum* и *Tetraselmis viridis* при разных режимах культивирования377

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

Г.И. Морозова, М.М. Муньос, А.В. Иванов, Т.М. Кулинич, С.А. РомановИсследование и моделирование реакций лейкоцитов в крови на γ -облучение с использованием энергетических показателей клеток иммунной сети..... 382**А.В. Брильков, Е.В. Брилькова, И.В. Жабрун, В.В. Ганусов, Ю.Ю. Логинов, А.Н. Шуваев**

Математическое моделирование экспериментальной эволюции трансгенных бактерий: «плазмидный парадокс» 392

Е.Н. Лесовая, О.Г. Садыкова, П.Н. Лобачевский

Моделирование динамики гетерогенной опухоли. Влияние облучения протонами отдельно и в сочетании с ингибитором синтеза ДНК – АраЦ.....401

А.В. Митина, Н.Г. Орлова, А.И. Дергилев, Ю.Л. Орлов

Компьютерные программы оценки сложности текста ДНК для анализа структуры геномов микроорганизмов 408

М.А. Аристархов, А.И. Дергилев, А.Ю. Потапова, П.А. Иванов-Ростовцев, Ю.Л. Орлов

Веб-сервисы для предсказания мишеней микроРНК с помощью нейронных сетей 417

В.С. Быстров, С.В. Филиппов, И.В. Лихачев, О.Р. Леденева, Е.В. Белова

Моделирование и компьютерное исследование хиральных свойств пептидных нанотрубок на основе дилейцина 424

С.В. Леонтьева

Вибронные спектры красителя оксазина 750 в водном растворе: расчетное исследование 429

А.В. Степанов, А.П. Попов, А.В. Коваленко, Д.С. Юманов, А.И. Димитриева, К.В. Сергеева, Д.А. Дементьев, А.А. Никольская, В.С. Туловчиков, Д.И. Тетельбаум

Генерация гиперзвуковых волн при облучении кремния светом, их распространение и влияние на живые организмы: компьютерное моделирование и эксперимент 440

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Zenteno Mateo, М.А. Morales, R.A. Serrano, А.М. Cervantes Tavera, R.M. Jose Israel, А.А. Hernandez Santiago

Обобщение модели термокинетического орегонатора447

А.М. Montiel del Cueto, А.А. Hernandez Santiago, М. Gonzalez Flores, E. Mendez Albores, М.А. Gonzalez Fuentes

Статистическая оценка электростимуляции бактерий с использованием метода Даннетта для микробного топливного элемента453

В.А. Туркина, П.О. Ярема, А.А. Майорова, Н.Г. Орлова, Е.А. Савина, Ю.Л. Орлов

Реконструкция генных и ассоциативных сетей заболеваний для поиска генов-мишеней... 458

О.Д. Смирнова, И.В. Калашникова, Г.А. Курбатов

Фотометрия МДА в растворах: сравнение методов прямых данных оптической плотности и анализа производных спектров оптического поглощения 468

А.С. Ботин, Д.А. Машал, Т.С. Попова, М.Г.Х. Ризк, А.В. Кордова

Углеродные наноконпозиты в медицине: графен и полиграфен как возможное средство доставки лекарств при онкологии кишечника477

А.С. Ботин, М.Г.Х. Ризк, Т.С. Попова, А.В. Кордова

Безопасность углеродных наноносителей в биомедицинских приложениях: биосовместимость графена и его производных..... 486

А.С. Ботин, А.М. Пулин, А.В. Гаврилов, Т.С. Попова, А.В. Кордова

Самоорганизация при формировании вирусов: нано-процесс сборки головок (капсидов) и укладки ДНК на примере хвостатых бактериофагов (лямбда, T4)..... 493

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

Д.С. Лавриченко, А.А. Ткачук, Е.С. Кладченко, А.Ю. Андреева

Влияние краткосрочного изменения солености на функциональные особенности гемоцитов средиземноморской мидии 505

И.А. Парфенова, А.А. Солдатов

Критические и пороговые концентрации кислорода для некоторых видов черноморских рыб (краткая справка).....510

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2023 ГОД.....515

CONTENTS

Volume 8, No. 4, 2023

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS**A.S. Lelekov, V.S. Klochkova, A.Yu. Poplavskaya**

Production characteristics of batch culture *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin during photoadaptation.....365

I.V. Golovchenko, V.D. Ratnikov

Analysis of the four-component system reduced model considering the theory of interceptor-protector action.....373

V.S. Klochkova, D.M. Shumeiko, A.S. Lelekov

Size structure of *Porphyridium purpureum* and *Tetraselmis viridis* populations under different cultivation regimes377

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS**G.I. Morozova, M.M. Muny'os, A.V. Ivanov, T.M. Kulinich, S.A. Romanov**

Investigation and modeling of leukocyte responses in the blood to γ -irradiation using energy parameters of immune network cells..... 382

A.V. Bril'kov, H.V. Brilkova, I.V. Jabrun, V.V. Ganusov, Yu.Yu. Loginov, A.V. Shuvaev

Mathematical modeling of the experimental evolution of transgenic bacteria: "plasmid paradox" 392

E.N. Lesovaya, O.G. Sadykova, P.N. Lobachevsky

Modeling of heterogeneous tumor dynamics. The influence of proton irradiation only and in combination with DNA synthesis inhibitor – AraC.....401

A.V. Mitina, N.G. Orlova, A.I. Dergilev, Y.L. Orlov

Computational tools for the DNA text complexity estimates for microbial genomes structure analysis 408

M.A. Aristarkhov, A.I. Dergilev, A.Y. Potapova, P.A. Ivanov-Rostovtsev, Y.L. Orlov

Web-services for microRNA target prediction using neural networks..... 417

V.S. Bystrov, S.V. Filippov, I.V. Likhachev, O.R. Ledeneva, E.V. Belova

Simulation and computer study of the chiral properties of peptide nanotubes based on dileucine 424

S.V. Leontieva

Vibronic spectra of oxazine 750 dye in aqueous media: a computational study..... 429

- A.V. Stepanov, A.P. Popov, A.V. Kovalenko, D.S. Yumanov, A.I. Dimitrieva, K.V. Sergeeva, D.A. Dementiev, A.A. Nikolskaya, V.S. Tulovchikov, D.I. Tetelbaum**
 Generation of hypersonic waves upon irradiation of silicon with light, their propagation and influence on living organisms: computer simulation and experiment 440

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- B. Zenteno Mateo, M.A. Morales, R.A. Serrano, A.M. Cervantes Tavera, R.M. Jose Israel, A.A. Hernandez Santiago**
 Generalization of the thermokinetic oregonator model447

- A.M. Montiel del Cueto, A.A. Hernandez Santiago, M. Gonzalez Flores, E. Mendez Albores, M.A. Gonzalez Fuentes**
 Statistical evaluation for bacteria electro-stimulation using the Dunnett method for a microbial fuel cell453

- V.A. Turkina, P.O. Iarema, A.A. Mayorova, N.G. Orlova, E.A. Savina, Y.L. Orlov**
 Reconstruction of gene and associative networks of diseases to search for target genes 458

- O.D. Smirnova, I.V. Kalashnikova, G.A. Kurbatov**
 MDA photometry in solutions: comparison of methods of direct optical density data and derivative spectroscopy..... 468

- A.S. Botin, D.A. Mashal, T.S. Popova, M.G.H. Rizk, A.V. Cordova**
 Carbon nanocomposites in medicine: graphene and polygraphene as possible drug delivery vehicle for intestinal oncology477

- A.S. Botin, M.G.H. Rizk, T.S. Popova, A.V. Cordova**
 Safety of carbon nanocarriers in biomedical applications: biocompatibility of graphene and its derivatives 486

- A.S. Botin, A.M. Pulin, A.V. Gavrilov, T.S. Popova, A.V. Cordova**
 Self-organization in viruses formation: the nano-process of assembling heads (capsids) and laying DNA on the example of tailed bacteriophages (lambda, T4) 493

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES

- D.S. Lavrichenko, A.A. Tkachuk, E.S. Kladchenko, A.Yu. Andreeva**
 The effect of short-term salinity changes on the functional features of mediterranean mussel hemocytes..... 505

- I.A. Parfyonova, A.A. Soldatov**
 Critical and lethal oxygen concentrations for some black sea fish (short review)510

- INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2023 515**

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM ВОHLIN ПРИ ФОТОАДАПТАЦИИ****Лелеков А.С.¹, Ключкова В.С.², Поплавская А.Ю.²**¹ ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0634

Аннотация. Проведено исследование светозависимого роста накопительной культуры *Phaeodactylum tricornutum*. На основе разработанной математической модели истинного спектра поглощения предложен экспресс-метод определения концентрации фотосинтетических пигментов без вмешательства в процесс роста культуры. В экспоненциальной фазе при облучённости $120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ определены максимальные удельные скорости синтеза хлорофиллов *a* и *c*, которые были в 1,4 раза выше удельной скорости роста культуры и составляли $0,3 \text{ сут}^{-1}$. На восьмые сутки эксперимента наблюдался излом кривой роста, который выражался в снижении как скорости роста, так и продукции хлорофилла. При переходе в линейную фазу роста максимальная продуктивность феодактилума составила $0,15 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, а продукция хлорофиллов – $3,44$ и $2,85 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ *a* и *c* соответственно. Получена зависимость интегрального коэффициента поглощения света от концентрации хлорофилла *a*, которая с достаточной степенью точности описывается законом Бугера-Ламберта-Бера, удельный коэффициент поглощения света составил $0,10 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ сухого вещества и $0,008 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ хлорофилла *a*. Сравнение полученных результатов с литературными данными показало, что при облучённости $120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и $602 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ удельные скорости синтеза хлорофилла *a* одинаковые, а максимальная удельная скорость роста культуры *Ph. tricornutum* пропорционально увеличивается с ростом интенсивности света с $0,23$ до $0,91 \text{ сут}^{-1}$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтез хлорофилла *a* определяется не действующей интенсивностью света, а количеством резервной биомассы, накопленной за предыдущий световой период.

Ключевые слова: моделирование, удельная скорость роста, продуктивность, облучённость, хлорофилл *a*, коэффициент поглощения света.

ВВЕДЕНИЕ

Phaeodactylum tricornutum – морская диатомовая водоросль, которая широко используется в качестве модельного объекта в области экологии, биохимии, молекулярной биологии. Известно, что данный вид синтезирует широко востребованные соединения, такие как фукоксантин, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты, и считается коммерчески целесообразным штаммом с потенциалом крупномасштабного производства [1].

Ключевым фактором, определяющим скорость синтеза того или иного клеточного компонента, является свет. При запуске накопительной культуры обычно клетки микроводорослей переносят с низкой на высокую освещённость. Известно, что в таких условиях происходят значительные изменения биохимического состава биомассы и содержания фотосинтетических пигментов [2]. Для исследуемого вида показано, что при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой $17 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на высокую $602 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ интенсивность света синтез хлорофилла *a* отсутствовал в течение 24 часов при этом происходило увеличение плотности культуры [3]. Похожие результаты получены и в работе [4], где при переносе клеток *S. costatum* с низкой $50 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на высокую $1200 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ облучённость рост концентрации хлорофилла *a* в течение 12 часов не отмечался. На сегодняшний день не установлена количественная взаимосвязь между удельной скоростью синтеза хлорофилла и количеством приходящей на освещаемую поверхность фотобиореактора световой энергией.

Диатомовые водоросли имеют специфический набор пигментов: хлорофилл *a* и *c*, фукоксантин, диациноксантин, диатоксантин и диацинохром. *Ph. tricornutum* осуществляет сбор света в основном с помощью комплексов фукоксантин-хлорофилл-белок, которые содержат три светоулавливающих пигмента, включая фукоксантин, хлорофилл *a* и хлорофилл *c* [5]. Как правило, большинство методов экстракции пигментов подразумевают под собой разрушение клеток, что является вмешательством в процессы роста культуры. Одним из способов вычисления концентрации пигментов в нативном состоянии является анализ спектров поглощения культуры микроводорослей с помощью математического моделирования [6].

Цель данной работы – на основе разработанной математической модели истинного спектра поглощения накопительной культуры *Ph. tricornutum*, определить скорости синтеза хлорофиллов *a* и *c* при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую освещённость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе кафедры «Физика» СевГУ. Объектом исследования являлась диатомовая микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1898 из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция гидробионтов Мирового океана». Выращивание культуры *Ph. tricornutum* проводили в накопительном режиме в культиваторах плоскопараллельного типа объёмом 1 л и толщиной слоя 2 см [7], используя среду для морских водорослей [8]. В качестве источника освещения использовали световую решётку из светодиодных ламп LCD Feron LB-213 мощностью 10 Вт. Освещённость поверхности фотобиореактора составляла 5 клк, что составляет 24 Вт м² или 120 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ с учётом спектра излучения лампы. Температуру культуры стабилизировали на уровне 22±1 °С. Барботаж осуществляли аквариумным компрессором Nailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Скорость барботажа – 1 л воздуха на литр культуры в минуту. Дополнительного введения углекислого газа не производилось.

Отбор проб для определения оптической плотности проводили с помощью дозатора Biohit 1 – 5 мл с разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность определяли на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. Кюветы (1 см) располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить погрешность измерения оптической плотности культуры, связанную с светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (от 30 до 70 % пропускания), пробу разбавляли дистиллированной водой. Для определения сухого веса 5 – 10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об·мин⁻¹, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 55 °С. В результате получена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , а коэффициент пропорциональности составил $k = 0,4 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$.

Пробы для определения содержания хлорофилла *a* отбирали на различных фазах роста накопительной культуры после тщательного перемешивания. Концентрацию хлорофилла *a* определяли согласно стандартной методике [3]. После отбора проб из фотобиореактора проводили центрифугирование при 3000 об./мин, надосадочную жидкость сливали. Затем добавляли 5 мл 100% ацетона. После экстракции хлорофилла в течение 18 ч при 8 °С экстракты центрифугировали и проводили измерения на спектрофотометре Unicо в кварцевых 1 см кюветках в диапазоне длин волн 400 – 800 нм с шагом 0,5 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения хлорофиллов *a* (664 нм) и *c* (630 нм) Концентрацию хлорофилла *a* определяли по формуле (1) с учётом объёмов экстрактов и массы навесок:

$$C_{\text{хл } a} = \frac{D_{664}}{\varepsilon_{\text{хл } a}} - \frac{D_{630}}{\varepsilon_{\text{хл } c}}, \quad (1)$$

где $C_{\text{хл } a}$ – концентрация хлорофилла *a*, мг·л⁻¹; D_{664} , D_{630} – значения оптических плотностей в соответствующей длине волны; $\varepsilon_{\text{хл } a}$ – экстинкция хлорофилла *a* 88,15 л·г⁻¹·см⁻¹; $\varepsilon_{\text{хл } c}$ – экстинкция хлорофилла *c* 39,2 л·г⁻¹·см⁻¹ [9].

Спектры поглощения культуры регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄). Истинный спектр поглощения культуры, компенсированный на рассеяние, определяли согласно методике [10, 11]. По истинным спектрам рассчитывали коэффициент поглощения света. Так как для разных длин волн величина коэффициента поглощения α_{sp} изменяется, то находили сумму всех значений α_{sp} в области ФАР [12]:

$$\alpha = \sum_{400}^{800} \alpha_{sp}(\lambda) d\lambda \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента получена накопительная кривая роста культуры *Ph. tricornutum*, представленная на рисунке 1 А. Для каждой точки рассчитан истинный спектр поглощения (рис. 1б). Биомасса *Ph. tricornutum* за двенадцать дней эксперимента увеличилась почти в 9 раз и достигла 1,73 г СВ·л⁻¹, что с учётом толщины фотобиореактора (2 см) составляет 34,67 г СВ·м⁻². На экспоненциальном участке накопительной кривой определено значение максимальной удельной скорости роста, на линейной фазе – максимальной продуктивности по формулам (3) [13]:

$$B = B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), \quad (3)$$

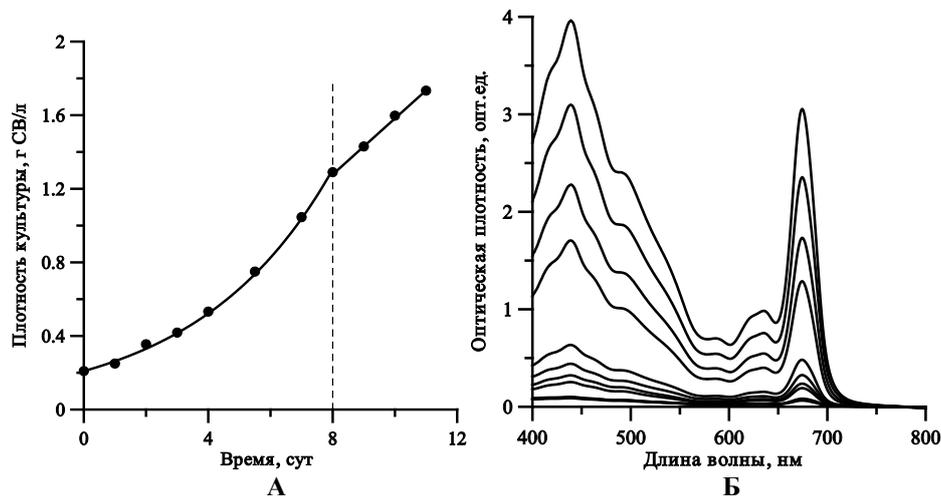


Рисунок 1. А – Накопительная кривая роста культуры *Ph. tricorutum*. Пунктирная линия показывает точку переключения лимитирующего фактора. Б – истинные спектры поглощения

где B_0 – начальная биомасса, г СВ·л⁻¹; $\mu_m = 0,23$ сут⁻¹ – максимальная удельная скорость роста; B_l – плотность культуры момент начала линейного роста t_l ; $P_m = 0,15$ г СВ·л⁻¹·сут⁻¹ – максимальная продуктивность.

Отметим, что на восьмые сутки эксперимента наблюдалось изменение как продуктивности, так и продукции пигментов (рис. 4а). Вероятно, в этот момент рост культуры был лимитирован потоком углекислого газа, подаваемого посредством барботаж, потому что используемая питательная среда рассчитана на 4 г СВ·л⁻¹, что исключает влияние биогенных элементов при достигнутых плотностях. В экспоненциальной фазе единственным ограничивающим рост фактором может являться только интенсивность света [13], поэтому продукционные характеристики феодактилума при фотоадаптации определяли именно на этом участке.

Для исследования механизмов фотоадаптации культуры микроводорослей к изменяющимся световым условиям необходимо рассматривать динамику концентраций или содержания в биомассе фотосинтетических пигментов. Следует отметить, что определение концентраций пигментов с помощью экстракции их из клеток является вмешательством в процессы роста накопительной культуры. В связи с этим нами разработана математическая модель спектра поглощения культуры *Ph. tricorutum*, которая представляет собой сумму кривых Гаусса и базируется на подходе, предложенном в [14].

На первом этапе удобно рассматривать только красную область спектра, в которую не вносят вклад каротиноиды, что существенно облегчает задачу по определению концентраций хлорофиллов *a* и *c*. Модель представляет собой сумму двух кривых Гаусса:

$$D(\lambda) = D_{chlc}(\lambda) + D_{chla}(\lambda) = C_{chlc} \cdot \varepsilon_{chlc} \cdot e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 631}{36} \right)^2} + C_{chla} \cdot \varepsilon_{chla} \cdot e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 675}{12,80} \right)^2}, \quad (4)$$

где $D(\lambda)$ – общая оптическая плотность, отн. ед; $D_{chlc}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла *c*; $D_{chla}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла *a*; C_{chlc} – концентрация хлорофилла *c*, г л⁻¹; ε_{chlc} – экстинкция хлорофилла *c* 39,2 л·г⁻¹·см⁻¹; C_{chla} – концентрация хлорофилла *a*, г л⁻¹; ε_{chla} – экстинкция хлорофилла *a* 88,15 л·г⁻¹·см⁻¹.

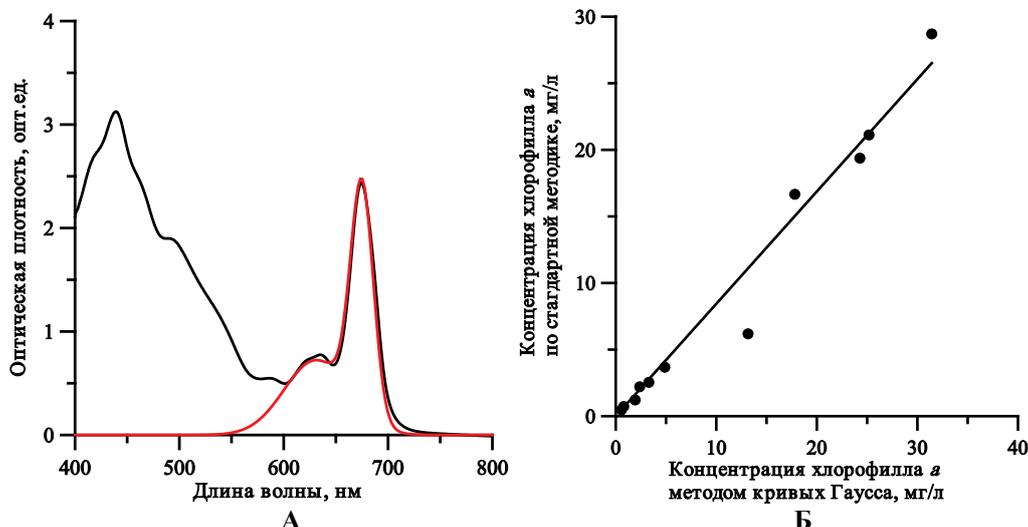


Рисунок 2. А – пример аппроксимации истинного спектра поглощения моделью (4). Б – концентрация хлорофилла *a*, определённая по стандартной методике и при помощи предлагаемой модели (4)

Для определения концентраций хлорофиллов a и c проводили аппроксимацию выражением (4) истинных спектров поглощения. Пример аппроксимации показан на рисунке 2а. Для верификации полученных результатов была проведена серия параллельных измерений концентрации хлорофилла a по стандартной биохимической методике и предлагаемой модели (4). Сравнение полученных результатов представлено на рисунке 2б. Значения концентраций хлорофилла a , полученные с помощью стандартного метода, а также концентрации, определённые методом разложения истинных спектров поглощения на кривые Гаусса, коррелируют между собой с высокой точностью ($R^2 = 0,95$).

Одним из ключевых параметров, определяющих обеспеченность клеток микроводорослей световой энергией, является интегральный (по всему диапазону ФАР) коэффициент поглощения света α . Известно, что α увеличивается с ростом плотности культуры. В простейшем случае зависимость коэффициента поглощения от плотности культуры или концентрации хлорофилла a может быть описана законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$\alpha = 1 - e^{-k_B \cdot B}, \quad \alpha = 1 - e^{-k_\pi \cdot \pi}, \quad (5)$$

где k_B – коэффициент удельного поглощения биомассы, $\text{м}^2 \text{мг}^{-1}$; k_π – коэффициент удельного поглощения хлорофилла a , $\text{м}^2 \text{мг}^{-1}$; π – концентрация хлорофилла a , мг м^{-2} .

Результаты проведённых расчётов (рис. 3) показывают, что для *Ph. tricornutum* $k_B = 0,10 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ и $k_\pi = 0,008 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$. Это означает, что при поверхностной концентрации 1 г биомассы на 1 м^2 культура поглощает 10 % света, а при поверхностной концентрации хлорофилла a 1 $\text{мг} \cdot \text{м}^{-2}$ культура поглощает около 1 % света. Аналогичные расчёты для цианопрокариаты *Arthrospira platensis* показали, что удельный коэффициент поглощения хлорофилла a составляет 0,017 $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ [15]. По литературным данным известно, что данный параметр определяется спектральным составом света, сечением поглощения хлорофилла a и варьирует от 0,005 до 0,03 $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ для различных систематических групп низших фотоавтотрофов [16].

На рисунке 4а представлена динамика концентраций хлорофиллов a и c . Как и для биомассы в целом, здесь присутствуют экспоненциальная и линейная фазы, которые описываются аналогичными (3) выражениями. Концентрация обоих пигментов увеличилась примерно в 18 раз, максимальные удельные скорости синтеза хлорофиллов a и c составили 0,32 сут^{-1} и 0,31 сут^{-1} соответственно. На линейном участке рассчитаны максимальная продукция: хлорофилла a – 3,44 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, хлорофилла c – 2,85 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. Отметим, что максимальная удельная скорость синтеза хлорофиллов в 1,4 раза выше максимальной удельной скорости роста культуры, что выражается в увеличении относительного содержания пигментов в биомассе (рис. 4б). Из-за того, что полученные значения скоростей синтеза хлорофиллов a и c почти одинаковы, соотношение этих пигментов в ходе всего эксперимента не изменялось и составляло 1,35, что соответствует литературным данным для данного вида [17].

Для сравнения полученных результатов были рассчитаны удельные скорости роста и синтеза хлорофилла a по данным [3]: на рисунке 4в, 4г представлены накопительная кривая роста феодактилума и динамика концентрации хлорофилла при переносе клеток с низкой 17 $\text{мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на высокую 602 $\text{мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ освещённость. Отметим, что при адаптации культуры к низкой освещённости концентрация хлорофилла первые сутки эксперимента уменьшалась, поэтому расчёт удельной скорости синтеза хлорофилла проводили на участке роста его концентрации. Полученные результаты сведены в таблице 1, согласно которой при облучённостях 120 $\text{мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и 602 $\text{мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ удельные скорости синтеза хлорофилла a примерно одинаковые и составляют около 0,3 сут^{-1} . При этом максимальная удельная скорость роста феодактилума пропорционально увеличивается

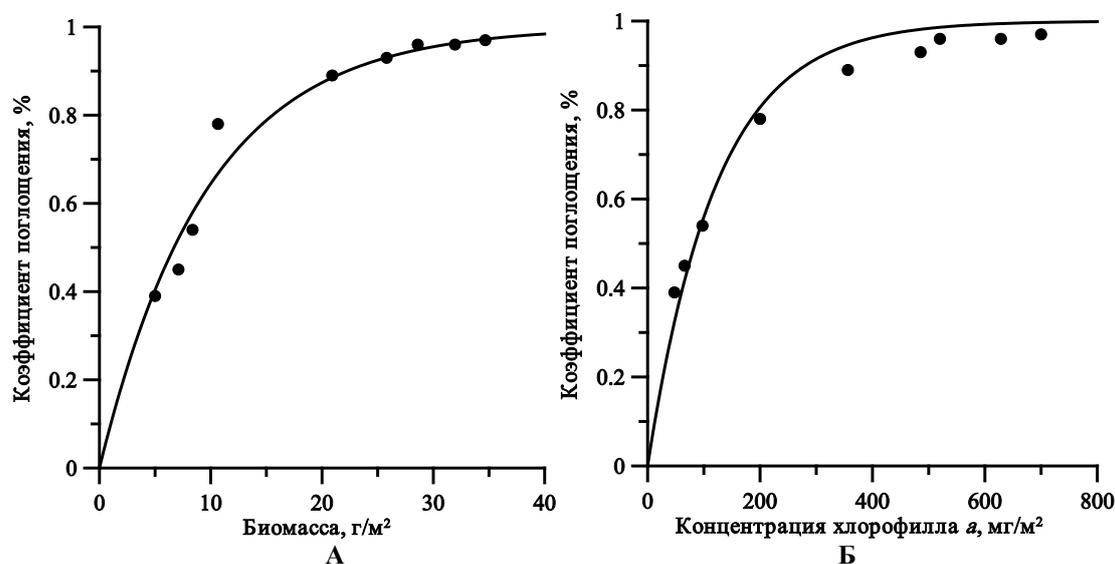


Рисунок 3. А – зависимость коэффициента поглощения света от биомассы. Б – зависимость коэффициента поглощения света от концентрации хлорофилла a . Чёрная линия – аппроксимация выражением (6)

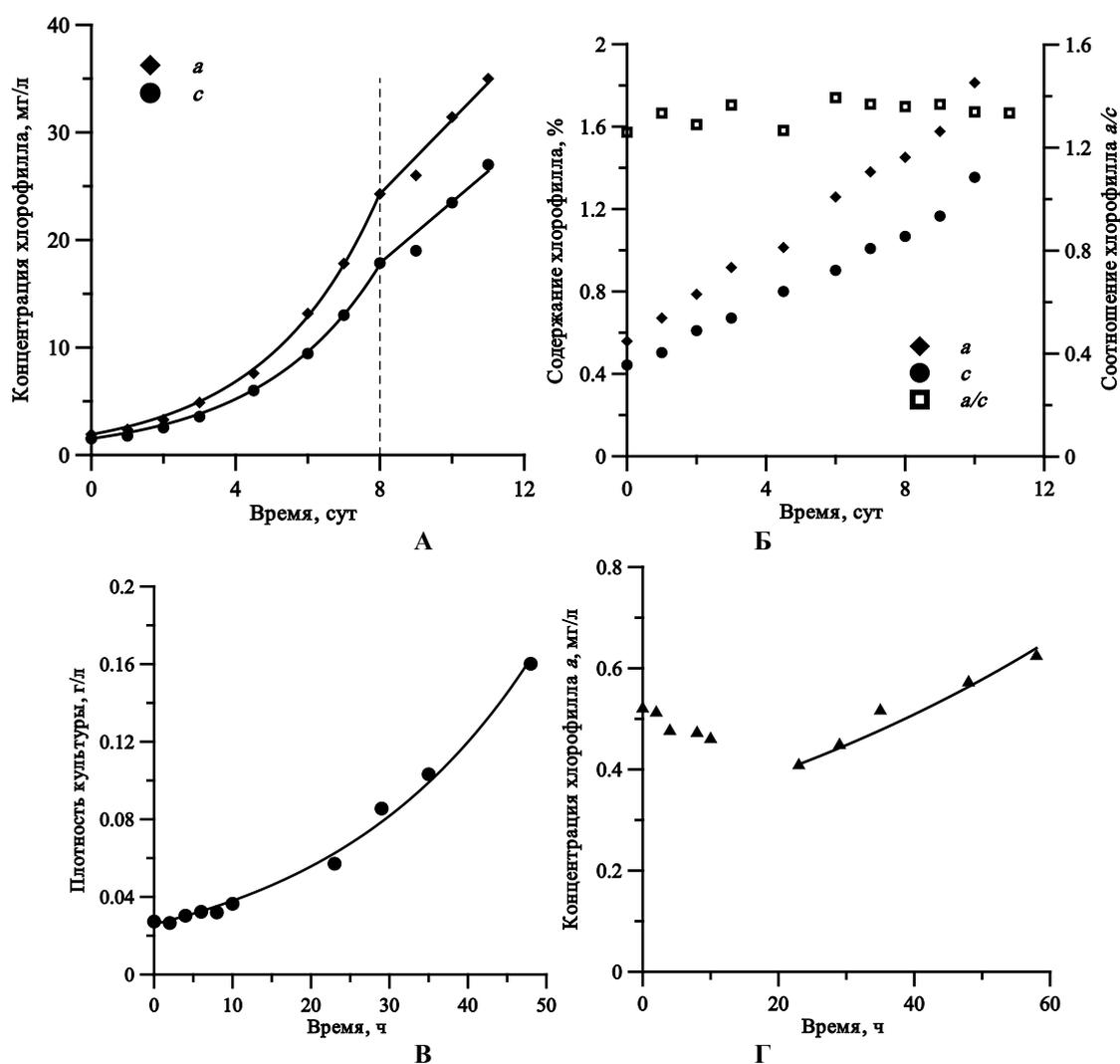


Рисунок 4. А – динамика концентраций хлорофиллов *a* и *c* в эксперименте. Пунктирная линия показывает точку переключения лимитирующего фактора. Б – динамика содержания в биомассе хлорофиллов *a* и *c* и их соотношения. В – динамика плотности культуры *Ph. tricornutum* и концентрации хлорофилла *a* (Г) по данным [3]. Аппроксимация экспоненциального роста. *Значения коэффициентов в тексте

с ростом интенсивности света. Таким образом, удельная скорость синтеза хлорофилла *a* не зависит от действующей интенсивности света, а определяется другим лимитирующим фактором. Согласно современным модельным представлениям, биомассу микроводорослей нельзя рассматривать как единое целое [18]. Исходя из двухстадийности фотоавтотрофного роста микроводорослей, ранее предложена модель [19], представляющая биомассу в виде суммы двух макромолекулярных форм – структурной и резервной. Первой стадией является собственно фотосинтез, в результате которого за счёт световой энергии происходит ассимиляция углекислоты и образуются простейшие углеводы. Эти углеводы не являются структурными компонентами клеток, а представляют собой энергетический и углеродный резерв для всех последующих метаболических реакций, в том числе для синтеза хлорофилла. На второй стадии происходит биосинтез клеточных структур за счёт энергии, выделяющейся при окислении фотосинтетических углеводов. Комплекс хлорофилл-белок представляет собой структурный компонент хлоропластов. В условиях нормального роста популяции клеток соотношение хлорофилл *a* / белок остаётся постоянным. То есть, зная концентрацию хлорофилла *a* в культуре микроводорослей возможно определить и количество белка или любого другого структурного компонента. В подтверждение таких заключений на рисунке 5 представлена прямо пропорциональная зависимость между концентрацией хлорофилла *a* и белка для накопительной культуры *Ph. tricornutum* по данным [20]. Коэффициент пропорциональности составил 0,026 мкг хлорофилла на мкг белка ($R^2 = 0,99$). Также отметим постоянство соотношения хлорофиллов *a* и *c* (рис. 4б).

Таким образом, скорость синтеза хлорофилла *a* (структурных форм биомассы) определяется количеством резервной биомассы, накопленной за предыдущий световой период. Согласно данным [3], рост концентрации хлорофилла начался только после 23 часов эксперимента, когда культура накопила необходимое количество резервов. Это позволяет объяснить равенство удельных скоростей синтеза хлорофилла *a* (табл. 1) при культивировании *Ph. tricornutum* при различной интенсивности света.

Таблица 1. Сравнительная характеристика продукционных характеристик культуры *Ph. tricornutum* при фотоадаптации

	μ_m , сут ⁻¹	μ^{π}_m , сут ⁻¹	Облучённость в эксперименте, мкЕ·м ⁻² ·с ⁻¹
Данная работа	0,23	0,32	120
По данным [3]	0,91	0,3	602

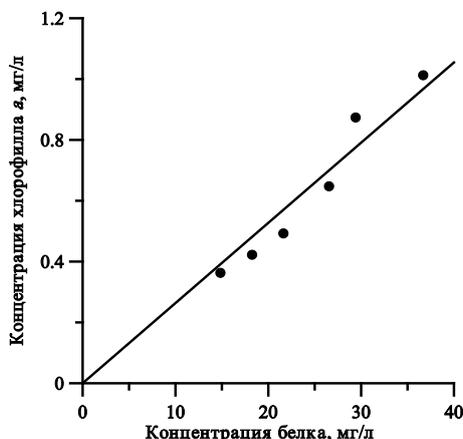


Рисунок 5. Соотношение хлорофилл *a* / белок в культуре *Ph. tricornutum* по данным работы [20]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В литературе приводятся различные механизмы фотоадаптации микроводорослей. Наиболее широко принятой является гипотеза об обратимом фотодеструктивном окислении пигментов, которая позволяет объяснить резкое снижение относительного содержания хлорофилла при переносе клеток с низкой на высокую освещённость. В данной работе фотоадаптация феодактилума рассмотрена с позиции изменения биохимического состава биомассы, определены продукционные характеристики роста накопительной культуры, указана их взаимосвязь с действующей облучённостью и световыми условиями, в которых находились клетки ранее. Такой подход, не отрицая возможной фотодеструкции пигментов, позволяет объяснить изменение содержания белков, углеводов и липидов при изменении световых условий.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Yang R., Wei D., Xie J. Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, vol. 40, no. 7, pp. 993-1009.
2. Тренкеншу Р.П. Рост микроводорослей при переходе от темноты к постоянному освещению. *Вопросы современной альгологии*, 2018, № 2(17) [Trenkenshu R.P. Growth of microalgae during the transition from darkness to constant illumination. *Questions of modern algology*, 2018, no. 2(17) (In Russ.)].
3. Паламодова О.С. Динамика фотоадаптации некоторых видов диатомовых водорослей. *Экология моря*, 2009, вып. 78, с. 70-74 [Palamodova O.S. Dynamics of photoadaptation of some species of diatom algae. *Marine Ecology*, 2009, iss. 78, pp. 70-74 (In Russ.)].
4. Anning T., MacIntyre H.L., Pratt S.M., Sammes P.J., Gibb S., Geider R.J. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.*, 2000, vol. 45, no. 8, pp 1807-1817, doi: 10.4319/lo.2000.45.8.1807.
5. Wang W., Yu L.J., Xu C., Tomizaki T., Zhao S., Umena Y., Chen X., Qin X., Xin Y., Suga M., Han G., Kuang T., Shen J.R. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*, 2019, vol. 363, no. 6427, 598 p.
6. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analyt. Chem*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
7. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т. М Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1(13) [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A. B., Novikova T. M Unified installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1(13) (In Russ.)].
8. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82 [Trenkenshu R.P.,

Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. A series of biological sciences*, 1981, vol. 5, no. 1, pp.75-82 (In Russ.).

9. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *UNESCO*, 1997, 661 p.

10. Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2000, vol. 58, pp. 123-129, doi: 10.1016/s1011-1344(00)00114-7.

11. Клочкова В.С., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Ширяев А.В., Бучельников А.С., Шупова Е.В. Изменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 543-547 [Klochkova V.S., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Shiryayev A.V., Buchelnikov A.S., Shupova E.V. Changes in the optical density spectrum of the accumulation culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Actual questions of biological physics and chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 543-547 (In Russ.)]

12. Геворгиз Р.Г., Шматок М.Г. Лелеков А.С. Расчёт КПД фотобиосинтеза у низших фототрофов. Непрерывная культура. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 31-36 [Gevorgiz R.G., Shmatok M.G. Lelekov A.S. Calculation of the efficiency of photobiosynthesis in lower phototrophs. Continuous culture. *Marine Ecology*, 2005, vol. 70, pp. 31-36 (In Russ.)].

13. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей*. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)].

14. Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С. Моделирование спектра поглощения культуры *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin в красной области. *Вопросы современной альгологии*, 2023 [Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Modeling of the absorption spectrum of *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin culture in the red region. *Questions of modern algology*, 2023 (In Russ.)].

15. Лелеков А.С., Чернышев Д.Н., Клочкова В.С. Количественные закономерности роста накопительной культуры *Arthrospira platensis*. *Математическая биология и биоинформатика*, 2022, т. 17, № 1, с. 156-170, doi: 10.17537/2022.17.156 [Lelekov A.S., Chernyshev D.N., Klochkova V.S. Quantitative regularities of growth of the accumulative culture of *Arthrospira platensis*. *Mathematical Biology and Bioinformatics*, 2022, vol. 17, no. 1, pp. 156-170 (In Russ.)].

16. Ефимова Т.В. *Действие спектрального состава света на структурные и функциональные характеристики микроводорослей*: автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2021, 28 с. [Efimova T.V. *Action of the spectral composition of light on structural and functional characteristics of microalgae*: Cand. of Biological Sciences. Sevastopol, 2021, 28 p. (In Russ.)].

17. Nymark M., Valle K.C., Brembu T., Hancke K, Winge P., Andresen K. et al. An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 11, p. e7743, doi: 10.1371/journal.pone.0007743.

18. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton. *J. Plan. Res*, 2001, vol. 23, pp. 977-997, doi: 10.1093/PLANKT/23.9.977.

19. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование динамики макромолекулярного состава микроводорослей в накопительной культуре. *Компьютерные исследования и моделирование*, 2023, т. 15, № 3, с. 739-756, doi: 10.20537/2076-7633-2023-15-3-739-756 [Lelekov A.S., Trenkenshu R.P. Modeling of dynamics of macromolecular composition of microalgae in accumulation culture. *Computer Research and Modeling*, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 739-756 (In Russ.)].

20. Jallet D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornerutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 2016, vol. 18, pp. 51-60, doi: 10.1016/j.algal.2016.05.014.

PRODUCTION CHARACTERISTICS OF BATCH CULTURE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* BOHLIN DURING PHOTOADAPTATION**Lelekov A.S.¹, Klochkova V.S.², Poplavskaya A.Yu.²**¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru² Sevastopol State University
Universitetskaya str. 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Received 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0634

Abstract. The study of light-dependent growth of batch culture *Phaeodactylum tricorutum* has been carried out. Based on the developed mathematical model of the true absorption spectrum, an express method for determining the concentration of photosynthetic pigments without interfering with the growth process of the culture was proposed. In the exponential phase at an irradiance of $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, the maximum specific synthesis rates of chlorophylls *a* and *c* were determined, which were 1,4 times higher than the specific growth rate of the culture and amounted to $0,3 \text{ day}^{-1}$. On the eighth day of the experiment, a kink in the growth curve was observed, which was expressed as a decrease in both growth rate and chlorophyll production. At the transition to the linear growth phase, the maximum productivity of *Phaeodactylum* was $0,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, and chlorophyll production was $3,44$ and $2,85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ *a* and *c*, respectively. The dependence of the integral light absorption coefficient on chlorophyll *a* concentration was obtained, which is described by the Bouguer-Lambert-Bera law with a sufficient degree of accuracy; the specific light absorption coefficient was $0,10 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter and $0,008 \text{ m}^2\cdot\text{mg}^{-1}$ chlorophyll *a*. Comparison of the results obtained with literature data showed that at irradiances of $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and $602 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ the specific rates of chlorophyll *a* synthesis are the same, and the maximum specific growth rate of *Ph. tricorutum* culture increases proportionally with increasing light intensity from $0,23$ to $0,91 \text{ day}^{-1}$. The results obtained indicate that chlorophyll *a* synthesis is determined not by the effective light intensity, but by the amount of reserve biomass accumulated during the previous light period.

Key words: modeling, specific growth rate, productivity, irradiation, chlorophyll *a*, light absorption coefficient.

АНАЛИЗ ПРИВЕДЁННОЙ МОДЕЛИ ЧЕТЫРЁХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ С УЧЁТОМ ТЕОРИИ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ

Головченко И.В., Ратников В.Д.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0635

Аннотация. В работе приводится способ количественного и качественного разбора четырёхкомпонентной системы с помощью модели, согласующейся с теорией интерцепторно-протекторного действия. Приведённая модель является развитием уже хорошо исследованных трёхкомпонентных систем и ранее демонстрировалась без символьного и графического решения. Элементы теории представляют собой полный аналитический алгоритм, который потенциально может быть применен к любой системе ДНК-специфических ароматических препаратов; компонентов, подавляющих вредоносное действие чужеродных агентов, которые препятствуют биологически значимым молекулярным взаимодействиям, или, наоборот, ингибиторов каталитических веществ. Такие аналитические модели важны в контексте создания новых лекарственных препаратов для регулирования их эффективности и нацеленности. В рамках статьи четвёртый компонент системы считается специфическим для интерцептора/протектора в трёхкомпонентной системе, выступая регулятором ингибиторной активности третьего компонента, при этом какое-либо взаимодействие с двумя другими компонентами полностью игнорируется. Полноценное графическое представление модели приведено только для случаев, когда сродство с четвёртым компонентом либо полностью отсутствует, либо бесконечно велико. При этом качественный анализ графика реальной четырёхкомпонентной системы будет проводиться по отслеживанию близости экспериментальных точек к одному из ранее упомянутых графиков.

Ключевые слова: теория интерцепторно-протекторного действия, четырёхкомпонентная модель молекулярного комплексобразования, гетероассоциация, константа равновесия, ингибирование.

Применение лекарственных препаратов в некоторых случаях может привести к негативным последствиям, поэтому современная медицина почти всегда проявляется в комбинационной терапии. Введение дополнительного агента, который непосредственно не оказывает лечебного эффекта, может вызвать каталитический эффект основной реакции, а это приведёт к уменьшению концентрации активного компонента, что поспособствует уменьшению вредоносных последствий от приёма. Альтернативным сценарием может выступать случай, когда сопровождающие вещества вводятся для того, чтобы провзаимодействовать со здоровыми клетками, участками ДНК и т.д., которые тоже являются мишенями для основного компонента лекарственного комплекса. Таким образом, добавки оказывают протекторное действие, исключая (или уменьшая) взаимодействие со здоровыми тканями, что вновь приводит к уменьшению цитотоксичности.

С точки зрения биологического эффекта существуют и другие варианты развития событий в многокомпонентных системах. Это доказывает необходимость детального качественного и количественного изучения таких комплексов, которое порой является весьма нетривиальной задачей.

Обычно в фармакологии связывание лекарственных препаратов описывается потенциальной дозой, эффективностью и аффинностью [1].

Потенциальная доза – количество препарата, необходимое для получения эффекта заданной интенсивности. Различия в потенциальной дозе препаратов оцениваются путем сравнения с концентрацией, которой соответствует половинный эффект от максимально возможного

Эффективность – способность препарата вызывать максимальный отклик от введения. Различия в эффективности препаратов оцениваются путем сравнения различий в максимальном ответе при высоких дозах или концентрациях препарата.

Аффинность можно сравнить с прочностью, с которой лекарство связывается с рецептором. Статистически ее можно описать как вероятность того, что молекула препарата свяжется с доступным рецептором в любой момент времени. Эффективность – неотъемлемое свойство агониста, определяющее его способность вызывать биологический эффект. По определению, это свойство препарата, а не рецептора или ткани. Аффинность связывает препарат с рецептором, а эффективность определяет, что происходит после связывания препарата.

Модели связывания лигандов имеют широкий спектр применения в клинической фармакологии:

- описание системы взаимодействующих элементов нескольких лигандов с несколькими связывающимися участками рецепторов;

- польза в процессе разработки лекарств для определения сайтов связывания рецепторов;

- выявление и демонстрация нескольких сайтов связывания и рецепторов одновременно.

- сравнения сродства различных лигандов к одному и тому же рецептору и т.д.

При анализе многокомпонентных систем хорошо себя показывает теория интерцепторно-протекторного

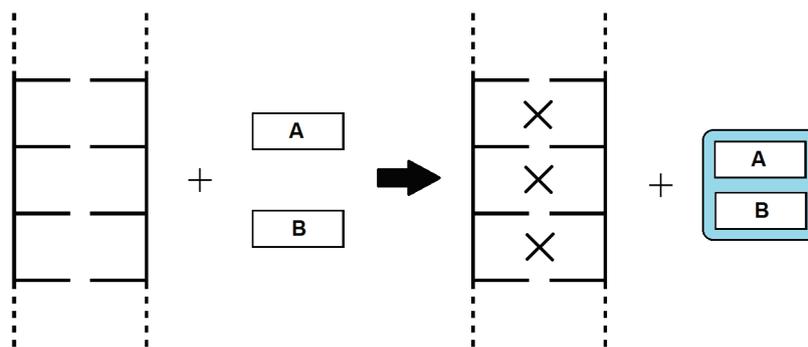


Рисунок 1. Схематическое изображение интерцепторного механизма действия препарата В на комплексообразование лиганда А с полимером

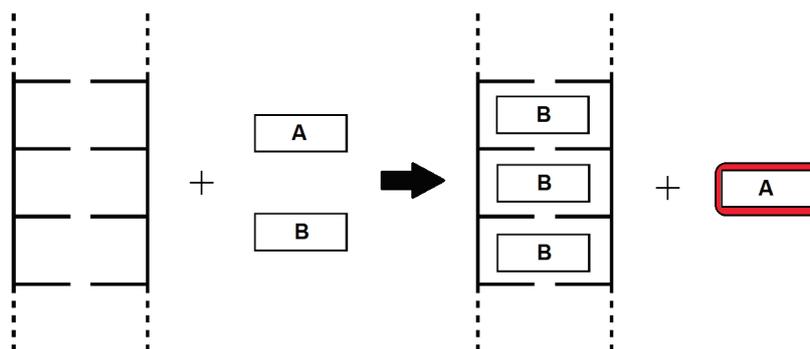


Рисунок 2. Схематическое изображение протекторного механизма действия препарата В на комплексообразование лиганда А с полимером

действия. Суть этой теории заключается в анализе зависимости относительного изменения мольной доли продуктов основной реакции (терапевтической или вредоносной) от концентрации сторонних компонентов в гетерокомплексе.

Объяснить влияние примесей (рис. 1, *A*; рис. 2, *A*) можно на примере связывания ароматического лиганда (рис. 1, *A*; рис. 2, *A*) с нуклеотидной последовательностью путём интеркаляции (встраивание лиганда между парами оснований). У примесного агента есть возможность связаться с терапевтическим лигандом, тем самым уменьшив доступную концентрацию лекарства. В этом случае лиганд *B* выступает в качестве перехватчика (интерцептора) лиганда *A* (рис. 1) [1-4].

Если лиганд *B* вместо этого связывается с полимером, блокируя сайты посадки для лекарственного лиганда, то такой способ называют протекторным (защитным) (рис. 2). Обычно вероятность одного из этих процессов преобладает, что можно в первом приближении проследить по равновесным константам комплексообразования для каждой реакции, и в этом случае вторым процессом можно пренебречь, что значительно упрощает получение аналитического решения, описывающего многокомпонентную систему [2].

Рассмотрим четырёхкомпонентную систему, изображённую на рисунке 3. Представим, что комплексообразование компонентов *A* и *N* (рис. 3, зелёные кружки) является биологически значимой реакцией, характеризующейся константой K_{AN} . Лиганд *B* (рис. 3, красный кружок) препятствует протеканию этой реакции по описанным ранее механизмам. В рамках модели лиганд *C* имеет сродство только с лигандом *B*. Таким образом данную задачу можно свести к хорошо изученной трёхкомпонентной системе, в которой концентрация свободной формы лиганда перехватчика будет являться функцией в том числе и от концентрации лиганда *C*.

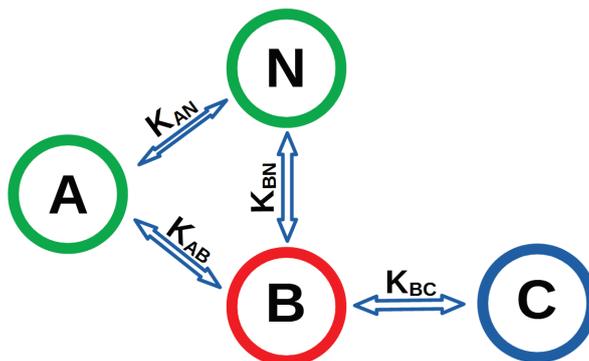


Рисунок 3. Приведённая схема реакции четырёхкомпонентной системы

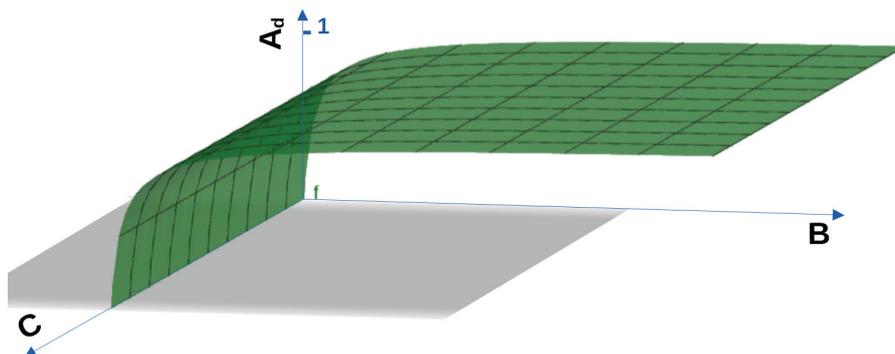


Рисунок 4. График зависимости Ad фактора от концентрации примесей В и С при бесконечно малом значении равновесной константы K_{bc}

Закон сохранения массы для данной системы будет иметь следующий вид:

$$\begin{cases} A = a + K_{AB}ab + K_{AN}an \\ N = n + K_{AN}an + K_{BN}bn \\ B = b + K_{AB}ab + K_{BN}bn + K_{BC}bc \\ C = c + K_{BC}bc \end{cases} \quad (1)$$

где индексы констант K_{ij} отвечают за комплексообразование соответствующих лигандов; A, B, C, N – начальные концентрации каждого компонента в растворе; a, b, c, n – концентрации мономерных (свободных) форм каждого компонента.

Фактор Ad показывает относительную долю вытесненного лиганда А от концентрации примесей. Варьируется он в пределах от 0 (нет влияния других лигандов) до 1 (весь терапевтический эффект пропадает).

$$Ad = \frac{f_{off}(an) - f_{on}(an)}{f_{off}(an)}, \quad (2)$$

где $f = \frac{K_{AN}an}{A}$ – мольная доля комплекса из компонентов A и N ; f_{off} – мольная доля при «выключенных» интерцепторном и протекторном механизмах; f_{on} – мольная доля при «включенных».

Выразив из четвертого уравнения системы c и подставив его в третье, получаем следующую зависимость:

$$B = b + K_{AB}ab + K_{BN}bn + K_{BC}b \frac{c}{1 + K_{BC}b}, \quad (3)$$

которая отличается от уравнений для трёхкомпонентной системы последним слагаемым. Легко заметить, что если K_{BC} равна 0 (первый из предельных случаев, которые мы рассмотрим), другими словами, между лигандами B и C отсутствует взаимодействие, то мольная доля терапевтического комплекса никак не будет зависеть от концентрации четвертого компонента.

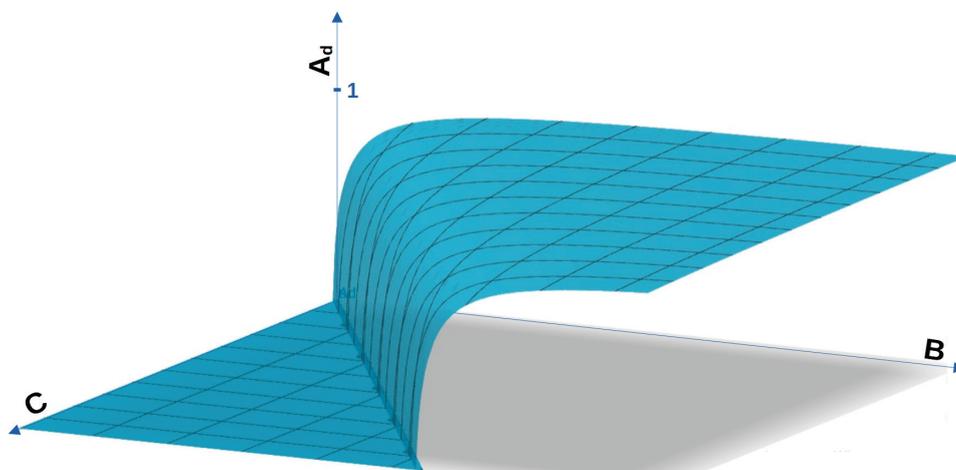


Рисунок 5. График зависимости Ad фактора от концентрации примесей В и С при бесконечно большом значении равновесной константы K_{bc} .

При бесконечно малом значении K_{BC} график зависимости фактора Ad от концентрации примесей B и C будет иметь вид, представленный на рисунке 4.

Второй крайний случай, когда K_{BC} стремится к бесконечности. В этом случае четвертое слагаемое $K_{BC}b \frac{C}{1+K_{BC}b}$ в пределе будет равно C , а уравнение примет вид:

$$B - C = b + K_{AB}ab + K_{BN}bn, \quad (4)$$

т.е. концентрация перехватчика будет равна $B_{\infty}=(B-C)$, если $B \geq C$, и $B_{\infty}=0$, если $C > B$. С учётом преобразований график зависимости фактора Ad от концентрации примесей B и C будет иметь вид, представленный на рисунке 5.

Таким образом можно определять эффективность и средство узкоспециализированного четвёртого компонента, не имея полноценного аналитического решения, а лишь анализируя положение фактора Ad для конкретных значений начальных концентраций относительно двух крайних случаев для константы гетероассоциации.

Список литературы / References:

1. Salahudeen M.S., Nishtala P.S. An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharm J.*, 2017, vol. 25, iss. 2, pp. 165-175.
2. Evstigneev M.P. The theory of interceptor-protector action of DNA binding drugs. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2019, vol. 149, pp. 131-146.
3. Evstigneev M.P. Physicochemical mechanisms of synergistic biological action of combinations of aromatic heterocyclic compounds. *Organic Chemistry International*, 2013, vol. 2013.
4. Salo V.A. et al. Interceptor potential of C60 fullerene aqueous solution: a comparative analysis using the example of the antitumor antibiotic mitoxantrone. *European Biophysics Journal*, 2022, vol. 51, no. 3, pp. 297-307.

ANALYSIS OF THE FOUR-COMPONENT SYSTEM REDUCED MODEL CONSIDERING THE THEORY OF INTERCEPTOR-PROTECTOR ACTION GOLOVCHENKO I.V., RATNIKOV V.D.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0635

Abstract. This paper provides a means of analysing a four-component system using a model consistent with the theory of interceptor-protector action. The given model is a further development of already well-studied three-component systems and was previously demonstrated without a symbolic and graphical solution. Elements of the theory present a complete analytical algorithm that can potentially be applied to any system of DNA-specific mixtures of aromatic drugs; components that inhibit the deleterious effects of noxious agents that interfere with biologically relevant molecular interactions, or conversely, inhibitors of catalytic agents. Such analytical models are important in the context of designing new drugs to regulate their efficacy and targeting. For the purposes of this article, the fourth component of the system is considered to be specific to the interceptor/protector in a three-component system, acting as a regulator of the inhibitory activity of the third component, with any interaction with the other two components being completely ignored. A full graphical representation of the model is given only for the extreme cases where the affinity to the fourth component is either completely absent or infinite. The qualitative analysis of the graph of the real four-component system is carried out by tracking the proximity of the experimental points to one of the previously mentioned graphs.

Key words: theory of interceptor-protector action, four-component molecular complexation model, hetero-association, equilibrium constant, inhibition.

РАЗМЕРНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* И *TETRASELMIS VIRIDIS* ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Клочкова В.С.¹, Шумейко Д.М.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0636

Аннотация. В работе проведено исследование размерной структуры культур морских красной *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross и зелёной *Tetraselmis viridis* Rouch микроводорослей при накопительном и квазинепрерывном режимах культивирования с различной облучённостью. С помощью лазерного анализатора «Ласка-ТМ» и микроскопа с камерой определено распределение клеток по размерам. На основе выборки из 50 случайных клеток находили среднее значение диаметра. Показано, что в накопительном режиме культивирования размер клеток остаётся постоянным. Средний диаметр клеток порфиридиума составлял от 8,9 до 9,3 мкм, а тетраселмиса – от 6,8 до 7,4 мкм. Полученный результат подтверждается литературными данными по культивированию микроводоросли *Chlorella protothecoides*. Квазинепрерывный режим осуществляли в экспоненциальной фазе роста, когда плотность культуры невелика и единственный лимитирующим фактором является интенсивность светового потока. Экспериментально установлено, что с повышением облучённости средний диаметр клеток обеих микроводорослей увеличивается. Показано, что значения средних диаметров, полученные на лазерном анализаторе, завышены, чем результаты, полученные с помощью микроскопа. Полученные данные могут послужить основой при разработке моделей роста накопительной культуры микроводорослей. Постоянство среднего размера клеток позволяет отказаться от сложных распределённых моделей популяции клеток.

Ключевые слова: порфиридиум, тетраселмис, размерная структура, средний диаметр клеток, облучённость.

ВВЕДЕНИЕ

Рост микроводорослей в культуре напрямую связан с ростом каждой отдельной клетки, а также с её клеточным циклом, длительность которого зависит от физико-химических свойств среды. Интенсивность света является основным фактором, который определяет скорость роста микроводорослей и размерную структуру популяции. В литературе практически отсутствуют данные о механизмах влияния света на жизненный цикл клетки микроводорослей в условиях интенсивной культуры. Красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* может рассматриваться как модельный объект при проведении подобных исследований благодаря практически сферическим клеткам от 4 до 9 мкм в диаметре, которые окружены мембраной с сульфатной полисахаридной оболочкой [1]. С практической точки зрения порфиридиум представляет интерес благодаря содержанию таких биологически активных веществ как: фотосинтетические пигменты (хлорофилл *a*, каротиноиды, В-фикоэритрин), внеклеточные экзополисахариды, а также ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновая (накапливается до 36% от общего количества жирных кислот) и эйкозапентаеновая кислоты [2]. Клетка зелёной морской микроводоросли *Tetraselmis viridis* имеет симметричную, эллиптическую, слабо выпуклую с одной и вогнутую, с другой стороны, форму, её длина 3-13 мкм, ширина 2-10 мкм и толщина 3,5 мкм [3,4]. *T. viridis* содержит биологически активные вещества, необходимые для полноценного развития и жизни гидробионтов, поэтому он используется в качестве кормовой добавки. Пигментный состав тетраселмиса представлен хлорофиллами *a* и *b*, которые характерны для Chlorophyta, а также каротиноидами: β-каротин, зеоксантин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин) [3].

Цель работы: исследовать размерную структуру морских микроводорослей *P. purpureum* и *T. viridis* при накопительном и квазинепрерывном режиме культивирования, а также выявить зависимость среднего диаметра клеток от облучённости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы выполняли на базе кафедры «Физика» СевГУ. В работе использовались морские микроводоросли: красная *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross и зелёная *Tetraselmis viridis* Rouch. Обе культуры выращивали в накопительном и квазинепрерывном режимах. в плоскопараллельном фотобиореакторе объёмом 1,2 л, рабочая толщина культуры – 2 см. Нижняя грань фотобиореактора расположена под углом с целью улучшения перемешивания суспензий. Сверху культиватор закрывался пластиковой крышкой, в которой было выполнено отверстие для подачи воздуха, а также был оснащён системой охлаждения («водяной рубашкой»), обеспечивающей поддержание температуры. Использовали среду для морских водорослей [5].

Таблица 1. Значения переведённой облучённости и соответствующая ей освещённость

Лампы	клк	1	3	5	7	10
Светодиодные	Вт/м ²	5	14	23	32	45
Люминесцентные		3	10	17	24	34

Температуру стабилизировали на уровне 27 ± 1 °С. Барботаж культуры осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Скорость подачи воздуха составляла 1 л/л культуры в минуту. Дополнительного введения углекислого газа не производилось. В качестве источников освещения использовали горизонтальную световую решётку из светодиодных LCD Feron LB-213 мощностью 10 Вт (для *P. purpureum*) и люминесцентных Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт (для *T. viridis*) ламп. В таблице 1 представлены значения интенсивностей света, используемых в эксперименте.

Оптическую плотность культуры рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. Пробы с оптической плотностью выше единицы предварительно разбавляли свежей питательной средой, подбирая коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-2 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2 – 0,6 единиц)

Для определения сухого веса 5 – 10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об·мин⁻¹, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 55 °С. В результате получена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , а коэффициент пропорциональности составил: для *P. purpureum* $k = 0,7$ г·СВ л⁻¹·ед. опт. пл⁻¹, а для *T. viridis* – $k = 0,9$ г·СВ л⁻¹·ед. опт. пл⁻¹.

Размерную структуру определяли с помощью лазерного анализатора «Ласка-ТМ» и микроскопа с камерой. На основе выборки из 50 случайных клеток находили среднее значение диаметра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента были получены накопительные кривые культур *P. purpureum* и *T. viridis*, представленные на рисунке 1. Пунктирными линиями условно были отмечены фазы роста: экспоненциальной, линейной, замедления, стационарной и фаза отмирания. На рисунке 2 представлена динамика среднего диаметра клеток для обоих видов водорослей, полученных на каждой фазе роста.

В течение экспериментов на каждой фазе роста накопительных кривых культур *P. purpureum* и *T. viridis* определялась размерная структура клеток. На экспоненциальной, линейной, замедления, стационарной и фазе отмирания для обоих исследуемых объектов средний диаметр клеток практически не изменялся: для порфиридиума размеры клеток варьировались от 8,9 до 9,3 мкм, что соответствует литературным данным для этого вида [6], а для тетраселмиса – от 6,8 до 7,4 мкм. Аналогичные данные приводятся в литературе для микроводоросли *Chlorella protothecoides* [7]. Авторами цитируемой работы показано, что средний диаметр клеток по ширине и по длине заметно не изменялся с течением времени. Размер клеток приблизительно соответствовал нормальному распределению. Во всех случаях средний диаметр клеток находился в пределах 3,93–4,12 мкм в длину и 2,95–3,15 мкм в ширину, соответственно.

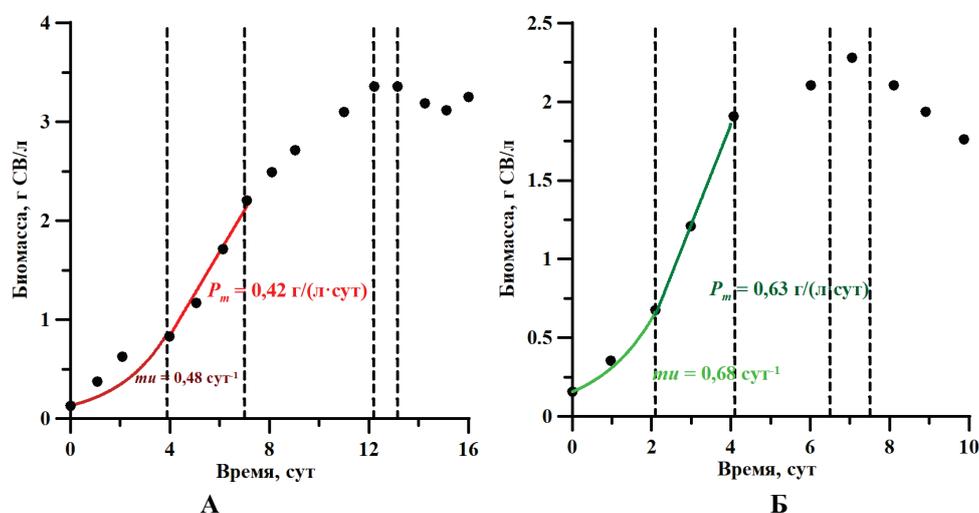


Рисунок 1. Накопительные кривые роста микроводорослей *P. purpureum* (А) при 23 Вт/м² и *T. viridis* (Б) при 17 Вт/м²

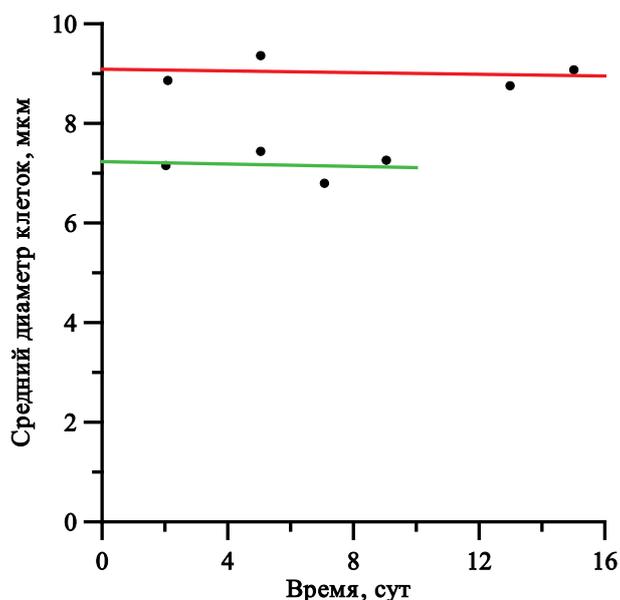


Рисунок 2. Средний диаметр клеток накопительных культур *P. purpureum* и *T. viridis*

Следующую серию экспериментов проводили в квазинепрерывном режиме культивирования. Обмен средой выполняли на экспоненциальной фазе, так как на ней оптическая плотность культуры невелика и можно изучать зависимость размерной культуры только от одного лимитирующего фактора – облучённости [8]. На рисунке 3 для примера представлены квазинепрерывные кривые роста культур *P. purpureum* при 23 Вт/м², и *T. viridis* при 17 Вт/м².

В таблице 2 представлены значения среднего диаметра клеток на экспоненциальной фазе роста, полученных для каждого значения облучённости для обоих видов водорослей. Очевидно, что с ростом облучённости увеличивается средний диаметр клеток культур *P. purpureum* и *T. viridis*. Данный вывод подтверждается с литературными данными [9], в которой показано, что размер клеток морской микроводоросли *Nannochloropsis* sp. с ростом интенсивности света увеличивался. Кроме того, следует обратить внимание на то, что значения средних диаметров, полученные на лазерном анализаторе, завышены, чем результаты, полученные с помощью микроскопа. Вероятно, это обусловлено тем, что калибровка лазерного анализатора осуществляется с помощью пластиковых шариков, которые имеют совсем другие оптические свойства, чем клетки исследуемого объекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в условиях обеспеченности биогенными элементами размеры клеток не зависят от фазы роста накопительных культур *P. purpureum* и *T. viridis*. Показано, что при выращивании культур в квазинепрерывном режиме, средний диаметр клеток будет увеличиваться с ростом облучённости. Полученные данные могут послужить основой при разработке моделей роста накопительной культуры микроводорослей.

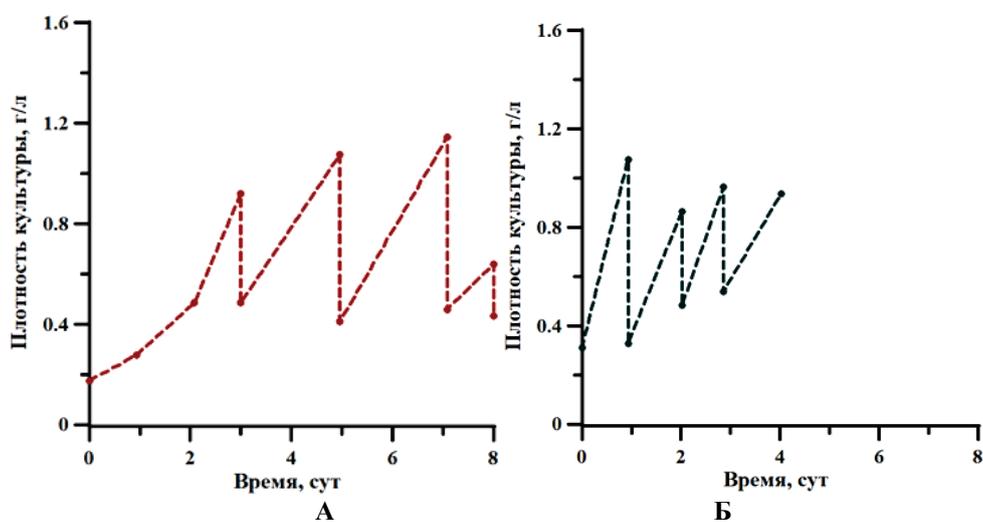


Рисунок 3. Квазинепрерывные кривые роста микроводорослей *P. purpureum* (А) при 23 Вт/м² и *T. viridis* (Б) при 17 Вт/м²

Таблица 2. Зависимость среднего диаметра и концентрации клеток культуры *P. purpureum* и *T. viridis* от облучённости. $d_{cp} (м)$ – средний диаметр клеток, измеренных на микроскопе; $d_{cp} (л)$ – средний диаметр клеток, измеренных на лазерном анализаторе «Ласка-ТМ»

Микроводоросль	$E, \text{Вт/м}^2$	$d_{cp} (м), \text{мкм}$	$d_{cp} (л), \text{мкм}$
<i>P. purpureum</i>	5	8,64	9,51
	14	8,92	9,6
	23	9,04	10,25
<i>T. viridis</i>	3	4,01	6,16
	10	4,21	6,75
	17	4,22	7,03
	24	4,25	7,14
	34	4,30	7,18

Постоянство среднего размера клеток позволяет отказаться от сложных распределённых моделей популяции клеток. Рост культуры может быть описан простейшими линейными дифференциальными уравнениями, основным параметром которых является биомасса совокупная масса клеток культуры.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Dermoun D. et al. Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. *Bioresource technology*, 1992, vol. 42, no. 2, pp. 113-117.
2. Akimoto M., Shirai A., Ohtaguchi K., Koide K. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1998, vol. 73, pp. 269-278.
3. Чурилова Т.Я., Финенко З.З., Акимов А.И. Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008 [Churilova T.Ya., Finenko Z.Z., Akimov A.I. *Black Sea microalgae: problems of biodiversity conservation and biotechnological use*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2008 (In Russ.)].
4. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Наука. Сиб. отд-ние, 1980 [Belyanin V.N., Sidko F.Y., Trenkenshu A.P. *Energetics of photosynthetic culture of microalgae*. Nauka. Siberian Branch, 1980 (In Russ.)].
5. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82 [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Proceedings of the Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR. Series of Biological Sciences*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75-82 (In Russ.)].
6. Орлова Т.Ю., Сабутская М.А., Маркина Ж.В. Изменение ультраструктуры морских микроводорослей из разных отделов в накопительной культуре. *Биология моря*, 2019, т. 45, № 3, с. 188-196, doi: 10.1134/S0134347519030100 [Orlova T.Y., Sabutskaya M.A., Markina J.V. Changes in the ultrastructure of marine microalgae from different departments in the accumulation culture. *Marine Biology*, 2019, vol. 45, no. 3, pp. 188-196 (In Russ.)].
7. Zhao J.M., Ma C.Y., Liu L.H. Temporal scaling of the growth dependent optical properties of microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2018, vol. 214, pp. 61-70.
8. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)].
9. Wahidin S., Idris A., Shaleh S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*, 2013, vol. 129, pp. 7-11.

SIZE STRUCTURE OF *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* AND *TETRASELMIS VIRIDIS* POPULATIONS UNDER DIFFERENT CULTIVATION REGIMES**Klochkova V.S.¹, Shumeiko D.M.¹, Lelekov A.S.²**¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str. 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

Received 03.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0636

Abstract. The study of the size structure of cultures of marine red *Purphurium purpurium* (Vogu) Ross and green *Tetraselmis viridis* Rouch microalgae under batch and quasi-continuous modes of cultivation with different irradiance was carried out. Cell size distribution was determined using a laser analyzer "Laska-TM" and a microscope with a camera. Based on a sample of 50 random cells, the mean diameter value was found. It is shown that in the accumulative mode of cultivation the cell size remains constant. The average cell diameter of *Porphyridium* cells ranged from 8.9 to 9.3 μm , and that of *Tetraselmis* from 6.8 to 7.4 μm . The result obtained is supported by literature data on cultivation of the microalga *Chlorella protothecoides*. The quasi-continuous regime was carried out in the exponential growth phase, when the culture density is low and the only limiting factor is the light flux intensity. It was experimentally found that the average cell diameter of both microalgae increased with increasing irradiance. It is shown that the values of average diameters obtained on the laser analyzer are overestimated than the results obtained using a microscope. The obtained data can serve as a basis for the development of growth models of the accumulative culture of microalgae. The constancy of the average cell size makes it possible to abandon complex distributed cell population models.

Key words: *Porphyridium*, *Tetraselmis*, size structure, average cell diameter, irradiation.

ИССЛЕДОВАНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ НА γ -ОБЛУЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК ИММУННОЙ СЕТИ

Морозова Г.И.¹, Муньос М.М.¹, Иванов А.В.², Кулинич Т.М.², Романов С.А.³

¹ Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ, e-mail: gimorozova@mail.ru

² ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии МЗ РФ
ул. Профсоюзная, 86, г. Москва, 117837, РФ

³ ООО «ONTEGRA»

2-я ул. Энтузиастов, 5, корп. 4, г. Москва, 111024, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0637

Аннотация. Биофизический контроль радиационного воздействия на человека в зонах ядерных реакторов, в условиях космического полета, а также при проведении лучевой терапии на сегодня является актуальным. В связи с этим в данной работе решались следующие задачи: 1) исследование реакций лейкоцитов в крови после однократного воздействия γ -излучения ^{60}Co на кровь *in vitro*; 2) математическое моделирование быстрых иммунных ответов на облучение на основе энергетических показателей клеток в крови. С помощью люминесцентного микроскопа распознавали и исследовали лимфоциты и нейтрофилы в мазках донорской венозной крови, витально окрашенной катионным зондом 4-(*n*-диметиламинстирил)-1-метилпиридинием (ДСМ). Энергетическую активность клеток (ЭА) в каждой популяции характеризовали суммой трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальной мембранах, и оценивали по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ в митохондриях и ядрах клеток. Доза-зависимые эффекты γ -облучения оценивали на основе данных компьютерного анализа цифровых флуоресцентных изображений клеток. В экспериментах установлено, что изменение ТМП лейкоцитов после γ -облучения крови в дозах 1Гр-5Гр зависит от исходной ЭА клеток. Выявлена S-образная дозовая зависимость для ЭА облученных лимфоцитов. Наибольший эффект деэнергизации клеток обнаружен после облучения крови в дозе 4Гр. Предложена модель T-зависимых иммунных реакций в виде системы нелинейных дифференциальных уравнений до и после облучения крови, где концентрации для пяти популяций клеток заменены на флуоресцентные переменные, которые отражают количество активных митохондрий в каждой популяции. Такая модель адекватна для описания быстрой фазы иммунного ответа после одноударного радиоактивного облучения организма.

Ключевые слова: γ -облучение крови, нейтрофилы, лимфоциты, мембранный потенциал, активность митохондрий, флуоресцентный зонд ДСМ, энергетические показатели, модель иммунитета.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время радиобиологические исследования приобретают всё большую актуальность в связи с необходимостью контроля за радиационной безопасностью в зонах расположения атомных реакторов, в условиях космического полета, а также в связи с использованием радиоактивных материалов в науке и в медицине. Все это обусловило необходимость изучения эффектов низкоинтенсивного хронического облучения и однократных радиационных воздействий на организм. В результате этих исследований был выявлен нелинейный характер зависимости радиобиологических эффектов от дозы радиации, открыта повышенная чувствительность млекопитающих к малым дозам радиации, установлено, что повреждение важных систем организма – кроветворной (гемопозза) и иммунной, определяют течение лучевой болезни и возникновение отдаленных последствий облучения [1,2]. В связи с этим актуально использование биологически мотивированных математических моделей на основе параметров, позволяющих установить причинно-следственные связи между формированием радиобиологических эффектов на различных уровнях биологической организации.

Кровь является информативным и удобным тест-объектом для исследования и моделирования динамики кооперативных иммунных реакций на фоне воздействий, в том числе радиационного облучения (РО). В ряде экспериментов установлено, что зрелые (дифференцированные) клетки, как правило, весьма резистентны к острому одноударному γ -облучению, когда не происходит их последующая гибель через сутки и более [1]. В то же время в других исследованиях *in vitro* [2] после γ -облучения крови уже при дозе 1Гр обнаружена общая тенденция к росту относительной доли мононуклеаров с повышенным синтезом внутриклеточной формы ИЛ-1, ФНО или ИЛ-4, регулирующих апоптоз.

С другой стороны, клетки крови как периферическое звено иммунной сети, являются естественными датчиками, которые могут сигнализировать о характере и степени внешнего воздействия по быстрым изменениям в мембранах и митохондриях. В биофизических и биохимических исследованиях выявлена ключевая роль перекисного окисления липидов (ПОЛ) в деактивации транспортных АТФ-аз в мембранных каналах,

деэнергизации митохондрий (снижения протонного потенциала), снижение $\Delta\phi$ на плазматической мембране клеток [3]. Установлено, что ПОЛ является важным фактором, запускающим цепь быстрых изменений ионного гомеостаза в клетках, причём, эти процессы могут быть тесно связаны с влиянием радиации на гемоглобин эритроцитов и на их способность переносить кислород [4]. В результате в крови может происходить закисление, которое влияет на транспорт ионов через клеточные мембраны и на энергетику митохондрий.

В свете выше изложенного целесообразно применение биофизических методов, позволяющих исследовать изменение мембранных и энергетических характеристик лейкоцитов крови после острого РО. В серии работ показаны универсальные возможности флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда ДСМ⁺[4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния] [5] как цветного флуорохрома для визуализации мембран митохондриального ретикулума и ядерных структур в живых клетках и как молекулярного инструмента для оценки структурно-энергетического статуса клеток [5-13]. В соответствии с теорией Нернста перераспределение катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром в клетках определяется соотношением суммы отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальной мембранах и положительного ТМП на ядерной мембране [7,12,14,15]. С помощью ДСМ установлено, что лимфоциты и нейтрофилы закономерным образом изменяют их ТМП и митохондриальную активность в ответ на различные физико-химические воздействия, в частности, на электромагнитные облучения [8,9].

На основе разработанных ранее флуоресцентных методик с зондом ДСМ имеется возможность исследовать энергетические состояния иммунных клеток разных типов и оценивать величины их ТМП непосредственно в цельной нативной крови при воздействиях *in vitro* или *in vivo* [6,11,16].

С другой стороны, математическое моделирование иммунных реакций на РО должно иметь практическую направленность, связанную с возможностью регистрации динамики структурно-энергетического баланса различных клеточных звеньев одновременно в одном и том же образце крови. Энергетические показатели иммунных клеток в нативной крови перспективны как экспериментальная основа для моделирования различных фаз иммунного ответа при внешних воздействиях. В связи с этим был предложен энергетический подход к описанию клеточно-гуморального иммунитета на основе перехода от концентраций клеток в популяциях к их энергетическим показателям, сопряженным с активностью митохондрий в системе нелинейных дифференциальных уравнений иммунной сети [16,17].

В свете вышеизложенного целью данной работы является исследование влияния разных доз однократного γ -облучения крови *in vitro* на энергетику и ТМП лимфоцитов и нейтрофилов в крови, а также применение энергетического подхода для построения модели быстрых фаз реакций иммунных клеток на одноударное γ -облучение.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проведена серия экспериментов по γ -облучению образцов венозной донорской крови (7 доноров). Забор крови делали из локтевой вены доноров в пробирку с цитратом. Пробы крови переносили микропипетками в конусные пробирки (Eppendorf объёмом 1,5 мл) по 100 мкл. Облучение пробирок с кровью производили радиоактивным элементом ⁶⁰Co с помощью гамма-терапевтической установки Рокус-М (перпендикулярно к оси пробирки, расположенной горизонтально) при разных дозовых (D) режимах облучения (D = NT = 1, 2, 3, 4 Гр), где мощность N=112 рентген/мин, T–время облучения образца. Контрольные и облученные образцы крови последовательно выдерживали в термостате при 37°C с экспозицией 2 часа каждый.

Для исследований использовали флуоресцентный зонд ДСМ [5], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Флуорохромирование клеток крови производили путем добавления физиологического раствора с ДСМ в пробирку с кровью до его конечных концентраций 25 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией в термостате при 37° С с экспозицией 30 мин. Все инкубации и исследования соответствующих контрольных и опытных образцов крови проводили последовательно с временным интервалом 15-20 мин. Мазки витально окрашенной крови приготавливали способом раздавленной капли (на стекле) и затем исследовали на люминесцентном микроскопе Люмам-И2 (ЛОМО) в свете флуоресценции ДСМ. Режим возбуждения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках крови аналогичен режиму в предыдущих экспериментах [6,11]. Для каждого образца исследовали массивы по 100 лейкоцитов (нейтрофилов и лимфоцитов). Получали фотоизображения клеток с помощью цветной цифровой видеокамеры (Sony), закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Анализ изображений лейкоцитов производили по показателям интенсивности и цвета флуоресценции ДСМ в митохондриях, и ядрах, как визуально (в мазке крови под микроскопом по аналогии с [11]), так и на компьютере с помощью стандартного и модифицированного программного обеспечения на основе обучающих выборок, полученных ранее в серии экспериментов на клетках с ДСМ [5-7,10,11,13]. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [18]. Полученные результаты представляли в виде двух типов гистограмм для распределения нейтрофилов и лимфоцитов по значениям суммы ТМП ($\Delta\phi$) в 4-х диапазонах калиброванных потенциалов согласно [6,7,10,11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент. Люминесцентно-микроскопические исследования показали, что в контрольных препаратах крови при выбранной рабочей концентрации ДСМ (25мкМ), в норме распознаются лимфоциты с жёлтой или

желто-зеленой флуоресценцией активных митохондрий, образующие компактные или цепочечные структуры, с очень слабой флуоресценцией в ядрах, а также нейтрофилы с ярко-оранжевыми сегментами ядер и с зелено-желтой цитоплазмой с единичными митохондриями.

На рисунке 1 представлены фотографии нативной крови, где видны лимфоциты и нейтрофилы в свете флуоресценции зонда ДСМ: а – контрольные клетки, б – клетки в крови облученной дозой 5 Гр. Как можно видеть, в облученных лимфоцитах снижена флуоресценция в митохондриях, а внутри облученного нейтрофила резко снижена флуоресценция в ядрах, активных митохондрий мало, но видны скопления крупных ярко-желтых гранул – бактерий, сохраняющих активность и мембранный потенциал. Из анализа наших наблюдений следует, что деполаризация нейтрофилов коррелирует со снижением их способности лизировать инфекцию, что может влиять на продуцирование ими Ia –антигенного белка и интерлейкинов [1,2,19,20].

Согласно хемоосмотической теории энергетический статус аэробных клеток прямо сопряжён с уровнем протонного потенциала на мембранах митохондрий [21]. При дезэнергизации митохондрий (в т.ч. в случае перекрашивания клеток зондом ДСМ) происходит перераспределение катионов зонда между митохондриями и ядром, катионы ДСМ проникают в ядро и связываются с отрицательными фосфатными группами полимеров [5,7]. Цвет флуоресценции зонда в митохондриях лимфоцитов может изменяться от ярко-жёлтого до бледно-зеленого в зависимости от их энергетического состояния и уровня суммы отрицательных ТМП [5-7]. Наблюдаемая оранжевая флуоресценция ДСМ в ядрах контрольных клеток возникает при достижении избыточной концентрации зонда внутри митохондрий (свыше предела его растворимости в воде 1 мМ), что характерно для исходно гиперактивных клеток с высоким уровнем протонного потенциала на мембранах митохондрий [8,9,12]. Важно отметить, что в норме нейтрофилы крови имеют на внешней мембране отрицательный ТМП на |60| мВ, в среднем, выше, чем у лимфоцитов [6]. Поэтому в соответствии с теорией Нернста при рабочей концентрации ДСМ более 10 мкМ, оптимальной для лимфоцитов, нейтрофилы оказываются перекрашенными и с ярко-оранжевыми ядрами. Однако, при этом сохраняется прямая корреляция между фагоцитарной активностью и интенсивностью флуоресценции ДСМ в цитоплазме и в ядрах нейтрофилов, сопряженной прежде всего с уровнем внешнего ТМП, поддерживаемого гликолизом в этих клетках [6,17]. В принципе в соответствии с электродиффузной теорией для адекватного окрашивания нейтрофилов можно использовать концентрацию зонда в 10 раз меньше (порядка 2мкМ), но тогда часть слабых лимфоцитов с низкими ТМП за выбранное время инкубации с ДСМ, оказываются не докрашенными с очень слабой флуоресценцией. Таким образом, особенности изображений лейкоцитов в свете флуоресценции ДСМ отражают разные энергетические состояния клеток и разные уровни отрицательных градиентов электрических полей (ТМП) на внешней и митохондриальных мембранах [7].

На основании полученных в предыдущих экспериментах с зондом ДСМ калибровочных данных [6,7,14], энергетический статус лимфоцитов и нейтрофилов в крови можно охарактеризовать их распределением по четырем диапазонам суммы ТМП на плазматической (φ_n) и митохондриальной ($\varphi_{мх}$) мембранах: $\Delta\varphi = (\varphi_n + \varphi_{мх})$, представленных в таблице 1.

На рисунке 2 представлены гистограммы распределения популяций лимфоцитов и нейтрофилов в контрольных (К) и опытных препаратах крови соответственно по четырём диапазонам $\Delta\varphi$ (соответственно табл. 1). Как можно видеть, после облучения крови дозами 1–2 Гр, наблюдается некоторый рост пулов лейкоцитов с высокими значениями потенциалов в диапазонах $\Delta\varphi_3$ и $\Delta\varphi_4$, однако, у части нейтрофилов происходит их снижение. Максимумы гистограмм для лимфоцитов сдвигаются вправо в сторону высоких ТМП. Напротив, при облучении дозами 4–5 Гр максимумы гистограмм сдвигаются в сторону меньших потенциалов,

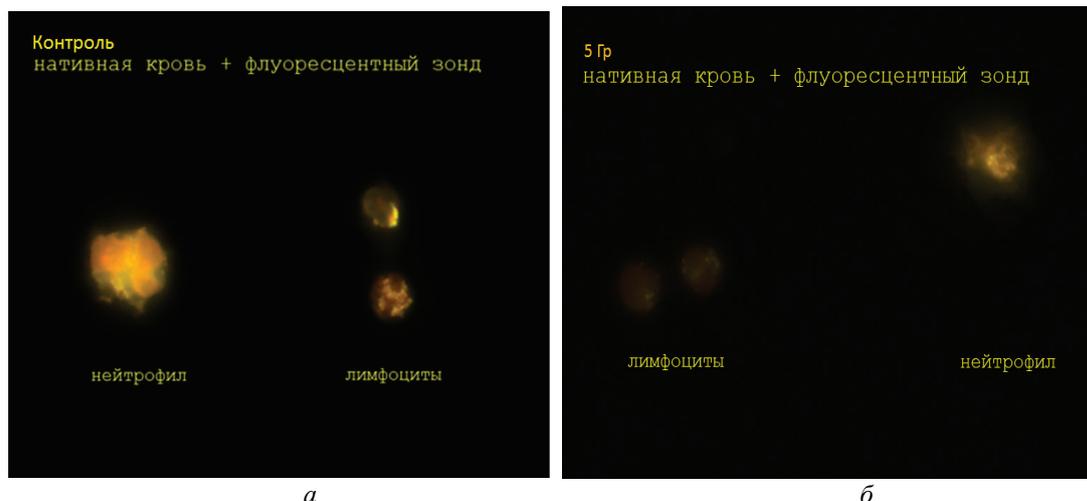


Рисунок 1. Кровь в свете флуоресценции ДСМ: а (без облучения) - гиперактивный нейтрофил и активные лимфоциты с желтыми энергизированными митохондриями; б (после γ -облучения крови): слабоактивные лимфоциты и деполаризованный нейтрофиле, в котором видны активные бактерии. Об. 90 \times МИ. Масштаб \leftrightarrow 5мкм

Таблица 1. Калибровочные диапазоны ТМП ($\Delta\varphi$) для лейкоцитов

$\Delta\varphi = \varphi_{\text{п}} + \varphi_{\text{мх}}$ mv	$\Delta\varphi_1$	$\Delta\varphi_2$	$\Delta\varphi_3$	$\Delta\varphi_4$
лимфоциты	< 60	60 - 150	160 - 230	230 - 280
нейтрофилы	< 120	120 -180	190 - 250	260 - 320

особенно для нейтрофилов. Наибольший эффект снижения энергетики клеток характерен для лимфоцитов после облучения дозой 4 Гр.

На рисунке 3 представлен результат статистического обобщения полученных данных, в том числе на основе анализа цифровых изображений клеток крови в свете флуоресценции ДСМ в контролях (К) и после γ -облучения разными дозами. Выявлена общая закономерность в реакциях клеток на облучение крови, наиболее характерная для популяции лимфоцитов: S-образная доза-зависимость изменения доли клеток с гипервысокой ($\Delta N_{\text{гэ}}$) и низкой энергетической активностью ($\Delta N_{\text{дэ}}$). Интересно, что больший эффект снижения пула лимфоцитов с высокими ТМП даёт облучение дозой 4 Гр, а не 5 Гр. Полученные результаты свидетельствуют в пользу кооперативного характера взаимодействия между субпопуляциями лимфоцитов и нейтрофилами, например, через интерлейкины с противоположными активностями, что, по-видимому, имеет адаптивное и регуляторное значение на ранней фазе энергетической реакции лимфоцитов на облучение, когда численность клеток в крови ещё близка к стационарной [2,19,20].

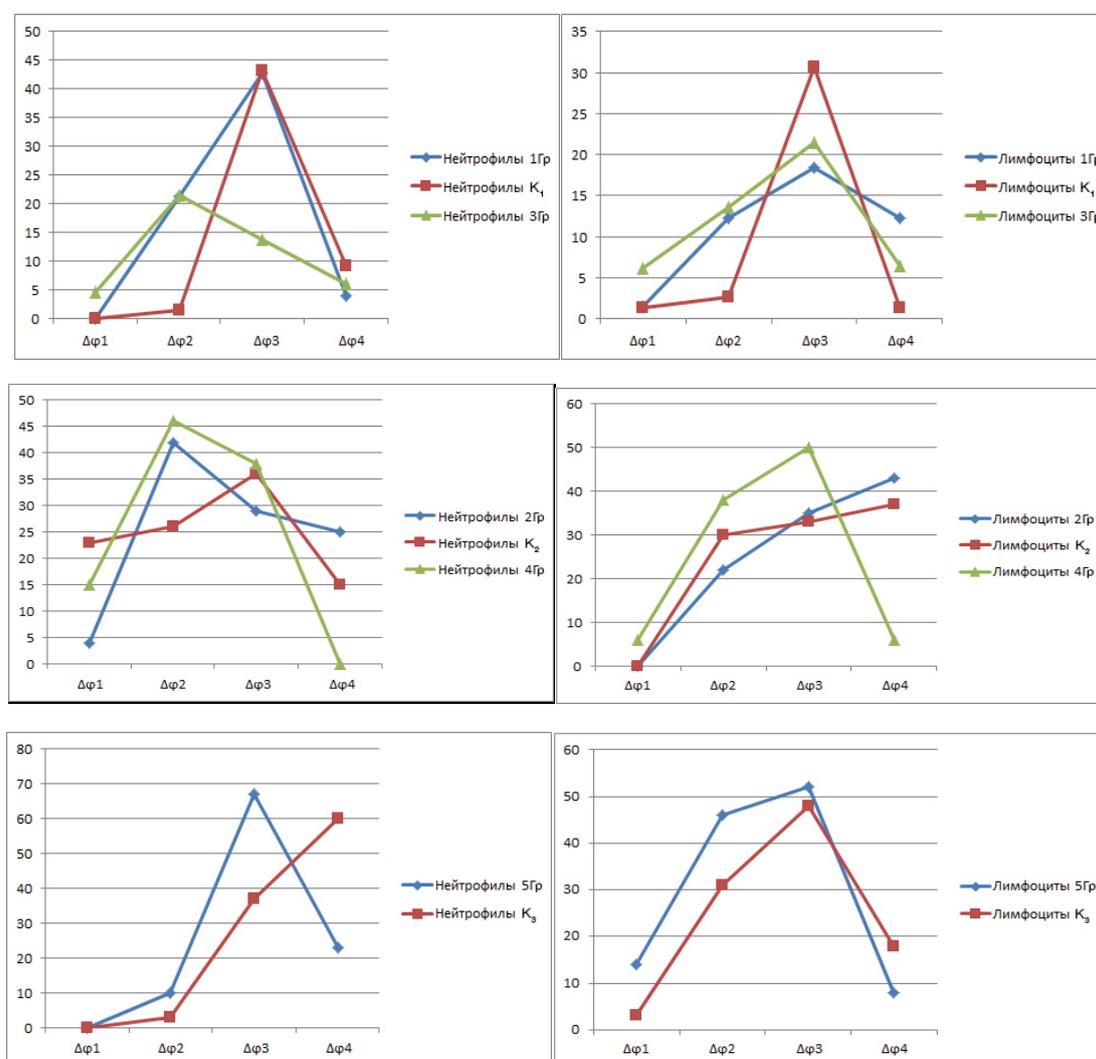


Рисунок 2. Гистограммы распределения лейкоцитов в крови по значениям суммы ТМП ($\Delta\varphi_i$) на плазматической ($\Delta\varphi_{\text{п}}$) и митохондриальной ($\Delta\varphi_{\text{мх}}$) мембранах: $\Delta\varphi_i = \Delta\varphi_{\text{п}} + \Delta\varphi_{\text{мх}}$, до и после их γ -облучения *in vitro* дозами от 1 до 5 Гр ($i = 1,2,3,4$ согласно таблице 1). По оси ординат - % клеток). Представлены данные для крови от трёх доноров соответственно контролям K_1, K_2, K_3 . Погрешность: $\pm 0, 5\%$

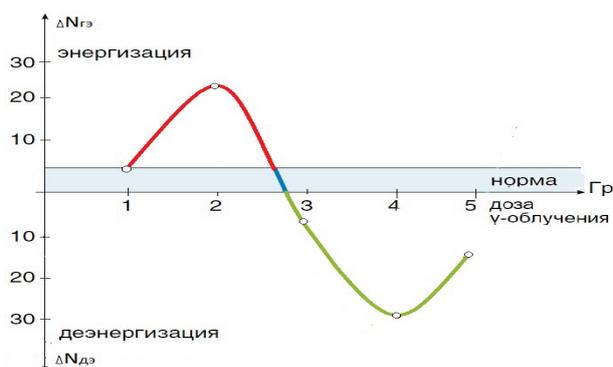


Рисунок 3. Обобщение доза-зависимой энергетической реакции лимфоцитов в донорской крови после γ -облучения. По оси ординат – изменение доли лимфоцитов (%) с высокой ($\Delta N_{гэ}$) и низкой ($\Delta N_{дэ}$) энергетической активностью.

Из сопоставления полученных данных можно заключить, что определённые пулы клеток крови в популяциях лимфоцитов и нейтрофилов могут иметь разную чувствительность к острому γ -облучению, сопряженную с их исходной энергетической активностью. Наиболее чувствительны к одноударному облучению нейтрофилы с незавершенным фагоцитозом. Обнаружена активация бактерий внутри ослабленных нейтрофилов через 2 ч после γ -облучения и выход части инфекции в кровь. В результате может происходить переактивация устойчивых к облучению нейтрофилов с последующей активацией Т-лимфоцитов. В то же время нельзя исключить активацию, например, естественных киллеров (ЕК), которые способны непосредственно уничтожать инфекцию в крови. Таким образом выявленный эффект опосредованной стимуляции части клеток в популяции лимфоцитов может быть обусловлен ростом антигенного инфекционного фона за счёт ослабления нейтрофилов, наиболее чувствительных к γ -облучению.

Модель. В течение последних трёх десятилетий методы математического моделирования использовали для исследования широкого спектра иммунологических процессов и явлений. Большой вклад в развитие этого направления внесли Г.И. Марчук и его ученики [22-24]. В основе этих моделей лежит популяционная модель Вольтерри-Лотки. Все эти модели можно разделить на два основных подкласса:

- I – модели, описывающие сетевые взаимодействия В-клеток и антител
- II – модели иммунной сети с учетом В-Т кооперации.

В общем случае динамика иммунных клеток разных популяций в крови на острое облучение организма сопряжена со снижением числа делящихся клеток в костном мозге – предшественников определенных линий клеточного иммунитета, т.е. обусловлена повреждением системы гемопоэза. В работах Н.В. Степановой и О.А. Смирновой была предложена математическая модель типа I для описания гуморального иммунного ответа на Т-независимый антиген у необлученных и облученных млекопитающих, основанной на клонально-селекционной теории Ф. Бернета и экспериментальных данных [1].

В нашем случае реакции лейкоцитов в крови до и после одноударного гамма-облучения *in vitro*, будем рассматриваем в рамках модели типа II как клеточно-гуморальный ответ с участием взаимодействий нейтрофилов (НФ) с Т-хелперами (Тх), между субпопуляциями Т-лимфоцитов (Тл) и В-лимфоцитов (Вл) (с запаздыванием) по аналогии с моделью Шишкина В.И. с соавторами [24]. Предлагаемая в данной работе общая модель учитывает следующие основные взаимодействия:

- НФ-ов и естественных киллеров (ЕК) с инфекцией (V_i),
- между Т-хелперами, Т-супрессорами и В-лимфоцитами,
- реакцию антиген (C_g) -антитело (C_a).

В случае пролонгированных (медленных) фаз иммунных реакций в уравнениях учитываются времена запаздываний (в процессах синтеза антител или лимфокинов, пролиферации под действием антигена, гибели в процессе апоптоза).

Тогда для реакций в необлученной крови система уравнений будет иметь вид:

$$\frac{dC_{НФ}}{dt} = k_1 C_{НФ} - \sigma_{1a} F_{НФ}(t - t_a) V_i(t - t_a) - \gamma_1 C_{НФ}$$

$$\frac{dC_{НФ}}{dt} = k_1 C_{НФ} + \chi_{1v} C_{НФ} V_i - \gamma_1 C_{НФ} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{ТХ}}{dt} = k_3 C_{ТХ} - \chi_{34} C_{ТС} C_{ТХ} + \chi_{31} C_{НФ} C_{ТХ} - \gamma_3 C_{ТХ}$$

$$\frac{dC_B}{dt} = k_2 C_B + C_B (\chi_{21} C_{НФ} + \chi_{23} C_{ТХ}) + \alpha_m C_B C_g(t - t_m) \theta(t - t_m - \chi_{2g}) C_B(t - t_d) C_g(t - t_d) - \gamma_2 C_B$$

$$\frac{dC_a}{dt} = \alpha_{\text{ПЛr}} C_{\text{ПЛ}}(t - t_r) C_g(t - t_r) \theta(t - t_r) - \omega_{ga} C_a C_g - \gamma_a C_a$$

$$\frac{dC_{EK}}{dt} = k_5 C_{EK} + \alpha_K C_{EK} V_i - \gamma_5 C_{EK}$$

$$\frac{dC_{TC}}{dt} = k_4 C_{TC} + \alpha_c C_{TC}(t - t_c) C_g(t - t_c) - \chi_{43} C_{TC} C_{TX} - \gamma_4 C_{TC}$$

$$\frac{dC_g}{dt} = k_0 C_g - \omega_{ga} C_a C_g - \gamma_g C_g$$

$$\frac{dV_i}{dt} = k_v V_i \left(1 - \frac{V_i}{V_{max}}\right) - f_v V_i (C_{HФ} + C_{EK}) - \gamma_v V_i$$

где $C_{\text{ПЛ}}$ – концентрация плазматических клеток через время t_r

На основе нового метода цитоэнергетического анализа крови [6,7,11] можно получить данные об изменении количества и качества (энергетики) клеток, как в популяции НФ, так и в четырёх субпопуляциях лимфоцитов. Поэтому целесообразно преобразовать нашу исходную модель с помощью энергетических показателей клеток. Исходя из принципа биологического эпиморфизма между функциональной активностью клеток и активностью их митохондрий, заменим переменную для концентраций клеток $C_j(t)$ в системе уравнений (1) концентрациями активных митохондрий для каждой клеточной субпопуляции. С этой целью введем некоторые определения и соответственно преобразуем систему уравнений (1).

В качестве переменной сначала рассмотрим митохондриальный показатель M_j , который характеризует изменение среднего числа активных митохондрий в каждой популяции клеток на разных фазах иммунного ответа. По определению

$$M_j = m_j C_j, \tag{2}$$

где m_j – среднее число активных митохондрий на клетку в j -ой популяции, C_j – концентрация этих клеток в крови. В соответствии с теорией взаимодействия катионов ДСМ с митохондриями [5-7].

$$M_j(t) = b F_{ij}(t) C_j(t), \tag{3}$$

где b – приборная константа, F_i – средняя интенсивность флуоресценции ДСМ в митохондриях одной клетки j -ой популяции, C_j – концентрация клеток j -й популяции в крови.

Замена переменной C_j на M_j расширяет возможности моделирования иммунного ответа, так как в зависимости от выбранного интервала времени можно получать упрощённые варианты модели. Если время

Таблица 2. Обозначения констант в уравнениях

k_j	константа скорости пополнений клеточной популяции (из стволовых клеток или клеток-предшественников) или размножения инфекции
χ_{ij}	константа скорости изменения активности клеток (потенциалов) при взаимодействии двух популяций
χ_{ig}	константа скорости дифференцировки клеток в популяции
α_j	константа скорости процесса пролиферации клеток в популяции (или сигнальной энергизации) под действием антигена
γ_j	константа естественной смерти клеток (необратимой дезэнергизации) в популяции
σ_{ig}	константа скорости гибели (или полной дезэнергизации) клеток в популяции путём апоптоза при взаимодействии с инфекцией
q	константа скорости активации клеток в популяции под влиянием энергоресурсов среды крови
t_d	время запаздывания в процессе дифференцировки клеточной популяции

исследуемой фазы иммунных реакций много меньше времени жизни клеток, то в правой части оставляем только члены, сопряженные с первичными быстрыми энергетическими реакциями и, наоборот, пренебрегаем эффектами изменения энергетики клеток на поздних фазах иммунного ответа, когда существенно изменяется именно соотношение клеток в популяциях (сутки и более).

Экспериментальные результаты этой работы и предыдущих исследований, свидетельствуют, что эффективными факторами быстрой фазы активации лимфоцитов в крови является не столько антигенная стимуляция, сколько стимуляция клеток опсонинами, интерлейкинами и другими биологически активными факторами [6]. Показано, что есть прямая корреляция между увеличением числа энергизированных митохондрий и интенсивности флуоресценции ДСМ в митохондриях в течение 30 мин после стимуляции лимфоцитов эритропоезином [13].

Исходя из этого, систему (1) преобразуем следующим образом:

- заменим переменные $C_j(t)$ на интенсивность флуоресценции зонда для клеток каждой популяции (F_j)
- исключим из уравнений члены для клеток-предшественников и плазматических клеток.

Тогда переход к **флуоресцентным энергетическим переменным** в системы (1) для каждой j -й популяции клеток будет следующий:

$$C_j(t) \rightarrow F_j(t) = m_i(t)F_i(t) C_j \quad (4)$$

Из результатов наших исследований следует, что первичная реакция лейкоцитов на острое γ -облучение крови *in vitro* обусловлена прежде всего изменением их ТМП и митохондриальной активности. При этом показатель энергетического статуса клеток (F_i) зависит от изменения их метаболизма и реакций мембран, которые в свою очередь зависят от биохимического состояния среды крови. Поэтому с целью моделирования быстрой фазы иммунных реакций концентрации клеток в системе (1) заменим на их энергетические показатели в виде флуоресцентных переменных $F_i(t)$, которые можно измерять в крови. Введем q_i - постоянный коэффициент скорости поддержания энергетики клеток и ионного гомеостаза для каждой популяции энергоресурсом среды.

Используя соотношение перехода (4), преобразуем систему уравнений (1) в систему с флуоресцентными переменными, где t много меньше времени жизни клеток:

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} + \chi_{1V}F_{H\Phi}V_i - \gamma_1F_{H\Phi} \quad (5)$$

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} - \chi_{1V}F_{H\Phi}V_i - \sigma_{1a}F_{H\Phi}(t - t_a)V_i(t - t_a) - \gamma_1F_{H\Phi}$$

$$\frac{dF_{TX}}{dt} = q_3F_{TX} - \chi_{34}F_{TX}F_{TC} + \alpha_XF_{TX}(t)C_g(t) + \chi_{23}F_{TX}(t)F_{H\Phi}(t) - \gamma_3F_{TX}$$

$$\frac{dF_B}{dt} = q_2F_B + \chi_{23}F_BF_{TX} + \alpha_BF_B(t)C_g(t) - \gamma_2F_B$$

$$\frac{dF_{TC}}{dt} = q_4F_{TC} - \chi_{43}F_{TC}F_{TX} + \alpha_CF_{TC}(t)C_g(t) + \chi_{41}F_{H\Phi}(t)F_{TC}(t) - \gamma_4F_{TC}$$

$$\frac{dF_{EK}}{dt} = q_5F_{EK} + \chi_{5V}F_{EK}(V_i) - \sigma_{5a}F_{EK}(t)(V_i) - \gamma_5F_{EK}$$

$$\frac{dC_g}{dt} = k_0C_g - \gamma_gC_g$$

$$\frac{dV_i}{dt} = k_VV_i(t) \left(1 - \frac{V_i}{V_{max}}\right) - f_VV_i(F_{H\Phi} + F_{EK}) - \gamma_VV_i$$

В каждом интервале времени t члены уравнений с коэффициентами α_j здесь отражают первичную сигнальную фазу за счет прямого взаимодействия антигена в среде с мембранами лимфоцитов, что приводит к быстрой стимуляции митохондрий и соответственно к росту F_i в клетках. Систему уравнений (5) в принципе можно использовать для моделирования быстрой фазы реакции популяций лейкоцитов после γ -облучения, если уровень антигенного фактора задан ($C_g = \text{const}$), а титр антител определяется стандартным способом.

Будем считать, что до облучения свободная активная инфекция в крови отсутствует: $V_i(0) = 0$, но некоторый антигенный фон сохраняется и постоянен, новые антитела не продуцируются. Если кровь исследуют через время менее четырех часов после облучения, то концентрации иммунных клеток близки к стационарным.

Введем в уравнения системы (5) линейные члены с параметрами облучения, отражающие прямое влияние радиации на энергетику митохондрий и ТМП в каждой популяции клеток крови.

Тогда при $dC_j/dt = 0$, $C_g = \text{const}$. получим достаточно однородную систему уравнений для флуоресцентных энергетических переменных иммунных клеток в пяти популяциях при заданных параметрах облучения:

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} - \gamma_1F_{H\Phi} - \frac{N}{D_{H\Phi}^0}F_{H\Phi} \quad (6)$$

$$\frac{F_{TX}}{dt} = q_3 F_{TX} - \chi_{13} F_{TX} F_{H\Phi} - \chi_{34} F_{TX} F_{TC} - \gamma_4 F_{TC} - \frac{N}{D_{TX}^0} F_{TX}$$

$$\frac{F_B}{dt} = q_2 F_B + \chi_{23} F_B F_{TX} - \gamma_2 F_B - \frac{N}{D_B^0} F_B$$

$$\frac{F_{TC}}{dt} = q_4 F_{TC} + \chi_{41} F_{H\Phi}(t) F_{TC}(t) - \chi_{43} F_{TC} F_{TX} - \gamma_4 F_{TC} - \frac{N}{D_{TC}^0} F_{TC}$$

$$\frac{F_{EK}}{dt} = q_5 F_{EK} - \gamma_5 F_{EK} - \frac{N}{D_{EK}^0} F_{EK}$$

где $\frac{N}{D_j^0}$ – удельные скорости перехода клеток j-ой популяции из неповреждённого состояния в умеренно повреждённое со сниженной энергетикой митохондрий и уровней ТМП.

Полученная система уравнений моделирует относительно быструю фазу энерго-сопряжённых реакций в популяциях лейкоцитов после одноударного γ -облучения крови *in vitro*. Результат этих взаимодействий, как системы реакций с обратными связями [1,2], может приводить к колебательному режиму значений флуоресцентного показателя F_i в лимфоцитах разных типов. Кроме того, по нашим данным, в процессе деполяризации части нейтрофилов может происходить процесс активации захваченных ими бактерий и выход инфекции в кровь. Далее возможна иммунная активация лимфоцитов в крови [2,20]. Таким образом, может запуститься как бы новый каскад иммунных реакций, эффективность которых далее зависит от дозы облучения, исходного состояния иммунных клеток и их чувствительности к воздействию. Такой процесс может являться причиной дальнейшего волнообразного характера изменения активности взаимодействующих клеток в крови [2,11, 20].

Предлагаемая здесь модель в виде системы нелинейных дифференциальных уравнений с энергетическими переменными (6) вполне адекватна и для описания ранней быстрой фазы ответа клеток иммунной сети после острого радиационного облучения организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о различном влиянии одноударного γ -облучения крови в системе *in vitro* на энергетику митохондрий и ТМП в лейкоцитах в зависимости от их исходного энергетического состояния и указывают на кооперативный характер иммунных реакций клеточных популяций в диапазоне радиоактивных доз 1–5 Гр, при этом возможно выявить и активацию инфекционного фона при ослаблении активности нейтрофилов. Исследование динамики энергетических показателей клеточного иммунитета после γ -облучения актуально в плане выяснения механизмов защитной адаптации организма к радиационному облучению и для поиска эффективных радиопротекторов. Моделирование каскада медленных и быстрых иммунных реакций клеточных популяций в крови на основе измеряемых их энергетических переменных, перспективны с целью создания алгоритмов системной диагностики и управления динамикой иммунного ответа, например, в ходе лучевой терапии.

Список литературы / References:

1. Смирнова О.А. *Радиация и организм млекопитающих: модельный подход*. Москва-Ижевск: 2006, 223 с. [Smirnova O.A. *Radiation and mammalian organism: model approach*. Moscow-Izhevsk: 2006, 223 p. (In Russ.)].
2. Тимошевский А.А., Пиголин Ю.И., Гребенюк А.Н. Использование иммунологических показателей периферической крови при проведении судебно-медицинской экспертизы лиц, подвергшихся радиационному воздействию. *Судебно-медицинская экспертиза*, 2013, № 1, с. 17-20 [Timoshevsky A.A., Pigolkin Yu.I., Grebenyuk A.N. The use of immunological characteristics of the peripheral blood for the purpose of forensic medical expertise of the subjects exposed to ionizing radiation. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, 2013, no. 1, pp. 17-20 (In Russ.)].
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука, 1972, 252 с. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Lipid peroxidation in biological membranes*. Moscow: Nauka, 1972, 252 p. (In Russ.)].
4. Иржик Л.И. *Гемоглобины и их свойства*. М.: Наука, 1975, 239 с. [Irzhik L.I. *Hemoglobins and their properties*. M.: Nauka, 1975, 239 p. (In Russ.)].
5. Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(n-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923 [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*, 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923 (In Russ.)].
6. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е. Н., Полосина О.В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47 [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva F. H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means

of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematal. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47 (In Russ.).

7. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273 [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266 -273 (In Russ.)].

8. Розенко Л.Я., Тарнопольская О.В., Шихлярова А.И., Непомнящая Е.М., Крохмаль Ю.Н. Флуоресцентные показатели живых клеток опухоли плоского эпителия до и после химиолучевой терапии у больных плоскоклеточным раком полости рта. *Современные проблемы науки и образования*, 2013, № 6 [Rozenko L.Y., Tarnopolskaya O.V., Shikhlyarova A.I., Nepomnyaschaya E.M., Krokmal Y.N. Fluorescence indices of living squamous epithelium tumor cells before and after chemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the cavity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniy*, 2013, no. 6 (In Russ)].

9. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2014, № 11, с. 31-38 [Morozova G.I., Kornilaeva G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF- irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38 (In Russ.)].

10. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424 [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424 (In Russ.)].

11. Акшинцев А.А., Морозова Г.И., Козлова М.А., Баренбойм Г.М. Выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных водорослей на энергетику лейкоцитов в нативной крови по флуоресценции потенциал - чувствительного зонда ДСМ. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3, с. 536-542 [Akshintsev A.A., Morozova G.I., Kozlova M.A., Barenboim G.M. Detection of adaptogenic and protective effect of extracts from thermophilic algae on the energy of leukocytes in native blood by fluorescence potential-sensitive probe DSM. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 536-542 (In Russ.)].

12. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник научных трудов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257 [Morozova G. I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. М.: 1999, pp. 256-257 (In Russ.)].

13. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

14. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photo-sensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials. *J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1*, March, 2019, pp. 483-490.

15. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. М: МГУ, 1987, 187 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of biological membranes functioning*. М: Moscow State University, 1987, 187 p. (In Russ.)].

16. Морозова Г.И., Аношин А.А., Добрецов Г.Е., Матвеева Н.К. Структурно-энергетический баланс иммунных клеток и тромбоцитов в нативной крови, определяемый с помощью флуоресцентного зонда ДСМ, как адекватная характеристика состояния организма. *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*, Краснодар: Кубанский ГУ, 2019, т. 2, с. 217-218 [Morozova G. I., Anoshin A. A., Dobretsov G.E., Matveeva N.K. Structure-energy balance of immune cells and platelets in native blood determined by fluorescent probe DSM as an adequate characteristic of the organism state. *Scientific Proceedings Collection of VI Russia Biophysicists Congress*, Krasnodar: Kuban State University, 2019, vol. 2, pp. 217-218 (In Russ.)].

17. Морозова Г.И., Аношин А.А., Оболонкова А.Н. Моделирование иммунной сети на основе структурно-энергетических параметров клеточных популяций. *Труды XVIII международной конференции*, Пушино: РАН, МКО, 2011, с. 110 [Morozova G.I., Anoshin A.A., Obolonkova A.N. Modeling of immune network on the basis of structural and energetic parameters of cell populations. *Proceedings of XVIII International Conference*, Pushchino: RAS, ICE, 2011, p. 110 (In Russ.)].

18. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. М.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)].

19. Бонд В., Флинднер Т.Б., Аршамбо Д. *Радиоационная гибель млекопитающих: Нарушение кинетики клеточных популяций*. М.: Атомиздат, 1971, 317 с. [Bond W., Flindner T.B., Archambault D. *Radiation death of mammals: Disturbance of kinetics of cell populations*. М.: Atomizdat, 1971, 317 p. (In Russ.)].

20. Петров Р.В. Роль гормонов и медиаторов в функционировании иммунной системы. *Вестник АМН СССР*, 1980, № 8, с. 3-11 [Petrov R.V. Role of hormones and mediators in functioning of immune system. *Bulletin of the USSR Medical Sciences Academy*, 1980, no. 8, pp. 3-11 (In Russ.)].
21. Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М.: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V. P. *Energy of biological membranes*. М.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)].
22. *Математическое моделирование в иммунологии и медицине*. Под ред. Г.И. Марчука. Новосибирск: Наука, 1982, 110 с. [Mathematical modeling in immunology and medicine. Edited by G.I. Marchuk. Novosibirsk: Nauka, 1982, 110 p. (In Russ.)].
23. Бельих Л.Н. *Анализ математических моделей в иммунологии*. М.: Наука, 1988, 192 с. [Belykh L.N. *Analysis of mathematical models in immunology*. М.: Nauka, 1988, 192 p. (In Russ.)].
24. Шишкин В.И., Янченкова Е.Н. Математическая модель иммунной сети с учётом деления Т-клеток на субпопуляции. *Физическая механика*, 1998, с. 174-179 [Shishkin V.I., Yanchenkova E.N. Mathematical model of immune network taking into account division of T-cells into subpopulations. *Physical Mechanics*, 1998, pp. 174-179 (In Russ.)].

INVESTIGATION AND MODELING OF LEUKOCYTE RESPONSES IN THE BLOOD TO γ -IRRADIATION USING ENERGY PARAMETERS OF IMMUNE NETWORK CELLS

Morozova G.I.¹, Muny'os M.M.¹, Ivanov A.V.², Kulinich T.M.², Romanov S.A.³

¹ Russian Peoples' Friendship University,

st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia, e-mail: gimorozova@mail.ru

² Russian Scientific Center of Roentgenradiology, Ministry of Health of Russia

st. Profsoyuznaya, 86, Moscow, 117837, Russia

³ LLC ONTEGRA,

Enthusiasts 2nd st., 5b4, Moscow, 111024, Russia

Received 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0637

Abstract. Biophysical control of radiation exposure to humans in the areas of nuclear reactors, in space flight conditions, as well as during radiation therapy, is relevant today. In this regard, the following tasks were solved in this work: 1) study of the leukocytes reactions in the blood after a single exposure to ^{60}Co γ -radiation on the blood in vitro; 2) mathematical modeling of the fast immune responses using energy indicators of cells. By use of the luminescent microscope, lymphocytes and neutrophils were recognized and examined in donor venous blood smears, vitally stained with a cationic probe 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium (DSM). Cell energy activity (EA) in each population was characterized by the sum of transmembrane potentials (TMP) on the outer and mitochondrial membranes, which was assessed by DSM fluorescence intensity and color in cell mitochondria and nuclei. Dose-dependent γ -irradiation effects were evaluated on the basis of digital fluorescent images computer analysis. It was found in the experiments that the change in the TMP of after blood γ - irradiation in doses of 1Gy-5Gy depends on their initial EA. An S-shaped dose dependence was revealed for the irradiated lymphocytes energy activity. The greatest effect of cells energy decrease occurs after irradiation with 4 Gy dose. A model of T-dependent immune responses is proposed in the form a system of nonlinear differential equations before and after blood irradiation, where the concentrations for five cell populations are replaced by their fluorescent variables, which reflect the number of active mitochondria in each population. Such a model is also adequate for describing the rapid phase of the immune response after single-hit radiation exposure of the body.

Key words: blood γ -irradiation, neutrophils, lymphocytes, membrane potential, mitochondria activity, fluorescent probe DSM, energy parameters, immunity model.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСГЕННЫХ БАКТЕРИЙ: «ПЛАЗМИДНЫЙ ПАРАДОКС»

Брильков А.В.¹, Брилькова Е.В.^{1,2}, Жабрун И.В.¹, Ганусов В.В.³, Логинов Ю.Ю.⁴,
Шуваев А.Н.¹

¹ Сибирский федеральный университет
пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

² Институт биофизики ФИЦ СО РАН
Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

³ Университет Теннесси
Knoxville, TN 37996-1937, USA

⁴ Сибирский государственный технический университет им. акад. М. Ф. Решетнева
пр. им. газ. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660014, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0638

Аннотация. В настоящей работе построена математическая модель распределения клеток трансгенных бактерий, по количеству содержащихся в них плазмид. Это позволяет изучать закономерности выживания трансгенных микроорганизмов в определенных экологических условиях с учетом различных характеристик трансгенных штаммов, например, стабильности плазмид в новых клетках, «популяционной стоимости» поддержания конъюгативных и неконъюгативных плазмид, эффективности экспрессии клонированных на плазмидах генов и других. «Плазмидный парадокс» заключается в том, что хотя обычно присутствие плазмид, содержащих клонированные гены, снижает удельную скорость роста трансгенных бактерий, но при длительном росте бактерий в неселективных условиях («экспериментальная эволюция», 20-30 или более генераций исходной формы без антибиотиков) «стоимость приспособленности», снижается на порядок-два. Анализ экспериментальных приводит к выводу, что это связано с изменением разницы в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток, с изменением вероятности образования бесплазмидных клеток, копийности плазмид и экспрессии клонированных генов в клетках трансгенных бактерий в различных экологических условиях.

Ключевые слова: Трансгенные бактерии, экспериментальная эволюция, «плазмидный парадокс», математическое моделирование.

Введение. Для прогнозирования сохранения и распространения генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО) в различных природных экосистемах и, в целом, экологических последствий интродукции, необходимым этапом является математическое моделирование. Это позволяет изучать закономерности выживания трансгенных микроорганизмов в определенных экологических условиях с учетом различных характеристик трансгенных штаммов, например, стабильности плазмид в новых клетках, «популяционной стоимости» поддержания конъюгативных и неконъюгативных плазмид, эффективности экспрессии клонированных на плазмидах генов и других.

«Плазмидный парадокс» заключается в том, что хотя обычно присутствие плазмид, содержащих клонированные гены, снижает удельную скорость роста трансгенных бактерий, но при длительном росте бактерий в неселективных условиях (т. н. «экспериментальная эволюция», 20-30 или более генераций исходной формы) стоимость приспособленности, снижается на порядок-два. Это, например, хорошо показано на плазмидах резистентности к антибиотикам у клинических изолятов, причем трансгенные штаммы содержали как конъюгативные, так и неконъюгативные плазмиды, с необходимыми делециями обозначенных оперонов, при разных температурах, в новых штаммах бактерий, при разной копийности и экспрессии клонированных на плазмидах генов и т.д. [1].

Причины такого значительного изменения в стабильности плазмид пока не были определены в каждом случае достаточно точно. В данной работе показано, что «компенсаторные мутации», в принципе, снижают стоимость плазмид для популяции на порядок-два. Интеграция клонированных генов из плазмид в хромосомы, новые штаммы бактерий-хозяев при горизонтальном переносе клонированных генов, новое сообщество организмов, куда встраивается трансгенный штамм бактерий, тоже играют большую роль в распространении плазмид трансгенных бактерий. Это связано с изменением разницы в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток (селективный коэффициент), с изменением вероятности образования бесплазмидных клеток, копийности плазмид и экспрессии клонированных генов в разных экологических условиях.

Математическая модель. Математическая модель сегрегационной потери многокопийных плазмид позволяет связать феноменологические параметры популяционной динамики трансгенных микроорганизмов с параметрами, описывающими кинетику репликации плазмид в индивидуальной клетке бактерий. Модель описывает динамику плазмид в популяции в предположении непрерывного их изменения от варианта с числом копий x к варианту с копийностью $x + dx$. Это свойство вполне может выполняться для высококопийных плазмид (плазмид, у которых средняя копийность достигает 50-100 копий на клетку), однако очевидно является неприменимым для плазмид с промежуточной или малой средней копийностью (порядка 5-30 копий на клетку).

Для описания популяционной динамики мало – и среднекопийных плазмид трансгенных микроорганизмов нами разработана математическая модель, где переменной является фактическое число копий плазмиды на клетку i , и которая описывает изменение распределения клеток с различным числом копий в популяции микроорганизмов.

Рассмотрим изменение численности популяции трансгенных бактерий, в которой каждая клетка содержит точно i копий плазмиды. Обозначим значение плотности этой популяции в момент времени t как $X_i(t)$. В следующий бесконечно близкий момент времени $t + dt$ три основных события может произойти с клетками этой популяции. Во-первых, благодаря негативному контролю копийности, число копий в клетке может возрасти до $i+1$, что определяется скоростью репликации плазмид λ_i , очевидно зависящей от числа копий плазмиды в популяции. Если копийность i является достаточно большой, то $\lambda_i \approx 0$, и соответственно, вероятность увеличения числа копий бесконечно мала. Во-вторых, так как все клетки имеют определенную вероятность деления, определяемую скоростью роста μ_i (которая равна $1 - \exp(-\mu_i t)$), клетки могут поделиться в момент времени $t + dt$ и, таким образом, случайная сегрегация плазмид по дочерним клеткам может привести к образованию бесплазмидной клетки с вероятностью $\tau_0(i)$. Более того, случайное распределение плазмид по дочерним клеткам также приводит к снижению (в среднем) копийности от i до $i - 1$ со скоростью $\tau_i \mu_i X_i$.

Популяционная динамика плазмид клеток трансгенных бактерий (схема) приведена на рисунке 1. Обозначения: λ_i – скорость репликации плазмид (с учетом негативного контроля копийности), τ_i – параметр, характеризующий скорость “разбавления” плазмид при делении (с учетом случайного распределения плазмид между дочерними клетками), $\tau_0(i)$ – вероятность образования бесплазмидной клетки при делении клетки с i копиями плазмиды.

Необходимо подчеркнуть, что рассматриваемая модель (см. рис. 1) не описывает подробно механизмы сегрегации и репликации плазмид, а снижение (в среднем) копийности плазмид при случайном их распределении между клетками при делении можно интерпретировать как “разбавление” плазмид пропорционально их количеству.

Суммируя все вышесказанное, математическая модель, описывающая динамику плазмид трансгенных микроорганизмов, может быть записана в общем виде следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dX_0}{dt} = (\mu_0(S) - D)X_0 + \tau\mu_1(S)X_1 + \sum_{i=1}^N \tau_0(i)\mu_i(S)X_i, \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S) - D)X_i - \tau i\mu_i(S)X_i + \tau(i+1)\mu_{i+1}(S)X_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \sum_{i=0}^N \frac{\mu_i(S)X_i}{Y_i}, \end{cases} \quad (1)$$

Анализ этой математической модели будет проведен ниже в несколько этапов. Сначала мы рассмотрим, как модель (1) отражает зависимость среднего числа копий плазмиды от условий культивирования, а также проанализируем динамику среднего числа копий плазмиды в популяции трансгенных микроорганизмов. На основе динамики средних и некоторых экспериментальных наблюдений мы рассмотрим популяционную динамику плазмидсодержащих бактерий в хемостате. После этого будет рассмотрен простой способ вычисления стационарных распределений клеток популяции трансгенных бактерий по числу копий плазмид и как эти распределения зависят от механизма контроля копийности плазмид. Далее будет описан метод оценки параметров математической модели, основанный на известном виде стационарного распределения клеток с различной копийностью в популяции микроорганизмов. Наконец, будут проанализированы причины сегрегационной нестабильности рекомбинантных плазмид, а также показано, как вариация продолжительности клеточного цикла клеток микроорганизмов может повлиять на стабильность поддержания плазмид в популяции трансгенных бактерий.

Обозначения: Препраймерная RNAII (0-555 п.о.) и ингибиторная RNAI (2-110 п. о.) производятся с постоянными скоростями k_{II} и k_I . RNAI и RNAII способны образовывать комплементарный комплекс, который при его образовании в окне ингибирования (110-360 п. о.) приводит к ингибированию образования праймера. M обозначает число плазмид в клетке, а Q_0 – вероятность формирования полноценного праймера для ДНК полимеразы, ρ – вероятность репликации плазмиды, при условии, что праймер для ДНК полимеразы успешно образовался.

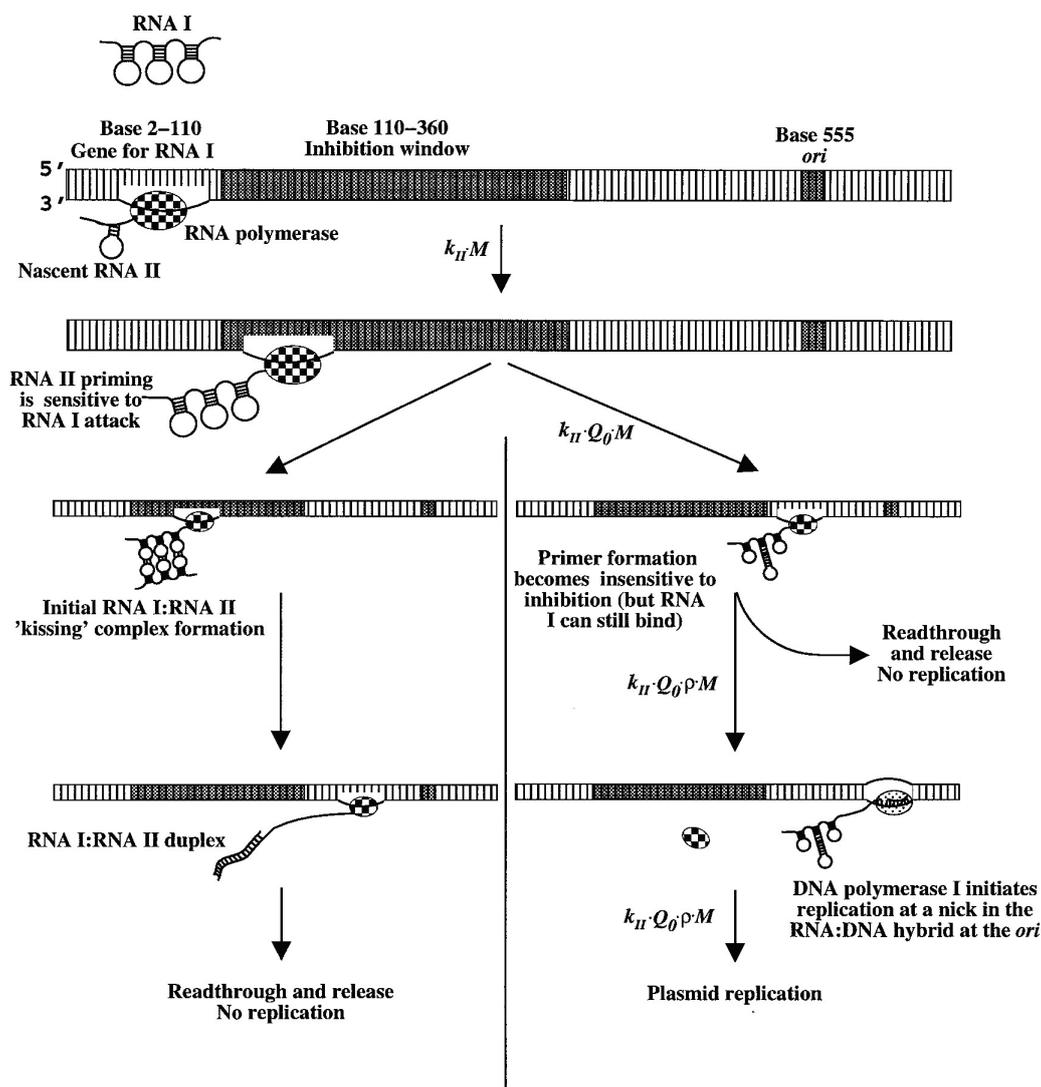


Рисунок 1. Общая схема процесса репликации плазмиды ColE1

Плаزمида ColE1 является небольшой плазмидой, широко распространенной в природных популяциях. Её молекулярный вес составляет $4,2 \cdot 10^3$ килодальтон, и длина – 6646 пар нуклеотидных оснований. ColE1 не обладает способностью к конъюгационному переносу, хотя и содержит гены, обеспечивающие ее мобилизацию в клетки–реципиенты со многими конъюгативными плазмидами, например с фактором *F*. Обычная бактериальная клетка содержит 10–50 копий плазмиды, и согласно, условной классификации, ColE1 относится к классу высококопийных плазмид.

Многокопийные плазмиды обычно не обладают системами активного распределения плазмид между дочерними клетками при делении материнской, а, следовательно, копии плазмиды сегрегируют независимо, и, таким образом, случайно. Случайное распределение плазмид при делении ведет к значительной вариации числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов в начале клеточного цикла. В этом случае основной задачей эффективного контроля копийности плазмид является выравнивание среднего числа копий на клетку в популяции (или другими словами, уменьшение вариации изначально высокодисперсного распределения клеток с различной копийностью) к началу митотического деления [2].

Репликация плазмид типа ColE1 изучалась достаточно подробно (как теоретически, так и экспериментально) как модельная система для исследования стабильного поддержания плазмидных репликонов в растущих культурах микроорганизмов. Контроль копийности плазмиды ColE1 зависит от ингибирования *cis*-действующей препраймерной РНК (названной RNAII) *trans*-действующей антисенсной РНК (названной RNAI) [2].

Транскрипция молекулы RNAII инициируется 555 п.о. выше (upstream) участка начала репликации *ori* (рис. 1), тогда как RNAI (обычно длиной от 108 до 110 п.о.) считывается с цепи ДНК, комплементарной участку, кодирующему RNAII, начиная с сайта, расположенного выше на 455 п.о. от начала репликации. Образование пре-праймера чувствительно к атаке молекулой RNAI, когда транскрипция происходит в так называемом “окне ингибирования” (inhibition window), которое простирается примерно от 100 нуклеотидной пары до 360 пары последовательности, кодирующей молекулу RNAII. Если RNAI и RNAII образуют изначально нестабильный комплементарный (“kissing”) комплекс, который впоследствии преобразуется в стабильный дуплекс во время

транскрипции RNAII, конформационные изменения молекулы RNAII приведут к формированию неполноценного пре-прайма, и, следовательно, к нарушению репликации плазмиды (рис. 1).

Небольшой, кодируемый генами плазмиды полипептид, Rom (RNA One Modulator), стабилизирует взаимодействие между RNAI и RNAII, увеличивая вероятность образования стабильного комплекса RNAI–RNAII после изначально нестабильного связывания. Если же комплекс между RNAI и RNAII не образуется к окончанию окна ингибирования (временная длительность этого процесса всего ~5 секунд), RNAII формирует стабильный гибрид с участком плазмидной ДНК, расположенным рядом с *ori*.

Динамика средней копийности плазмид. Для описания динамики среднего числа копий плазмиды в клетках популяции трансгенных бактерий уточним вид общей математической модели (1). Прежде всего, для простоты анализа, положим $\mu = const$. Также предположим, что динамика концентрации субстрата, лимитирующего рост бактерий, является быстрой, по сравнению с динамикой клеток с различной копийностью плазмид в клетках бактерий (это достаточно легко показать в приближении малых τ и λ). Тогда справедливо равенство $\mu = D$. Система (1) переписывается следующим образом:

$$\frac{dX_i}{dt} = -\tau iDX_i + \tau(i+1)DX_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \quad (2)$$

где не учитывается динамика популяции бесплазмидных клеток, так как они не дают никакого вклада в среднюю копийность плазмид (как минимум в селективных условиях). Средняя копийность плазмид определяется как

$x = \sum_{i=1}^{\infty} iX_i / X = \sum_{i=1}^{\infty} ip_i$, где $X = \sum_i X_i$. Для нахождения уравнения для относительной средней копийности, рассмотрим две суммы:

$$\sum_{i=1} \lambda_{i-1} ip_{i-1} = \sum_{k=0} \lambda_k (k+1)p_k = \sum_{k=0} \lambda_k kp_k + \sum_{k=0} \lambda_k p_k = \sum_{i=0} \lambda_i ip_i + \sum_{i=0} \lambda_i p_i, \quad (3)$$

$$\sum_{i=0} i(i+1)p_{i+1} = \sum_{k=1} k(k-1)p_k = \sum_{k=1} k^2 p_k - \sum_{k=1} kp_k = \sum_{i=0} i^2 p_i - n \quad (4)$$

С учетом выражений (3) и (4) мы находим уравнение на среднее число копий плазмиды в популяции n :

$$\dot{x} = -\tau Dx + \sum_{i=0} \lambda_i p_i \quad (5)$$

Таким образом, в упрощенном виде уравнение (5) предсказывает динамику средней копийности плазмид в клетках трансгенных бактерий. Например, при $\lambda = 0$ (при отсутствии контроля копийности, либо при резкой смене условий), среднее число копий на клетку снижается экспоненциально, как и предсказывается решением общей модели. Заметим, что в случае, когда λ_i нелинейно зависит от числа копий (например, при экспоненциальном механизме ингибирования), система (2) и следовательно, уравнение (5) не имеют аналитического решения. Когда же $\lambda = const$, решение уравнения (5) находится простым интегрированием:

$$x(t) = \frac{\lambda}{\tau D} + \left[x(0) - \frac{\lambda}{\tau D} \right] \exp(-\tau Dt) \quad (6)$$

где $x(0)$ – начальная относительная копийность (обычно она принимается равной 1). Решение (6) также предсказывает экспоненциальное снижение (точнее, изменение) средней копийности плазмид со скоростью $\sim \tau D$ (средняя копийность в стационарном состоянии обозначается как $n = \tilde{x}$), хотя и с последующим замедлением (до скорости $\sim \lambda$) при подходе к стационарному значению $\lambda/\tau D$.

При $\lambda = const$ средняя копийность плазмид в популяции трансгенных микроорганизмов обратно пропорциональна удельной скорости разбавления среды в хемостате D (или, в стационарном состоянии, скорости роста популяции). Это означает, что при культивировании при низких скоростях протока среды в хемостате или в стационарной фазе роста при периодическом культивировании, клетки бактерий должны преимущественно обладать высоким числом копий плазмид, по сравнению с большими скоростями роста в хемостате или, например, в логарифмической фазе роста. Этот вывод подтверждается многочисленными экспериментальными данными.

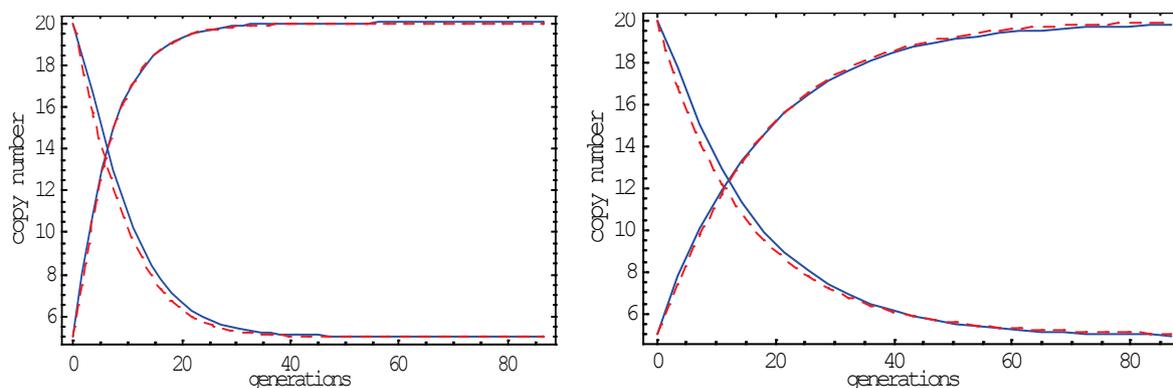


Рисунок 2. Динамика средней копийности при изменении условий культивирования при экспоненциальном (левый график) и гиперболическом (правый график) механизме ингибирования. Расчеты выполнены по формулам (6,7). Непрерывные линии – численное решение модели (1), штрихованные – выражение (7). Параметры, использованные в расчетах: $\mu(S) = 1/(0.01 + S)$, $\theta=10$, $\lambda = \tau\theta DK$ (гиперболический механизм ингибирования) и $\lambda = \tau D\theta \exp(-x/K)$ (экспоненциальный), $\tau=0.1$, $D=0.1$, $S_0=10$, $x(0) = 20$ (или 5), $x(\infty) = 5$ (или 20)

Отметим, что эти экспериментальные данные относятся к случаю, когда копийность плазмиды измеряется по отношению к числу хромосом на клетку, а, следовательно, исключают влияние всех остальных факторов, которые могут привести к снижению копийности при малых скоростях роста. В дополнение к сказанному, решение (6) не учитывает вариабельность параметров модели от условий культивирования, что также может привести к другим предсказаниям (см. ниже). Уравнение (5) переписывается при $\lambda = const$ в виде $\dot{x} = \lambda - \tau Dx$, который также описывает скорость перехода плазмид между клетками с близкой копийностью ($x \rightarrow x + dx$). Такое совпадение неудивительно, так как динамика средних следует из более общей модели популяционной динамики плазмид трансгенных микроорганизмов (рис. 1). Основываясь на этом, можно предположить, что и в нашей модели динамика среднего числа копий плазмид в популяции трансгенных бактерий может быть описана уравнением:

$$\dot{x} = \lambda(x) - \tau\mu(x, S)x. \quad (7)$$

Численные решения демонстрируют (рис. 2), что уравнение (7) достаточно хорошо описывает динамику изменения средней копийности в популяции микроорганизмов и практически точно предсказывает значение квазистационарного числа копий плазмиды на клетку. Заметим, что, как и ожидалось в полной модели (1), изменение копийности происходит наиболее быстро в случае экспоненциального ингибирования, по сравнению с гиперболическим, что связано с чувствительностью многократного процесса соединения-распада молекул RNAII и RNAI (рис. 1, 2).

Решение уравнения (7) может быть проведено как при помощи численных, так и с использованием графических методов. Графический способ также позволяет оценить, как среднее число копий в популяции зависит от условий культивирования (удельной скорости роста популяции, селективности условий для поддержания плазмид с клонированными генами). Один из простейших примеров был ранее изучен Атлунгом с соавт. [3]. Эти авторы оценивали изменение среднего числа копий плазмиды на клетку при различной скорости роста популяции микроорганизмов. Было показано, что при увеличении скорости роста плазмидосодержащих клеток, средняя копийность должна снижаться (при всех равных прочих условиях). Таким образом, уравнение (7) может быть использовано для предсказания как стационарных содержания плазмидной ДНК в клетках трансгенных микроорганизмов, так и для анализа его изменения. Стационарная концентрация плазмид вычисляется по уравнению (7) при $\dot{x} = 0$, или, что то же самое, в нелинейном выражении:

$$\lambda(x) = \tau\mu(x, S)x. \quad (8)$$

Хотя динамика средней копийности плазмид, описываемая решением уравнения (7), практически не отличается от численного решения системы (1), выражение (8) может не описывать снижение копийности, наблюдаемое в реальных экспериментах. Используем разработанную Паулсоном с соавт. математическую модель, которая описывает изменение средней копийности x и концентрации ингибиторной молекулы R в популяции микроорганизмов, содержащих плазмиду ColE1 [2].

Авторы предположили, основываясь на известном механизме контроля копийности плазмиды ColE1, что изменение концентраций плазмидной ДНК и RNAI (ингибитора) подчиняется следующей системе дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \rho k_{II} x Q(R) - Dx, \\ \dot{R} &= (k_I - k_{II})x - (D + \varepsilon_I)R \end{aligned} \quad (9)$$

где параметры имеют следующий биологический смысл – описание функции дорепликации плазмид $\lambda(i \rightarrow j)$: k_I – скорость образования полноценных (т.е. способных к ингибированию) RNAI молекул, k_{II} – скорость образования молекулы RNA II (которая ведет к репликации плазмиды), $Q(R)$ – вероятность образования полноценного праймера RNAII для ДНК полимеразы (без связывания с комплиментарной RNAI), ρ – вероятность того, что полноценный праймер для ДНК-полимеразы приведет к репликации плазмиды, ε_I – время полураспада свободной RNA I и D – скорость роста популяции. Как было упомянуто выше, вероятность транскрипции RNAII без связывания с ингибиторной молекулой RNAI (при любой конечной концентрации R это, очевидно, возможно) зависит от точного механизма взаимодействия RNAI и RNAII (и последовательное образование (диссоциация) комплекса RNAII::RNAI), а точнее, от числа сайтов в “окне ингибирования”, необходимых для полного ингибирования транскрипции молекулы RNAII. Две основные зависимости были предложены в [2]:

$$Q(R) = \frac{1}{1 + R/k}, \text{ гиперболическим, и } Q(R) = \exp(-R/k), \text{ экспоненциальным}$$

Причем, разные механизмы ингибирования соответствуют различной чувствительности скорости репликации плазмид $\rho k_{II} Q(R)$ к изменению концентрации R антисенсной молекулы. В случае экспоненциального ингибирования число репликаций на плазмиду в течение одного клеточного деления находится гораздо ближе к единице, чем при гиперболическом ингибировании, что, впрочем, компенсируется высокой скоростью производства и распада молекулы RNAI при экспоненциальном ингибировании.

Ряд экспериментальных наблюдений действительно подтверждают, что в широком диапазоне условий культивирования скорость транскрипции молекулы RNAI является очень высокой, а период полураспада RNAI составляет несколько минут [4]. Более того, как показывает анализ, высокая скорость оборота ингибиторной молекулы необходима для стабильной репликации плазмид. Основываясь на этих результатах, можно предположить, что $k_I \gg k_{II}$ и $\varepsilon_I \gg D$. Тогда второе уравнение в (9) является быстрым по сравнению с первым, и значение концентрации RNAI тогда выражается:

$$R(t) \approx \frac{k_I}{\varepsilon_I} x(t). \tag{10}$$

Тогда система (9) сводится к уравнению:

$$\dot{x} = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right) - Dx \tag{11}$$

Сравнивая (11) с (7), мы замечаем, что они совпадают при $\tau = 1$ и параметрах $\mu(x, S) = D$ и $\lambda(x) = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right)$. В случае гиперболического и экспоненциального механизмов ингибирования функция перерепликации плазмид $\lambda(x)$ принимает вид:

$$\lambda(x) = \frac{\rho k_{II} x}{1 + \frac{k_I}{\varepsilon_I} \frac{x}{k}} = D \frac{\theta x}{1 + \frac{x}{K}} \approx D \theta K = \text{const (гиперболический)} \tag{12}$$

$$\lambda(x) = \rho k_{II} x \exp\left(-\frac{k_I}{\varepsilon_I} \frac{x}{k}\right) = D \theta x \exp\left(-\frac{x}{K}\right) \text{ (экспоненциальный)} \tag{12a}$$

где $\theta = \rho k_{II} / D$, $K = \varepsilon_I k / k_I$ и $\tau = 1$.

Таким образом, показана связь между феноменологическими параметрами популяционной динамики плазмидсодержащих микроорганизмов $\lambda(x)$ и τ и параметрами, описывающими кинетику репликации плазмид в индивидуальной клетке K и θ . Приближение $\lambda = \text{const}$, использованное в целом ряде исследований, относится к ColE1-типа плазмидам с предположительно гиперболическим механизмом ингибирования репликации плазмид, тогда как начальное увеличение и последовательное снижение копияности плазмид описывается экспоненциальным механизмом ингибирования.

Сравнение с экспериментальными данными распределения клеток с различным числом копий плазмиды при разных механизмах ингибирования. Математическая модель (1) достаточно точно описывает как динамику среднего числа копий плазмиды в популяции, так и изменение численности плазмидсодержащих и бесплазмидных клеток при длительном культивировании. Можно провести сопоставление расчетов по математической модели и стационарных распределений клеток популяций трансгенных бактерий по количеству копий плазмид, которые к настоящему времени экспериментально определены для целого ряда плазмид [4].

Изменение среднего числа копий плазмиды $x(t)$ в популяции трансгенных микроорганизмов описывается уравнением (5) и в стационарном состоянии находится из уравнения (8), что в явном виде выражается как:

$$n = K \ln(\theta), \quad (13)$$

$$n = K(\theta - 1), \quad (14)$$

для экспоненциального (13) или гиперболического (14) механизмов ингибирования с $\theta = \rho k_{II}/D$. Используя модель (2) и метод нахождения динамики средних (3)-(4), продемонстрированный на вычислении динамики среднего числа копий в распределенной модели (1), находится уравнение на второй момент $\mu = \sum_i i^2 p_i$ распределения плазмид в микробной популяции:

$$\dot{\mu}(t) = \sum_i \lambda_i p_i(t) + x(t) + 2 \left[\sum_i i \lambda_i p_i(t) - \mu(t) \right], \quad (15)$$

где $x(t)$ описывает изменение средней копийности. Тогда вариационный коэффициент CV стационарного распределения \tilde{p}_i , который определяет относительную ширину распределения, находится из выражения:

$$CV = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{n} = \frac{\sqrt{\mu - n^2}}{n} = \sqrt{\sum_i i \lambda_i \frac{\tilde{p}_i}{n^2} + \frac{1}{n} - 1} \quad (16)$$

Стационарное распределение клеток в популяции с различным числом копий плазмиды получается из уравнения (2) при $\dot{X} = 0$, или:

$$\left(i + \frac{\lambda_i}{\tau D} \right) \tilde{p}_i = (i+1) \tilde{p}_{i+1} + \frac{\lambda_{i-1}}{\tau D} \tilde{p}_{i-1} \quad (17)$$

Вспомним, что $p_i = X_i/X$ (см. модель (2)). То, что $\lambda_i = \tau \rho k_{II} Q(i/K)$, означает, что функция $\lambda_i/(\tau D)$ зависит только от двух составных параметров $\theta = \rho k_{II}/D$ и $K = \varepsilon_1 k/k_I$ (см. выражения (12), (13)).

Следовательно, определяя среднее число копий n и дисперсию числа копий плазмиды σ^2 (вариационный коэффициент CV) в экспериментальной популяции плазмидсодержащих микроорганизмов, мы можем определить два важных параметра: θ , характеризующий эффективность процесса репликации плазмиды по сравнению с удельной скоростью роста популяции микроорганизмов (точнее, число успешных транскрипций молекулы RNAII с одной плазмиды за клеточный цикл) и K , связанный с эффективностью ингибирования препрайма RNA II ингибиторной молекулой RNA I.

Из приведенных выражений видно, что дисперсия стационарного распределения при экспоненциальном ингибировании гораздо меньше, чем при гиперболическом (4). Этот результат, таким образом, подтверждает

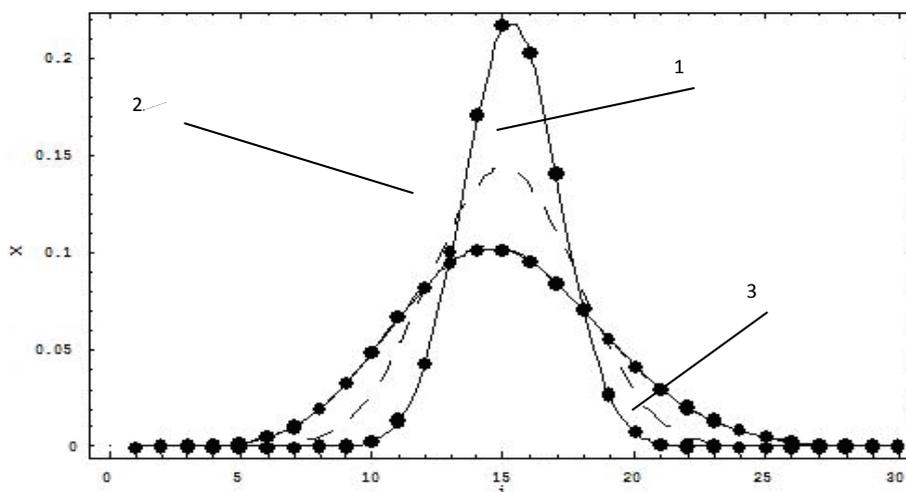


Рисунок 3. Стационарные распределения клеток с различным числом копий плазмиды при разных механизмах ингибирования репликации плазмид в соответствии с решением (18) математической модели (1). Обозначения: 1 – экспоненциальный механизм ингибирования, 2 – то же в точной модели (3), 3 – гиперболический механизм ингибирования. Параметры: $n = 15$, $\theta = 100$, K находится из уравнений (13), (14) совпадает с теоретически

предсказываемым распределением Пуассона $p_i = \frac{n^i}{i!} \exp(-n)$ (см. выражение (10)) а, следовательно, не зависит от θ .

увеличенную стабильность плазмид с экспоненциальным механизмом ингибирования, которая в основном связана с малой дисперсией стационарного распределения [4]. Отметим, что при достаточно большой средней копияности (рис. 3, $n = 15$) стационарное распределение (3) при гиперболическом механизме ингибирования с другой стороны, распределение (1) на рисунке 3, вычисляемое в математической модели (1) при экспоненциальном механизме ингибирования репликации плазмид, немного отличается от предсказания точной модели, изображенного на рис. 3 (кривая (2)), которое при $\theta \gg 1$ дается биномиальным распределением (4). Очевидно, это связано с тем, что точная модель не учитывает скорости репликации плазмид в клетке, которая возрастает многократно при больших θ . Если скорость репликации плазмид велика ($\theta \gg 1$), то в стационарном состоянии будет много клеток с копияностью плазмид, близкой к средней или с копияностью больше (меньше) средней, что видно на рис. 3. Таким образом, математическая модель (1) описывает наблюдаемое распределение клеток с различным числом копий плазмид, а, следовательно, стационарное распределение (18), может быть применено для оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов *in vivo* с помощью выражений (13)-(18).

Количественную оценку популяционной стоимости клонированных генов трансгенных бактерий можно провести также на основе зависимости продолжительности клеточного цикла от времени накопления белка, инициирующего репликацию хромосомы – DnaA. Для этого необходимо построить вероятностную модель синтеза этого белка с учетом конкуренции за рибосомы мРНК, кодирующих DnaA, с остальными мРНК (в том числе и плазмидными). Время накопления инициирующего количества DnaA (а, значит, и время генерации) зависит от количества плазмидных мРНК, которое в свою очередь определяется размером и числом копий плазмид, а также эффективностью экспрессии клонированных генов [5]. Эти важнейшие характеристики трансгенных бактерий, содержащих клонированные гены биолюминесценции, необходимы для использования их при распространении трансгенных микроорганизмов (ГМО) в окружающей среде.

Таким образом, «популяционная стоимость» клонированных на плаزمидах генов трансгенных микроорганизмов должна определяться, прежде всего, копияностью плазмид, эффективностью экспрессии клонированных генов, их токсичностью для метаболизма клеток, затратами на поддержание активно функционирующих клонированных генов [6-9]. Действительные механизмы экспериментальной эволюции в последнее время интенсивно изучаются [10-11]. Среди них наибольшее значение имеют компенсаторные мутации в хромосоме или плазмиде, интерференция транскрипции клонированных генов и репликации ДНК.

Список литературы / References:

1. Brockhurst M.A., Harrison E. Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox. *Trends Microbiol.*, 2022, vol. 30, no. 6, pp. 534-543.
2. Paulsson J., Nordstrom K., Ehrenberg M. Requirements for rapid plasmid ColE1 copy number adjustments: a mathematical model of inhibition modes and RNA turnover rates. *Plasmid.*, 1998, vol. 39, pp. 215–234.
3. Atlung T., Christensen B.B., Hansen F.G. Role of the *rom* protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid.*, 1999, vol. 41, pp. 110-119.
4. Standley M.S., Million-Weaver S., Alexander D.L., Hu S., Camps M. Genetic control of ColE1 plasmid stability that is independent of plasmid copy number regulation. *Curr. Genet.*, 2019, vol. 65, no. 1.
5. Shuvaev A. DnaA dynamics could be linked with fitness cost in bacteria. *Cell Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 70, no. 1, pp. 295-299.
6. Rajer F., Sandegren L. The Role of Antibiotic Resistance Genes in the Fitness Cost of Multiresistance Plasmids. *mBio*, 2022, vol. 13, no. 1.
7. Dimitriu T., Matthews A.C., Buckling A. Increased copy number couples the evolution of plasmid horizontal transmission and plasmid-encoded antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, vol. 118, no. 31.
8. San Millan A., Santos-Lopez A., Ortega-Huedo R., Bernabe-Balas C., Kennedy S.P., Gonzalez-Zorn B. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, pp. 3335-3341.
9. Брильков А.В., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Жабрун И.В., Логинов Ю.Ю. Экологическая биофизика: опыт математического моделирования динамики трансгенных микробных популяций. *Акту. вопр. биол. физ. и хим.*, 2019, т. 4, № 3, с. 378-382 [Brilkov A.V., Brilkova E.V., Ganusov V.V., Zhabrun I.V., Loginov Yu.Yu. Ecological biophysics: experience of mathematical modeling of dynamics of transgenic microbial populations. *Act. vopr. biol. phys. and chem.*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 378-382 (In Russ.)].
10. Vanacker M., Lenuzza N., Rasigade J. P. The fitness cost of horizontally transferred and mutational antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.*, 2023, vol. 14, p. 1186920.
11. Hall J.P.J., Wright R.C.T., Harrison E., Muddiman K.J., Wood A.J., Paterson S. et al. Plasmid fitness costs are caused by specific genetic conflicts enabling resolution by compensatory mutation. *PLoS Biol.*, 2021, vol. 19, e3001225.

MATHEMATICAL MODELING OF THE EXPERIMENTAL EVOLUTION OF TRANSGENIC BACTERIA:
“PLASMID PARADOX”Brilkov A.V.¹, Brilkova H.V.^{1,2}, Jabrun I.V.¹, Ganusov V.V.³, Loginov Yu.Yu.⁴, Shuvaev A.V.¹¹ Siberian Federal University

Svobodny Ave., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

² Institute of Biophysics FIC SB RAS

Akademgorodok, pp. 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru.

³ University of Tennessee

Knoxville, TN 37996-1937, USA

⁴ Siberian State Technical University named after Acad. M. F. Reshetnev

Gaz. ave. Krasnoyarsk Worker, 31, Krasnoyarsk, 660014, Russia

Received 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0638

Abstract. In the present work, a mathematical model for the distribution of transgenic bacteria cells by the number of plasmids contained in them is constructed. This makes it possible to study the patterns of survival of transgenic microorganisms under certain environmental conditions, taking into account various characteristics of transgenic strains, for example, the stability of plasmids in new cells, the “population cost” of maintaining conjugative and non-conjugative plasmids, the efficiency of expression of genes cloned on plasmids, and others. The “plasmid paradox” lies in the fact that although the presence of plasmids containing cloned genes usually reduces the specific growth rate of transgenic bacteria, but with prolonged growth of bacteria under non-selective conditions (“experimental evolution”, 20-30 or more generations of the original form without antibiotics) “cost of fitness” is reduced by an order of magnitude or two. An analysis of the experimental results leads to the conclusion that this is due to a change in the difference in the growth rates of plasmid and plasmid-free cells, with a change in the probability of formation of plasmid-free cells, the copy number of plasmids, and the expression of cloned genes in cells of transgenic bacteria under various environmental conditions.

Key words: *transgenic bacteria, experimental evolution, “plasmid paradox”, mathematic modeling.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ГЕТЕРОГЕННОЙ ОПУХОЛИ. ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ ОТДЕЛЬНО И В СОЧЕТАНИИ С ИНГИБИТОРОМ СИНТЕЗА ДНК – АраЦ

Лесовая Е.Н., Садыкова О.Г., Лобачевский П.Н.

Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, Московская обл., 141980, РФ; e-mail: sadykova@jinr.ru

Поступила в редакцию 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0639

Аннотация. Интерпретация роста злокачественной опухоли и ее реакции на терапевтическое воздействие требует рассмотрения ее гетерогенности с учетом присутствия в ней небольшой субпопуляции опухолевых стволовых клеток наряду с обычными опухолевыми клетками. В данной работе предложена математическая модель, сочетающая две основные концепции теории роста опухоли - стохастический рост и наличие субпопуляции опухолевых стволовых клеток. Модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающую динамику субпопуляций опухолевых клеток с учетом различных типов деления и переходов между ними. Важной особенностью системы является поддержание равновесной пропорции опухолевых стволовых клеток в необлученной опухоли с помощью обратной связи. Модель применена для интерпретации экспериментальных данных по торможению роста опухоли после одиночного облучения протонами в дозе 10 Гр и комбинированного действия облучения и ингибитора синтеза ДНК АраЦ у лабораторных мышей с привитой меланомой В16. Влияние облучения отдельно и облучения совместно с АраЦ включено в систему с помощью параметра, описывающего вероятность утраты клеткой способности к успешному делению. Рассчитанные в результате зависимости объема опухоли от времени для случаев без облучения, после облучения и после облучения с АраЦ служат хорошим приближением экспериментальных данных, что позволяет оценить параметры системы.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, радиотерапия, протоны, тик Брэгга радиосенсибилизаторы, обыкновенные дифференциальные уравнения, математическое моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время радиотерапия относится к одному из самых распространенных методов лечения рака наряду с хирургией и химиотерапией. Приблизительно половина всех онкологических больных проходят лечение радиотерапией как в качестве основного, так и вспомогательного метода. Традиционным подходом в радиотерапии является использование фотонного (рентгеновского) излучения, эффективность которого существенно возросла с использованием современных методов томографии опухолей. В последнее время также все более широкое распространение в радиотерапии получают корпускулярные типы излучения, такие как протоны и ионы углерода. Преимущество корпускулярных излучений заключается в том, что их физические характеристики позволяют максимально локализовать поглощенную дозу в опухоли при минимизации дозы в окружающих нормальных тканях [1].

Однако, несмотря на все достижения радиотерапии, сам по себе этот метод не обладает стопроцентной эффективностью излечения, поэтому актуальными остаются радиотерапевтические подходы с использованием различных радиосенсибилизаторов, которые увеличивают радиочувствительность преимущественно злокачественных клеток. Особенно применение радиосенсибилизаторов позволит эффективно лечить радиорезистентные опухоли, например, такие как меланома. Одним из таких потенциальных соединений является широко известный аналог цитозина 1- β -D-арабиофуранозилцитозин (АраЦ). Радиосенсибилизирующее действие АраЦ продемонстрировано в лабораторных условиях на различных радиобиологических моделях клеток и животных. Это соединение под названием цитарабин одобрено для клинического применения при лечении ряда злокачественных заболеваний, однако не в качестве радиосенсибилизатора, а в качестве цитостатического средства. Механизм действия АраЦ заключается в блокировании репликации ДНК, которая является неотъемлемым этапом репарации повреждений ДНК, в том числе и радиационно-индуцированных.

Необходимым элементом интерпретации реакции опухоли на облучение и применение радиосенсибилизаторов является понимание механизмов возникновения и прогрессирования опухолей. На сегодняшний день появляется все больше данных в пользу так называемой иерархической теории канцерогенеза в противоположность стохастической теории возникновения и прогрессирования опухолей, которая постулировала, что любая клетка злокачественной опухоли обладает клоногенными свойствами. В отличие от стохастической теории, иерархическая теория предполагает, что раковые клетки формируются и поддерживаются небольшой популяцией клеток – клеточных предшественников, которые обладают способностью неограниченного самообновления и способны дать начало всем остальным опухолевым клеткам в популяции [2]. Эти редкие клетки (их доля порядка 1% в опухоли [3,4]), называемые опухолевыми стволовыми клетками (ОСК), играют важную роль в иницировании и продолжении ракового процесса. Принято считать, что

ОСК являются более резистентными к воздействию терапевтических агентов, в том числе и радиации, а потому именно они являются одной из причин возникновения рецидива опухоли спустя некоторое время после лечения. Поэтому современные экспериментальные и теоретические исследования направлены на изучение особенностей ОСК, их отличие от других опухолевых клеток и ключевые аспекты их взаимодействия друг с другом, а также поиск методов лечения, нацеленных именно на ОСК.

Для изучения радиосенсибилизирующего потенциала АраЦ были проведены эксперименты на мышах с использованием модели опухоли меланомы В16 с целью установить влияние АраЦ на замедление роста опухоли после облучения протонами в пике Брэгга [4]. В этом исследовании радиосенсибилизирующий эффект АраЦ был подтвержден, а также было обнаружено снижение доли ОСК меланомы В16 в 3,1 раза после комбинированного воздействия АраЦ с протонами по сравнению с одиночным облучением. Однако в другом исследовании с этой же моделью было обнаружено увеличение доли ОСК после облучения опухоли фотонным излучением [5]. Данные результаты подчеркивают необходимость более детального изучения роли ОСК в реакции опухоли на облучение.

Целью данной работы является построение математической модели для описания и интерпретации экспериментальных данных, полученных в работе [4], по замедлению скорости роста опухоли после облучения протонами и таковыми в комбинации с АраЦ. Модель основана на концепции ОСК, как наиболее резистентного пула опухолевых клеток, способных дать начало всем другим клеткам и обеспечить рост опухоли после воздействия. Модель не претендует на рассмотрение всех деталей сложной структуры и взаимодействия всех компонентов опухоли, а учитывает только минимально необходимый уровень сложности для интерпретации вышеупомянутых экспериментальных данных.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

В основу построения модели роста опухоли и ее реакции на облучение положены следующие предположения:

1. Опухоль содержит три субпопуляции клеток (рис. 1): а) небольшая субпопуляция опухолевых стволовых клеток (ОСК); б) самая многочисленная субпопуляция собственно клеток присущих рассматриваемой опухоли (ОК); и в) утратившие способность к делению опухолевые клетки из субпопуляции (а) (УСДК).

2. ОСК могут делиться как симметрично, давая начало двум новым ОСК (рис. 1), так и несимметрично, давая начало ОСК и ОК. Пропорция ОСК в опухоли поддерживается приблизительно постоянной с помощью обратной связи. Данное предположение связано с экспериментальными данными, указывающими на незначительные изменения доли ОСК в процессе роста опухоли [4].

3. ОСК ответственны за восполнение субпопуляции ОК в случае их гибели, что достигается путем увеличения вероятности несимметричного деления ОСК. Это предположение согласуется с общепризнанной ролью ОСК в опухоли [2].

4. Рост опухоли замедляется с увеличением ее объема. Это предположение следует из экспериментальных наблюдений [4,6], а также хорошо описано и применяется в других математических моделях [7].

5. Гибель клеток после воздействия (облучения или облучения в присутствии АраЦ) выражается в потере ими пролиферативной способности (репродуктивная гибель). При этом образуются так называемые УСДК (рис. 1). Вероятность перехода ОК в УСДК сохраняется у потомков ОК на протяжении нескольких делений. Это предположение подкреплено наблюдениями в экспериментах по изучению клоногенной выживаемости клеток, в которых наблюдается гетерогенность размеров колоний вследствие образования в процессе роста нежизнеспособных клеток [8-10].

6. УСДК вносят вклад в регистрируемый объем опухоли, однако с течением времени удаляются иммунной системой.

В модели для субпопуляций введены следующие обозначения:

$X(t)$ – объем, занимаемый опухолевыми клетками (ОК);

$Y(t)$ – объем, занимаемый опухолевыми стволовыми клетками (ОСК);

$Z(t)$ – объем, занимаемый утратившими способность к делению опухолевыми клетками (УСДК).

Симметричное деление ОСК на две ОСК происходит с вероятностью $-P_y$, а ассиметричное деление ОСК на ОСК и ОК, соответственно, с вероятностью $(1 - P_y)$. Мы не рассматриваем третий вариант деления ОСК, при котором образуются две ОК, так как модель с этим вариантом эквивалентна модели с двумя путями деления при соответствующем соотношении вероятностей [11,12].

В отличие от ОСК, ОК способны делиться только на две ОК, с вероятностью $-(1 - P_z)$, где P_z – есть вероятность репродуктивной гибели, то есть перехода ОК в состояние УСДК, при котором деления не происходит. Причиной репродуктивной гибели может быть наличие в клетке нерепарируемых повреждений ДНК, образованных в результате действия химического агента или радиации. ОК вполне могут утратить способность к делению и в отсутствие цитотоксического воздействия. Таким образом P_z зависит от внешних условий среды, в которой находится опухоль. Заметим, что для ОСК в нашей модели отсутствует механизм утраты способности к делению. Тем самым мы учитываем более высокую, по сравнению с ОК, устойчивость ОСК к неблагоприятным условиям.

Итак, модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, вида:

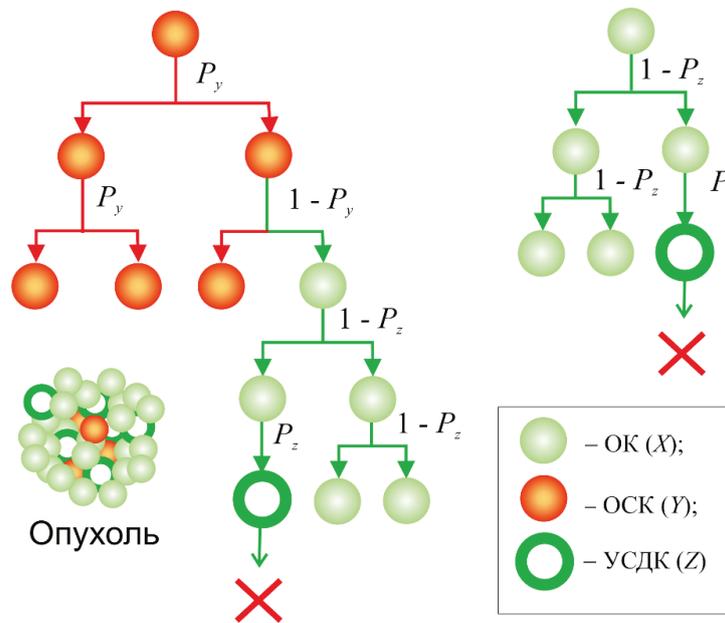


Рисунок 1. Пути и вероятности деления ОСК (слева) и ОК (справа), рассмотренные в данной модели. Симметричное деление ОСК с образованием двух ОСК происходит с вероятностью P_y , несимметричное деление ОСК с образованием ОСК и ОК происходит с вероятностью $1-P_y$. ОК делится только симметрично с образованием двух ОК с вероятностью $1-P_z$, а с вероятностью P_z переходит в УСДК

$$\frac{dX}{dt} = (K_{x0}(1 - 2P_z)X + K_y(1 - P_y)Y) \left(1 - \left(\frac{X+Y+Z}{V_{max}}\right)^b\right), \tag{1}$$

$$\frac{dY}{dt} = K_y P_y Y \left(1 - \left(\frac{X+Y+Z}{V_{max}}\right)^b\right), \tag{2}$$

$$\frac{dZ}{dt} = K_{x0} P_z X \left(1 - \left(\frac{X+Y+Z}{V_{max}}\right)^b\right) - K_z Z. \tag{3}$$

Ограничение роста опухоли, заявленное в предположении п.4, добавлено в уравнения (1) – (3) в виде множителя $1 - \left(\frac{X+Y+Z}{V_{max}}\right)^b$, в котором V_{max} представляет предельную величину объема опухоли, b – свободный параметр [7].

Параметр K_{x0} определяет скорость роста субпопуляции ОК или вероятность деления клетки в единицу времени, которая в нашей модели является постоянной величиной. Скорость роста субпопуляции ОСК – K_y учитывает имеющиеся у всех стволовых клеток, в том числе и у ОСК сигнальные механизмы, которые регулируют равновесную пропорцию стволовых клеток в опухоли. А именно, если пропорция ОСК превышает равновесную F_{s0} , то ОСК делятся медленнее, если наоборот по каким-либо причинам доля ОСК падает, то скорость их пролиферации возрастает. Итак, параметр K_y имеет вид:

$$K_y = K_{x0} \left(\frac{F_{s0}}{F_s}\right)^c, \tag{4}$$

где $F_s = Y/(X + Y + Z)$ – пропорция ОСК в общем объеме опухоли, c – свободный параметр. Такая зависимость скорости роста ОК диктуется условием, что при $F_s < F_{s0}$ единственным способом достижения баланса является увеличение скорости роста ОСК, в то время как при $F_s > F_{s0}$, баланс может быть достигнут как уменьшением их скорости роста, так и уменьшением вероятности симметричного деления ОСК P_y .

Полагаем, что P_y определяется величиной пропорции УСДК в опухоли $F_d = Z/(X + Y + Z)$. Если она возрастает, то соответственно, требуется восполнить популяцию ОК, значит должна увеличиться вероятность асимметричного деления. Итак, для P_y запишем следующее выражение

$$P_y = (1 - F_d)^d, \tag{5}$$

где d – свободный параметр, определяющий эффективность переключения деления ОСК на несимметричный путь при увеличении доли УСДК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты численного решения системы уравнений (1) – (3) и подбора параметров для оптимальной подгонки к экспериментальным данным [4] представлены на рисунке 2. Соответствующие величины параметров показаны в таблицах 1 и 2.

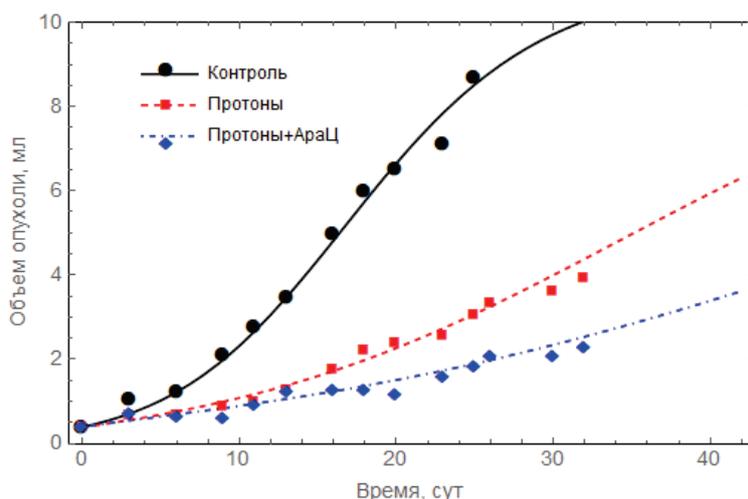


Рисунок 2. Результаты фитирования экспериментальных данных по росту опухоли, представленных символами [4], расчетными кривыми величины объема опухоли $V(t) = X(t) + Y(t) + Z(t)$, полученными при решении системы уравнений (1) – (3). Начальные условия для $X(0) = 0,99 V(0)$, $Y(0) = 0,01 V(0)$, и $Z(0) = 0$. $V(0) = 0,395$ мл (Контроль), $V(0) = 0,383$ мл (Протоны), $V(0) = 0,397$ мл (Протоны + АраЦ)

Значения скорости роста ОК K_{x0} , максимального объема V_{max} и показателя степени b подобраны для оптимального приближения рассчитанной временной зависимости роста необлученной опухоли к экспериментальному графику (рис. 2). При этом равновесная пропорция ОСК F_{s0} принималась равной 0,01 исходя из имеющихся экспериментальных данных, где обнаружено, что в стационарном состоянии доля стволовых клеток в очаге привитой опухоли редко превышает 1-3% [4]. Величина параметра $c = 2$ в выражении (4) практически не влияет на расчетную кривую роста необлученной опухоли. Она подбиралась таким образом, чтобы доля ОСК F_s выходила на равновесную величину 0,01 при начальных значениях $F_s(0)$ в диапазоне от 0,005 до 0,02. В окончательном варианте расчета $F_s(0)$ принималась равной 0,01.

В то время как рост необлученной опухоли близок к экспоненциальному с насыщением по мере приближения к V_{max} , облученные опухоли растут медленнее, чем по экспоненциальному закону (рис. 2). Фактор приближения к V_{max} для этих случаев вносит незначительный вклад, а основными механизмами замедления роста являются образование УСДК и их последующая элиминация. Величины вероятности перехода ОК в УСДК P_z и показателя степени d в выражении (5) приведены в таблице 2. Для необлученной опухоли принимали значение $P_z = 0,01$, которое практически не влияет на расчетную кривую, но отражает тот факт, что в необлученной опухоли тоже могут образовываться нежизнеспособные клетки.

Таблица 1. Параметры модели

Параметр	Наименование	Величина
K_{x0}	Скорость роста ОК, свободный параметр (сутки ⁻¹)	0,225
V_{max}	Максимальный объем опухоли, свободный параметр (мл)	11
F_{s0}	Равновесная доля стволовых клеток в опухоли	0,01
b	Свободный параметр модели	0,7
c	Свободный параметр модели	2
K_z	Скорость элиминации УСДК, свободный параметр (сутки ⁻¹)	0,18

Дополнительно к временным зависимостям злокачественного роста, интересно посмотреть, как ведут себя доля ОСК $F_s(t)$ и доля УСДК $F_d(t)$ в ответ на облучение и облучение в сочетании с АраЦ. Соответствующие графики приведены на рис. 3 и 4. Как видно, в обоих случаях: после облучения протонами и таковыми в сочетании с АраЦ, доля ОСК немного возрастает от заданной равновесной величины (рис. 3). Причем в случае

Таблица 2. Величина P_z в зависимости от облучения и комбинированного воздействия облучения с АраЦ

Условие	P_z	d
Контроль	0,01	3
Облучение	0,28	
Облучение + АраЦ	0,35	

комбинированного с АраЦ облучения этот эффект более выражен. В контексте модели это обусловлено уменьшением доли ОК в опухоли вследствие их перехода в УСДК и неспособности последних делиться. Подобные результаты наблюдались в ряде экспериментов по изменению доли стволовых клеток после облучения фотонами, например, в [5,13]. По-видимому, повышение доли ОСК происходит на фоне снижения скорости роста объемов субпопуляций как ОК, так и ОСК. Так рассчитанный нами рост объема субпопуляции ОСК существенно замедляется после облучения и комбинированного с АраЦ облучения по сравнению с контролем. Этот эффект демонстрирует срабатывание системы обратной связи и переключение ОСК на путь несимметричного деления, чтобы восстановить субпопуляцию ОК. Таким образом, мы получаем в модели опосредованный негативный эффект на ОСК исследуемого цитотоксического воздействия на ОК.

Как следовало ожидать, доля УСДК вначале расчетного периода существенно возрастает в отличие от необлученных УСДК (рис. 4). Далее, вследствие элиминации и наличия в модели системы обратных связей и за счет постепенного роста субпопуляций ОСК и ОК пропорция УСДК начинает убывать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе построена новая математическая модель, описывающая динамику гетерогенной опухоли на основе концепции об опухолевых стволовых клетках. Модель представляет собой систему трех обыкновенных

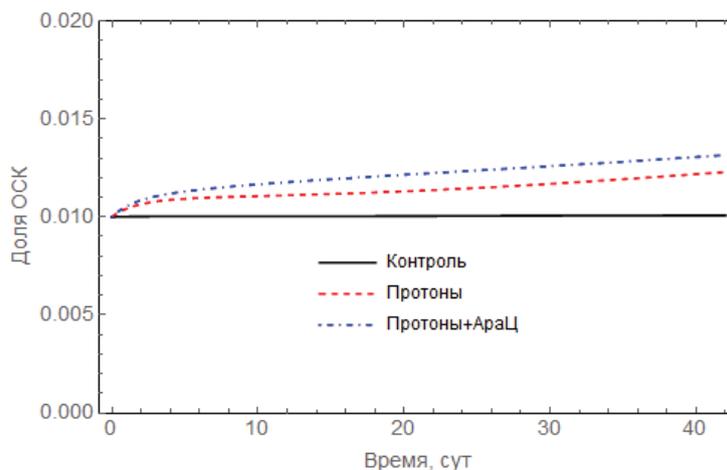


Рисунок 3. Доля ОСК в зависимости от времени. Начальные условия: 1% для всех графиков

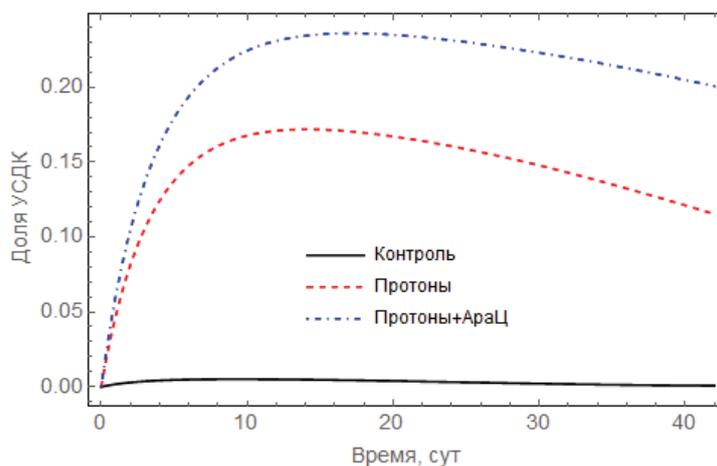


Рисунок 4. Доля УСДК в зависимости от времени. Начальные условия: 0% для всех графиков

дифференциальных уравнений для ОК, ОСК и УСДК. Включение в модель эффектов облучения протонами и протонами в сочетании с АраЦ задается путем изменения параметра, отвечающего за переход клеток из пролиферативного состояния в состояние, в котором дальнейшее деление невозможно. Важным достоинством предложенной системы уравнений является учет механизма саморегуляции выбора симметричного и асимметричного путей делений ОСК. Кроме того, в модели заложена устойчивость ОСК к воздействию неблагоприятных условий. Проявление радиорезистентности ОСК выражено в незначительном повышении их доли после облучения и облучения с АраЦ, как показано в наших расчетах.

В результате численного расчета продемонстрировано существенное снижение скорости роста опухоли после облучения. Причем дополнительное действие АраЦ усиливает эффект облучения. Получено хорошее согласие наших графиков для объемов опухоли в зависимости от времени с экспериментальными данными из работы [4]. С помощью аппроксимации экспериментальных графиков модельными кривыми подобраны оптимальные значения параметров модели.

Список литературы / References:

1. Mohan Rю, Grosshans D. Proton therapy - Present and future. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2017, vol. 109, pp. 26-44.
2. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, vol. 414, no. 6859, pp. 105-111.
3. Yang G., Xue F., Chen X. Prognostic value of different amounts of cancer stem cells in different molecular subtypes of breast cancer. *Gland Surg.*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 20-4, doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2012.04.02.
4. Zamulaeva I.A., Matchuk O.N., Selivanova E.I. et al. Radiobiological Effects of the Combined Action of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine and Proton Radiation on B16 Melanoma in vivo. *Phys. Part. Nuclei Lett.*, 2023, vol. 20, pp. 63-75.
5. Matchuk O.N., Orlova N.V., Zamulaeva I.A. Changes in the relative number of SP cells of melanoma line B16 after radiation exposure in vivo. *Radiats Biol. Radioekol.*, no. 5, 2016, pp. 487-493.
6. Hu Z., Sun Y., Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, no. 14, pp. 8161-8166, doi: 10.1073/pnas.96.14.8161.
7. Sachs R.K., Hlatky L.R., Hahnfeldt P. Simple ODE Models of Tumor Growth and Angiogenic or Radiation Treatment. *Mathematical and Computer Modelling*, 2001, vol. 33, pp. 1297-1305.
8. Kimmel M., Axelrod D.E. Unequal cell division, growth regulation and colony size of mammalian cells: A mathematical model and analysis of experimental data. *Journal of Theoretical Biology*, 1991, vol. 153, no. 2, pp. 157-180.
9. Panyutin I., Holar S., Neumann R. et al. Effect of ionizing radiation on the proliferation of human embryonic stem cells. *Sci Rep*, 2017, vol. 7, p. 43995
10. Axelrod D.E., Kuczek T. Clonal heterogeneity in populations of normal cells and tumor cells. *Computers & Mathematics with Applications*, 1989, vol. 18, iss. 10p11, pp. 871-881.
11. Weekes S.L., Barker B., Bober S., Cisneros K., Cline J., Thompson A., Hlatky L., Hahnfeldt P., Enderling H. A multicompartiment mathematical model of cancer stem cell-driven tumor growth dynamics. *Bull Math Biol.*, 2014, vol. 76, no. 7, pp. 1762-1782, doi: 10.1007/s11538-014-9976-0.
12. Gao X., McDonald J.T., Hlatky L., Enderling H. Acute and fractionated irradiation differentially modulate glioma stem cell division kinetics. *Cancer Res.*, 2013, vol. 73, no. 5, pp. 1481-1490, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3429.
13. Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44(+) breast cancer-initiating cells to radiation. *J. Natl Cancer Inst.* 98, 2006, pp. 1777-1785.

MODELING OF HETEROGENEOUS TUMOR DYNAMICS. THE INFLUENCE OF PROTON IRRADIATION ONLY AND IN COMBINATION WITH DNA SYNTHESIS INHIBITOR – ARAC**Lesovaya E.N., Sadykova O.G., Lobachevsky P.N.**

Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research

Joliot-Curie Str., 6, Dubna, Moscow region, 141980, Russia; e-mail: sadykova@jinr.ru

Received 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0639

Abstract. Interpretation of the growth of a malignant tumor and its response to therapeutic treatment requires consideration of its heterogeneity, taking into account the presence in it of a small subpopulation of tumor stem cells along with ordinary tumor cells. In present work, a mathematical model is proposed that combines two basic concepts of the theory of tumor growth - stochastic growth and the presence of a subpopulation of tumor stem cells. The model is a system of ordinary differential equations that describes the dynamics of subpopulations of tumor cells, taking into account different types of division and transitions between them. An important feature of the system is the maintenance of the equilibrium proportion of tumor stem cells in an unirradiated tumor using feedback. The model was used to interpret experimental data on inhibition of tumor growth after protons irradiation at a dose of 10 Gy only and the combined treatment of irradiation and the inhibitor of DNA synthesis AraC in laboratory mice with grafted melanoma B16. The effect of irradiation only and irradiation in combination with AraC is included in the system using a parameter describing the probability of loss of the cell's ability to successfully divide. As a result, the dependence of tumor volume on time calculated for cases without irradiation, after irradiation and after irradiation with AraC serves as a good approximation of experimental data, which makes it possible to evaluate the parameters of the system.

Key words: *cancer stem cells, radiotherapy, protons, Bragg peak, radiosensitizers, ordinary differential equations, mathematical modeling.*

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ОЦЕНКИ СЛОЖНОСТИ ТЕКСТА ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ ГЕНОМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Митина А.В.¹, Орлова Н.Г.², Дергилев А.И.^{3,4}, Орлов Ю.Л.^{1,3,4}

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

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

² Финансовый Университет при Правительстве РФ

Ленинградский проспект, 49/2, г. Москва, 125167, РФ

³ Новосибирский государственный университет

ул. Пирогова, 1, г. Новосибирск, 630090, РФ

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН

просп. ак. Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: orlov@d-health.institute

Поступила в редакцию 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0640

Аннотация. Одна из классических задач биоинформатики - поиск повторов и статистически неоднородных участков последовательностей ДНК и полных геномов микроорганизмов. Теоретические подходы к исследованию сложности текста последовательностей макромолекул - ДНК, РНК и белков – развивались до появления полных геномных последовательностей и получили новый импульс в связи с распространением технологий массового параллельного секвенирования и бурным ростом доступных данных. Рассматриваются современные компьютерные методы и существующие программы оценки сложности текста ДНК и построения профиля свойств для анализа структуры геномов микроорганизмов. Дан обзор доступных онлайн-программ для поиска и визуализации повторов текста. Представлена собственная компьютерная реализация метода оценки лингвистической сложности текста и сжатия по Лемпелю-Зиву для выявления структурных особенностей и аномалий геномов микроорганизмов. Представлены примеры профилей анализа сложности текста. Рассмотрено применение оценок сложности к анализу последовательности генома коронавируса SARS-CoV2, последовательности вируса эндемического паротита *Mumps Orthorubulavirus*. Выявлены участки низкой сложности текста.

Ключевые слова: биоинформатика, биофизические модели, сложность текста, геномы микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач биоинформатики - исследование сложности символьных последовательностей (ДНК, белков и полных генов), поиск статистически неоднородных участков последовательностей [1]. Для изучения сложности генетических текстов применяют алгоритмы сжатия данных, анализ частоты повторов определенных участков в последовательности, таких как тандемные повторы, которые могут быть связаны с функциональными элементами генома [2-4]. Оценка энтропии (энтропия Шеннона) может быть применена для анализа вариативности участков последовательностей [5].

Для понимания генетической информации и ее связи с фенотипическими свойствами организмов необходимо проведение анализа последовательностей ДНК как текста, основанных на вычислении числовых значений свойств данной молекулы, таких как содержание GC, аминокислотного состава, вторичной структуры. Эти значения могут быть использованы для создания профиля свойств ДНК [6], что позволяет сравнивать различные последовательности и выявлять свойства, способные влиять на их функциональность [7-9].

Методы профилирования свойств ДНК с использованием компьютерных подходов включают в себя различные алгоритмы и программные инструменты, которые обрабатывают и анализируют биологические данные ДНК для извлечения полезной информации. Примеры применения профилей свойств включают:

1. Сравнение последовательностей ДНК, в том числе выравнивание с использованием физико-химических свойств (классические алгоритмы BLAST [10,11] и последующие модификации). Такие методы позволяют определить гомологию с другими известными последовательностями, предсказать функциональные элементы (например, гены, регуляторные регионы) и проводить анализ мутаций.

2. Предсказание неканонических структур ДНК на основе последовательности [12]. Это позволяет идентифицировать области, обладающие особыми структурными свойствами, такими как G-квадруплексы или двойные спиральные участки [13].

3. Анализ участков, мотивов и сайтов связывания транскрипционных факторов. Эти методы ищут мотивы (повторяющиеся паттерны символов) в последовательностях ДНК, которые могут быть связаны с функциональными элементами, такими как участки связывания белков или регуляторные мотивы промоторов генов [14]. Ранее были даны статистические оценки различия энтропии регуляторных последовательностей генов (сайтов связывания белков – транскрипционных факторов) и фланкирующих последовательностей [15]. Получающие все большее развитие алгоритмы машинного обучения и искусственного интеллекта широко используются для обнаружения и анализа таких мотивов.

4. Предсказание участков эпигенетических модификаций генома, к которым относятся участки метилирования ДНК и модификации гистонов, по статистическим свойствам последовательности [16]. Эти участки связаны с поиском CpG островов [17,18] (участков, обогащенных нуклеотидами GC, которые могут быть метилированы), и позиционированием нуклеосом на последовательности (такие участки на ДНК связаны с модификаций гистонов в составе нуклеосомы) [19,20]. Компьютерные методы могут быть использованы для теоретического предсказания мест эпигенетических модификаций на основе последовательности ДНК, что определяется в настоящее время в основном экспериментально, с помощью технологий серии ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation and sequencing) [21]. Это позволяет понять, как эпигенетические модификации влияют на функциональность генома [22].

5. Моделирование и симуляция структуры. С использованием компьютерных моделей и алгоритмов можно моделировать физические свойства и процессы, связанные с ДНК [6], такие как упаковка, взаимодействие с белками или лекарствами. Это позволяет предсказывать и понимать различные аспекты функционирования ДНК.

Цели данной работы – рассмотреть существующие методы и интернет-доступные программы оценки сложности и визуализации генетических текстов и анализа структурных особенностей полных геномов микроорганизмов, и разработать собственную программу оценки лингвистической сложности текста. В ходе исследований разработан оригинальный программный код для методов оценки сложности генетических текстов [23]. Программа применена для анализа сложности текста коронавируса и полных геномов микроорганизмов.

В целом, оценки сложности генетического текста [24] дали толчок развитию методов предсказания кодирующих участков ДНК, сайтов позиционирования нуклеосом [19], некодирующих РНК [2]. Использование оценок сложности улучшает предсказание регуляторных элементов генов [19,25], хотя является скорее дополнительным компьютерным инструментом для интерпретации найденных закономерностей.

Выявление участков низкой сложности в геномных последовательностях микроорганизмов позволяет определять быстро эволюционирующие части геномов прокариот [26], в том числе в связи с эволюцией окружающей среды [27], исследовать контекстные особенности участков мутаций генов эукариот [15,28], геномных участков сайтов связывания транскрипционных факторов [29,30]. Применительно к вирусам, оценки сложности позволяют рассмотреть связь таких участков с изменениями патогенности [31,32].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования являлись геномные последовательности и их функциональная разметка. Использовались данные из открытых баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

Рассмотрены существующие методы оценки сложности последовательности символов и компьютерные реализации применительно к ДНК [1,2]. Общий, наиболее фундаментальный подход к определению сложности символьных последовательностей (текстов) был предложен академиком А.Н. Колмогоровым в 1960-х. Число операций кодирования называется алгоритмической сложностью (сложностью по Колмогорову) [33]. Комбинаторная сложность позволяет находить участки повышенной сложности и простые участки, зачастую соответствующие коротким тандемным повторам. Операционной сложностью называют число операций, необходимых для сжатия текста алгоритмом Лемпеля-Зива [34]. В основе данного алгоритма лежит последовательное сканирование текста и добавление каждой последовательности символов, которую алгоритм встречает впервые, в словарь. Если алгоритм находит последовательность символов, которая уже есть в словаре, то он заменяет эту последовательность на ссылку в соответствующую запись в словаре. Применительно к ДНК могут быть использованы операции инвертирования (учет комплементарных) участков, поиск повторов текста.

Основным доступным инструментом является программный комплекс Complexity (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/lzcomposer/>) [24], разработанный в Институте цитологии и генетики СО РАН. Он позволяет определить сложность генетического текста по Лемпелю-Зиву [2] (операционная сложность) вместе с энтропийными оценками. Методика получила свое развитие в серии применений для анализа регуляторных районов ДНК эукариот [35], сравнения сложности белок-кодирующих и некодирующих последовательностей [36], фланкирующих районов участков мутаций [15,28].

Энтропия Шеннона может быть применена как для анализа коротких последовательностей олигонуклеотидов, так и для протяженных последовательностей. Используется только частный состав символов (из алфавита А, Т, С, G для ДНК). Вычисляется данная величина по следующей формуле (адаптировано из [2]):

$$H(x) = -\sum_{i=0}^n p(i) \log_n p(i), \quad (1)$$

где $p(i) = n_i/L$, n_i – число встретившихся символов типа i , L – длина последовательности (окна, в котором идет расчет), n – мощность алфавита (для алфавита ДНК равна 4).

Высокая энтропия генетического текста указывает на наличие разнообразных последовательностей (отсутствие повторов). Кроме того, энтропия Шеннона может быть использована для определения потенциальных границ функциональных областей в геноме.

Операционной, или компрессионной, сложностью называют число операций, необходимых для сжатия текста алгоритмом Лемпеля-Зива [24]. Для применения данного алгоритма к нуклеотидным последовательностям

необходимо учитывать все возможные виды повторов (помимо прямых повторов учитываются также инвертированные и комплементарные).

Лингвистической, или комбинаторной сложностью генетических текстов называют отношение числа встретившихся слов к числу всех возможных слов в последовательности заданной длины [37,38]. Формула расчета лингвистической сложности C для последовательности символов длины L :

$$C = (\sum_{i=1}^m V_i) / (\sum_{i=1}^m V_{i \max}), \quad (2)$$

где V_i – число слов длины i , m – максимальная длина слова $1 \leq m \leq L$. $V_{i \max}$ – максимально возможное число слов длины i в последовательности длины L . $V_{i \max}$ равен наименьшему из двух чисел: K^i , равное числу всех возможных слов длины i , или числу слов, которые можно разместить в последовательности – $(N-i+1)$.

Примеры расчета лингвистической сложности даны в работах [2,36].

Разработанная программа осуществляет расчет и визуализацию лингвистической сложности генетического текста, следуя формулам представленным в [2] и [38]. Разработка велась в среде Jupiter Notebook на языке Python (<https://jupyter.org/>). Программа рассчитывает лингвистическую сложность для любой последовательности, состоящей из четырехбуквенного алфавита. Программный код доступен по ссылке <https://github.com/Alinabio/complexity.git>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Разработка программы. Техническим результатом работы является разработка компьютерного кода. Программа рассчитывает лингвистическую сложность для любой последовательности, состоящей из четырехбуквенного алфавита.

Программа представляет собой простой и понятный инструмент для расчета и визуализации сложности геномов (в форме профиля). Работа с программой осуществляется через python-код, который является одним из основных инструментов биоинформатики (<https://www.python.org/downloads/>). Программа позволяет эффективно рассчитывать значения лингвистической сложности текста [38], в том числе и для длинных последовательностей (полных хромосом и геномов прокариот). Также программа предоставляет возможность настройки параметров (длины окна, шага, алфавита), что способствует получению результатов, соответствующих потребностям пользователя.

Программный код `linguistic complexity` состоит из трех смысловых блоков: расчет сложности всей последовательности (с функциями входа), расчет сложности в окне (`count_ling_complexity`), выдача результатов и визуализация (построение профиля).

Функция `count_ling_complexity` принимает на вход последовательность, равную длине окна и рассчитывает значение сложности для данной последовательности. Для расчета знаменателя используется цикл `for` и условные конструкции. В зависимости от величины i к значению знаменателя (`denominator`), которое по умолчанию равно 4 (количество возможных нуклеотидов длины 1) прибавляется число $i^{**alphabet}$ (если $i^{**alphabet}$ меньше длины окна) или число `len_window - (i-1)`, если $i^{**alphabet}$ больше длины окна.

Далее рассчитывается числитель для последовательности, который равен числу различных встретившихся слов в последовательности. Все встретившиеся слова записываются во множество `set_numerator`, которое оставляет только уникальные значения. Длина множества равна числителю. В переменной `result` рассчитывается значение сложности для конкретной последовательности, оно равно отношению числителя на знаменатель. Программа возвращает результат переменной `result`.

Функция `linguistic_complexity` принимает на вход уже четыре параметра: на вход передается файл в формате FASTA, длина окна – `len_window` (по умолчанию - 50), величина шага - `step` (по умолчанию - 100), размер алфавита – `alphabet` (по умолчанию - 4). Функция читает FASTA-файл с одной последовательностью и переводит её в строку. Далее создается словарь, ключами которого будут являться серединные позиции окна последовательности, а значениями – лингвистические сложности. Далее в цикле происходит заполнение словаря, значения рассчитываются на основании расчета функции `count_ling_complexity`. В итоге функция выводит словарь, где ключом служит позиция нуклеотида в середине окна, а значением - рассчитанное значение сложности окна.

Для визуализации полученных результатов была написана функция `visualization`. Для работы функции необходима установка библиотеки `Matplotlib` (<https://matplotlib.org/>). Для получения графика необходим ее модуль `Pyplot` (https://matplotlib.org/stable/api/_as_gen/matplotlib.pyplot.plot.html). С помощью данного модуля строится линейный график, где можно увидеть участки низкой и высокой сложности. График может быть конвертирован в текстовый формат для визуализации сторонними программами (Excel).

Компьютерную модель порождения последовательности ДНК с помощью повторов текста (дубликаций и инверсий) [24] можно рассматривать как информационную биофизическую модель. Мы исследовали применения этой модели для анализа последовательности генома коронавируса и поиска ассоциаций с участками патогенности [31,32].

2. Анализ сложности генома коронавируса. Пандемия COVID-19 придала импульс исследованиям в данной области [9], в том числе развитию баз данных биоинформатики для вирусов, масштабному сбору

статистики о каждой мутации в известных штаммах, детальному статистическому анализу и поиску новых моделей связи мутаций в геноме коронавируса и патогенности.

С использованием разработанной программы в геноме коронавируса были найдены участки низкой сложности текста. Их расположение соответствовало участкам повторяющихся моонуклеотидов, находившиеся между белок кодирующими последовательностями. На вход программа принимала последовательность всего генома SARS-CoV-2, полученную из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/694009/>).

SARS-CoV-2 относится к группе одноцепочечных РНК-вирусов. Геном данного вируса один из самых крупных вирусных геномов и составляет 29,9 Кб. Структурная организация генома SARS-CoV-2 приведена на рисунке 1.

Наиболее важными генами коронавируса, кодирующими белки, являются:

1. Ген, кодирующий S-белок. S-белок представляет собой гликопротеин оболочки, который играет наиболее важную роль в прикреплении вируса, слиянии и проникновении в клетки-хозяева и служит основной мишенью для разработки нейтрализующих антител, ингибиторов проникновения вируса и вакцин.

2. Ген, кодирующий М-белок. Этот белок играет ключевую роль в формировании вирусной оболочки.

3. Ген, кодирующий Е-белок. Данный белок участвует в сборке вирусной частицы.

4. Ген, кодирующий N-белок. Белок принимает участие в защите вирусной РНК от воздействия организма хозяина.

5. Ген, кодирующий белки, связанные с репликацией, процессингом новых вирусных частиц. Этот процесс происходит внутри инфицированной клетки, где вирус использует клеточные механизмы для создания копий своего генома и новых вирусных частиц.

6. Гены, кодирующие белки, которые вызывают иммунный ответ организма [39].

Гены в геноме коронавируса и участки полиморфизмов являются объектами детального изучения с точки зрения патогенности, и функциональной аннотации [40].

В ходе предварительных расчетов нами показано, что наиболее приемлемым вариантом для оценки является длина окна 50 нт, так как данная длина наиболее соответствует участкам низкой сложности текста, находящимся на стыке генов. Далее был построен отдельный график расчета профиля сложности последовательности коронавируса с длиной окна, равной 50 нт (рис. 2).

Наименьшая сложность наблюдается на участке позиции 24625. При расчете лингвистической сложности были получены наиболее интересные результаты, так как участок низкой сложности был найден в гене, кодирующем белок S. Предполагается, что участки низкой сложности наиболее подвержены мутациям, что как раз соотносится с тем, что S-белок служит основной мишенью для разработки нейтрализующих антител, ингибиторов проникновения вируса и вакцин.

3. Анализ генома вируса эндемического паротита. Был проведен анализ последовательности вируса эндемического паротита *Mumps Orthorubulavirus*, вызывающего одноименное заболевание. Паротит известен как опасное вирусное заболевание детского возраста, которое можно предотвратить с помощью вакцины [41]. Однако в последние годы в развитых странах было зарегистрировано несколько крупных вспышек инфекции, вызванной вирусом паротита [42]. При эпидемическом паротите имеет место не только поражение железистых органов (паротит, субмандибулит, сублингвит, панкреатит, орхит, простатит, оофорит – в 5% случаев у девушек и девочек, мастит, тиреоидит, дакриoadенит), но и длительная циркуляция возбудителя в крови. При осложненном эндемическом паротите возможно развитие серозного менингита и менингоэнцефалита, миелита и энцефаломиелита, поражение черепных нервов. В исходе паротит нередко приводит к поражению центральной нервной системы, формирует бесплодие у 50% мужчин [43].

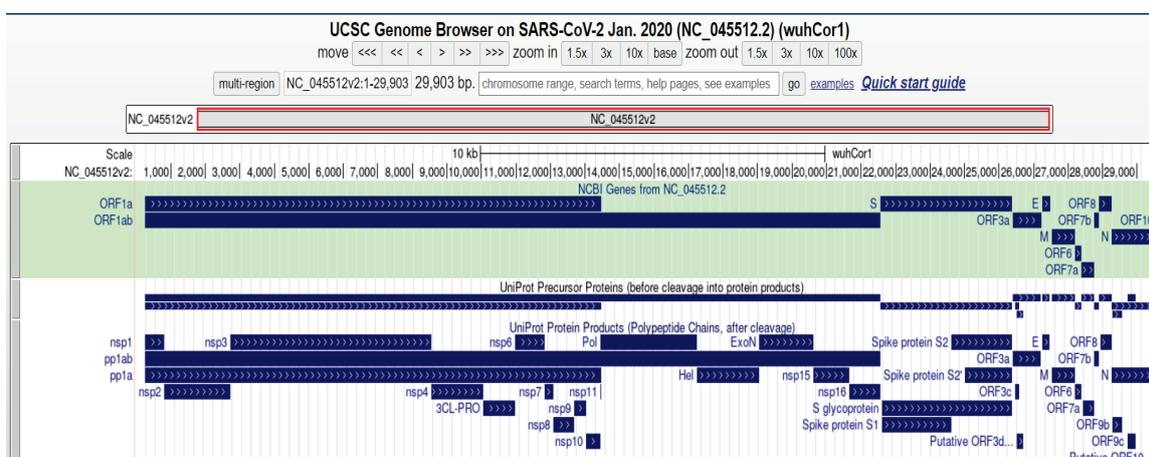


Рисунок 1. Структурная организация генома SARS-CoV-2. Рисунок построен с помощью геномного браузера UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>)

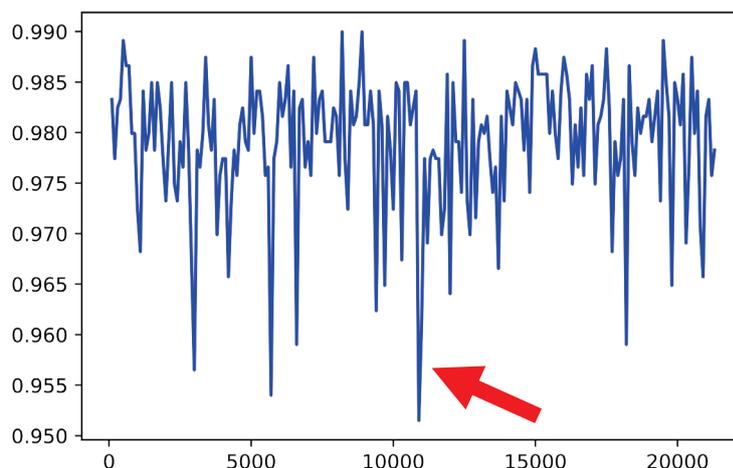


Рисунок 2. Расчет лингвистической сложности для SARS-CoV-2 при шаге, равном 200, и длине окна, равной 50 нуклеотидам (нт). По оси X – позиция в геноме, нт; по оси Y – значение сложности участка текста, значения в интервале [0;1]

Геном вируса составляет 15384 нт и содержит семь генов, кодирующих девять белков (рис. 3). Для данного РНК-вируса был построен профиль лингвистической сложности (рис. 4).

Расчет лингвистической сложности для *Mumps orthorubulavirus* был выполнен при шаге, равном 200, и длине окна, равной 50. Найден участок пониженной сложности в области 1625 нт. Данная позиция соответствует гену NP, который кодирует белок, участвующий в образовании нуклеокапсида. Тот факт, что участок низкой сложности был найден для гена NP, свидетельствует о том, что данный ген наиболее подвержен различного рода мутациям. Этот участок может быть мишенью для лекарственных воздействий. Разработаны противовирусные препараты, направленные на нарушение сборки нуклеокапсида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены ключевые компоненты разработанной программы, ее возможности и ограничения, а также примеры ее использования для анализа последовательностей полных генов микроорганизмов, их эволюции [23,26]. Разработка программных конвейеров и инструментов биоинформатики проводится на Цифровой кафедре Сеченовского университета и имеет как исследовательский, так и образовательный характер (<https://dk.sechenov.ru/>). В данной работе, защищенной в качестве диплома на Цифровой кафедре, рассмотрен процесс разработки программы визуализации лингвистической сложности генома. Представлено общее описание работы программы, описаны ее основные компоненты и алгоритмы.

На примере генома SARS-CoV-2 и вируса эндемического паротита было показано, что программа может быть использована для анализа различных нуклеотидных последовательностей и широкого круга задач. Ранее проводились похожие исследования по оценке сложности текста, которые позволили выявить горячие точки мутации для генома коронавируса [32], представляющие интерес как эволюционирующая нуклеотидная последовательность минимального размера.

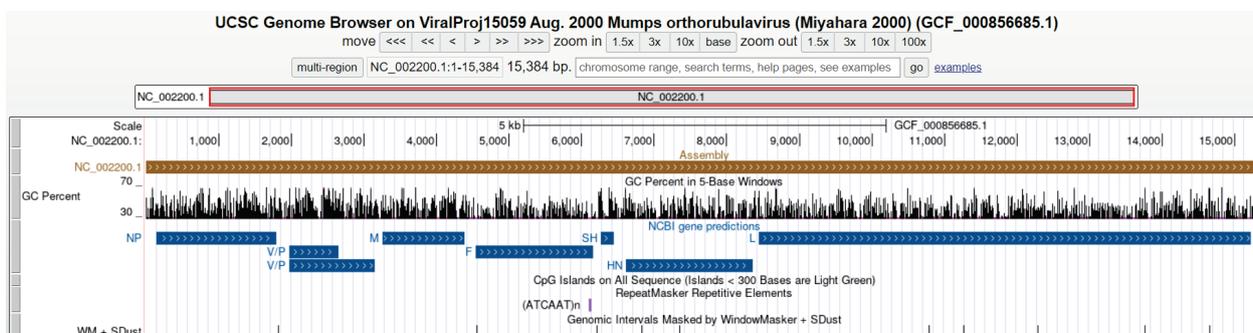


Рисунок 3. Структурная организация генома *Mumps orthorubulavirus*. Рисунок построен с помощью геномного браузера (<https://genome.ucsc.edu/>)

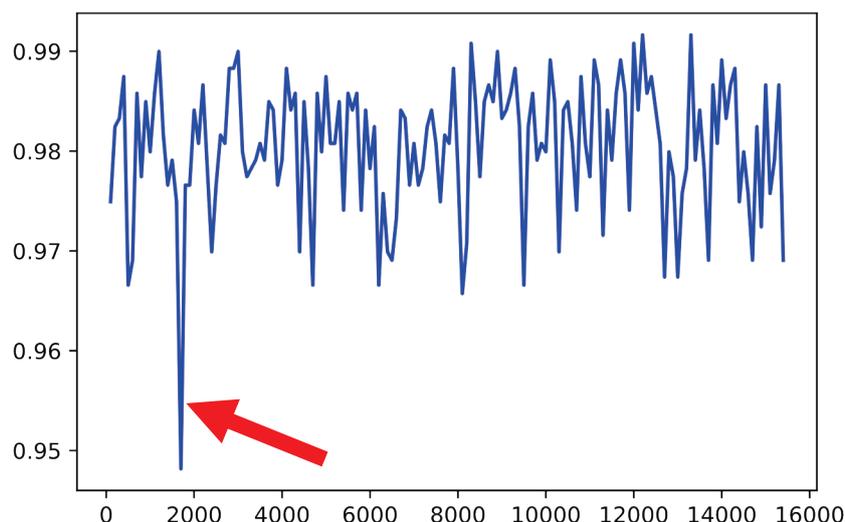


Рисунок 4. Расчет лингвистической сложности для генома *Mumps orthorubulavirus* при шаге, равном 200, и длине окна, равной 50. Обозначения шкал соответствуют рис. 2. Отмечен участок пониженной сложности в области 1625 нт

В биологических системах показано различие в уровнях сложности между белок-кодирующими и некодирующими последовательностями ДНК [36]. Таким образом, можно сказать, что лингвистическая сложность отличается в различных участках ДНК. Белок-кодирующие последовательности обычно более консервативны и менее изменчивы, поскольку они несут ключевую информацию о синтезе белков, который является важным для выживания организма [4]. Некодирующие последовательности, с другой стороны, обладают большей изменчивостью и гибкостью, поскольку они выполняют разнообразные функции, связанные с регуляцией генов и структурой генома. Понимание этих различий помогает нам лучше осознать сложность генома и его эволюционные механизмы. Оценка лингвистической сложности нуклеотидных последовательностей служит основой статического анализа структуры геномов микроорганизмов и патогенов растений [44], важна для задач биотехнологии. Продолжение работы требует интеграции с существующими базами отечественными программными ресурсами биоинформатики, такими как ICGenomics [45], и будет развиваться для анализа геномных последовательностей патогенов растений.

Программный код доступен по ссылке <https://github.com/Alinabio/complexity.git>.

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФ (23-44-00030). Авторы выражают благодарность А.Ю. Потаповой, П.А. Иванову-Ростовцеву и Е.А. Савиной за техническую помощь в работе.

Список литературы / References:

1. Simoes R.P., Wolf I.R., Correa B.A., Valente G.T. Uncovering patterns of the evolution of genomic sequence entropy and complexity. *Mol Genet Genomics*, 2021, vol. 296, no. 2, pp. 289-298, doi: 10.1007/s00438-020-01729-y.
2. Orlov Y.L., Potapov V.N. Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. W628-W633, doi: 10.1093/nar/gkh466.
3. Bartal A., Jagodnik K.M. Progress in and Opportunities for Applying Information Theory to Computational Biology and Bioinformatics. *Entropy (Basel)*, 2022, vol. 24, no. 7, pp. 925, doi: 10.3390/e24070925.
4. Bernaola-Galvan P., Carpena P., Gomez-Martin C., Oliver J.L. Compositional Structure of the Genome: A Review. *Biology (Basel)*, 2023, vol. 12, no. 6, p. 849, doi: 10.3390/biology12060849.
5. Chang C.H., Hsieh L.C., Chen T.Y., Chen H.D., Luo L., Lee H.C. Shannon information in complete genomes. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 587-608, doi: 10.1142/s0219720005001181.
6. Olson W.K., Zhurkin V.B. Modeling DNA deformations. *Curr Opin Struct Biol.*, 2000, vol. 10, no. 3, pp. 286-297, doi: 10.1016/s0959-440x(00)00086-5.
7. Orlov Y.L., Filippov V.P., Potapov V.N., Kolchanov N.A. Construction of stochastic context trees for genetic texts. *In Silico Biol.*, 2002, vol. 2, no. 3, pp. 233-247.
8. Chanda P., Costa E., Hu J., Sukumar S., Van Hemert J., Walia R. Information Theory in Computational Biology: Where We Stand Today. *Entropy*, 2020, vol. 22, no. 6, p. 627, doi: 10.3390/e22060627.
9. Akbari Rohn Abadi S., Mohammadi A., Koohi S. A new profiling approach for DNA sequences based on the nucleotides' physicochemical features for accurate analysis of SARS-CoV-2 genomes. *BMC Genomics*, 2023, vol. 24, no. 1, p. 266, doi: 10.1186/s12864-023-09373-7.
10. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, no. 17, pp. 3389-3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

features and GC content in prokaryotic genomes in connection with environmental evolution. *Paleontological Journal*, 2013, vol. 47, no. 9, pp. 1056-1060 (In Russ.).

28. Safronova N.S., Babenko V.N., Orlov Y.L. 117 Analysis of SNP containing sites in human genome using text complexity estimates. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2015, vol. 33, suppl. 1, pp. 73-74, doi: 10.1080/07391102.2015.1032750.

29. Дергилев А.И., Орлова Н.Г., Митина А.В., Орлов Ю.Л. Применение методов оценки сложности текста к анализу геномных кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов. *Сборник научных трудов VII Съезда Биофизиков России*: в 2 томах, том 1 - Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023, с. 335-336, doi: 10.26297/SbR6.2023.001 [Dergilev A.I., Orlova N.G., Mitina A.V., Orlov Y.L. Application of methods for assessing text complexity to the analysis of genomic clusters of transcription factor binding sites. *Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia*: in 2 volumes, vol.1 - Krasnodar: Printing house of FGBOU VO "KubGTU", 2023, pp. 335-336 (In Russ.)].

30. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of multiple transcription factors binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. *J Integr Bioinform.*, 2021, vol. 19, no. 1, p. 20200036, doi: 10.1515/jib-2020-0036.

31. Принглаева А.М., Дергилев А.И., Панова А.Д., Орлов Ю.Л. Сложность текста и структура повторов генома на примере коронавируса. *Марчуковские научные чтения 2020*: Тезисы Междунар. конф., посв. 95-летию со дня рождения акад. Г. И. Марчука Новосибирск, 19-23 октября 2020 г. Ин-т вычислит. математики и матем. геофизики СО РАН, Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2020, с. 167, doi: 10.24411/9999-017A-2020-10295 [Pringlaeva A.M., Dergilev A.I., Panova A.D., Orlov Y.L. The complexity of the text and the structure of genome repeats on the example of coronavirus. *Marchuk Scientific Readings 2020*: Abstracts of the Intern. conf., dedicated 95th anniversary of the birth of Acad. G. I. Marchuk Novosibirsk, October 19-23, 2020. Inst. Comput. mathematics and math. geophysics SB RAS, Novosibirsk: CPI NSU, 2020, p. 167 (In Russ.)].

32. Галиева А.Г., Лузин А.Н., Орлова Н.Г., Куликова Д.К., Дергилев А.И., Орлов Ю.Л. Биоинформационные подходы для анализа точек мутации генома коронавируса. В сборнике: *Молекулярная диагностика и биобезопасность-2021*. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика: сборник тезисов Онлайн-конгресса с международным участием (28-29 апреля 2021 г., Москва). М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021, 144 с. [Galieva A.G., Luzin A.N., Orlova N.G., Kulikova D.K., Dergilev A.I., Orlov Y.L. Bioinformatics approaches to analyze the mutation points of the coronavirus genome. In the collection: *Molecular Diagnostics and Biosafety-2021*. COVID-19: epidemiology, diagnosis, prevention: collection of abstracts of the Online Congress with international participation (April 28-29, 2021, Moscow). М.: Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, 2021, 144 p. (In Russ.)].

33. Antao R., Mota A., Machado J.A.T. Kolmogorov complexity as a data similarity metric: application in mitochondrial DNA. *Nonlinear Dyn.*, 2018, vol. 93, no. 3, pp. 1059-1071.

34. Dheemanth H.N. LZW Data Compression. *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 2014, vol. 3, no. 2, pp. 22-26.

35. Putta P., Orlov Y.L., Podkolodnyy N.L., Mitra C.K. Relatively conserved common short sequences in transcription factor binding sites and miRNA. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2011, т. 15, № 4, с. 750-756 [Putta P., Orlov Y.L., Podkolodnyy N.L., Mitra C.K. Relatively conserved common short sequences in transcription factor binding sites and miRNA. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2011, vol. 15, no. 4, pp. 750-756 (In Russ.)].

36. Orlov Y.L., te Boekhorst R., Abnizova I.I. Statistical measures of the structure of genomic sequences: entropy, complexity, and position information. *J Bioinform Comput Biol.*, 2006, vol. 4, pp. 523-536.

37. Popov O., Segal D.M., Trifonov E.N. Linguistic complexity of protein sequences as compared to texts of human languages. *Biosystems*, 1996, vol. 38, no. 1, pp. 65-74, doi: 10.1016/0303-2647(95)01568-x.

38. Troyanskaya O.G., Arbell O., Koren Y., Landau G.M., Bolshoy A. Sequence complexity profiles of prokaryotic genomic sequences: a fast algorithm for calculating linguistic complexity. *Bioinformatics*, 2002, vol. 18, no. 5, pp. 679-688.

39. Lu R., Zhao X., Li J. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10224, pp. 565-574, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

40. Hu B., Guo H., Zhou P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.*, 2021, vol. 19, pp. 141-154, doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.

41. Рубальская Т.С., Ерохов Д.В., Жердева П.Е., Милихина А.В., Гаджиева А.А., Тихонова Н.Т. Генотипирование вируса эпидемического паротита (*Paramyxoviridae: Orthorubulavirus: Mumps Orthorubulavirus*) как элемент лабораторного подтверждения инфекции. *Вопросы вирусологии*, 2023, т. 68, № 1, с. 59-65 [Rubalskaya T.S., Erokhov D.V., Zherdeva P.E., Milikhina A.V., Gadzhieva A.A., Tikhonova N.T. Genotyping of mumps virus (*Paramyxoviridae: Orthorubulavirus: Mumps Orthorubulavirus*) as element of laboratory confirmation of infection. *Questions of virology*, 2023, vol. 68, no. 1, pp. 59-65 (In Russ.)].

42. Su S.B., Chang H.L., Chen A.K. Current Status of Mumps Virus Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Vaccine. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, vol. 17, no. 5, p. 1686, doi: 10.3390/ijerph17051686.

43. Юминова Н.В., Контарова Е.О., Балаев Н.В., Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Россошанская Н.В., Сидоренко Е.С., Гафаров Р.Р., Зверев В.В. Вакцинопрофилактика кори, эпидемического паротита и краснухи: задачи, проблемы и реалии. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2011, т. 4, № 59, с. 40-44 [Yuminova N.V.,

Kontarova E.O., Balaev N.V., Artyushenko S.V., Kontarov N.A., Rossoshanskaya N.V., Sidorenko E.S., Gafarov R.R., Zverev V.V. Measles, mumps and rubella vaccination: tasks, problems and realities. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2011, vol. 4, no. 59, pp. 40-44 [In Russ.].

44. Chao H., Zhang S., Hu Y., Ni Q., Xin S., Zhao L., Ivanisenko V.A., Orlov Y.L., Chen M. Integrating omics databases for enhanced crop breeding. *J Integr Bioinform.*, 2023, doi: 10.1515/jib-2023-0012.

45. Orlov Y.L., Bragin A.O., Babenko R.O., Dresvyannikova A.E., Kovalev S.S., Shaderkin I.A., Orlova N.G., Naumenko F.M. Integrated Computer Analysis of Genomic Sequencing Data Based on ICGenomics Tool. In: Advances in Intelligent Systems, Computer Science and Digital Economics. CSDEIS 2019, AISC 1127, *International Journal of Intelligent Systems and Applications (IJISA)*, 2020, pp. 154-164, doi: 10.1007/978-3-030-39216-1_15.

COMPUTATIONAL TOOLS FOR THE DNA TEXT COMPLEXITY ESTIMATES FOR MICROBIAL GENOMES STRUCTURE ANALYSIS

Mitina A.V.¹, Orlova N.G.², Dergilev A.I.^{3,4}, Orlov Y.L.^{1,3,4}

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University)

Trubetskaya 8-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: alinamitina44@gmail.com

² Financial University under the Government of the Russian Federation

Leningradsky Ave, 49.2, Moscow, 125167, Russia

³ Novosibirsk State University

Pirogova str., 1, Novosibirsk, 630090, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS

Lavrentieva str., 10, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: orlov@d-health.institute

Received 02.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0640

Abstract. One of the fundamental tasks in bioinformatics involves searching for repeats, which are statistically heterogeneous segments within DNA sequences and complete genomes of microorganisms. Theoretical approaches to analyzing the complexity of macromolecule sequences (DNA, RNA, and proteins) were established prior to the availability of complete genomic sequences. These approaches have experienced a resurgence due to the proliferation of mass parallel sequencing technologies and the exponential growth of accessible data. This article explores contemporary computer methods and existing programs designed to assess DNA text complexity as well as construct profiles of properties for analysing the genomic structures of microorganisms. The article offers a comprehensive overview of available online programs designed for detecting and visualising repeats within genetic text. Furthermore, the paper introduces a novel computer-based implementation of a method to evaluate the linguistic complexity of text and its compression using Lempel-Ziv. This approach aims to identify structural features and anomalies within the genomes of microorganisms. The article also provides examples of profiles generated through the analysis of text complexity. Application of these complexity estimates in the analysis of genome sequences, such as those of the SARS-CoV-2 coronavirus and the Mumps Orthorubulavirus, is discussed. Specific areas of low complexity within the genetic text have been successfully identified in this research.

Key words: *bioinformatics, biophysical models, text complexity, microbial genomes.*

ВЕБ-СЕРВИСЫ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ МИШЕНЕЙ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Аристархов М.А.¹, Дергилев А.И.^{2,3}, Потапова А.Ю.¹, Иванов-Ростовцев П.А.¹, Орлов Ю.Л.^{1,2,3}

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Трубецкая, 8-2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: max-a2000@mail.ru

² Институт цитологии и генетики СО РАН
просп. ак. Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090, РФ

³ Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 1, г. Новосибирск, 630090, РФ

Поступила в редакцию 10.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0641

Аннотация. Поиск генов мишеней микроРНК требует разработки новых программных средств и веб-сервисов. МикроРНК – короткие некодирующие молекулы РНК – играют важную роль в регуляции метаболизма, в ответе на стрессовые воздействия окружающей среды у растений, регулируют экспрессию генов. Понимание функций микроРНК, исследование их генов-мишеней, может помочь в разработке новых лекарственных препаратов, решении биотехнологических задач. Исследование и определение мишеней микроРНК в геноме связано с техническими проблемами. МикроРНК способствует деградации мРНК или подавляет ее трансляцию, и этот процесс может происходить без полной комплементарности мишени. Таким образом определение мишени по принципу комплементарности не однозначно. Кроме того, одна молекула микроРНК может соответствовать сразу нескольким генам-мишеням. Решением является использование больших объемов данных и методов машинного обучения, нейронных сетей. Нейросети в биоинформатике используются для различных задач, таких как анализ биомедицинских данных, диагностика, прогнозирование, классификация и сегментация нуклеотидных последовательностей. Поиск и предсказание мишеней микроРНК с помощью методов машинного обучения активно развивается в настоящее время. Был проведен сравнительный анализ современных нейронных сетей для данной задачи. Разработан веб-сервис для предсказания микроРНК с использованием нейронной сети. С помощью языка программирования Python и библиотеки Flask была разработана серверная часть сервиса. Использовалась нейронная сеть Mitaq, основанная на глубоком обучении, которая способна предсказывать мишени для микроРНК с более высокой точностью. Будут продолжены исследования с целью повышения эффективности и расширения функционала разработанной программной системы.

Ключевые слова: биоинформатика, микроРНК, гены-мишени, предсказание, нейронные сети, медицинская информатика, веб-сервис.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск генов-мишеней микроРНК является важной задачей биоинформатики, требующей разработки новых программных средств и веб-сервисов [1-3]. Актуальность задачи связана с тем, что микроРНК регулируют экспрессию генов, играют важную роль в метаболизме, контролируя многие клеточные процессы. МикроРНК являются объектом активного исследования, в том числе в биологии растений, исследовании ответа на стрессовые воздействия окружающей среды [4-7]. Изменение экспрессии микроРНК связано с различными заболеваниями, включая сахарный диабет, ожирение, болезни печени и рак [8].

МикроРНК представляют из себя короткие некодирующие молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов (в среднем 22). МикроРНК были открыты в конце 20-го века в ходе исследований на модельном организме нематоды *Caenorhabditis elegans* [9]. В ходе исследований было обнаружено, что ген lin-14 кодирует короткий РНК-транскрипт, который играет важную роль в развитии организма. Это привело к открытию нового класса РНК, получивших название микроРНК. В дальнейшем было показано, что микроРНК являются ключевыми регуляторами экспрессии генов [2]. Они играют важную роль в регуляции метаболизма, контролируя многие процессы, такие как регуляция глюкозного метаболизма, метаболизма липидов, аминокислот и железа, восстановления после повреждений тканей и воспаления. МикроРНК играют важную роль практически во всех биологических процессах [10]. Исследования дифференциальной экспрессии микроРНК у организма-хозяина во время инфекции подтверждают, что они могут играть ключевую роль в реакции хозяина на вторгающиеся патогены [7].

В целом, микроРНК являются объектом активного исследования в биологии, биотехнологии и медицине [8,11]. Понимание их биологических функций может помочь в разработке новых лекарственных препаратов и методов лечения различных заболеваний [12].

В мире активно развиваются компьютерные базы данных микроРНК (<https://mirdb.org/>). Необходимо дальнейшее детальное исследование микроРНК, разработка новых программных средств для их анализа, определения их мишеней в геноме [13]. Существующие компьютерные решения связаны с теоретическими и

техническими проблемами. Молекула микроРНК может быть не полностью комплементарной молекуле-мишени мРНК, но все равно вызывает регуляцию экспрессии генов. МикроРНК способствует деградации мРНК или подавляет ее трансляцию, и этот процесс может происходить без полной комплементарности мишени. Это затрудняет однозначное определение мишени молекулы, в связи с невозможностью точно определить мишень по принципу комплементарности [14]. Кроме того, одна молекула микроРНК может соответствовать сразу нескольким генам-мишеням [11].

Решением является использование современных методов биоинформатики – нейронных сетей. Нейросети – это компьютерные системы, которые могут обрабатывать и анализировать данные, используя методы машинного обучения [15]. В медицине нейросети используются для различных задач, таких как диагностика, прогнозирование, классификация и сегментация.

Для нашего веб-сервиса использовалась нейронная сеть *Mitar*, основанная на глубоком обучении (DL-based), которая способна предсказывать мишени для микроРНК с более высокой точностью. Подход объединяет сверточные нейронные сети (CNN), которые преуспевают в изучении пространственных объектов, и рекуррентные нейронные сети (RNN), которые распознают последовательные объекты.

Разработан веб-сервис для предсказания микроРНК с использованием нейронной сети. Проведен сравнительный анализ современных нейронных сетей для данной задачи. Выполнен анализ существующей литературы в области баз данных в Интернете, обращая внимание на основные модели прогнозирования мишеней микроРНК. Среди известных аналогов есть только сервисы, использующие экспериментально подтвержденные данные, а использующие нейронные сети – отсутствуют. Использование предложенной программы поможет улучшить эффективность поиска микроРНК, сократить затраты на экспериментальные исследования и разработку лекарственных средств [16,17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования являлись геномные последовательности и их функциональная разметка. Использовались данные из открытых баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

Для разработки использовался PyCharm — интегрированная среда разработки на языке Python, созданная компанией JetBrains (<https://www.jetbrains.com/ru-ru/pycharm/>). Он является инструментом для разработки с использованием современных веб-фреймворков, например, Django, Flask, Google App Engine, Pyramid и web2py (<https://flathub.org/ru/apps/com.jetbrains.PyCharm-Professional>). Для разработки серверной части использован веб-фреймворк Flask языка Python. Flask — это упрощенная платформа Python для веб-приложений, которая обеспечивает основные возможности маршрутизации URL-адресов и визуализации страниц. Сервис работает на архитектуре REST (REpresentational State Transfer) (<https://otus.ru/journal/arhitektura-rest-1-api/>). Для работы с данным сервисом разработаны несколько HTML страниц, которые будут возвращаться ответом на запрос в сервис. HTML - язык маркировки гипертекстов, который не зависит от типа компьютерной платформы.

С помощью языка программирования Python (v. 3.11.4, <https://www.python.org/>) и библиотеки Flask (v. 2.3.2, <https://flask.palletsprojects.com/>) была разработана серверная часть сервиса. Она включает в себя набор функций, которые должны вызываться при поступлении HTTP запроса. Главная страница сервиса содержит форму для вставки последовательности микроРНК. Выполняется проверка на заполненность поля для ввода последовательности, и, если поле заполнено, создается HTTP запрос, который отправляется на серверную часть. Серверная часть, получает запросы в формате Json.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Техническим результатом работы является разработка компьютерного кода. Программа дает оценку присутствия микроРНК для нуклеотидной последовательности.

Рассмотрим механизмы действия микроРНК, полученные в ходе обзора литературы и послужившие основой собственной разработки. У растительных микроРНК практически полное соответствие с их целевыми (мишеневыми) мРНК вызывает подавление генов за счёт расщепления транскриптов. В отличие от этого, микроРНК у животных распознают свои мишеневые мРНК, используя всего 6-8 нуклеотидов (затравочную область) на 5'-конце микроРНК, что недостаточно для расщепления мРНК. Конкретная микроРНК может иметь несколько мРНК мишени, и множество микроРНК может регулировать альтернативную мишень [11].

Оценка количества уникальных мишеней для типичной микроРНК варьирует в зависимости от используемых методов. Однако несколько подходов показали, что у микроРНК млекопитающих есть множество уникальных мишеней. Например, анализ микроРНК у высококонсервативных позвоночных показывает, что каждая имеет в среднем около 400 консервативных мишеней. Похожим образом, эксперименты показывают, что один вид микроРНК может снижать стабильность сотен уникальных информационных РНК. Другие эксперименты показывают, что один вид микроРНК может подавлять продукцию сотен белков, но эта репрессия обычно бывает относительно слабой (меньше, чем в 2 раза) [9].

МикроРНК-опосредованная репрессия включается в процессы регуляции почти всех клеточных процессов. Паттерны регуляции нескольких других микроРНК уже были выявлены у многих видов животных, включая человека.

Согласно последней версии miRBase (<https://mirbase.org/>) (версия 16.0), геном человека содержит 1048 аннотированных микроРНК последовательностей, и возможны дополнительные аннотации в будущем. Согласно литературе, около трети этих микроРНК находится в 113 кластерах генов и, экспериментальные данные профилирования микроРНК в различных тканях и клеточных линиях, показывают, что эти кластеры в основном экспрессируются совместно. Это наблюдение вызвало вопросы о том, как регулируются гены, находящиеся в кластерах, и как это влияет на экспрессию микроРНК [18]. Считается, что если одна микроРНК из кластера теряет свою регуляторную функцию, то это может повлиять на другие микроРНК из того же кластера. Поэтому важно исследовать, можно ли регулировать одну микроРНК в кластере независимо от других, особенно в отношении тех микроРНК, которые играют роль в патологии человека. МикроРНК нацелены на примерно треть генов, кодирующих белки, и одна микроРНК может одновременно взаимодействовать с примерно 200 транскриптами благодаря различным паттернам связывания [18].

Существует три основных механизма регуляции генов, опосредованных микроРНК: репрессия трансляции, прямая деградация мРНК и опосредованный микроРНК распад мРНК. Важно отметить, что последние данные свидетельствуют о том, что механизм репрессии в основном определяется снижением устойчивости мРНК-мишеней.

Разработан сервис для предсказания микроРНК с использованием нейронной сети. Был проведен сравнительный анализ современных нейронных сетей для данной задачи.

С помощью языка программирования Python и библиотеки Flask была разработана серверная часть сервиса. Она включает в себя набор функций, которые должны вызываться при поступлении HTTP запроса.

Для работы пользователя было разработано несколько HTML страниц и css файлов для корректного отображения информации.

Главная страница (рис. 1) содержит форму для вставки последовательности микроРНК. При нажатии на кнопку ввода выполняется проверка на заполненность поля для ввода последовательности и создается HTTP запрос, который отправляется на серверную часть.

Получив тело запроса, серверная часть обрабатывает его нейронной сетью Mitar. Получив ответ от нейронной сети, серверная часть формирует ответ на HTTP запрос. Ответ может содержать в себе предсказанные последовательности мишеней либо сообщение об ошибке, если что-то пошло не так.

Серверная часть, получая запрос, разбирает его на составляющие, чтобы получить тело запроса. Запрос приходит в формате Json. Для корректной работы с сервисом лучше всего использовать Google Chrome, Mozilla Firefox, Microsoft Edge либо любой другой браузер, поддерживающий новые версии html и css.

Получив ответ, разработанная программа (отображает его после заголовка “Результаты” (рис. 3) в виде нескольких (в данный момент настроено на 3) последовательностей мишеней микроРНК с указанием точности их определения.

Кроме того, было реализовано меню для взаимодействия с другими страницами сервиса.

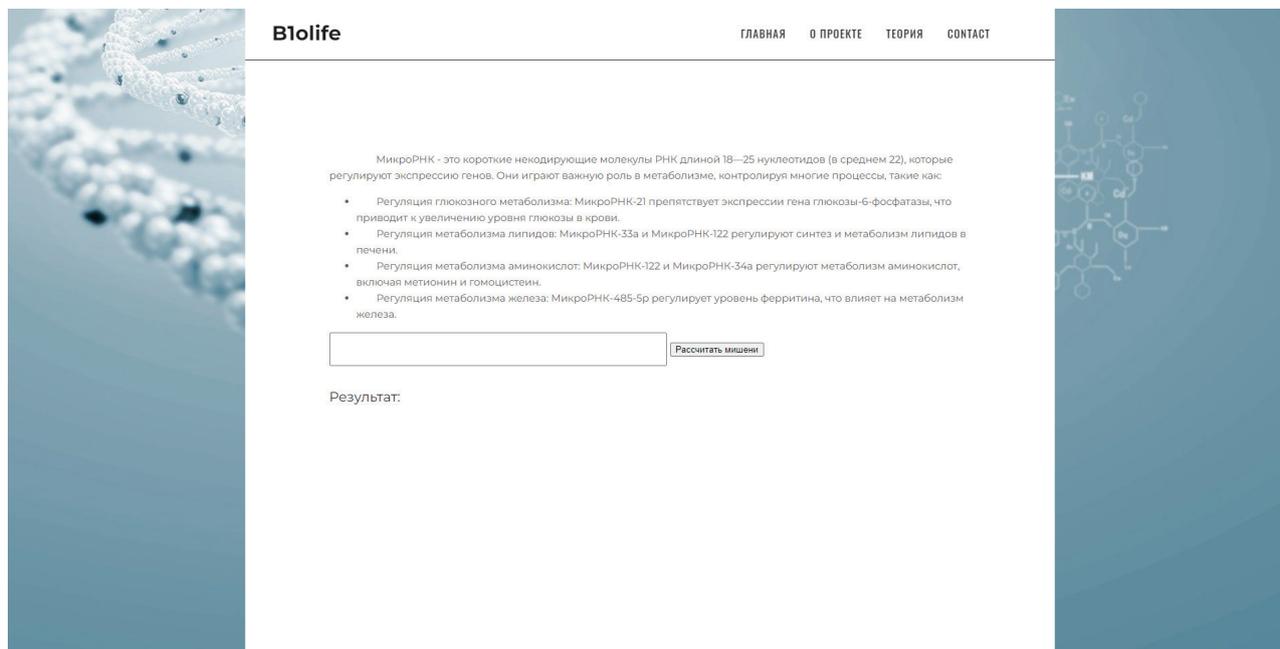


Рисунок 1. Главная страница разработанного сервиса

2. Quillet A., Saad C., Ferry G., Anouar Y., Vergne N., Lecroq T., Dubessy C. Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. *Front. Genet.*, 2020, vol. 10, p. 1330, doi: 10.3389/fgene.2019.01330.
3. Roberts J.T., Borchert G.M. Computational Prediction of MicroRNA Target Genes, Target Prediction Databases, and Web Resources. Bioinformatics in MicroRNA Research. *Methods in Molecular Biology*, NY: Springer, 2017, pp. 109-122, doi: 10.1007/978-1-4939-7046-9_8.
4. Orlov Y.L., Babenko V.N., Dergilev A.V., Galieva A.G., Dobrovolskaya O.B., Chen M. Databases and computer resources on plant miRNA to study its role in abiotic stress response. In book: *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019) Abstracts*. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2019, p. 150, doi: 10.18699/PlantGen2019-132.
5. Orlov Y.L., Dobrovolskaya O., Yuan C.H., Afonnikov D.A., Zhu Y., Chen M. Integrative computer analysis of antisense transcripts and miRNA targets in plant genomes. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2012, vol. 8, no. 3, p. S7.
6. Орлов Ю.Л., Цуканов А.В., Богомолов А.Г., Добровольская О.Б. Методы биоинформатики для поиска некодирующих РНК, связанных с устойчивостью растений к засухе. *Сборник тезисов республиканской научной конференции современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии*. Академия Наук Республики Узбекистан, Центр Геномики и Биоинформатики. 18 мая 2018 года. Ташкент, 2018, с. 139-142 [Orlov Yu.L., Tsukanov A.V., Bogomolov A.G., Dobrovolskaya O.B. Bioinformatics methods for searching for non-coding RNAs associated with plant drought resistance. Collection of abstracts of the republican scientific conference modern problems of genetics, genomics and biotechnology. Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Center for Genomics and Bioinformatics. May 18, 2018. Tashkent, 2018, pp. 139-142 (In Russ.)].
7. Wang J., Meng X., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L., Chen M. Non-coding RNAs and Their Roles in Stress Response in Plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, vol. 15, no. 5, pp. 301-312, doi: 10.1016/j.gpb.2017.01.007.
8. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Orlov Y.L., Churkina M.I., Berezina O.V., Gurazheva A.A., Ageeva T.A., Seregina O.B., Maksimov V.N. The Methylation of the p53 Targets the Genes MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A and MIR-34B/C in the Tumor Tissue of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Genes*, 2022, vol. 13, no. 8, pp. 1401, doi: 10.3390/genes13081401.
9. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, vol. 116, no. 2, pp. 281-297, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
10. Klimontov V.V., Koshechkin K.A., Orlova N.G., Sekacheva M.I., Orlov Y.L. Medical Genetics, Genomics and Bioinformatics-2022. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 10, p. 8968, doi: 10.3390/ijms24108968.
11. Matsuyama H., Suzuki H.I. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 21, pp. 132, doi: 10.3390/ijms21010132.
12. Anashkina A.A., Leberfarb E.Y., Orlov Y.L. Recent Trends in Cancer Genomics and Bioinformatics Tools Development. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, p. 12146, doi: 10.3390/ijms222212146.
13. Riffo-Campos L., Riquelme I., Brebi-Mieville P. Tools for Sequence- Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 12, p. 1987, doi: 10.3390/ijms17121987.
14. Putta P., Orlov Y.L., Podkolodny N.L., Mitra C.K. Relatively conserved common short sequences in transcription factor binding sites and miRNA. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2011, vol. 15, no. 4, pp. 750-756.
15. Schmidhuber J. Deep Learning. *Scholarpedia*, 2015, vol. 10, no. 11, p. 32832, doi: 10.4249/scholarpedia.32832.
16. Berg M.M.J. van den, Krauskopf J., Ramaekers J.G., Kleinjans J.C.S., Prickaerts J., Bried J.J. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 2020, vol. 185, p. 101732, doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.101732.
17. Vasu S., Kumano K., Darden C.M., Rahman I., Lawrence M.C., Naziruddin B. MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. *Cells*, 2019, vol. 8, no. 12, p. 1533, doi: 10.3390/cells8121533.
18. Yuan Y., Weidhaas J.B. Functional microRNA binding site variants. *Molecular Oncology*, 2019, vol. 13, no. 1, pp. 4-8, doi: 10.1002/1878-0261.12421.
19. Orlov Y.L., Potapov V.N. Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity. *Nucleic Acids Res.*, 2004, iss. 32, pp. 628-33, doi: 10.1093/nar/gkh466.
20. Витяев Е.Е., Орлов Ю.Л., Вишнеvский О.В., Беленок А.С., Колчанов Н.А. Компьютерная система "GENE DISCOVERY" для поиска закономерностей организации регуляторных последовательностей эукариот. *Молекулярная биология*, 2001, т. 35, № 6, с. 952-960 [Vityaev E.E., Orlov Yu.L., Vishnevsky O.V., Belenok A.S., Kolchanov N.A. Computer system "GENE DISCOVERY" for searching for patterns of organization of regulatory sequences of eukaryotes. *Molecular Biology*, 2001, vol. 35, no. 6, pp. 952-960 (In Russ.)].
21. Vityaev E.E., Orlov Y.L., Vishnevsky O.V., Pozdnyakov M.A., Kolchanov N.A. Computer system "Gene Discovery" for promoter structure analysis. *In Silico Biol.*, 2002, vol. 2, pp. 257-62.
22. Orlov Y.L., Filippov V.P., Potapov V.N., Kolchanov N.A. Construction of stochastic context trees for genetic texts. *In Silico Biol.*, 2002, vol. 2, no. 3, pp. 233-247.
23. Orlov Y.L., Boekhorst R., Abnizova I.I. Statistical measures of the structure of genomic sequences: entropy, complexity, and position information. *J Bioinform Comput Biol.*, 2006, vol. 4, pp. 523-536, doi: 10.1142/s0219720006001801.

24. Митина А.В., Орлов Ю.Л. Оценка лингвистической сложности генетических последовательностей штаммов SARS-CoV-2. *Сборник научных трудов VII Съезда Биофизиков России*: в 2 томах, том 1 – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023, с. 330, doi: 10.26297/SbR6.2023.001 [Mitina A.V., Orlov Yu.L. Assessment of linguistic complexity of genetic sequences of SARS-CoV-2 strains. *Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia*: in 2 volumes, vol. 1 - Krasnodar: Printing house of FGBOU VO “KubGTU”, 2023, p. 330 (In Russ.)].
25. Дергилев А.И., Орлова Н.Г., Митина А.В., Орлов Ю.Л. Применение методов оценки сложности текста к анализу геномных кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов. *Сборник научных трудов VII Съезда Биофизиков России*: в 2 томах, том 1 - Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023, с. 335-336, doi: 10.26297/SbR6.2023.001 [Dergilev A.I., Orlova N.G., Mitina A.V., Orlov Yu.L. Application of methods for assessing text complexity to the analysis of genomic clusters of transcription factor binding sites. *Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia*: in 2 volumes, vol.1 - Krasnodar: Printing house of FGBOU VO “KubGTU”, 2023, pp. 335-336 (In Russ.)].
26. Gorbenko I.V., Petrushin I.S., Shcherban A.B., Orlov Y.L., Konstantinov Y.M. Short Interrupted Repeat Cassette (SIRC)-Novel Type of Repetitive DNA Element Found in Arabidopsis thaliana. *Int J Mol Sci.*, 2023, vol. 24, no. 13, p. 11116, doi: 10.3390/ijms241311116.
27. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N., Orlov Y.L., Seregina O.B. Clinical aspects of TP53 gene inactivation in diffuse large B-cell lymphoma. *BMC Med Genomics*, 2019, vol. 12, suppl. 2, p. 35, doi: 10.1186/s12920-019-0484-9.
28. Babenko V.N., Bragin A.O., Spitsina A.M., Chadaeva I.V., Galieva E.R., Orlova G.V., Medvedeva I.V., Orlov Y.L. Analysis of differential gene expression by RNA-seq data in brain areas of laboratory animals. *J Integr Bioinform.*, 2016, vol.13, no. 4, p. 292, doi: 10.2390/biecoll-jib-2016-292.
29. Orlov Y.L., Baranova A.V. Editorial: Bioinformatics of Genome Regulation and Systems Biology. *Front Genet.*, 2020, vol. 11, pp. 625, doi: 10.3389/fgene.2020.00625.
30. Orlov Y., Dobrovolskaya O., Chen M., Hofstaedt R. Bioinformatics of genome regulation and structure – 2020 papers collection. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2020 vol. 17, no. 4, p. 20200038, doi: 10.1515/jib-2020-0038.
31. Спицина А.М., Орлов Ю.Л., Подколodная Н.Н., Свичкарев А.В., Дергилев А.И., Чен М., Кучин Н.В., Черных И.Г., Глинский Б.М. Суперкомпьютерный анализ геномных и транскриптомных данных, полученных с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК. *Программные системы: теория и приложения*, 2015, т. 6, № 1(24), с. 157-174, doi: 10.25209/2079-3316-2015-6-1-157-174 [Spitsina A.M., Orlov Y.L., Podkolodnaya N.N. et al. Supercomputer analysis of genomics and transcriptomics data revealed by high-throughput DNA sequencing. *Program systems: theory and applications*, 2015, vol. 6, no. 1(24), pp. 157-174 (In Russ.)].
32. Orlov Y.L., Bragin A.O., Babenko R.O., Dresvyannikova A.E., Kovalev S.S., Shaderkin I.A., Orlova N.G., Naumenko F.M. Integrated Computer Analysis of Genomic Sequencing Data Based on ICGenomics Tool. In: *Advances in Intelligent Systems, Computer Science and Digital Economics. CSDEIS 2019, AISC 1127. International Journal of Intelligent Systems and Applications (IJISA)*, 2020, pp. 154-164, doi: 10.1007/978-3-030-39216-1_15.
33. Орлов Ю.Л., Брагин А.О. и др. ICGenomics: программный комплекс анализа символьных последовательностей геномики. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2012, т. 16, № 4/1, с. 732-741 [Orlov Y.L., Bragin A.O. et al. ICGenomics: a program complex for analysis of symbol sequences in genomics. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2012, vol. 16, no. (4/1), pp. 732-741 (In Russ.)].
34. Veljkovic A.N., Orlov Y.L., Mitic N.S. BioGraph: Data Model for Linking and Querying Diverse Biological Metadata. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 8, pp. 6954, doi: 10.3390/ijms24086954.

WEB-SERVICES FOR MICRORNA TARGET PREDICTION USING NEURAL NETWORKS

Aristarkhov M.A.¹, Dergilev A.I.^{2,3}, Potapova A.Y.¹, Ivanov-Rostovtsev P.A.¹, Orlov Y.L.^{1,2,3}¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University)

Trubetskaya 8-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: max-a2000@mail.ru

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS

Lavrentieva str., 10, Novosibirsk, 630090, Russia

³ Novosibirsk State University

Pirogova str., 1, Novosibirsk, 630090, Russia

Received 10.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0641

Abstract. The pursuit of microRNA target genes necessitates the creation of novel software and web services. MicroRNAs, abbreviated as short non-coding RNA molecules, hold a pivotal role in metabolic regulation, plant responses to environmental stress, and gene expression. Gaining insights into microRNA functions and investigating their target genes can advance drug development and address biotechnological challenges. However, the study and identification of microRNA targets within the genome present technical obstacles. MicroRNA molecules may not exhibit complete complementarity with their mRNA targets. These molecules either contribute to mRNA degradation or inhibit translation, and this process can transpire without full target complementarity. Consequently, the delineation of targets solely based on the principle of complementarity lacks unequivocal clarity. Moreover, a single microRNA molecule can correspond to multiple target genes simultaneously. The solution entails harnessing substantial datasets, employing machine learning techniques, and leveraging neural networks. In bioinformatics, neural networks serve a variety of functions, encompassing the analysis of biomedical data, diagnostics, prediction, classification, and nucleotide sequence segmentation. The pursuit and anticipation of microRNA targets through machine learning methods are currently undergoing vigorous development. A comparative assessment of contemporary neural networks for this task has been executed. A neural network-driven web service for microRNA prediction has been created. The server aspect of the service was developed using the Python programming language and the Flask library. The Mitar neural network, founded on deep learning, was employed. This network demonstrates heightened precision in predicting microRNA targets. We deliberate on the applications of miRNA prediction in gene expression analysis. Sustained research efforts are imperative to enhance the efficiency and broaden the capabilities of the developed computer system.

Key words: bioinformatics, microRNA, recognition, neural networks, medical informatics, web-service.

МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХИРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПЕПТИДНЫХ НАНОТРУБОК НА ОСНОВЕ ДИЛЕЙЦИНА

Быстров В.С.¹, Филиппов С.В.¹, Лихачев И.В.¹, Леденева О.Р.², Белова Е.В.²

¹ Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

ул. Профессора Виткевича, 1, г. Пушкино, РФ; e-mail: vsbys@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские Горы, 1, г. Москва, 119234, РФ

Поступила в редакцию 11.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0642

Аннотация. В работе проведено моделирование, представлены расчеты дипольных, полярных и электронных свойств спиральных наноструктур на основе дилейцина (LL) разной хиральности (L, D) методами AM1, PM3 программы HyperChem. Показано, что физические свойства нанотрубок на основе дилейцина близки к свойствам дифенилаланиновых нанотрубок (FF PNT). Для наноструктур на основе дилейцина левой хиральности L-LL существующие экспериментальные данные позволяют выделить из кристаллографических структур молекулярные наноструктуры спиральных нанотрубок, которые имеют правую хиральность D, что соответствует закону смены хиральности при переходе на следующий уровень самоорганизации. Были построены модельные спиральные структуры нанотрубок на основе дилейцина правой хиральности D-LL, для которых ещё нет экспериментальных данных. Расчеты хиральности методом смешанного векторно-скалярного произведения векторов дипольных моментов дипептидов, показали, что для модельных спиральных нанотрубок на основе D-LL также справедлив закон смены типа хиральности. Эти результаты могут быть основой для синтеза экспериментальных структур на основе дипептидов правой хиральности.

Ключевые слова: аминокислоты, дипептиды, дилейцин, пептидная нанотрубка, хиральность, дипольный момент, молекулярное моделирование, полужэмпирические методы.

Исследование пептидных наноструктур на основе различных аминокислот является одним из актуальных направлений современной биофизики и молекулярной биологии, фармакологии и нанобиотехнологии. Это оказывается важным для многих практических применений: для разработки новых гибридных гетероструктур наноэлектроники и создания систем доставки лекарств, разнообразных сенсоров и различных молекулярных машин. Важно, что эти пептидные наноструктуры и спиральные нанотрубки на основе дипептидов, проявляют набор пьезо-, сегнето- и фотоэлектрических свойств, которые и лежат в основе их практических применений.

В настоящее время имеется уже значительное количество экспериментальных данных по исследованию свойств наноструктур на основе дипептидов. Среди них наиболее изученными являются дифенилаланиновые нанотрубки (FF PNT) [1-3]. Все аминокислоты, имеют дипольные моменты и при самоорганизации в различные сложные структуры, включая дипептиды, проявляют полярные и сегнетоэлектрические свойства с большими значениями спонтанной поляризации и пьезоэлектрических коэффициентов. Среди них, особый интерес, вслед за фенилаланином, имеют и аминокислоты с разветвленной цепью: лейцин (L, Leu) и изолейцин (I, Ile) [4].

Известно, также, что в зависимости от своей стерео-конформации, две формы одной молекулы могут быть различны по проявлению оптической и биологической активности. Это свойство молекул - «хиральность» - очень важно для их функционирования, как в живых, так и в технических системах, в молекулярной и нано-электронике [3]. Изучение FF PNT показало, что как значение поляризации, так и другие физические свойства тесно связаны с тем, на основе аминокислот (и дипептидов) какой хиральности они образованы: левой L-FF или правой D-FF [1-3,5,6]. Поэтому крайне важным представляется изучение физических свойств и формирования наноструктур различной хиральности L и D на основе других дипептидов, в т.ч. лейцина (L-LL и D-LL) и изолейцина (L-II и D-II). Однако, еще не все эти наноструктуры достаточно хорошо изучены экспериментально. В этой связи, эффективным является их исследование с помощью методов компьютерного моделирования.

В данной работе представлены результаты моделирования и изучения свойств пептидных нанотрубок на основе дилейцина разной хиральности, расчетов величины и знака хиральности нанотрубок на их основе. Расчеты хиральности спиральных нанотрубок проведены методом смешанного векторно-скалярного произведения векторов дипольных моментов дипептидов, расположенных последовательно, по витку спирали образующейся нанотрубки PNT [5]. Этот подход и алгоритм расчета, реализованный здесь в виде Tcl/Tk скрипта в специальных опциях Tool Command Language программного пакета HyperChem [7], аналогичен примененному ранее для нанотрубок на основе FF [5]. Отметим, что данный подход оказался эффективным и для расчета хиральности нанотрубок на основе FF, самособранных методом молекулярной динамики [8]. В отличие от нанотрубок FF PNT, у которых на 1 виток спирали приходилось 6 молекул дипептидов FF, в нанотрубках LL PNT и II PNT на 1 виток спирали приходится по 4 молекулы дипептида LL или II. Тем не менее, не смотря на эту разницу, данный подход расчета хиральности спиральных структур приводит к аналогичному результату: на основе дипептидов левой хиральности L-LL и L-II образуются нанотрубки с правой хиральностью D, и наоборот, на основе D-LL и D-II - формируются нанотрубки левой хиральности L. Это соответствует закону смены знака хиральности при переходе структур на следующий уровень их иерархической самоорганизации [9].

В настоящей работе было проведено компьютерное моделирование и расчеты хиральности наноструктур на основе дипептидов лейцина с исходно различной хиральностью, а также исследованы их физические, электронные и структурные свойства. Исходные структуры аминокислот, а также их дипептидов (в необходимой для их функционирования цвиттерионной форме), строились на основе базы данных аминокислот, которая включена в программный пакет HyperChem [7]. Расчеты дипольных моментов проводились полуэмпирическими квантово-химическими методами AM1, PM3 в приближении ограниченного Хартри-Фока (RHF) программного пакета HyperChem [7]. Этими методами были проведены расчеты и электронных уровней E-HOMO, E-LUMO.

Для структурных исследований первоначально нами были построены кольцевые модели наноструктур на основе диизолейцина и дилейцина различной хиральности, а затем получены и их спиральные модели. Для наноструктур на основе дилейцина и диизолейцина известны экспериментальные данные, полученные в работах Горбитца [10-13] и хранящиеся в базах данных CCDC [14]. Однако, все они были получены на основе исходных аминокислот только левой хиральности L. В настоящее время, нет пока экспериментальных данных для структур на основе аминокислот правой хиральности D, за исключением дифенилаланина, для которого недавно были получены экспериментальные данные по наноструктурам на основе FF правой хиральности D-FF [3]. В наших работах мы используем экспериментальные рентгеновские кристаллографические данные, для построения соответствующих молекулярных структур нанотрубок. Так было сделано для FF PNT на основе их исходной хиральности L-FF и D-FF. В результате были выделены нанотрубки, имеющие спиральную структуру, которая отличалась от первоначальной кольцевой модели. В итоге было показано, что экспериментально дипептиды формируют спиральные структуры, отличные от кольцевых моделей по физическим свойствам [1-3].

В случае с лейцином и изолейцином мы имеем экспериментальные рентгеновские данные только для наноструктур на основе дипептидов левой хиральности. Поэтому мы можем только их использовать для построения моделей таких спиральных нанотрубок. Для нанотрубок на основе дипептидов правой хиральности мы здесь предлагаем построение гипотетических спиральных моделей по аналогии с данными D-FF PNT. Однако, и в этом случае, не все оказывается так просто. Дело в том, что экспериментальные данные для наноструктур на основе диизолейцина имеют несколько различных и достаточно «запутанных» кристаллографических структур [11,13], из которых пока не удается выделить однозначно четкую структуру нанотрубки. Поэтому, в данной работе мы строим модели только на основе дилейцина, исходя из аналогов с уже известными структурами. При этом, из экспериментальных рентгеновских кристаллографических данных для дилейцина левой хиральности L-LL [10,13] удается выделить четкую структуру спиральной нанотрубки и определить ее хиральность как правую D. При этом, в одном витке здесь как раз и укладывается по 4 дипептида.

Рассмотрим подробнее данные структуры и расчеты хиральности нанотрубок на основе дилейцина L-LL, D-LL. Прежде всего тут следует отметить, что более тщательный и углубленный анализ результатов сравнения спиральных структур для нанотрубок на основе дилейцина, извлеченных из рентгеновских данных, и построенных исходя из базы данных аминокислот (встроенной в HyperChem), показал, что исходные конформации лейцина с хиральностью L должны быть не только типа -helix, но left-hand-helix (рис. 1). Только в этом случае возникает нужное соответствие хиральности спиральной структуры и направлений векторов дипольных моментов как отдельных дипептидов, так и всего витка спиральной нанотрубки (таб. 1, 2, рис. 2, 3). Кстати, аналогичный эффект был выявлен нами ранее и в случае нанотрубок на основе FF левой хиральности [1]. Возможно, это вообще характерно для дипептидов левой хиральности.

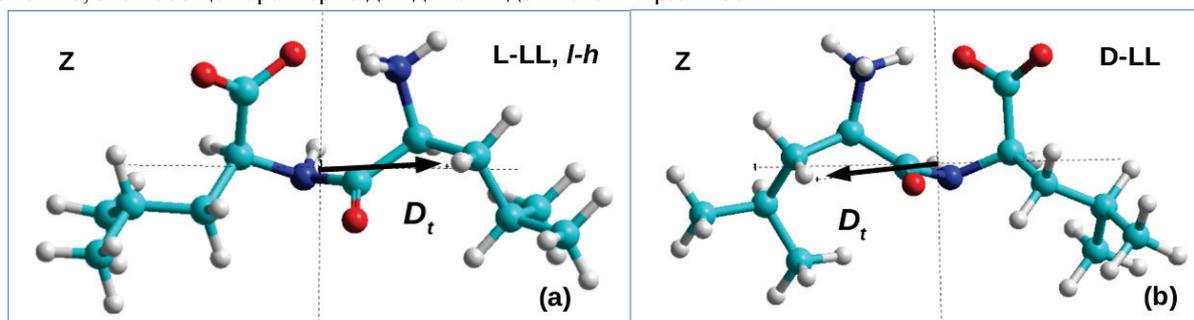


Рисунок 1. Модели дилейцина: а) L-LL в конформации left-hand *l-h* - helix; б) D-FF в конформации - helix

Таблица 1. Расчеты физических свойств для дилейцина разных конформаций полуэмпирическими методами

Метод расчетов	Хиральность исходного LL	D_x , Debye	D_y , Debye	D_z , Debye	D_r , Debye	Volume, Å ³	Polarization, C/m ²
PM3 RHF	L-LL, <i>l-h</i>	10,399	0,049	-4,262	11,238	243,243	0,1541
	D-LL	-10,334	-1,397	-0,110	10,429	244,143	0,1425
AM1 RHF	L-LL, <i>l-h</i>	10,609	0,183	-4,069	11,364	243,243	0,1558
	D-LL	-10,765	-1,318	0,0623	10,846	244,143	0,1482

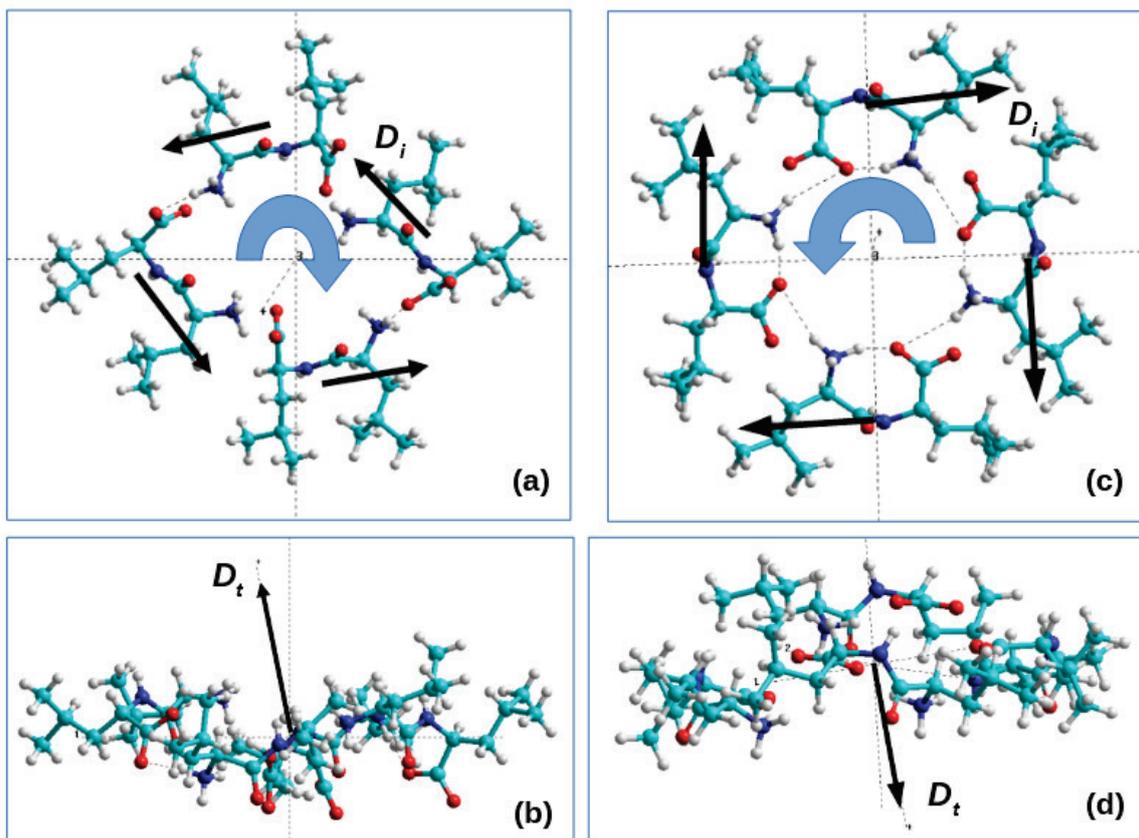


Рисунок 2. Молекулярные модели дилейцина: а) и б) на основе L-LL из экспериментальных данных в проекциях Z и Y для 1-го витка спирали PNT; с) и d) на основе D-LL - модель 1 витка искусственной спирали

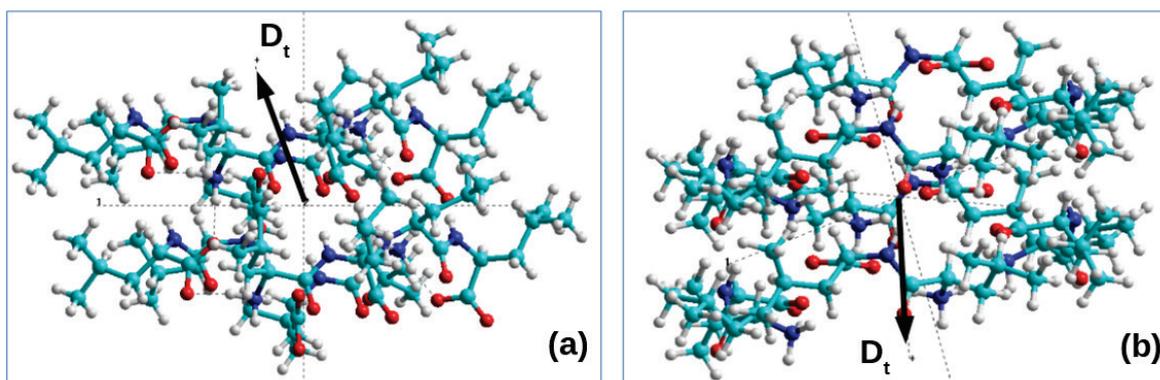


Рисунок 3. Модельные структуры спиральных нанотрубок PNT дилейцина LL из 2-х витков спирали: а) на основе L-LL по экспериментальным данным; б) искусственная модель спиральной PNT на основе D-LL

Формирование и особенности наноструктур витков нанотрубок PNT на основе LL разной хиральности L и D, показаны на рис. 2 и рис. 3. В таблице 2 собраны результаты расчетов величины и знака хиральности обоих типов нанотрубок разными методами AM1 и PM3. На рисунке 2 (рис. 2а, рис. 2с) круговой стрелкой показаны направления обхода витка спирали при последовательном вычислении смешанного векторно-скалярного произведения по векторам дипольных моментов (показанных стрелками также на рис. 2а и 2с) — это определяет показатель хиральности по методике, описанной в [5,8], и выполняемой по программе Tc/Tk скрипта, встроенного нами в HyperChem. Результаты таблицы 2 показывают полное соответствие закону смены хиральности при усложнении структуры [9].

Таблица 3 представляет результаты расчетов физических свойств LL PNT: дипольных моментов, поляризации и электронных уровней, а также ширины запрещенной зоны $E_g = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$. Видно, что величины дипольных моментов и поляризации для структур на основе экспериментально собранной PNT L-LL заметно больше искусственно созданной спиральной структуры PNT D-FF. Также отличаются величины электронных уровней и ширины запрещенной зоны. Тем не менее, тенденции изменений и ориентации векторов дипольных моментов и уровней энергии, соответствуют аналогичным параметрам в структурах FF PNT [1-3,5,6,8]. Более того, сами значения дипольных моментов, поляризации и изменений ширины

Таблица 2. Результаты расчета хиральности нанотрубок на основе дилейцина разной исходной хиральности (структуры витков PNT L-LL – экспериментальные; для витков PNT D-FF – искусственная модель)

Хиральность исходных дипептидов LL		L-LL	D-LL
Модель структуры	Метод расчета	Значения хиральности: знак и величина	
1 виток спиральной нанотрубки	PM3 RH	1,214	-0,279
	AM1 RHF	1,209	-0,242
2 витка спиральной нанотрубки	PM3 RHF	3,968	-0,783
	AM1 RHF	3,936	-0,874
Знак хиральности спиральной нанотрубки PNT		Положительный «+»	Отрицательный «-»
Символ хиральности спиральной нанотрубки PNT		D	L

Таблица 3. Результаты расчетов физических свойств нанотрубок LL PNT разными методами

Методы и модели			Основные рассчитанные физические величины						
Методы расчета	Хиральность LL	Модель PNT	D _z , Debye	D _t , Debye	Volume, Å ³	P, C/m ²	E_HOMO, eV	E_LUMO, eV	Eg, eV
PM3 RHF	L-LL	1 виток	-38,810	41,110	930,99	0,1473	-7,6812	-1,3861	6,2951
		2 витка	-78,243	89,739	1854,47	0,1614	-6,0452	-2,8156	3,2296
	D-LL	1 виток	3,845	4,005	970,47	0,0138	-8,7981	-0,5559	8,2422
		2 витка	6,0685	6,093	1907,86	0,01065	-8,7179	-0,7068	7,9211
AM1 RHF	L-LL	1 виток	-38,192	40,4985	930,99	0,1451	-7,6714	-1,1661	6,5053
		2 витка	-76,4628	87,8063	1854,47	0,1579	-6,0695	-2,5199	3,5496
	D-LL	1 виток	3,3475	3,5278	970,47	0,01213	-8,7774	-0,0905	8,6869
		2 витка	7,6507	7,6663	1907,86	0,01340	-8,5002	-0,4326	8,0676

запрещенной зоны для PNT L-LL очень близки к значениям для PNT L-FF [2, 6]. Это говорит об общем характере физических явлений и возможностях применений наноструктур на основе LL, также, как и применяемых наноструктур на основе FF.

Заключение. В данной работе представлены новые результаты моделирования и численного исследования пептидных наноструктур типа спиральных нанотрубок, собранных на основе дипептидов дилейцина. Известно, что в настоящее время экспериментально синтезированы и исследованы такие наноструктуры только на основе дилейцина левой хиральности L-LL. Используя эти экспериментальные данные, в данной работе построены и рассмотрены модели спиральных нанотрубок на основе дилейцина L-LL левой хиральности, и рассчитаны их физические свойства, близкие со свойствами нанотрубок на основе дифенилаланина FF. Для дифенилаланина уже хорошо известны синтезированные структуры на основе обоих типов хиральности L-FF и D-FF. В тоже время для дилейцина правой хиральности D-LL нет пока экспериментально созданных таких наноструктур. В данной работе предложены, построены и численно исследованы аналогичные наноструктуры спиральных нанотрубок на основе дилейцина D-LL правой хиральности. Эти гипотетические модельные структуры могут быть хорошей основой для экспериментального поиска и синтеза наноструктур на базе LL правой хиральности.

Важным моментом работы является также выполненные расчеты показателя хиральности по методике на основе векторов дипольных моментов дипептидов, что имеет более глубокий физический смысл. Полученные здесь результаты полностью соответствуют закону смены знака хиральности при переходе на следующий уровень организации биомолекулярных систем. Выполненные расчеты физических свойств LL нанотрубок показали хорошее согласие с аналогичными данными для FF нанотрубок. В частности, для экспериментально известных левых структур L-FF и L-LL значения дипольных моментов и поляризации оказываются одинаково высокими (для L-LL: D_t = 89,74 Debye, P = 0,16 C/m²; L-FF: D_t ~ 140 Debye, P ~ 0,14 C/m² [1-3]). Ширина запрещенной зоны Eg также близки (для L-LL: Eg = 3,24 eV; для L-FF: Eg = 3,44 eV [6] при расчетах PM3 RHF).

Подобные величины имеют и нанотрубки на основе правой D-FF. Построенные модели нанотрубок на основе D-LL имеют пока меньшие значения дипольных моментов и поляризации, и более широкую Eg. Но эта работа продолжается и следует ожидать, что новые синтезированные наноструктуры на основе D-LL будут также иметь аналогичные значения исследованных физических величин. И это будет иметь большое практическое значение для применений в различных областях биоинженерии, создании фотодетекторов и биосенсоров и т.п.

Список литературы / References:

1. Bystrov V.S., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S. et al. Chiral Peculiar Properties of Self-Organization of Diphenylalanine Peptide Nanotubes: Modeling of Structure and Properties. *Math. Biol. Bioinform.*, 2019, vol. 14, pp. 94-125.
2. Bystrov V.S., Filippov S.V. Molecular modelling and computational studies of peptide diphenylalanine nanotubes, containing waters: Structural and interactions analysis. *J. Mol. Model.*, 2022, vol. 28, pp. 1-24.
3. Zelenovskiy P.S., Nuraeva A., Kopyl S. et al. Chirality-Dependent Growth of Self-Assembled Diphenylalanine Microtubes. *Cryst. Growth Des.*, 2019, vol. 19, pp. 6414-6421.
4. Leuchtag H.R. Voltage-Sensitive Ion Channels: Biophysics of Molecular Excitability. *Springer*, 2008, 529 p.
5. Bystrov V., Sidorova A., Lutsenko A. et al. Modeling of Self-Assembled Peptide Nanotubes and Determination of Their Chirality Sign Based on Dipole Moment Calculations. *Nanomaterials*, 2021, vol. 11, p. 2415.
6. Bystrov V., Paramonova E., Zelenovskii P., Kopyl S., Shen H., Lin T., Fridkin V. Photoelectronic Properties of Chiral Self-Assembled Diphenylalanine Nanotubes: A Computational Study. *Symmetry*, 2023, vol. 15, no. 2, p. 504.
7. HyperChem 8. Tools for Molecular Modeling. Professional Edition for Windows AC Release 8.0 USB (on CD). Gainesville, FL 32601 United States: Hypercube. Inc. 2011.
8. Bystrov V., Likhachev I., Filippov S., Paramonova E. Molecular Dynamics Simulation of Self-Assembly Processes of Diphenylalanine Peptide Nanotubes and Determination of Their Chirality. *Nanomaterials*, 2023, vol. 13, no. 13, p. 1905.
9. Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 128-132.
10. Gorbitz C.H. Nanotube formation by hydrophobic dipeptides. *Chem. Eur. J.*, 2001, vol. 7, pp. 5153-5159.
11. Gorbitz C.H. A crystallographic titration of the dipeptide L-isoleucyl-L-isoleucine. *Acta Crystallographica*, 2004, vol. 60, pp. 569-577.
12. Gorbitz C.H. The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's B-amyloid polypeptide. *Chemical Communications*, 2006, vol. 22, no. (22), pp. 2332-2334.
13. Gorbitz C.H. Hydrophobic dipeptides: the final piece in the puzzle. *Acta Section B: Structural Science*, 2018, vol. 74, no. 3, pp. 311-318.
14. CCDC Home | CCDC [Electronic resource]. (accessed: 10.06.2023).

SIMULATION AND COMPUTER STUDY OF THE CHIRAL PROPERTIES OF PEPTIDE NANOTUBES BASED ON DILEUCINE

Bystrov V.S.¹, Filippov S.V.¹, Likhachev I.V.¹, Ledeneva O.R.², Belova E.V.²

¹Institute for Mathematical Problems of Biology of RAS, branch of KIAM RAS
Prof. Vitkevicha str., 1, Pushchino, Russia; e-mail: vsbys@mail.ru

²Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 1, Moscow, 119234, Russia

Received 11.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0642

Abstract. The paper presents calculations of the dipole, polar, and electronic properties of helical nanostructures based on dileucine (LL) of different chirality (L, D) using the AM1, PM3 methods from the HyperChem software package. It has been shown that the physical properties of dileucine-based nanotubes are close to those of diphenylalanine nanotubes (FF PNT). For nanostructures based on dileucine of left chirality L-LL, the existing experimental data make it possible to isolate from crystallographic structures molecular nanostructures of helical nanotubes that have right chirality D, which corresponds to the law of chirality change upon transition to the next level of self-organization. Model helical structures of nanotubes based on dileucine of right chirality D-LL were also constructed, for which there are no experimental data. Calculations of chirality by the method of mixed vector-scalar product of dipole moments of dipeptides showed that the law of changing the type of chirality is also valid for model helical nanotubes based on the D-LL. These results can be the basis for the synthesis of new experimental nanostructures based on right-handed dipeptides.

Key words: *amino acids, dipeptides, dileucine, peptide nanotube, chirality, dipole moment, molecular modeling, semi-empirical methods.*

VIBRONIC SPECTRA OF OXAZINE 750 DYE IN AQUEOUS MEDIA: A COMPUTATIONAL STUDY

Leontieva S.V.

Black Sea Higher Naval Orders of the Red Star School named after P.S. Nakhimov

Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028, Russia; e-mail: tezidi@gmail.com

Received 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0643

Abstract. The MN12SX/6-31++G(d,p)/SMD theory level exactly reproduced both positions of the main maximum and short-wavelength shoulder of OX750 absorption in an aqueous solution. The optimal functional for calculating the vibronic absorption spectra of different oxazine dyes in an aqueous solution was discussed based on the author's present and previous studies. The absorption spectrum shoulder is caused by the vibronic transition. The vibrations involved in vibronic transitions correspond to large-scale molecular movements, are low-frequency, and very weak compared to the others. However, excitation significantly influences the vibrations including the most intensive ones. Photoinduced charge redistribution is local and there is no charge transfer over the dye molecule as a whole. Aliphatic hydrogen atoms prevent water molecules from accessing the N24 nitrogen atom. Considering H-bonded "solute-solvent" interactions by three water molecules led to a redshift of the entire spectrum by ≈ 15 nm. A strengthening of H-bonds with water molecules upon OX750 excitation was found, which explains this bathochromic effect. The intensity of low-frequency vibrations (including those involved in vibronic transitions) increases with the addition of bound water molecules, especially in an excited state. The vibration of the N-H bond of the imino group is strengthened (especially in an excited state) due to water molecule binding. Noticeable polarization of one water molecule bounded was revealed upon dye excitation. The vibronic model was also applied to calculate the emission spectrum of OX750 in the aqueous media.

Key words: TD-DFT/DFT, vibronic transitions, aqueous solution, oxazine 750, absorption spectrum, emission spectrum.

INTRODUCTION

Oxazine 750 (OX750, Fig. 1) is a highly fluorescent dye used in lasers [1-4], as well as a fluorescent marker [5,6] and included in chemical sensors [7].

Using optical methods, it was found that OX750 can effectively bind to DNA [6], surfaces of sol-gel glasses [8], porous silicate xerogel monoliths [9], nanoporous crystals [10], silicate xerogel [11]. A fairly large number of experimental works are devoted to the study of the optical properties of the OX750 itself. The Zhou and Han group studied the fluorescence and relaxation of this dye in various organic solvents [12-14]. The solvatochromism of OX750 in water [15] and other isotropic solvents [16], hydrophilic gel [17], and also in anisotropic medium (liquid crystals) [18] was investigated by the group of Ghanadzadeh and Zakerhamidi. Solvent effects were also analyzed by Rauf and Zaman [19]. The two-photon absorption of the dye was studied in Refs. [20,21]. While lasers use alcoholic solutions of OX750, the application of a dye as a fluorescent marker and chemical sensor requires an aqueous environment. Therefore, a detailed description and understanding of the photoexcitation of the OX750 in the aquatic environment, which can be achieved through theoretical analysis, is important. However, the theoretical analysis of the photoexcitation and relaxation of the OX750 was performed only for a non-aqueous medium. A theoretical study of the fluorescence and vibrational relaxation of OX750 in acetone was performed using the perturbative density operator method and the transient linear susceptibility theory [22]. The above-mentioned group of Zhou and Han, using the TD-DFT and CIS methods, analyzed the intermolecular H-bonds of OX750 in the ground and excited states with two ethanol molecules, as well as the electron transfer between them [13]. According to their calculations, one of the alcohol molecules is bound with the oxygen atom of the dye, and the other with the nitrogen atom of the side aminoethyl group. In a later work by the same authors, the energies of OX750 H-bonds (oxygen and nitrogen atoms of the central ring) with various organic solvents (acetone, methanol, ethanol, DMF, DMSO, and formamide) and its atomic charges in excited states were calculated [12]. An important result of Refs. [12,13] is the discovery of the enhancement of the H-bonds of OX750 with the solvent upon excitation. It should be noted that these authors further elaborated in detail the influence of photoexcitation of a solute on its H-bonds with a solvent for many different systems (see their review [23]). At once, vertical electronic transitions in

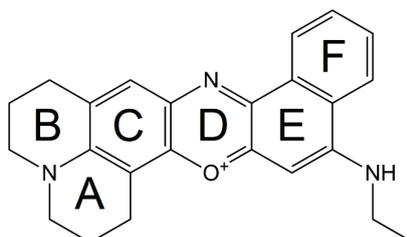


Figure 1. Chemical structure of OX750

Refs. [12,13] does not reproduce the experimental spectrum of OX750. For this purpose, it needs to consider vibronic transitions [24-27]. The absorption spectra of dilute OX750 solutions (both in water and in organic solvents) have a short-wavelength shoulder [12,17,18,20,21]. For an OX750 in aqueous media, the shoulder and the main maximum are situated at $\lambda_{\text{shoulder}}=612$ nm and $\lambda_{\text{max}}=666$ nm, respectively [21]. The authors of Refs. [17,18,21] believe that this shoulder is the dimer absorption band. However, a spectrophotometrically resolved spectrum of the OX750 monomer (Fig. 4) [21] has a shoulder also. In Ref. [20] authors state that the shoulder has a vibronic nature. It can also be caused by a separate electronic transition. The issue of the origin of the short-wavelength shoulder of the absorption spectra of dilute OX750 solutions can be answered by theoretical calculations of the OX750 excited states and vibronic transitions between them. This work completes a series of theoretical studies of oxazine dyes [28-33].

METHODS

Let us briefly describe the quantum-chemical model of photoexcitation of a dye molecule in solution, which corresponds to the steady-state absorption spectroscopy experiment, by which the calculation results were verified.

When a photon is absorbed, the solute molecule, which was originally in the ground state (GS), goes into an excited non-equilibrium state, also called Franck-Condon (FC). This nonequilibrium is since, according to the Franck-Condon principle [34], the electronic transition first occurs at fixed R_{GS} positions of the nuclei (Fig. 2). The invariance of the coordinates corresponds to the vertical transition line E_{vert} , shown in yellow in Fig. 2.

The nonequilibrium of the excited electron shell and nuclei, whose R_{GS} coordinates still correspond to the ground state, leads to the activation of vibrational energy levels of the nuclear core (green wave in Fig. 2), so the transition is not purely electronic, but electronic-vibrational (vibronic). Since the excitation of the molecule under consideration occurs in solution, the reaction to it from the solvent (reaction field) will also initially be nonequilibrium. In this work, the nonequilibrium field of the solvent reaction was set using the state-specific approach [35]. A detailed modern interpretation of the Franck-Condon principle is given in Ref. [36].

From the excited Franck-Condon state, the solute molecule and the solvent molecules closest to it relax to the excited equilibrium state (EES) by changing the coordinates of the nuclei ($R_{\text{GS}} \rightarrow R_{\text{EES}}$, red arrow in Fig. 2) and polarization, respectively. This process was described by the equilibrium solvation model [37]. The difference between the respective energies is designated as the adiabatic energy: $E_{\text{adia}}=E_{\text{EES}}-E_{\text{GS}}$ (see Fig. 2).

According to Kasha's rule [38], the emission originates from EES and is also a vertical transition (purple arrow in Fig. 2) following the Franck-Condon principle. In other words, the nuclear core remains in the configuration corresponding to the excited state (R_{EES}), while the electron shell returns to its ground state. This mutual nonequilibrium of the nuclear core and the electron shell again leads to the activation of the vibrational energy levels of the nuclear core (turquoise wave in Fig. 2). Then the nuclear core relaxes to the basic configuration of the electron shell (blue arrow in Fig. 2), and the system returns to its GS. Unfortunately, the literature does not contain the emission spectrum of OX750 in an aqueous solution, there is only the magnitude of the emission maximum $\lambda_{\text{em}}=667$ nm [16]. Therefore, the verification of the selected level of theory was carried out using the experimental absorption spectrum of the dye [21]. To avoid confusion, the calculation of the emission spectrum and its analysis are described separately in Appendix A.

The aqueous medium was modeled in two ways: implicit and combined. In the first part of the work, the approximation of a polarizable continuum (Integral Equation Formalism of Polarizable Continuum Model, IEFPCM, see review [39]) was used. Based on the experience of Refs. [29-33,40], IEFPCM calculations with radii and non-electrostatic terms of the SMD solvation model [41] were applied. Solvent continuum models consider site-specific interactions with the aqueous environment (i.e., strong hydrogen bonds) only on an average. As mentioned above, the OX750 molecule

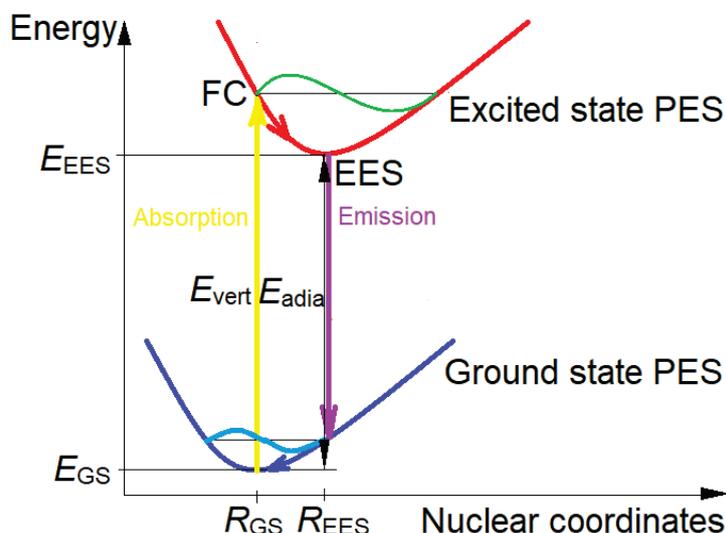


Figure 2. Energetic diagram of vibronic transitions

contains four H-bond donor and acceptor centers. To elucidate the effect of this strong hydrogen bonding, in the second part of the work, an explicit-implicit accounting of the aqueous medium was used: four water molecules strongly bound to dye molecules were specified explicitly, while the rest of the aqueous environment was implicitly specified.

In this work, the three lowest singlet electronic transitions in the OX750 molecule were analyzed. The PESs of the ground and excited states were calculated in the harmonic approximation near their minima, R_{GS} and R_{EES} , respectively. According to Ref. [36], anharmonicity effects are negligible for rigid and semirigid molecules (rotation of benzene rings relative to chromophores will be analyzed below). The PESs of the excited states were built using TD-DFT and the adiabatic Hessian model. The 6-31++G(d,p) basis set and forty hybrid functionals supported by Gaussian16 [42] were used in the work, among which one was chosen that gives the best match between the calculated vibronic absorption spectra and the experimental ones as the positions of the maxima ($E_{\text{vibron}}=E_{\text{max}}$), and in shapes (see Results and Discussion).

Vibronic absorption spectra of dyes were calculated using the methodology [43] implemented in the Gaussian16 package based on time-independent DFT. The broadening of the vibronic transition bands was performed using Gaussians with $\text{HWHM}=400\text{ cm}^{-1}$, and the peaks of the calculated IR spectra - with $\text{HWHM}=4\text{ cm}^{-1}$. The temperature was assumed to be $T=298\text{ K}$. The spatial structure of the OX750 dye was taken from the PubChem database (CID 194254) and optimized as the ground state at the selected DFT level. Vibronic and IR spectra, spatial structures, molecular orbitals, distributions of electron density differences, and electrostatic potentials were built using the Gaussview6.0 package [44].

RESULTS AND DISCUSSION

The energies of electronic states and transitions between them substantially depend on the X fraction of the "exact" Hartree-Fock exchange in the functional. As a rule, with an increase in the X value, the energy of the electronic (and vibronic) transition increases [45,46]. Pure functionals with $X=0$ are not suitable for the analysis of excitation, since they often give too low (compared with experiment) transition energies and spurious excited states [47]. In the case of pronounced charge transfer, functionals with long-range correction should be used, in which the X value depends on the distance [48].

The main absorption peak in the visible spectrum region is caused by the HOMO→LUMO ($S_0\rightarrow S_1$) transition [12,13]. Therefore, the selection of a hybrid functional, which reproduces the E_{vibron} (maximum of the calculated vibronic spectrum) for this transition coinciding with the main maximum $E_{\text{max}}=1.86\text{ eV}$ (which corresponds to $\lambda_{\text{max}}=666\text{ nm}$ [21]) of the resolved monomer spectrum of the dye (Fig. 3), was carried out.

From Fig. 3 it can be seen that the MN12SX functional [49] with long-range correction is in excellent agreement with the experiment on the position of the main maximum. MN12SX depends on the density, the density gradient, and the kinetic energy density. It includes an $X=25\%$ at short-range distances and $X=0\%$ (Hartree-Fock exchange is screened) at long-range ones. The success of the functional with a long-range correction may mean the presence of photoinduced charge transfer in the OX750 molecule. This assumption will be tested below by analysis of atomic charges. Note that both the MN12SX functional and SMD solvent model used in this study were developed by Truhlar's group.

The calculated spectrum coincides with the experimental one in terms of the positions of the main maximum and short-wavelength shoulder ($\lambda_{\text{shoulder}}=612\text{ nm}$, Fig. 4). The latter has a vibronic nature: it is due to vibronic transition #10 (see Fig. 4 and Table 1).

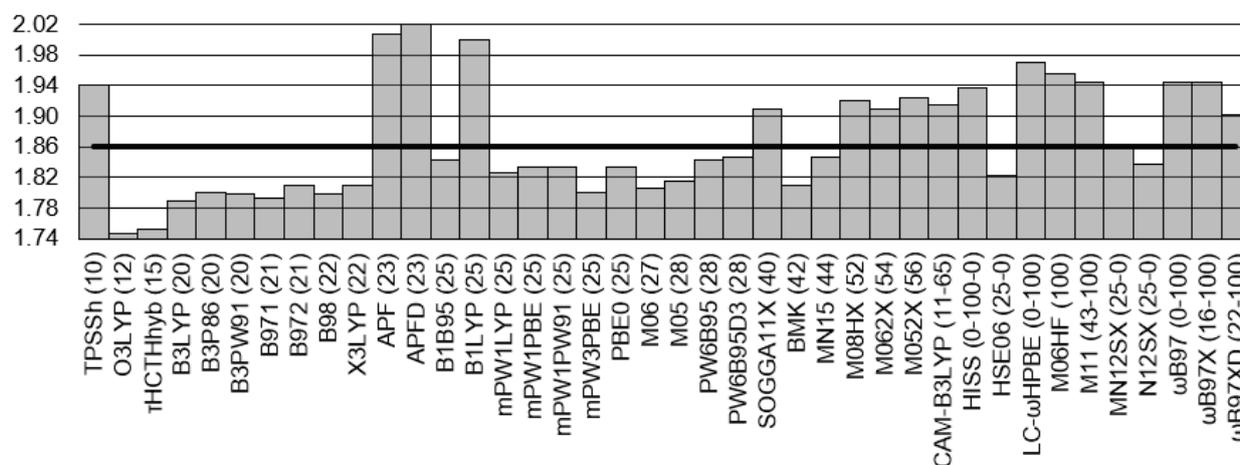


Figure 3. Maxima E_{vibron} (eV) of theoretical vibronic absorption spectra of OX750 in aqueous media. X percentage is indicated in parentheses. X values for small and large distances are indicated for functionals with long-range correction (HISS functional - for small, medium, and long distances, respectively). The bold horizontal line is the E_{max} value

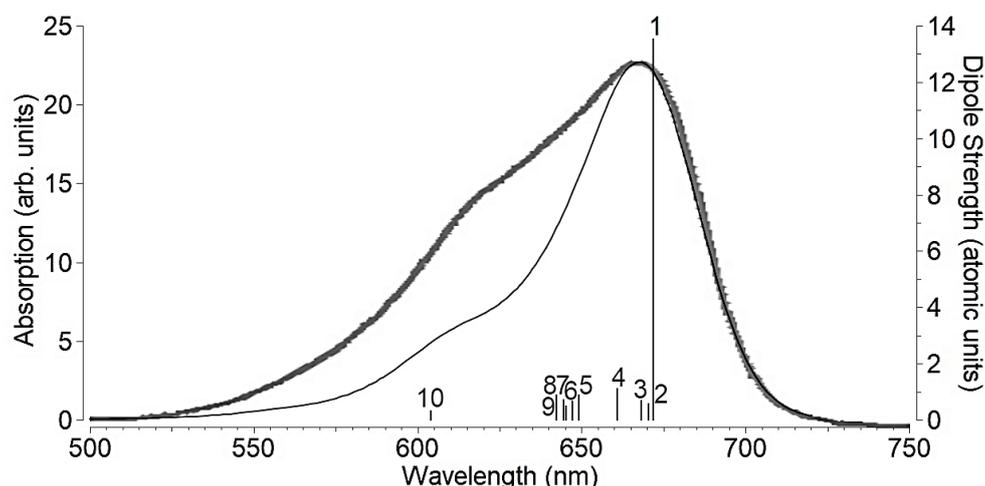


Figure 4. The calculated vibronic absorption spectrum of OX750 in aqueous media (thin line) and resolved OX750 monomer spectrum in aqueous solution from Ref. [21] (thick line here and in Fig. 9, adapted with permission from AIP Publishing, order 5097060452897). The vertical lines are the dipole strength of the vibronic transitions (see Table 1)

However, the shoulder in the calculated spectrum is twice lower than the experimental one. This may be due to both the dimeric absorption and the contribution of higher electronic transitions to the experimental spectrum. The latter assumption will be verified below.

Whilst, analysis of the OX750 excitation in an aqueous media will be performed below on the MN12SX/6-31++G(d,p)/SMD theory level. It should also be noted that the vibrations involved in vibronic transitions correspond to large-scale molecular movements, are low-frequency, and very weak compared to the others (Fig. 5).

Table 1. Parameters of OX750 vibronic transitions upon excitation in an aqueous media

#	Transition	λ (nm)	E (eV)	ν (cm^{-1})	I	p (atomic units)	Definitions of excited-state vibrations involved (see Fig. 5)
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	672	1.85	0	167200	13.6	-
2	$0_0 \rightarrow 2^1$	670	1.85	29.2	6861	0.557	Flexural vibration of the chromophore perpendicular to its plane
3	$0_0 \rightarrow 5^1$	668	1.86	80.3	8383	0.678	Flexural vibration of the chromophore in its plane
4	$0_0 \rightarrow 15^1$	661	1.88	247	13760	1.10	Compression-stretching of the chromophore along its long axis
5	$0_0 \rightarrow 34^1$	649	1.91	520	11060	0.869	Compression-stretching of the central (heterocyclic) ring across the long axis of the chromophore
6	$0_0 \rightarrow 36^1$	647	1.92	567	8151	0.639	Compression-stretching of the central (heterocyclic) along the long axis of the chromophore
7	$0_0 \rightarrow 38^1$	645	1.92	613	6016	0.470	Compression-stretching of the side aromatic ring
8	$0_0 \rightarrow 39^1$	645	1.92	627	9107	0.711	Compression-stretching of the chromophore across its long axis
9	$0_0 \rightarrow 43^1$	642	1.93	684	11310	0.880	Shear vibration of the chromophore along its long axis
10	$0_0 \rightarrow 126^1$	604	2.05	1670	4317	0.316	Compression-stretching of the aromatic rings

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

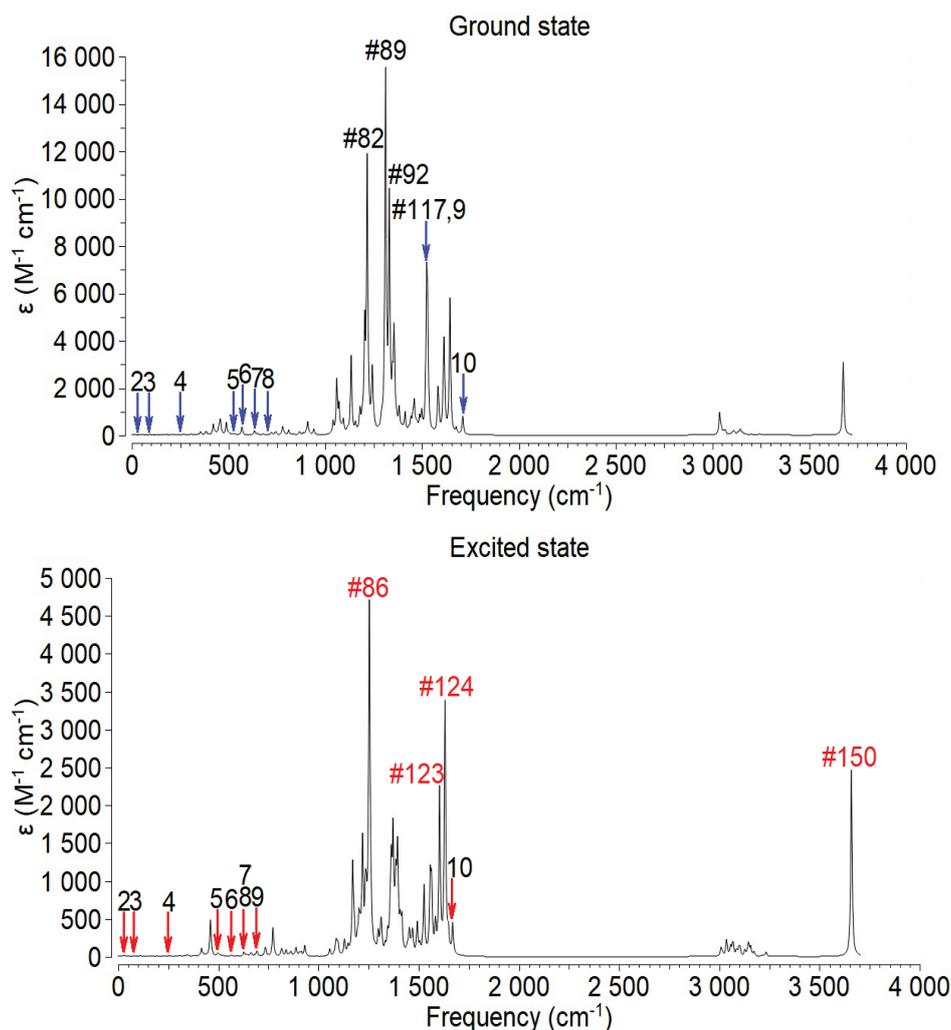


Figure 5. Calculated IR spectra of OX750 in an aqueous media. The vibration frequencies of the excited state involved in absorption vibronic transitions are indicated by red arrows with appropriate numbers. Vibrations weakened by excitation are indicated by black numbers, and those enhanced by red. The vibration frequencies of the ground state involved in emission vibronic transitions are indicated by blue arrows with appropriate numbers

It is interesting to note that, according to our previous studies [28-33], the optimal functional (with the same 6-31++G(d,p) basis set and the SMD solvent model) for calculating the vibronic absorption spectrum of oxazine dyes in an aqueous solution depends on the number of chromophore rings. Thus, the chromophores of oxazine 1 [29], brilliant cresyl blue [30], and oxazine 4 [32] contain three rings, and the X3LYP functional gives the best agreement with the experiment for them. At the same time, for four- and six-ring chromophores, the optimal functional each time turns out to be different: M062X for cresyl violet [30], ω B97XD for oxazine 170 (720) [31], O3LYP for the Nile red [28], and MN12SX for OX750 (this work). However, it should be clarified that, unlike the other dyes mentioned, Nile red is electrically neutral, and the 6-31G(d,p) basis set and the IEFPCM solvent model were used for it.

Comparing the calculated IR spectra of OX750 (see Fig. 5), one can see that excitation significantly influences the vibrations including the most intensive ones. The most significant photoinduced changes in oscillations are as follows. The mid-frequency fluctuations (#82, #89, #92, and #117) are noticeably weakened. Other mid-frequency vibrations (#86, #123, and #124) are greatly enhanced. All of the above modes describe the compression-stretching of the bonds of the chromophore in its plane in various combinations. Also, upon excitation, the most high-frequency vibration #150 (stretching-compression of the N-H bond of the imino group in the side chain (see Fig. 1) is significantly enhanced. The photoinduced changes in the vibration frequencies are small (~ 25 cm^{-1}). Visualization of all these vibrations is presented in Appendix as GIF files under the appropriate numbers. Changes in the vibration frequencies of OX750 due to excitation can also be visualized by the Duschinsky rotation matrix.

Two other electronic transitions in the visible spectrum region ($S_0 \rightarrow S_2$ and $S_0 \rightarrow S_3$) have a very low oscillator strength f (Table 2), and thus do not make an essential contribution to the absorption spectrum.

Frontier MOs involved in the $S_0 \rightarrow S_1$ electronic transition considered are shown in Fig. 6. Their configurations are close to those obtained in Ref. [13] at the BP86/TZVP/vacuo theory level. From Fig. 6, it can be seen that the frontier MOs cover almost the entire molecule, with the least extent of the aliphatic rings and the side chain.

Table 2. Parameters of electronic states and transitions between them for OX750 in an aqueous media

Electronic state	E_{eq}^* (eV)	Electronic transition	λ_{adia}^{**} (nm)	E_{adia}^{***} (eV)	λ_{vert} (nm)	E_{vert} (eV)	λ_{vibron} (nm)	E_{vibron} (eV)	f	Involved transitions
S_0 (GS)	-31769.92									
S_1	-31767.99	$S_0 \rightarrow S_1$	642	1.93	543	2.28	667	1.86	1.0775	HOMO \rightarrow LUMO
S_2	-31767.24	$S_0 \rightarrow S_2$	463	2.68	428	2.90	461	2.69	0.0002	HOMO \rightarrow (LUMO+1)
S_3	-31767.09	$S_0 \rightarrow S_3$	438	2.83	416	2.98	433	2.87	0.0569	(HOMO-1) \rightarrow LUMO

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

** $\lambda_{adia} = hc/E_{adia}$

*** $E_{adia} = E_{EES} - E_{GS}$, see Fig. 2

The OX750 dipole moment increases due to excitation ($\mu_{GS} < \mu_{FC} \approx \mu_{EES}$, Table 3). It corresponds to the $\pi \rightarrow \pi^*$ type of electronic transition and redshift of absorption maximum with solvent polarity increases [50]. However, the OX750 does not show this dependence. In particular, solvents with donors of H-bonds cause a redshift of the OX750 absorption bands compared to 1,4-dioxane ($\lambda_{max} = 649$ nm for dioxane, 665 nm for acetone, 669 nm for methanol, and 665 nm for water) [18]. Therefore, OX750 solvatochromism significantly influenced by specific solute-solvent H-bonds. In the present work, when simulating water molecules strongly bound to the dye, two of them were H-bond donors, and one was acceptor (Fig. 8), and they caused the redshift also (see below). In Ref. [16] based on solvatochromic shifts for polar solvents, $\mu_{GS} = 3.7$ D and $\mu_{EES} = 9.9$ D values were obtained. In Ref. [20], from solvatochromic shifts with H-bonding considering, the value $\Delta\mu = \mu_{EES} - \mu_{GS} = (2.1 \pm 1.1)$ D was calculated. As you can see, these results significantly differ quantitatively, both among themselves and with the values obtained in the present work. The transition moment M is oriented almost along the long chromophore axis (see Scheme inside Table 3, the coordinate axes coincide along the OX750 principal inertia axes).

To estimate the photoinduced electron density shifts in OX750 cation, its Merz-Kollman [51] charges of non-hydrogen atoms were analyzed. In the GS, the positive charges are located mainly on the C6, C7, and C10 atoms, and the negative ones - are on N1, N5, C2, C4, and C9 atoms. Due to excitation, the GS \rightarrow FC transition leads to a significant increase in electron density at the N5 atom, and a decrease - at C4, C6, C10, and C12 atoms. Hereafter, the absolute values of μ_x , μ_y , and μ increase (see Table 3). The FC \rightarrow EES relaxation leads to an electron density decrease in the C12 and C21 atoms and an increase in the C11 atom. This causes a decrease of μ_x and μ_y modulus and an insignificant μ increase. The electron density displacement during the GS \rightarrow FC vertical excitation is much stronger than upon the FC \rightarrow EES relaxation.

Photoinduced charge redistribution can be represented also by building a map of the difference in electron density (Fig. 7) or the distribution of electrostatic potential over the van der Waals surface of the molecule. As you can see from these Figs., charge redistribution is very complex (albeit local), and encompasses, to a greater or lesser extent, the entire dye molecule. Only the ethyl side group remains unused in this process. Thus, there is no charge transfer over the dye molecule as a whole.

To estimate the contribution of hydration to the OX750 excitation in an aqueous media, we calculated the vibronic absorption spectrum for the "OX750+3H₂O" hydrated complex (Figs. 8 and 9). In Ref. [13], two ethanol molecules bind only to nitrogen molecules. In this work, it is shown that a water molecule (probably due to its smaller size) is also capable of binding to the endocyclic oxygen O8 atom (see the caption in Fig. 8). It should be noted that aliphatic hydrogen atoms

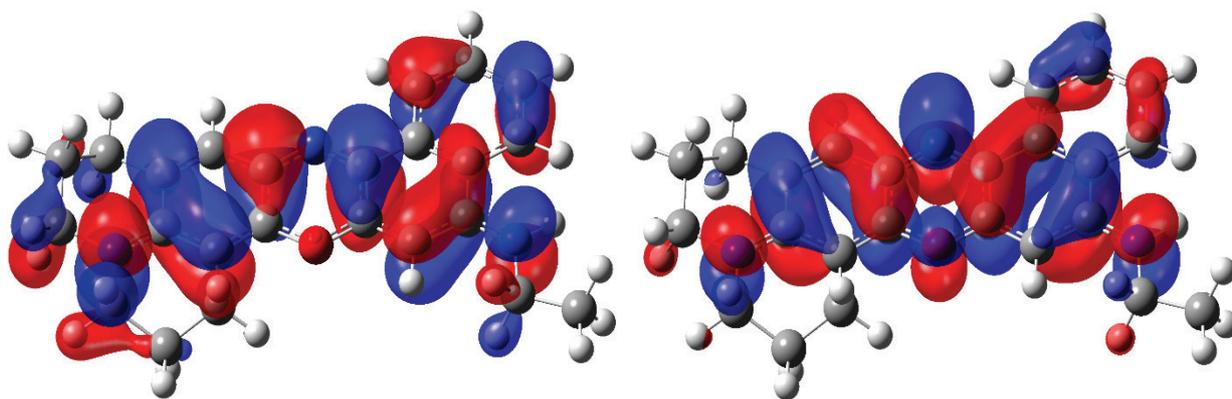
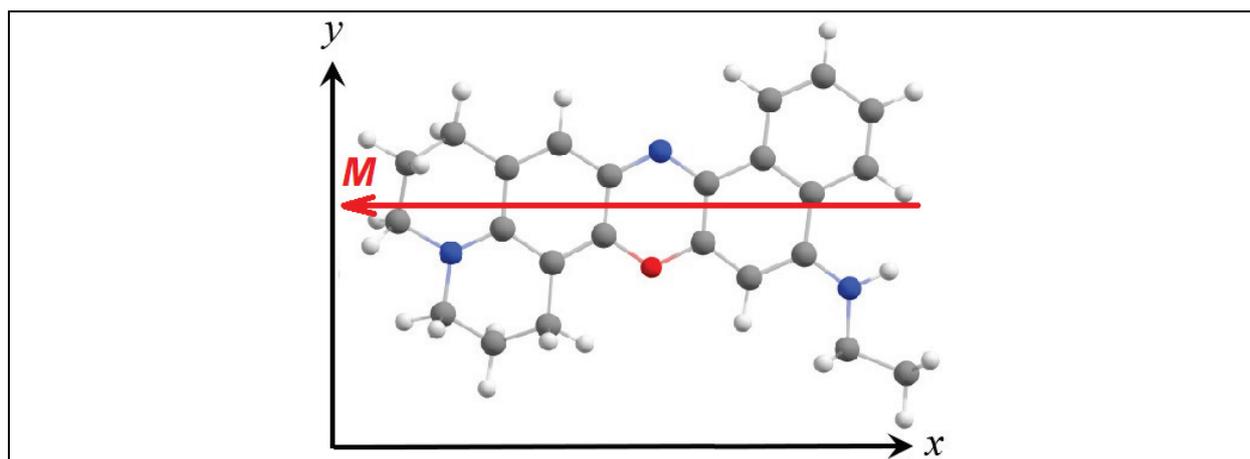
**Figure 6.** HOMO (left) and LUMO (right). Positive lobes are shown in red and negative lobes in blue

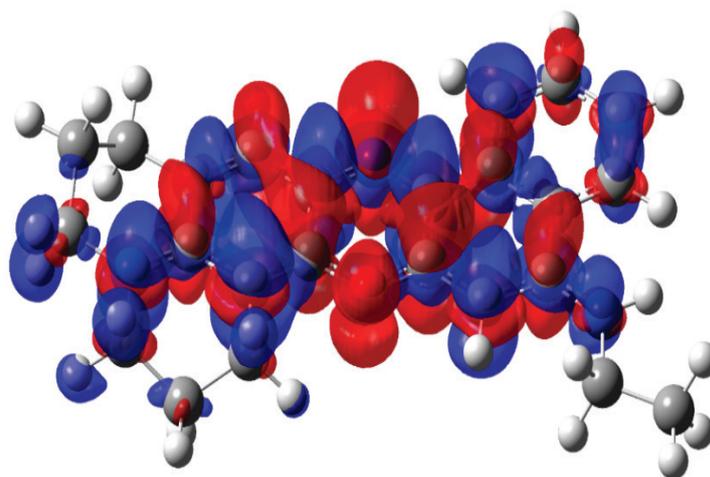
Table 3. Calculated moments (D) of OX750 cation in aqueous media (MN12SX/6-31++G(d,p)/SMD theory level)


Dipole moment	Ground state (S_0)	Excited state (S_1)		Transition dipole moment	
		Franck-Condon	Equilibrium		
μ_x	-1.45	-2.65	-2.70	M_x	-13.7
μ_y	-5.13	-6.07	-6.12	M_y	0.0399
μ_z	0.227	0.275	0.569	M_z	0.0615
μ	5.34	6.63	6.72	M	13.7

prevent water molecules from accessing the N24 nitrogen atom. The ABC ring group of the OX50 molecule (see Fig. 1) is a julolidyl moiety that is part of 7-amino-substituted coumarins, for which H-bonding of water with a nitrogen atom is possible (see, for example, case of coumarin 102(480) in Ref. [52]). However, unlike coumarin 102, the OX750 julolidyl moiety does not have such a strong pucker, and the resulting displacement of aliphatic H-atoms (versus a flat structure) is insufficient for the guaranteed access of the water molecule to the nitrogen atom. Note that the aforementioned H-bond of coumarin 102 with a water molecule is weak and breaks upon excitation [52].

All three H-bonds of OX750 with water molecules in the excited equilibrium state are stronger than in the ground one, which is reflected in its shortening (see Fig. 8). As mentioned above (see Introduction), this feature took place for the OX750 in ethanol (theoretical study of Zhao and Han [13]). The absorption intensity decreases slightly when adding three explicit water molecules (cf. Figs. 4 and 9).

However, in this case, a small short-wavelength vibronic peak at 535 nm in the calculated spectrum appears, which is absent in the experimental spectrum. This artifact peak is caused by a bug in Gaussian software. The main bands of the vibronic absorption spectrum of the "OX750+3H₂O" system have the same shape as for a single OX750 cation, but its absorption maximum is at $\lambda_{\text{vibron}}=681$ nm, and the shoulder at $\lambda_{\text{shoulder}}\approx 630$ nm, i.e. the spectrum is redshifted by ≈ 15 nm (Fig. 9). This regularity is easily explained as follows. Since the interactions with the water molecules for OX750 EES are stronger than in the GS, the PES of the EES drops lower than for a completely implicit consideration of the aqueous solution. The convergence of the PESs leads to a decrease in E_{adia} and E_{vert} (see Fig. 2), and, respectively, to an increase in λ_{vibron} .

**Figure 7.** The electron density difference between the Franck-Condon point and the ground state. Regions of positive values are shown in red and negative values in blue

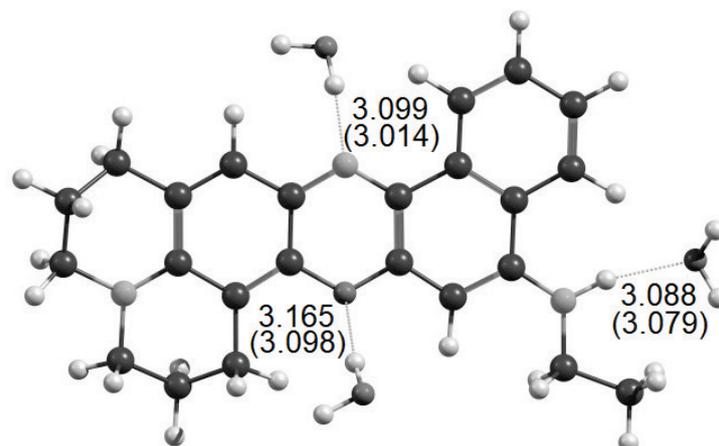


Figure 8. Calculated structure of the OX750 hydration complex with three water molecules. Strong H-bonds are shown with a dotted line. Their lengths in Å (distances between heavy atoms) are given for the ground and equilibrium excited (in parentheses) states. The water molecule bounded with the O8 atom (below in the Figure) is in front of the chromophore plane due to steric hindrances from the chromophore hydrogen atoms. The water molecule bounded with the N5 atom (above in the Figure) is located behind the plane of the chromophore for the same reason. The third water molecule is located in the plane of the chromophore

Let us analyze briefly the effect of strong H-bonds with water on the electronic and vibrational states of the dye. Changes in the vibronic transitions occur (cf. Figs. 4 and 9). Their number reduced from 10 to 8, and the transitions have varied essentially (cf. Table 1). The intensity of low-frequency vibrations (including those involved in vibronic transitions) increases with the addition of bound water molecules, especially in an excited state. IR spectra also changed. In particular, the normal modes of water molecules are added and vibration #150 of the N-H bond of the imino group is strengthened (especially in an excited state) due to water molecule binding (see Fig. 8). Frontier MOs of the "OX750+3H₂O" complex practically coincide with those for a single OX750 molecule (cf. Fig. 6). It is interesting that out of three water molecules strongly bound to the OX750 cation, only one polarizes upon excitation (bound to the N5 endocyclic nitrogen atom, Fig. 10). As mentioned above, the electron density on the N5 atom increases the most. This leads to a significant charge redistribution of the water molecule bounded. It can also be visualized by the electrostatic potential distribution.

CONCLUSIONS

The best agreement with the experiment on the position of the main maximum ($\lambda_{\max} = 666$ nm) was given by MN12SX functional which contains a long-range correction. The MN12SX/6-31++G(d,p)/SMD theory level also exactly reproduced the position of the short-wavelength shoulder ($\lambda_{\text{shoulder}} = 612$ nm). The optimal functional for calculating the vibronic absorption spectra of oxazine dyes in an aqueous solution depends on the number of chromophore rings. Thus, for the oxazines with three rings, the X3LYP functional gives the best agreement with the experiment. For four- and six-ring chromophores, the optimal functional each time turns out to be different. The vibrations involved in vibronic

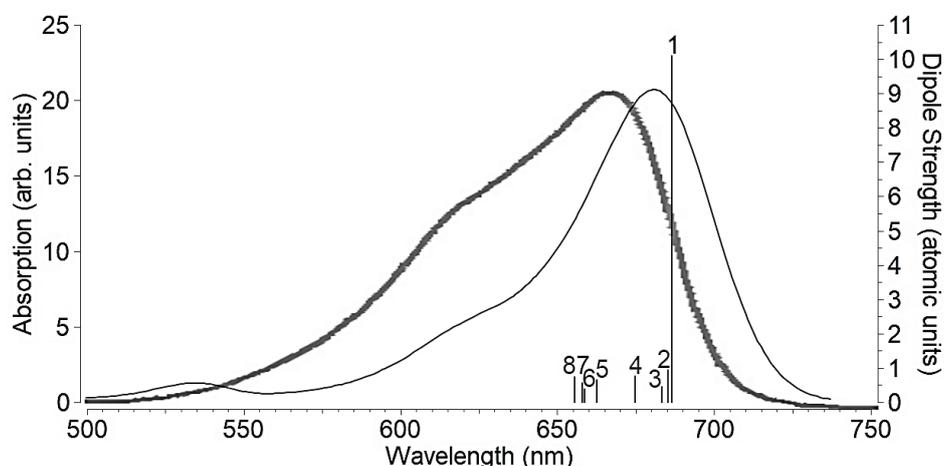


Figure 9. The calculated vibronic absorption spectrum of the "OX750+3H₂O" system (thin line) and the resolved monomer spectrum of OX750 aqueous solution from Ref. [21] (thick line)

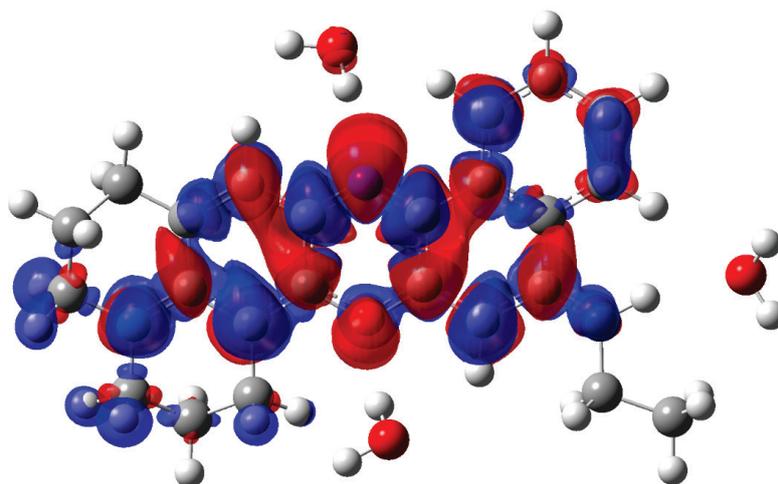


Figure 10. The electron density difference between the Franck-Condon point and the ground state for the "OX750+3H₂O" hydrated complex

transitions correspond to large-scale molecular movements, are low-frequency, and very weak compared to the others. Excitation significantly influences the vibrations including the most intensive ones. Aliphatic hydrogen atoms prevent water molecules from accessing the N24 nitrogen atom. Explicit consideration of strong H-bonds between waters and dye cation leads to an entire spectrum redshift by ≈ 15 nm. Strengthening of these H-bonds due to OX750 excitation was found, which explains this redshift. The intensity of low-frequency vibrations (including those involved in vibronic transitions) increases with the addition of bound water molecules, especially in an excited state. The vibration of the N-H bond of the imino group is strengthened (especially in an excited state) due to water molecule binding. Noticeable polarization of one out of three waters was revealed upon dye excitation.

References:

1. Eilenberger D.J., Isaacs E.D., Aumiller G.D. Near infrared, tunable, oxazine 750 perchlorate, synchronously-pumped picosecond ring dye laser. *Optics Commun.*, 1983, vol. 44, pp. 350-352.
2. Scheps R. Near-IR Dye Laser for Diode-Pumped Operation, *IEEE J. Quantum Electronics*, 1995, vol. 31, pp. 126-134.
3. Bos F. Optimization of spectral coverage in an eight-cell oscillator-amplifier dye laser pumped at 308 nm. *Appl. Optics*, 1981, vol. 20, pp. 3553-3556.
4. Fehrenbach G.W., Gruntz K.J., Ulbrich R.G. Subpicosecond light pulses from a synchronously modelocked dye laser with composite gain and absorber medium. *Appl. Phys. Lett.*, 1978, vol. 33, pp. 159-160.
5. Kaneta T., Imasaka T. Indirect Detection of Aromatic Hydrocarbons by Semiconductor Laser Fluorometry in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.*, 1995 vol. 67, pp. 829-834.
6. Shapiro H.M., Stephens S. Flow Cytometry of DNA Content Using Oxazine 750 or Related Laser Dyes With 633 nm Excitation. *Cytometry*, 1986, vol. 7, pp. 107-110.
7. Blyler L.L., Lieberman R.A., Cohen L.G., Ferrara J.A., Macchesney J.B. Optical Fiber Chemical Sensors Utilizing Dye-Doped Silicone Polymer Claddings. *Polym. Eng. Sci.*, 1989, vol. 29, pp. 1215-1218.
8. Sathy P., Penzkofer A. Absorption and fluorescence spectroscopic analysis of rhodamine 6G and oxazine 750 in porous sol-gel glasses. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1997, vol. 109, pp. 53-57.
9. Ammer F., Penzkofer A., Weidner P. Concentration-dependent fluorescence behaviour of oxazine 750 and rhodamine 6G in porous silicate xerogel monoliths. *Chem. Phys.*, 1995, vol. 192, pp. 325-331.
10. Wark M., Ganschow M., Schulz-Ekloff G., Woehrl D. Incorporation of organic dye molecules in nanoporous crystals for the development of hexagonal solid state microlasers. *Proc. SPIE*, 2001, vol. 4456, pp. 57-67.
11. Weidner P., Penzkofer A. Picosecond transient spectral hole-burning studies on oxazine 750 in a silicate xerogel. *Chem. Phys.*, 1995, vol. 191, pp. 303-319.
12. Zhou P., Song P., Liu J.-Y., Shi Y., Han K., He G. Rotational Reorientation Dynamics of Oxazine 750 in Polar Solvents. *J. Phys. Chem. A*, 2008, vol. 112, pp. 3646-3655.
13. Zhao G.-J., Liu J.-Y., Zhou L.-C., Han K.-L. Site-Selective Photoinduced Electron Transfer from Alcoholic Solvents to the Chromophore Facilitated by Hydrogen Bonding: A New Fluorescence Quenching Mechanism. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, pp. 8940-8945.
14. Zhou L.-C., Shi Y., Liu J.-Y., Han K.-L. The effect of hydrogen-bond in alcoholic solvent on the solvation ultrafast dynamics of oxazine 750 dye. *Chin. Sci. Bull.*, 2008, vol. 53, pp. 1951-1954.
15. Milanchian K., Tajalli H., Ghanadzadeh A., Zakerhamidi M.S. Nonlinear optical properties of two oxazine dyes in aqueous solution and polyacrylamide hydrogel using single beam Z-scan. *Opt. Mater.*, 2009, vol. 32, pp. 12-17.
16. Zakerhamidi M.S., Golghasemi Sorkhabi S. Solvent effects on the molecular resonance structures and photo-physical properties of a group of oxazine dyes. *J. Luminesc.*, 2015, vol. 157, pp. 220-228.

17. Zakerhamidi M.S., Tajalli H., Ghanadzadeh A., Milanchian K., Hosseini Nasab N., Moghadam M. Effect of polyacrylamide hydrophilic gel composition on photo-physical behavior of Oxazine 750. *Spectrochim. Acta A*, 2010, vol. 77, pp. 164-169.
18. Ghanadzadeh A., Tajalli H., Zirack P., Shirdel J. On the photo-physical behavior and electro-optical effect of oxazine dyes in anisotropic host. *Spectrochim. Acta A*, 2004, vol. 60, pp. 2925-2932.
19. Rauf M.A., Zaman M.Z. Spectral properties of oxazines in various solvents. *Spectrochim. Acta A*, 1987, vol. 43, p. 1171.
20. Beuerman E., Makarov N., Drobizhev M., Rebane A. Justification of two-level approximation for description of two-photon absorption in oxazine dyes. *Proc. SPIE*, 2010, vol. 7599, pp. 75-99.
21. Yamaguchi S., Tahara T. Determining electronic spectra at interfaces by electronic sum frequency generation: One- and two-photon double resonant oxazine 750 at the air/water interface. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 125, p. 194711.
22. Dong L.-Q., Niu K., Cong S.-L. Theoretical Analysis of Femtosecond Fluorescence Depletion Spectra and Vibrational Relaxations of Dye Oxazine 750 and Rhodamine 700 Molecules in Acetone Solution. *Int. J. Quantum Chem.*, 2007, vol. 107, pp. 1205-1214.
23. Zhao G.-J., Han K.-L. Hydrogen Bonding in the Electronic Excited State. *Acc. Chem. Res.*, 2012, vol. 45, pp. 404-413.
24. Jacquemin D., Brymond E., Planchat A., Ciofini I., Adamo C. TD-DFT vibronic couplings in anthraquinones: from basis set and functional benchmarks to applications for industrial dyes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, vol. 7, pp. 1882-1892.
25. Lopez G.V., Chang C.-H., Johnson P.M., Hall G.E., Sears T.J., Markiewicz B., Milan M., Teslja A. What Is the Best DFT Functional for Vibronic Calculations? A Comparison of the Calculated Vibronic Structure of the S_1-S_0 Transition of Phenylacetylene with Cavity Ringdown Band Intensities. *J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 116, pp. 6750-6758.
26. Charaf-Eddin A., Planchat A., Mennucci B., Adamo C., Jacquemin D. Choosing a Functional for Computing Absorption and Fluorescence Band Shapes with TD-DFT. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 2749-2760.
27. Jacquemin D., Bremond E., Ciofini I., Adamo C. Impact of Vibronic Couplings on Perceived Colors: Two Anthraquinones as a Working Example. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, vol. 3, pp. 468-471.
28. Kostjukova L.O., Leontieva S.V., Kostjukov V.V. The Vibronic Absorption Spectrum and Electronic States of Nile Red in Aqueous Solution. *ChemistrySelect*, 2021, vol. 6, pp. 1297-1304.
29. Yaroshenko N.S., Kostjukova L.O., Kostjukov V.V. Excited states of six oxazine 1 conformers in aqueous solution: TD-DFT/DFT study. *J. Mol. Liquids*, 2021, vol. 341, p. 117456.
30. Kostjukov V.V. Photoexcitation of brilliant cresyl blue dye in aqueous solution: TD-DFT study. *Mol. Phys.*, 2021, pp. 66-47.
31. Kostjukov V.V. Photoexcitation of oxazine 170 dye in aqueous solution: TD-DFT study. *J. Mol. Model*, 2021, vol. 27, p. 311.
32. Kostjukov V.V. Photoexcitation of oxazine 4 dye in aqueous solution: TD-DFT study. *Chem. Phys.*, 2022, vol. 553, p. 111399.
33. Kostjukov V.V. Photoexcitation of cresyl violet dye in aqueous solution: TD-DFT study. *Theor. Chem. Acc.*, 2021, vol. 140, p. 155.
34. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
35. Improta R., Barone V., Scalmani G., Frisch M.J. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 125, p. 54103.
36. Alia J.D., Flack J.A. Unspecified verticality of Franck-Condon transitions, absorption and emission spectra of cyanine dyes, and a classically inspired approximation. *RSC Adv.*, 2020, vol. 10, pp. 43153-43167.
37. Scalmani G., Frisch M.J., Mennucci B., Tomasi J., Cammi R., Barone V. Geometries and properties of excited states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 124, p. 94107.
38. Kasha M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, 1950, vol. 9, pp. 14-19.
39. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105, pp. 2999-3093.
40. Fleming S., Mills A., Tuttle T. Predicting the UV-vis spectra of oxazine dyes, Beilstein *J. Org. Chem.*, 2011, vol. 7, pp. 432-441.
41. Marenich A.V., Cramer C.J., Truhlar D.G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 6378-6396.
42. Frisch M.J. et al. Gaussian 16, Revision C.01, Inc., Wallingford CT, 2016.
43. Baiardi A., Bloino J., Barone V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 4097-4115.
44. Dennington R., Keith T.A., Millam J.M. GaussView Version 6.1, Semicem Inc., Shawnee Mission KS, 2016.
45. Dierksen M., Grimme S. The Vibronic Structure of Electronic Absorption Spectra of Large Molecules: A Time-Dependent Density Functional Study on the Influence of "Exact" Hartree-Fock Exchange. *J. Phys. Chem. A*, 2004, vol. 108, pp. 10225-10237.

46. Kantchev E.A.B., Norsten T.B., Sullivan M.B. Time-dependent density functional theory (TDDFT) modelling of Pechmann dyes: from accurate absorption maximum prediction to virtual dye screening. *Org. Biomol. Chem.*, 2012, vol. 10, pp. 6682-6692.
47. Escudero D., Laurent A.D., Jacquemin D. Time-dependent density functional theory: A tool to explore excited states. *Springer Int. Publish. Switzerland*, 2017, pp. 927-961.
48. Iikura H., Tsuneda T., Yanai T., Hirao K. A long-range correction scheme for generalized-gradient-approximation exchange functionals. *J. Chem. Phys.*, 2001, vol. 115, pp. 3540-3544.
49. Peverati R., Truhlar D.G. Screened-exchange density functionals with broad accuracy for chemistry and solid-state physics. *Phys. Chem.*, 2012, vol. 14, pp. 16187-16191.
50. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicator. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
51. Singh U.C., Kollman P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.*, 1984, vol. 5, pp. 129-145.
52. Hessz D., Hegely B., Kallay M., Vidoczy T., Kubinyi M. Solvation and Protonation of Coumarin 102 in Aqueous Media: A Fluorescence Spectroscopic and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A*, 2014, vol. 118, pp. 5238-5247.
53. Lakowicz J.R., Masters B.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Optics*, 2008, vol. 13.2, p. 29901.
54. Marciniak H., Hristova S., Deneva V., Kamounah F.S., Hansen P.E., Lochbrunner S., Antonov L. Dynamics of excited state proton transfer in nitro substituted 10-hydroxybenzo [h] quinolones. *Phys. Chem.*, 2017, vol. 19, pp. 26621-26629.
55. Greiner J., Sundholm D. Calculation of vibrationally resolved absorption and fluorescence spectra of the rylenes. *Phys. Chem.*, 2020, vol. 22, pp. 2379-2385.

ВИБРОННЫЕ СПЕКТРЫ КРАСИТЕЛЯ ОКСАЗИНА 750 В ВОДНОМ РАСТВОРЕ: РАСЧЕТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Леонтьева С.В.

Черноморское Высшее Военно-морское Ордена Красной Звезды Училище имени П.С. Нахимова

Дыбенко 1а, 299028, Россия; e-mail: tezidi@gmail.com

Поступила в редакцию 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0643

Аннотация. Уровень теории MN12SX/6-31++G(d,p)/SMD точно воспроизводит как положение основного максимума, так и коротковолнового плеча поглощения ОХ750 в водном растворе. На основе настоящих и предыдущих исследований автора выбран оптимальный функционал для расчета вибронных спектров поглощения различных оксазиновых красителей в водном растворе. Плечо спектра поглощения обусловлено вибронным переходом. Колебания, участвующие в вибронных переходах, соответствующие крупномасштабным молекулярным движениям, являются низкочастотными и очень слабыми по сравнению с остальными. Однако возбуждение существенно влияет на колебания, в том числе наиболее интенсивные. Фотоиндуцированное перераспределение заряда носит локальный характер и перенос заряда по молекуле красителя в целом отсутствует. Алифатические атомы водорода не позволяют молекулам воды получить доступ к атому азота N24. Учет взаимодействий «растворенное вещество-растворитель» по водородным связям трех молекул воды привел к красному смещению всего спектра на ≈ 15 нм. Обнаружено усиление водородных связей с молекулами воды при возбуждении ОХ750, что и объясняет такой батохромный эффект. Интенсивность низкочастотных колебаний (в том числе участвующих в вибронных переходах) возрастает при присоединении связанных молекул воды, особенно в возбужденном состоянии. Колебания связи N-H иминогруппы усиливаются (особенно в возбужденном состоянии) за счет связывания молекул воды. При возбуждении красителя обнаружена заметная поляризация одной связанной молекулы воды. Вибронная модель была также применена для расчета спектра излучения ОХ750 в водной среде.

Ключевые слова: TD-DFT/DFT, вибронные переходы, водный раствор, оксазин 750, спектр поглощения, спектр испускания.

ГЕНЕРАЦИЯ ГИПЕРЗВУКОВЫХ ВОЛН ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КРЕМНИЯ СВЕТОМ, ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВЛИЯНИЕ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТ

Степанов А.В.¹, Попов А.П.¹, Коваленко А.В.¹, Юманов Д.С.¹, Димитриева А.И.¹, Сергеева К.В.¹, Дементьев Д.А.¹, Никольская А.А.², Туловчиков В.С.², Тетельбаум Д.И.²

¹Чувашский государственный аграрный университет,

ул. К. Маркса, 29, г. Чебоксары, 428003, РФ; e-mail: for.anton_step@mail.ru

²Нижегородский государственный университет им. Н.М. Лобачевского,

пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603022, РФ; e-mail: tetelbaum@phys.unn.ru

Поступила в редакцию 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0644

Аннотация. В данной работе представлено молекулярно-динамическое моделирование распространения гиперзвуковых волн в системах жидкость–твердое тело, таких как водные растворы NaCl и стекла (содержащие ионы Na); анализируется роль волноводных свойств кластеров Na⁺–(H₂O)_n-типа; обсуждается роль кластеров Na⁺–(H₂O)_n-типа в распространении гиперзвуковых волн. Взаимодействие между гиперзвуком и клеточными органеллами было исследовано численно и сопоставлено с биологическими экспериментами на семенах яровой мягкой пшеницы сорта Экада 70, в частности по влиянию указанного воздействия на их рост. гиперзвуковое облучение влияет на биометрические показатели яровой мягкой пшеницы, на массу семян и урожайность. При этом большое значение имеет время воздействия данного облучения. Наименьшая высота растений в варианте с облучением семенного материала в течение 30 минут – 71 с, а продуктивная кустистость составила 1,8. Показатели общей кустистости и среднего числа нормально развитых стеблей, дающих зерно на одно растение также были наилучшими в варианте с воздействием облучения семенного материала в течении 100 секунд, худшими в варианте в 30 минут. Отсюда можно сделать вывод о том, что гиперзвуковое облучение влияет на биометрические показатели яровой мягкой пшеницы, на массу семян и урожайность. При этом большое значение имеет время воздействия данного облучения. Полученные в результате моделирования данные показывают, что граница раздела двух сред вода-стекло является каналом передачи энергии от источника гиперзвуковых волн до биологического объекта.

Ключевые слова: эффект дального действия, гиперзвук, биологический эффект дального действия.

В настоящее время обозначилась тенденция производства экологически чистых продуктов питания, которая потребовала применения альтернативных методов, с минимально возможным уровнем техногенного загрязнения окружающей среды.

В отличие от химических методов обработки, физическое воздействие, поглощаясь в обрабатываемое растение, оказывает непосредственное влияние на процессы жизнедеятельности растения, но при этом не происходит внесения в растительный объект или в окружающую среду каких-либо экологически вредных химических веществ.

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что различные виды облучения семян оказывают положительное влияние на активацию жизненно важных процессов у растений при определенных условиях. Поэтому в настоящее время в сельском хозяйстве на практике достаточно широко применяются стимулирующие факторы, способствующие повышению энергии прорастания и полевой всхожести семенного материала.

Имеется множество работ, посвященных воздействию физических факторов (электрических и магнитных полей, ультрафиолетового, инфракрасного, лазерного облучения) на семенной материал, которое в свою очередь способствует повышению посевных качеств, выживаемости и урожайности. Однако остается необходимость в более детальном изучении механизма энергетического воздействия на внутреннюю структуру семени, рост и развитие растений, а также выбора установок эффективных, простых по конструкции, невысокой стоимостью и высокой надежностью.

Многочисленные исследования воздействия миллиметровых электромагнитных волн на живые организмы и ткани и их применения в медицине позволили сделать вывод об их важной функциональной роли [1]. При этом генерация и распространение таких электромагнитных волн сопровождается акустическими колебаниями и гиперзвуковыми волнами, которые являются главными действующими лицами вышеупомянутых эффектов [2,3]. Остаются без ответа вопросы, касающиеся механизма аномально большого радиуса действия облучения: световое облучение твердого тела, например, кремния, находящегося в контакте с системой, содержащей водный раствор NaCl (0,1-7%). При этом свойства другого образца изменяются даже если он находится на расстоянии нескольких сантиметров и более от облучаемого образца. Согласно предложенной модели, эффект обусловлен генерацией гиперзвуковых волн облученным образцом [4], а их распространение на большие расстояния связано с волноводными свойствами границы раздела раствор–твердое тело [5].

Предлагаемая вниманию, работа посвящена изучению влияния гиперзвуковых волн на посевные качества яровой мягкой пшеницы сорта Экада 70.

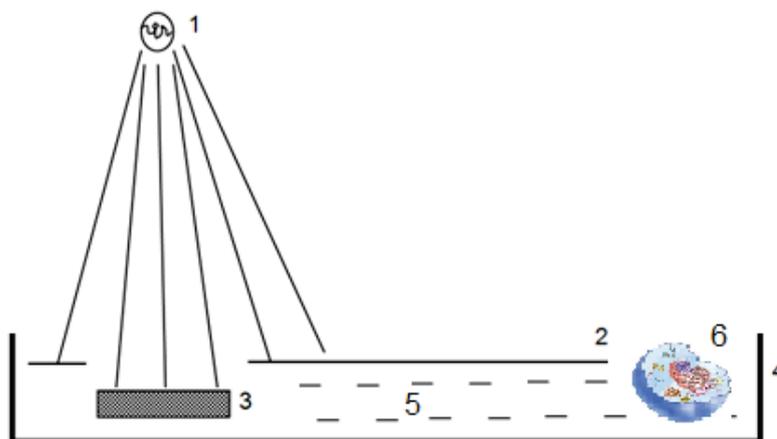


Рисунок 1. Экспериментальная схема для испытания биологического эффекта дальнего действия: 1 – светодиод, 2 – экран, 3 – кремниевая пластина, 4 – чашки Петри, 5 – вода, 6 – биологическая клетка или организм

Цель настоящего исследования – оценка влияния гиперзвуковых волн на посевные качества яровой мягкой пшеницы с помощью облучения в установке с кремниевой пластиной и выбором различных вариантов облучения по времени (100 секунд, 20 минут и 30 минут) и контрольный вариант (замачивание семян в воде).

В дополнение к экспериментальной проверке гипотезы влияния гиперзвука на живые организмы был проведен расчет по проверке гипотезы механизма распространения гиперзвука по границе раздела вода-стекло.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

С целью получить практическое подтверждение представленному выше методу был проведен эксперимент. Предметом исследования стали семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Экада 70, которые были подвергнуты гиперзвуковому облучению с различным временем воздействия на семенной материал для того, чтобы проверить благотворное влияние гиперзвуковой стимуляции на семена яровой мягкой пшеницы: повышение энергии прорастания, всхожесть, рост урожайности.

Чтобы не исследовать дополнительные факторы, мы остановились на использовании дистиллированной воды.

Схема эксперимента выглядела следующим образом (рис. 1).

Система позволила облучать неподвижную массу семян, варьируя время воздействия: 100 секунд, 20 минут, 30 минут и Контроль (замачивание в воде без облучения). По каждому времени воздействия была 5-ти кратная повторяемость. В каждой повторяемости (пробе) было по 600 семян (на 1 м²).

В наших исследованиях прорастание семян характеризовалось двумя показателями: энергией прорастания [6], которую мы определяли на 4 сутки после посева и лабораторной всхожестью, которая характеризует способность семян давать полноценные проростки, и определяли мы ее на 7-8 сутки (табл. 1).

Семена проращивали в термостате в чашках на фильтровальной бумаге (повторность 4-х кратная). В каждой пробе было по 100 семян.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Энергия прорастания семян яровой мягкой пшеницы менялась в зависимости от времени воздействия на нее гиперзвукового облучения. Наивысшее ее значение отмечено при воздействии на нее в течение 100 секунд (72%), наименьшее в течении 30 минут (59%).

Наивысшее значение лабораторной всхожести составило 91% – при облучении в течение 100 секунд, наименьшее значение – 56% – при облучении в течение 30 минут.

Таблица 1. Влияние гиперзвукового облучения на энергию прорастания (рис. 2) и всхожесть семян (рис. 3)

Вариант	Энергия прорастания, %	Всхожесть семян, %	
		лабораторная	полевая
Контроль	66	82	81,6
100 секунд	72	91	85,7
20 минут	59	72	68,3
30 минут	58	56	54,2

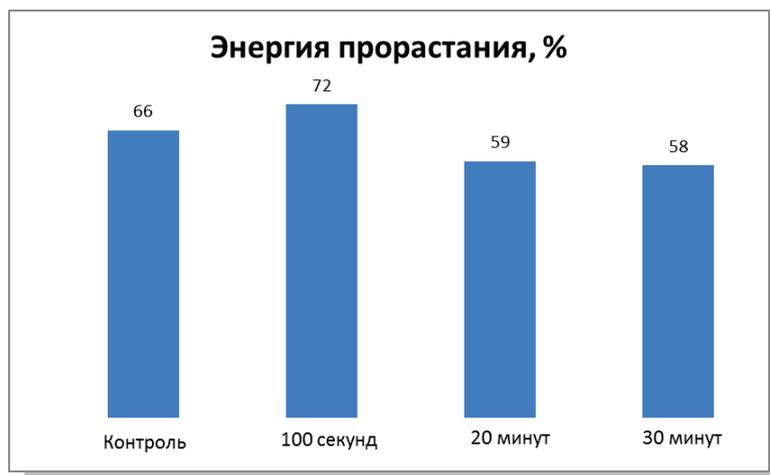


Рисунок 2. Энергия прорастания семян яровой мягкой пшеницы сорта Экада 70, облученных гиперзвуковым излучением



Рисунок 3. Лабораторная всхожесть семян яровой мягкой пшеницы сорта Экада 70, облученных гиперзвуковым излучением

Формирование всходов, рост и развитие растений изучали в режиме реального времени. Массу снопов (с каждого повторности), высоту растений, длину стебля с колосом и длину колоса определяли, непосредственно после уборки урожая.

Самые ранние всходы появились на 9-е сутки из семян, обработанных в установке в течение 100 секунд. Стеблевой побег после выхода на поверхность развивал от 2 до 5 настоящих зеленых листьев, потом на некоторое время рост приостанавливался. В этот период закладывались и формировались вторичные корни и новые стеблевые побеги, образующие разветвление главного побега. Развивалась корневая система, наступала фаза кушения. Корневая система растений, облученных 100 секунд, была более развита по сравнению с контролем и облучением по 20 и 30 минут соответственно.

Облучение семян пшеницы гиперзвуковыми волнами влияло на биометрические показатели выросших из них растений (рис. 4 а, б).



а



б

Рисунок 4 Растения яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Экада 70, выросших из семян, облученных 100 секунд, 20 минут, 30 минут и контрольного варианта

Таблица 2. Биометрические показатели яровой мягкой пшеницы.

№ п/п	Вариант	Высота растений	Кустистость		Количество междоузлий, шт.
			Общая	Продуктивная	
1.	Контроль	83	2,3	2,0	3,0
2.	100 секунд	90	2,5	2,2	3,3
3.	20 минут	74	2,1	1,9	2,8
4.	30 минут	71	2,0	1,8	2,7

На рисунках 4 а и б можно увидеть что семена, облученные по 100 секунд и Контрольный вариант, не сильно отличаются друг от друга, как те семена, время воздействия на которые составило 20 и 30 минут.

Результаты биометрического анализа (см. таблицу 2) у растений яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Экада 70 показали, что семена, облученные по 100 секунд, имеют большую высоту растений (рис.5), общую и продуктивную кустистость (рис. 6), количество междоузлий (шт.), чем контроль и время воздействия 20 и 30 минут.

На основании, приведенных выше данных, можно сделать следующий вывод, что наивысшее значение высоты растений преимущественно в варианте со временем воздействия облучения на семенной материал в течение 100 секунд - что составило 90 см, а продуктивная кустистость при этом составляет 2,8.

Наименьшая высота растений в варианте с облучением семенного материала в течение 30 минут – 71 с, а продуктивная кустистость составила 1,8.

Показатели общей кустистости и среднего числа нормально развитых стеблей, дающих зерно на одно растение также были наилучшими в варианте с воздействием облучения семенного материала в течении 100 секунд, худшими в варианте в 30 минут.

Отсюда можно сделать вывод о том, что гиперзвуковое облучение влияет на биометрические показатели яровой мягкой пшеницы, на массу семян и урожайность. При этом большое значение имеет время воздействия данного облучения.

Расчетная модель.

В данной работе методом молекулярной динамики показано, что распространение гиперзвуковой волны вдоль границы раздела вода-стекло, содержащей ионы натрия, происходит дальше, чем в водной среде.

Поскольку в данной работе проверялась волноводная модель кластеров $Na^+-[H_2O]_n$, было проведено молекулярно-динамическое моделирование с использованием кода LAMMPS [7]. Для построения модели использовался код atomsk [8], ovito [9], последний применялся также для визуализации результатов моделирования.

Модель волноводной цепочки кластеров $Na^+-[H_2O]_n$ создана с использованием потенциалов взаимодействия ReaxFF [10]. Геометрия модели представляла собой параллелепипед размерами 3.3 нм × 3.3 нм × 132 нм, состоящий из молекул воды, помещенных в периодические граничные условия Борна-Кармана по всем трем измерениям. В первом случае параллелепипед содержал расположенные с периодом 3,3 нм ионы Na^+ , во втором, только молекулы воды. Система приводилась в начальное состояние из твердой фазы льда с гексагональной упаковкой [11] путем плавления до жидкой фазы с температурой 300 К. После подготовки происходил расчет распространения гиперзвуковой акустической волны при помощи отклонения центра масс слоя (толщиной 1,8 нм) молекул воды от положения равновесия по закону.

$$f(t) = 0.01nm \cdot \sin(2\pi / 10^{-13} Hz \cdot t) \tag{1}$$

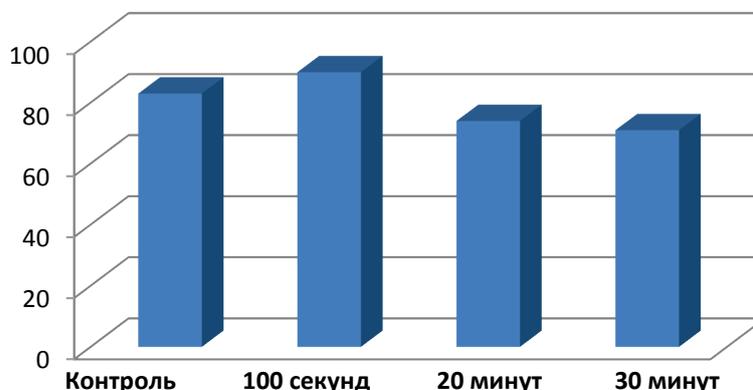


Рисунок 5. Средняя высота растений (см)

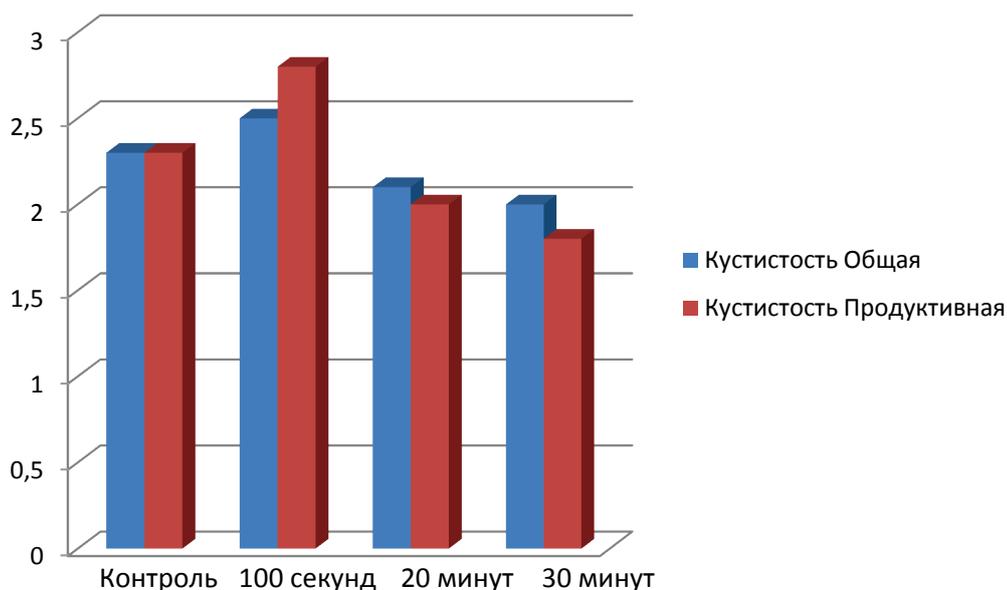


Рисунок 6. Биометрические показатели общей и продуктивной кустистости в зависимости от времени воздействия облучения на семенной материал

Результаты расчетов.

Результаты моделирования распространения гиперзвуковой акустической волны использованы для построения графика зависимости амплитуды отклонения слоев молекул воды толщиной 1,8 нм от положения равновесия. На графике зависимости амплитуды отклонения от расстояния до источника (рис. 7) видно, что начиная с 10 нм амплитуда волны в системе, содержащей ионы Na^+ выходит на плато и оказывается в 5 раз выше, чем в системе, не содержащей ионов Na^+ . Данный результат свидетельствует о том, что цепочка кластеров, созданных ионами Na^+ , способствует лучшему распространению волны и меньшему затуханию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании, приведенных выше данных, можно сделать следующий вывод, что наивысшее значение высоты растений преимущественно в варианте со временем воздействия облучения на семенной материал в течение 100 секунд - что составило 90 см, а продуктивная кустистость при этом составляет 2,8.

Наименьшая высота растений в варианте с облучением семенного материала в течение 30 минут – 71 см, а продуктивная кустистость составила 1,8.

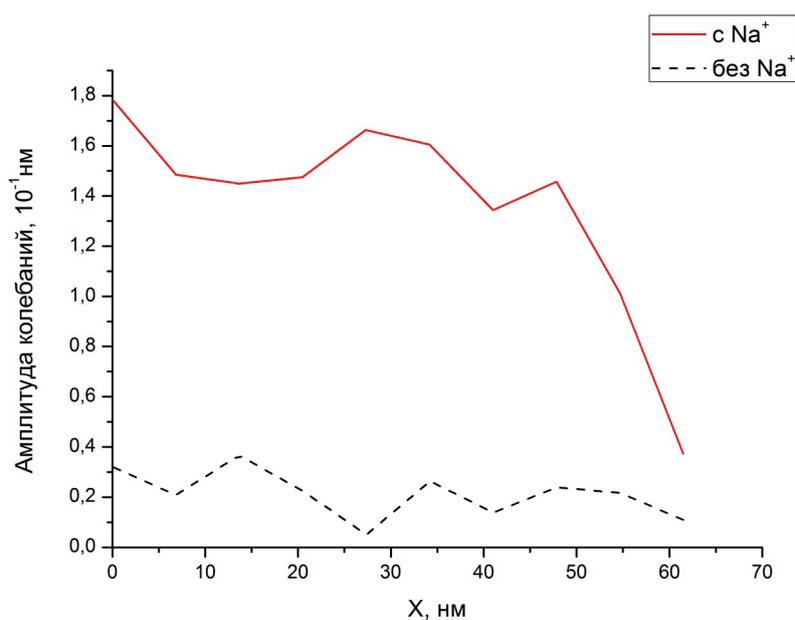


Рисунок 7. Зависимость величины смещения кластера от расстояния до гиперзвукового источника

Показатели общей кустистости и среднего числа нормально развитых стеблей, дающих зерно на одно растение также были наилучшими в варианте с воздействием облучения семенного материала в течении 100 секунд, худшими в варианте в 30 минут.

Отсюда можно сделать вывод о том, что гиперзвуковое облучение влияет на биометрические показатели яровой мягкой пшеницы, на массу семян и урожайность. При этом большое значение имеет время воздействия данного облучения.

Полученные в результате моделирования данные показывают, что граница раздела двух сред вода-стекло является каналом передачи энергии от источника гиперзвуковых волн до биологического объекта.

Исследование выполнено при поддержке Суперкомпьютерного центра МГУ [12].

Список литературы / References:

1. Бецкий О.В., Кислов В.В., Лебедев Н.Н. *Миллиметровые волны и живые системы*. М.: Сайнс-пресс, 2004, 272 с. [Betsky O.V., Kislov V.V., Lebedev N.N. *Millimeter waves and living systems*. M.: Science-press, 2004, 272 p. (In Russ.)].
2. Тетельбаум Д.И., Курильчик Е.В., Менделева Ю.А. Эффект дальнего действия при малоинтенсивном облучении твердых тел. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 2009, вып. 3, с. 94-103 [Tetelbaum D.I., Kurilchik E.V., Mendeleva Yu.A. Effect of long-range action at low-intensity irradiation of solids. *Surface. X-Ray, Synchrotron and Neutron Research*, 2009, no. 3, pp. 94-103 (In Russ.)].
3. Тетельбаум Д.И., Туловчиков В.С., Менделева Ю.А., Курильчик Е.В., Никольская А.А., Степанов А.В. Роль границы раздела водная среда-твердое тело в передаче возбуждения кремния светом. *Журнал технической физики*, 2019, вып. 89, № 9, с. 1427-1433 [Tetelbaum D.I., Tulovchikov V.S., Mendeleva Yu.A., Kurilchik E.V., Nikolskaya A.A., Stepanov A.V. The role of the water-solid interface in the transfer of excitation of silicon by light. *Journal of Technical Physics*, 2019, vol. 89, no. 9, pp. 1427-1433 (In Russ.)].
4. Левшунова В.Л., Похил Г.П., Тетельбаум Д.И. Автоколебания распределенных зарядов в естественном оксиде на поверхности кремния как источник возбуждения процессов, ответственных за эффект дальнего действия. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2011, вып. 3, с. 1-4 [Levshunova V.L., Pokhil G.P., Tetelbaum D.I. Self-oscillations of distributed charges in natural oxide on the silicon surface as a source of excitation of processes responsible for the long-range effect. *Surface. X-ray, synchrotron and neutron studies*, 2011, no. 3, pp. 1-4 (In Russ.)].
5. Степанов А.В., Тетельбаум Д.И. Молекулярно-динамическое моделирование проникновения в кремний гиперзвуковых волн, генерируемых в естественном оксиде кремния при облучении. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2017, вып. 7, с. 82-88 [Stepanov A.V., Tetelbaum D.I. Molecular dynamics simulation of penetration into silicon of hypersonic waves generated in natural silicon oxide during irradiation. *Surface. X-ray, synchrotron and neutron studies*, 2017, no. 7, pp. 82-88 (In Russ.)].
6. ГОСТ 12038-84. *Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести* [GOST 12038-84. *Seeds of agricultural crops. Germination methods* (In Russ.)].
7. Plimpton S. Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics. *Journal of Computational Physics*, 1995, vol. 117, no. 1, pp. 1-19.
8. Pierre Hirel. Atomsk: A tool for manipulating and converting atomic data files. *Comput. Phys. Comm.*, 2015, vol. 197, pp. 212-219, doi: 10.1016/j.cpc.2015.07.012.
9. Stukowski A. Modelling Simul. *Mater. Sci. Eng.*, 2010, vol. 18, p. 015012.
10. Monti S., Corozzi A., Fristrup P., Joshi K.L., Shin Y.K., Oelschlaeger P., van Duin A.C.T., Barone V. Exploring the conformational and reactive dynamics of biomolecules in solution using an extended version of the glycine reactive force field. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, vol. 15, no. 36, pp. 15062-15077.
11. Hirsch T.K., Ojamae L. Quantum-Chemical and Force-Field Investigations of Ice Ih: Computation of Proton-Ordered Structures and Prediction of Their Lattice Energies. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, 2004, pp. 15856-15864.
12. Воеводин В.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. Практика «Ломоносова» Суперкомпьютер. *Открытые системы Ж*, Москва: Открытые системы, 2012, № 7, с. 36-39 [Voevodin V.V., Zhumatiy S.A., Sobolev S.I., Antonov A.S., Bryzgalov P.A., Nikitenko D.A., Stefanov K.S., Voevodin V.V. Practice "Lomonosov" Supercomputer. *Open Systems Zh*, Moscow: Open Systems, 2012, no. 7, pp. 36-39 (In Russ.)].

GENERATION OF HYPERSONIC WAVES UPON IRRADIATION OF SILICON WITH LIGHT, THEIR PROPAGATION AND INFLUENCE ON LIVING ORGANISMS: COMPUTER SIMULATION AND EXPERIMENT**Stepanov A.V.¹, Popov A.P.¹, Kovalenko A.V.¹, Yumanov D.S.¹, Dimitrieva A.I.¹, Sergeeva K.V.¹, Dementiev D.A.¹, Nikolskaya A.A.², Tulovchikov V.S.², Tetelbaum D.I.²**¹Chuvash State Agrarian University

K. Marx str., 29, Cheboksary, 428003, Russia; e-mail: for.anton_step@mail.ru

²Lobachevskiy Nizhniy Novgorod State University,

23 Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022, Russian Federation; e-mail: tetelbaum@phys.unn.ru

Received 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0644

Abstract. This paper presents a molecular dynamics simulation of hypersonic wave propagation in liquid–solid systems such as aqueous solutions of NaCl and glass (containing Na ions); the role of waveguide properties of Na⁺–(H₂O)_n-type clusters is analyzed; the role of Na⁺–(H₂O)_n-type clusters in the propagation of hypersonic waves is discussed. The interaction between hypersound and cellular organelles was studied numerically and compared with biological experiments on seeds of spring soft wheat variety Ekada 70, in particular on the effect of this effect on their growth. hypersonic irradiation affects the biometric parameters of spring soft wheat, seed weight and yield. In this case, the time of exposure to this irradiation is of great importance. The smallest plant height in the variant with seed irradiation for 30 minutes was 71 s, and the productive bushiness was 1.8. The indices of general bushiness and the average number of normally developed stems producing grain per plant were also the best in the variant with exposure to seed material irradiation for 100 seconds, the worst in the variant of 30 minutes. From this we can conclude that hypersonic irradiation affects the biometric parameters of spring soft wheat, seed weight and yield. In this case, the time of exposure to this irradiation is of great importance. The data obtained as a result of modeling show that the water-glass interface is a channel for energy transfer from a source of hypersonic waves to a biological object.

Key words: long-range effect, hypersound, long-range biological effect.

GENERALIZATION OF THE THERMOKINETIC OREGONATOR MODEL

Zenteno Mateo B., Morales M.A., Agustín Serrano R., Cervantes Tavera A.M.,
Jose Israel R.M., Hernandez Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Ciudad Universitaria CU, San Claudio S/N. C.P 72570, Puebla, Pue., México

Received 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0645

Abstract. In this research work proposal, a way to generalize the thermokinetic Oregonator model in order to simulate the dynamics of oscillating chemical reactions. The simulations to be carried out use elementary numerical methods using the Runge Kutta method, which are a very good approximation of the mathematical solutions of the models of these complex systems of nonlinear chemistry. The implications of the results of the simulations lie in the reproduction of the nonlinear dynamics of thermokinetic oregonator model to temperatures different from room temperature. Additionally, the linear stability analysis is established to find the oscillation regions in the parameter space of the proposed model.

Key words: oregonator model, oscillating chemical reaction, nonlinear chemistry.

INTRODUCTION

In the 1930's, the kinetics of oscillating chemical reactions was little understood and less studied. The pioneering work of Alfred Lotka in 1910, discovered and constructed a mathematical model of a chemical reaction whose irreversible autocatalytic process showed the behavior of color changes from dark to light (oscillations) [1,2]. In the 1920's other works developed by William C. Bray were published, who, by means of a reaction, whose product is the catalytic decomposition of hydrogen peroxide under the influence of iodite ions, also presented oscillations in terms of color change [3]. One more attempt to study the oscillating reactions, and perhaps the most important historically, was made by the Russian Boris P. Belousov, who was interested in investigating the process of glycolysis, succeeded in experimentally making an autocatalytic oxidation reaction that was equivalent to that process [4]. However, none of these works nor those elaborated in the following two decades succeeded in revealing the underlying mechanism of this type of chemical behavior. Even when Belousov tried to publish his results, he was refused, because his experiment could not exist since it violated the second law of thermodynamics. This confusion was resolved by Anatoly M. Zhabotinsky 25 years later, who proposed other chemical reagents such as malonic acid, cerium bromite and cerium bromate to find the mechanism of chemical oscillations: the existence of an autocatalytic oxidation-reduction reaction process [5]. Because of these historical events the latter chemical reaction is called the Belousov-Zhabotinsky reaction, or BZ reaction. Zhabotinsky himself proposed a variant of the experimental arrangement finding that the chemical oscillation process can be extended to spatio-temporal behaviors [6], as well as a further variant is the shape of the spatio-temporal patterns formed by the chemical reaction [7]. These experimental findings are studied with mathematical modeling. Taking as a starting point other similar oscillating reaction, mathematical models have been developed based on the dynamics of chemical kinetics such as the thermokinetic Oregonator [9], which can be extended and solved with computational simulation methods to reproduce the spatiotemporal patterns that present chaos [1].

THE MODEL

New Molarity model. Based on the work of Marco and collaborators [1], we have the following:

Taking as references the equations presented in [1] [(see Eqs. (1) and (2))] applying the law of masses we have that the new nonlinear molarity model will be by:

Taking into consideration that,

$$x = \frac{2k_4[X]}{k_1[A]}; [X] = \frac{k_1[A]}{2k_4} x; y = \frac{k_5[Y]}{k_1[A]}; [Y] = \frac{k_1[A]}{k_5} y; \tau = \frac{k_8^2}{k_7} t \quad (1)$$

Using the fact that:

$$\frac{d}{dt} = \frac{d\tau}{dt} \frac{d}{d\tau} \Rightarrow \frac{d\tau}{dt} = \frac{k_8^2}{k_7} \quad (2)$$

Considering (1), for the law of mass action that,

$$\frac{d[X]}{dt} = h_0 [k_1[A][X] - k_5[X][Y] + k_7[A][Y] - 2k_4[X]^2] \quad (3)$$

Taking into account Eq. (2):

$$\frac{d[X]}{dt} = \frac{k_1[A]}{2k_4} \frac{d\tau}{dt} \frac{dx}{d\tau} = \frac{k_1[A]}{2k_4} \frac{k_8^2}{k_7} \frac{dx}{d\tau} = \frac{k_1[A]k_8^2}{2k_4k_7} \frac{dx}{d\tau} \Rightarrow \frac{dx}{d\tau} = \frac{2k_4k_7}{k_1[A]k_8^2} \frac{d[X]}{dt} \quad (4)$$

After some algebraic manipulation and substituting the above in (3), we obtain:

$$\frac{dx}{d\tau} = h_0 \frac{2k_4k_7}{k_1[A]k_8^2} \left\{ k_1[A] \left(\frac{k_1[A]}{2k_4} \right) x - k_5 \left(\frac{k_1[A]}{2k_4} \right) \left(\frac{k_1[A]}{k_5} \right) xy + k_7[A] \left(\frac{k_1[A]}{k_5} \right) y - 2k_4 \left(\frac{k_1[A]}{2k_4} \right)^2 x^2 \right\} \quad (5)$$

Simplifying we get,

$$\frac{dx}{d\tau} = h_0 \frac{2k_4 k_7 (k_1[A])^2}{2k_1[A]k_4 k_8^2} \{x - xy + \frac{2k_4 k_7}{k_1 k_5} y - x^2\} = h_0 \frac{k_7 k_1 [A]}{k_8^2} \{x - xy + \frac{2k_4 k_7}{k_1 k_5} y - x^2\} \quad (6)$$

Finally, we obtain that,

$$\frac{dx}{d\tau} = \frac{1}{\varepsilon} \{x - xy + qy - x^2\} \quad (7)$$

where,

$$\varepsilon(T) = \frac{1}{h_0 k_1(T) k_7(T) [A]}; q(T) = \frac{2k_4(T) k_7(T)}{k_1(T) k_5(T)} \quad (8)$$

These are dimensionless parameters.

By rewriting Eq. (7) as,

$$\frac{dx}{d\tau} = \frac{qy - xy + x - x^2}{\varepsilon} \quad (9)$$

Unlike the findings of Marco and his colleagues on the concentration of y , in which only the linear case was considered and non-linear terms were ignored, resulting in a linear equation (see reference [1]), our work expands on theirs by including second-order non-linear terms. This led us to obtain a non-linear ordinary differential equation for the concentration of y .

$$\frac{d[Y]}{dt} \approx f k_8 [B] [Z] (1 - \omega) - h_0 k_5 [X] [Y] - h_0 k_7 [A] [Y] + k_{12} [B] \quad (10a)$$

In which it was considered

$$\omega = h_0 \frac{k_{-8}}{k_9} ([C] - [Z]); [Z] = \frac{(k_1[A])^2}{k_4 k_7 [B]} z \Rightarrow \omega = h_0 \frac{k_{-8}}{k_9} \left([C] - \frac{(k_1[A])^2}{k_4 k_7 [B]} z \right) \quad (10b)$$

additionally using,

$$y = \frac{k_5 [Y]}{k_1 [A]}; [Y] = \frac{k_1 [A]}{k_5} y; \tau = \frac{k_8^2}{k_7} t \quad (11)$$

we finally obtain,

$$\frac{dy}{d\tau} \approx 2 \frac{-h_0 p q y - \frac{1}{2} h_0 p x y + f z + p \alpha - h_0 f \beta z + h_0 f \beta \gamma z^2}{\delta} \quad (12)$$

where,

$$\alpha(T) = \frac{2k_4(T) k_{12}(T) [B]}{(k_1(T) [A])^2}; \beta(T) = \frac{k_{-8}(T) [C]}{k_9(T)}; \gamma(T) = \frac{(k_1(T) [A])^2}{k_4(T) k_7(T) [B] [C]} \quad (13)$$

$$\delta(T) = \frac{2k_4(T) k_8(T)}{k_1(T) k_5(T) [A]}; p(T) = \frac{k_7(T)}{k_8(T)}; q(T) = \frac{2k_4(T) k_7(T)}{k_1(T) k_5(T)} \quad (14)$$

Finally, we calculate the parameter for Z , taking into account

$$\frac{d[Z]}{dt} \approx 2h_0 k_7 [A] [X] - k_8 [B] [Z] (1 - \omega) \quad (15)$$

$$\omega = h_0 \frac{k_{-8}}{k_9} ([C] - [Z]); [Z] = \frac{(k_1[A])^2}{k_4 k_7 [B]} z \Rightarrow \omega = h_0 \frac{k_{-8}}{k_9} \left([C] - \frac{(k_1[A])^2}{k_4 k_7 [B]} z \right); \tau = \frac{k_8^2}{k_7} t; [X] = \frac{k_1[A]}{2k_4} x \quad (16)$$

Thus, we finally obtain

$$\frac{dz}{d\tau} \approx h_0 p \left(r [B] p x - \frac{[B]}{h_0} z - \beta \gamma [B] z^2 + \beta [B] \right) \quad (17)$$

Whose parameters are dimensionless. In particular, if r and $h_0 y [B]$ are equal to one and $\beta = 0$, the original model present in [1] is recovered. This implies $k_9 \rightarrow \infty$ that while $k_{-8} [C]$ remains approximately constant, $k_7 \rightarrow k_1$ or vice versa and $[B] \rightarrow h_0 \rightarrow 1$ (i.e. they tend to be maximums).

$$\alpha(T) = \frac{2k_4(T) k_{12}(T) [B]}{(k_1(T) [A])^2}; \beta(T) = \frac{k_{-8}(T) [C]}{k_9(T)}; \gamma(T) = \frac{(k_1(T) [A])^2}{k_4(T) k_7(T) [B] [C]} \quad (18)$$

$$\delta(T) = \frac{2k_4(T) k_8(T)}{k_1(T) k_5(T) [A]}; p(T) = \frac{k_7(T)}{k_8(T)}; q(T) = \frac{2k_4(T) k_7(T)}{k_1(T) k_5(T)}; r(T) = \frac{k_7(T)}{k_1(T)} \quad (19)$$

Therefore, the first-order generalized Zhabotinsky system in which the reaction-diffusion equations of the proposed model are as follows:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{d\tau} &= \frac{qy - xy + x - x^2}{\varepsilon} = F(x, y, z), \\ \frac{dy}{d\tau} &\approx \frac{-p q y - p x y + (f - p \beta) z + f \beta \gamma z^2 + p \alpha}{\delta} = G(x, y, z), \\ \frac{dz}{d\tau} &\approx h_0 p [B] (r p x - z - \beta \gamma z^2 + \beta) = H(x, y, z). \end{aligned} \quad (20)$$

Considering that if $h_0 = [H^+]$ (Hammett's acidity function) is equal to one, it means that the reaction takes place in an acidic medium.

LINEAR STABILITY ANALYSIS AND NUMERICAL SOLUTION

The stability analysis is the reflection of the work done from different references here. Here reference [1] is followed to study the stability of Eqs. (20) from the following process:

a. Fixed points calculus. For this analysis, the fixed points are calculated from the non-linear terms of the system in a temporally and spatially stationary state:

$$\begin{aligned} qy_0 - x_0y_0 + x_0 - x_0^2 &= 0, \\ -pqy_0 - px_0y_0 + (f - p\beta)z_0 + f\beta\gamma z_0^2 + p\alpha &= 0, \\ rpx_0 - z_0 - \beta\gamma z_0^2 + \beta &= 0. \end{aligned} \tag{21}$$

1. Calculus of Jacobean and eigenvalues: The Jacobian obtained from the non-linear terms of the dynamic system given by Eqs. (20) is presented.

$$J(k^2) = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{\varepsilon}[1 - y - 2x] & \frac{1}{\varepsilon}(q - x) & 0 \\ \frac{-1}{\delta}py & \frac{-1}{\delta}p(q + x) & \frac{1}{\delta}[f - p\beta + 2f\beta\gamma z] \\ p^2r[B] & 0 & -p[B](1 + 2\beta\gamma z) \end{pmatrix} \tag{22}$$

2. Calculus of eigenvalues from the linearization of non-linear terms:

$$\begin{aligned} J(k^2) - \lambda I &= 0 \Rightarrow \\ \begin{vmatrix} \frac{1}{\varepsilon}[1 - y - 2x] - D_x k^2 - \lambda & \frac{1}{\varepsilon}(q - x) & 0 \\ \frac{-1}{\delta}py & \frac{-1}{\delta}p(q + x) - D_y k^2 - \lambda & \frac{1}{\delta}[f - p\beta + 2f\beta\gamma z] \\ p^2r[B] & 0 & -p[B](1 + 2\beta\gamma z) - D_z k^2 - \lambda \end{vmatrix} &= 0, \end{aligned} \tag{23}$$

Obtaining the equation to solve:

$$\lambda^3 + a\lambda^2 + b\lambda + c = 0 \tag{24}$$

Where:

$$\begin{aligned} a &= -(m_{11} + m_{22} + m_{33}), b = m_{11}m_{33} + m_{22}m_{33} - m_{11}m_{22} - m_{12}m_{21}, \\ c &= m_{12}m_{21}m_{33} - m_{12}m_{31}m_{23} - m_{11}m_{22}m_{33} \end{aligned} \tag{25}$$

Being k , the wave number and replacing diffusion.

When at least 2 eigenvalues are pure imaginary, they are called **Hopf instability**, is the case considered in this work. An important case to mention is when we have: Complex eigenvalues, in this case, we consider: a). 2 complex conjugate eigenvalues and 1 positive real and b) 2 complex conjugate eigenvalues and 1 negative real. Therefore, in the most general case the eigenvalues are such that:

$$\lambda_{1,2} = \psi \pm i\omega, \lambda_3 = \phi \tag{26}$$

If equation (24) is solved using Cardano's equations, it can be shown that:

$$a = -(2\psi + \phi), b = \psi^2 + \phi^2 + 2\psi\phi, c = -(\psi^2 + \phi^2)\phi \tag{27}$$

n cases a) and b), we have: $\psi = 0 \Rightarrow \lambda_{1,2} = \pm i\omega, a = -\phi, b = \phi^2, c = -\phi^3 \Rightarrow c - ab = 0$ [by equations (27)].

A condition that satisfies both cases is: $c = 0$.

So the Hopf instability is given by the condition: $c - ab = 0$, which by equation (24) is equivalent to,

$$m_{12}m_{21}m_{33} - m_{12}m_{23}m_{31} + m_{11}m_{22}m_{33} + (m_{11} + m_{22} + m_{33})(m_{11}m_{22} + m_{22}m_{33} + m_{33}m_{11} - m_{21}m_{21}) = 0 \tag{28}$$

RESULTS OF SIMULATIONS

Next, we show the numerical results of the Hopf instability for certain values of the considered parameters. By numerically solving the Eq. (21) using the numerical method of Runge Kutta with step $dt = 0.005$ time and fixed initial conditions $x_0 = 0.3, y_0 = 0.7$, are obtained the solutions shown in Figs. 1, 2.

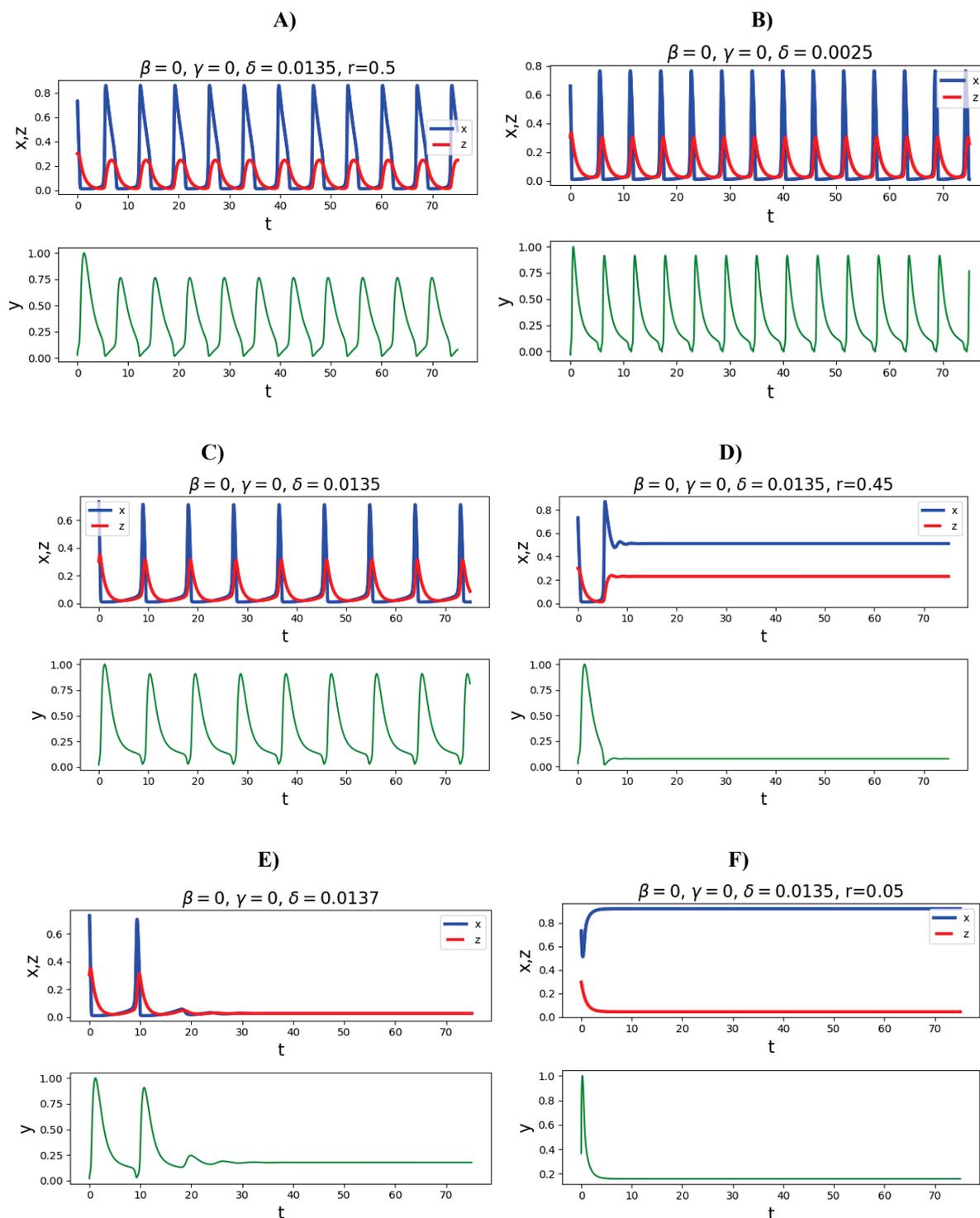


Figure 1. The plots of the left column shows the elimination of the oscillations when the value of control parameter δ is incremented for $p = 1, B = 1$ and $r = 1$. The value change of the control parameter r alters the shape of the oscillations and when $r \rightarrow 0$ for $p = 1, B = 1$ the value of contractions x, y and z tend to their fixed point (see right panel)

In this work, we reproduce the general model already published (reference [1]) in which we consider $\beta = 0, \gamma = 0$ and vary the value of δ which in fact decreases from the value of $\delta = 0,0025$ to $\delta = 0,0137$ (see panels A-E of Figure 1) until it cancels out, i.e. a dither of the reaction is obtained and the oscillations disappear (panel E) by decreasing the oscillation frequencies and for intermediate values of δ in the above given interval. It is found from these results that the parameter δ modulates the oscillations until they decrease which turns out to be the only parameter that does so. An interesting result that can be observed from the graphs in the panels

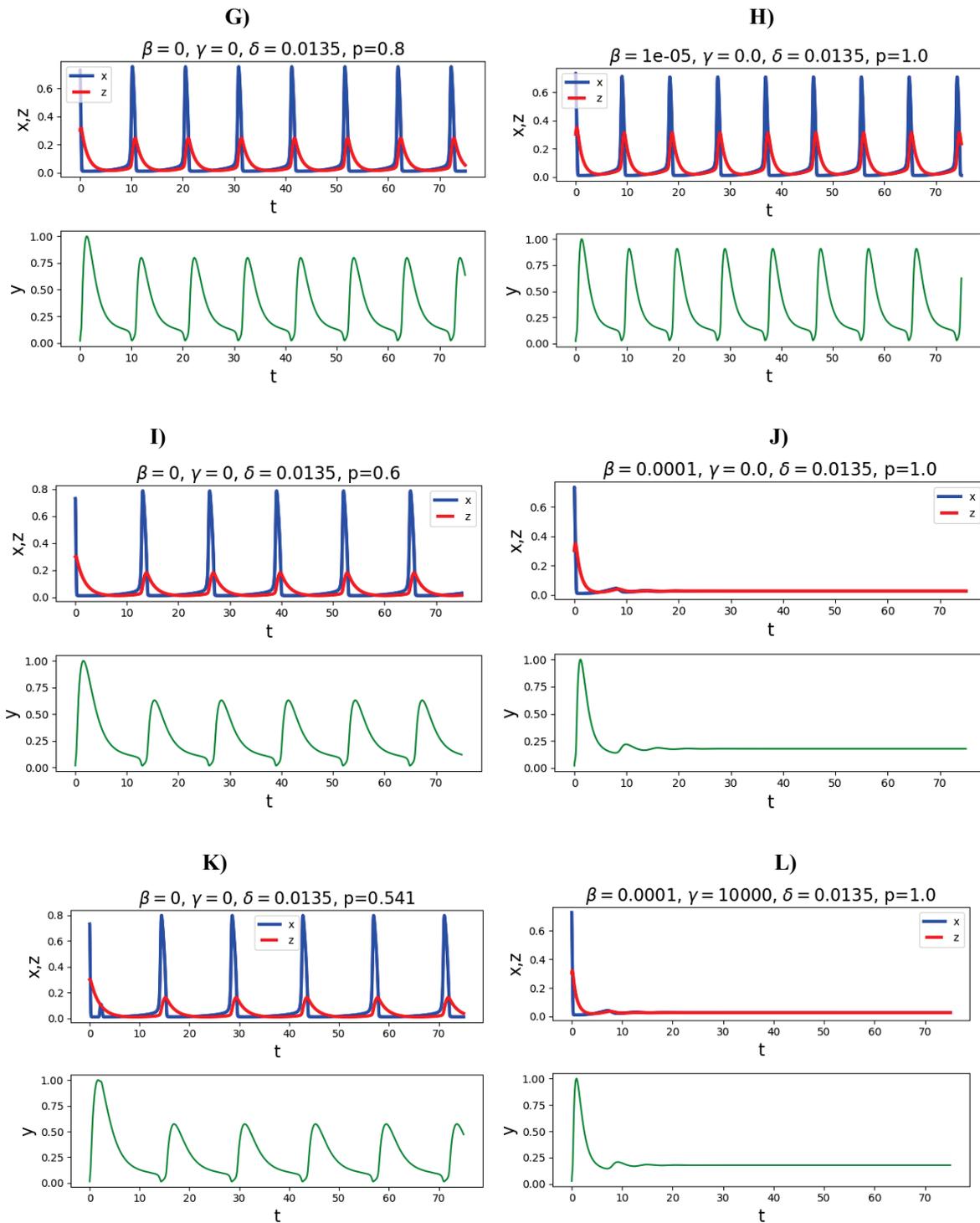


Figure 2. The plots of the left column shows how changing the value of control parameter r , the oscillations number decremented for $r = 1, B = 1$. The difference between the control parameter p and r is that p does not eliminate oscillations, it simply extends the oscillation period. The control parameter B has a similar effect on the oscillations as that of r and p . The right column shows the effect of the β and γ control parameters on the oscillations, which are highly sensitive to the β parameter for $r = 1$, no matter how small its value is, in such a way that if its value is large enough, the oscillations are damped. While regardless of the value of the γ control parameter, the oscillations do not change in any way

on the left of Figure 1 is that the control parameter r determines when the oscillations end and at what concentration they stabilize. Unlike what might be considered, this parameter does not cancel out at the origin. On the other hand, when fixing the other parameters and varying p , as shown in panel G) of Figure 2, it can be seen that the value of beta $\beta = 1 \times 10^{-5}$, although small, modulates the frequency and can make the oscillations advance faster or even destroy them. The beta parameter is the most sensitive of all, as small variations in it can significantly modify the oscillations, as can be seen in panels H, J, L of Figure 2. This is due to its association with the quadratic terms in the equations [see Ecs. (21)], resulting in the expansion in power series of the model already published in [1].

CONCLUSIONS

The proposed thermo-kinetic Oregonator model is the generalization of models reported in Refs. [1-3, 5, 6], is easy to study numerically and analytically such that reproduces the models published in Refs. [7-9]. This property of our model allows extend this study to a thermodynamic and Physic-Chemical treatment [1, 8], but this point is a reason for future work. Furthermore, our model has a nonlinear chemical dynamic given by kinetic and physicochemical feedback mechanisms to reproduce the behavior of realistic chemical oscillations,

The proposed thermokinetic oregonator model is a second-order generalization of the model proposed in Ref. [1] [and its references therein] to study numerically and analytically what the model proposed in [1] reproduces. The properties of our model allow for an extension of the study towards a thermodynamic and physicochemical approach, making it a good basis for further studies on reaction-diffusion in nonlinear chemical systems, such as Turing instabilities, for example.

References:

1. Morales M.A., Anzo A., Luna-Flores A., Cervantes-Tavera A.M., Hernández-Santiago A.A. The role of activation enthalpy modeled with a modified Arrhenius equation in a variant of a minimal bromate oscillator for temperatures changes. *Chemical Physics*, 2021, vol. 546, p. 111165.
2. Ságuas F., Epstein I.R. Nonlinear Chemical Dynamics. *Dalton Trans.*, 2003, pp. 1202-1217.
3. Belousov B.P. Periodically acting reaction and its mechanism. *Collection of abstracts on radiation medicine*, Medgiz: Moscow, 1958, pp. 145-147.
4. Zhabotinsky A.M. A history of chemical oscillations and waves. *Chaos Interdisciplinary J. Nonlinear Sci.*, 1991, vol. 1, no. 4, pp. 379-385, doi: 10.1063/1.165848.
5. Barragán D., Ádera J., Parra W. Entropy production in the Oregonator model perturbed in a calorimeter with a chemical pulse. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2015, vol. 119, p. 705.
6. Pallela S.R., Cristancho D., He P., Luo D., Hall K.R. Temperature dependence of the Oregonator model for the Belousov-Zhabotinsky reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, vol. 11, p. 4236.
7. Aller Pellitero M., Álvarez Lamsfus C., Borge J., The Belousov-Zhabotinskii reaction: improving the oregonator model with the Arrhenius equation. *J. Chem Educ.*, 2013, vol. 90, no. 1, pp. 82-89, doi: 10.1021/ed300227w.
8. Sena S., Riaz S.S., Ray D.S. Temperature dependence and temperature compensation of kinetics of chemical oscillations; Belousov-Zhabotinskii reaction, glycolysis and circadian rhythms. *J. Theoretical Biol.*, 2008, vol. 250, pp. 103-112.
9. Laidler K.J. The development of the Arrhenius equation. *J. Chem. Educ.*, 1984, vol. 61, no. 6, p. 494, doi: 10.1021/ed061p494.

ОБОБЩЕНИЕ МОДЕЛИ ТЕРМОКИНЕТИЧЕСКОГО ОРЕГОНАТОРА

**Зентено Матео Б., Моралес М.А., Серрано Р.А., Сервантес Тавера А.М.,
Хосе Исраэль РМ, Эрнандес Сантьяго АА**

Автономный университет Пуэбла

г. Пуэбла, Мексика

Поступила в редакцию 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0645

Аннотация. В работе предлагается способ обобщить термокинетическую модель орегонатора для моделирования динамики колебательных химических реакций. Для моделирования используются элементарные численные методы с использованием метода Рунге–Кутты, которые дают очень хорошую аппроксимацию математических решений моделей этих сложных систем нелинейной химии. Смысл результатов моделирования заключается в воспроизведении нелинейной динамики термокинетической модели орегонатора к температурам, отличным от комнатной. Кроме того, проводится анализ линейной устойчивости для поиска областей колебаний в пространстве параметров предлагаемой модели.

Ключевые слова: модель орегонатора, осциллирующая химическая реакция, нелинейная химия.

STATISTICAL EVALUATION FOR BACTERIA ELECTRO-STIMULATION USING THE DUNNETT METHOD FOR A MICROBIAL FUEL CELL

Montiel del Cueto A.M., Hernandez Santiago A.A., Gonzalez Flores M., Palomino Jimenez C., Mendez Albores E., Gonzalez Fuentes M.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Ciudad Universitaria CU, San Claudio S/N. C.P 72570, Puebla, Pue., México; e-mail: marcos.gonzalez@correo.buap.mx

Received 31.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0646

Abstract. A microbial fuel cell is a bioelectrochemical device that uses microorganisms, such as electrogenic bacteria, capable of generating electricity. However, the electrical energy generated depends mainly on the ability of the microorganisms present in the anode to decompose the organic matter contained in an effluent. In this work, an electrochemical setting formed as an anode and a cathode of graphite felt were connected in an electrical circuit to electro-stimulate microorganisms to enhance the biofilm on the anode. In this sense, different potential values were imposed in several electrochemical cells to evaluate chemical oxygen demand, volatile solids, and bacteria increase. Dunnett method was used to find significant differences between treatments, taking a sample without treatment as the control sample.

Key words: *Electrogenic bacteria, biofilm, Dunnett method, Saphiro-Wilk, Variance analysis.*

INTRODUCTION

The first discoveries in the use of microorganisms to obtain electric energy were made in 1911 by Potter, who developed the first prototype of a microbial fuel cell (MFC) by experimenting with *Escherichia coli* and *Saccharomyces* cultures, as well as the use of platinum electrodes, with which he obtained a small magnitude of electric currents in a range of 0.3 to 0.5 V [1-3].

MFC is considered an environmental alternative to efficiently and comprehensively solve the problems related to sustainably obtaining electricity. This is possible because the electrical energy generated in a CCM depends primarily on the capacity of the microorganisms present in the anode to decompose the organic matter contained in an effluent [4].

Biofilm formation occurs after the establishment of inoculum bacteria on the electrode surface, which occurs by the action of Van der Waals forces, acid-base interactions, and electrostatic forces [5].

Biofilm formation by bacterial clustering has demonstrated electroactivity and susceptibility to electrical stimulation, which is why electrochemical techniques expand the options for biofilm characterization and modification [5].

METHODOLOGY

In order to analyze the comparative effects obtained by pretreatment of the anode electrode, graphite-felt electrodes were used. The anode pretreatment consisted of modifying the electrode surface to improve compatibility with the electrogenic bacteria present in the inoculum and thus promote biofilm formation on the anode. Two pretreatments were applied on graphite felt, and the untreated graphite felt was used as a control. In that sense, three graphite-felt samples were obtained named: ST (untreated), TT (thermal treatment), and ET (electrochemical treatment).

The electrochemical treatment (ET) was based on the methodology of Cercado 2013 [6]. The geometric area treated was 2 x 2 x 0.3 cm, using a potentiostat-galvanostat (VoltaLab PGZ 301) to apply 1.6 V vs. Ag as a pseudo reference for one hour. The phosphate buffer solution was used as an electrolyte media (4.33 g/L Na₂HPO₄, 2.69 g/L NaH₂PO₄, 2.85 g/L NaCl and 1.0 g/L CH₃COONa).

The thermal treatment (TT) consisted of calcinating at 400 °C the graphite felt into a muffle (Thermolyne, Thermo Scientific) for 20 minutes and then cooling at room temperature.

Once the anodes were pre-treated, they were placed in the fuel cell, according to Figure 1. Different electrical cell potential values were applied for 110 hours using a power source (GEINSTEK GPE-2323 and GP-1303DU E2 Digital Co.). In this case, 0 V, 0.5 V, 1.1 V, and 2.2 V were applied. At the end of this time, the percentage of organic matter was evaluated as the total suspended solids (TSS) and chemical oxygen demand (COD). However, both analyses were compared with a control system (a cell without applying the electrical potential).

Comparison of treatments concerning the control (Dunnett method). Let *k* treatments be compared, one of which will be called the control treatment. The main interest is to compare the remaining (*k* – 1) treatments with the control treatment. In many cases, the control treatment refers to a reference standard treatment or the absence of treatment. The (*k*-th) treatment is denoted as the control treatment.

Making comparisons concerning the control involves testing the (*k* – 1) hypotheses given by:

$$\begin{aligned} H_0: \mu_i &= \mu_k \\ H_A: \mu_i &\neq \mu_k \end{aligned} \quad (1)$$

With *i* = 1, 2, ..., *k* – 1, where *k* is the control treatment. The null hypothesis is rejected if:

$$|\bar{Y}_i - \bar{Y}_k| > D_\alpha(k - 1, l) = \sqrt{CM_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_k} \right)} \quad (2)$$

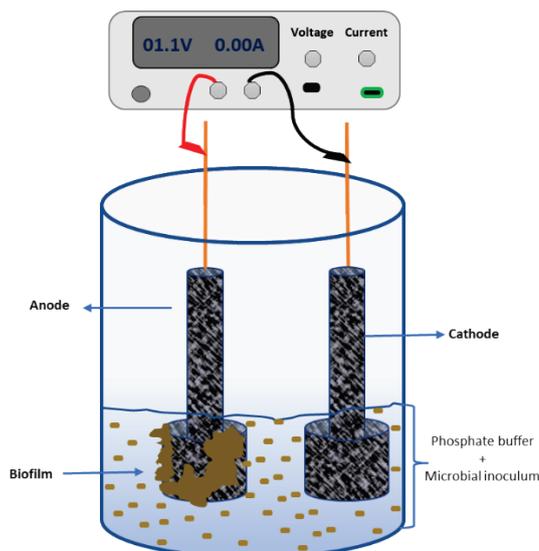


Figure 1. Electrochemical cell used for biofilm formation

Where $D_{\alpha}(k-1, l)$ is the following: D by Dunnett, α the level of significance, and $D\alpha$ is found in Dunnett's tables; l are the degrees of freedom.

\bar{Y}_i y \bar{Y}_k : They are the sample means of the treatments.

CM_E : Is the mean square of the error.

n_i : Is the number of elements contained in each treatment.

n_k : Is the number of elements contained in the control treatment.

An Excel spreadsheet was used to carry out this test, as shown in Figure 2. This program was applied to obtain the corresponding results [7-10].

RESULTS AND DISCUSSION

The data obtained from the experiment carried out are shown in Table 1, considering the methods Without Treatment, Thermal Treatment, and Electrochemical Treatment, applying potentials from 0.5 V, 1.1 V, 2.2 V, and 0 V for the sample Without Treatment.

Statistical analysis was carried out on the data in Table 1, which consisted of applying the Shapiro-Wilk normality test, and the Levene Test to determine equality of variances, which are the necessary requirements to apply an Analysis of the Variance of two Factors, with a single sample per group. If this analysis of variance shows significant differences, then Dunnett Test can be applied.

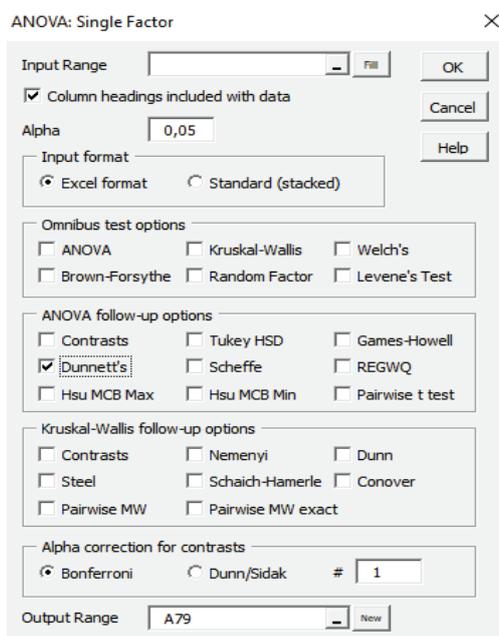


Figure 2. Dunnett test calculation with an Excel program

What is attempted to be demonstrated through the Dunnett test is whether there are significant differences in the treatments to conclude which treatment worked better. Dunnett method allows to compare the treatments with a control treatment, determined by the investigator, which for our analysis was the sample Without Treatment.

To apply the Dunnett test, we will first use the normality test to the data in Table 1, then the variance equality test, all this before applying an Analysis of Variance.

The first thing we must corroborate is the normality of the data. This will determine what statistical analysis to perform, whether parametric methods because they have a normal distribution or non-parametric methods if they are not normal, for which we apply the Shapiro-Wilk test using the Excel spreadsheet, which showed the following results. See Table 2.

As seen in Table 2, the Shapiro-Wilk test demonstrated normality in the data, so we proceeded to determine equality of variances, to cover the requirement needed to apply an Analysis of Variance.

To verify the equality of variances, the Levene test was applied using the Excel spreadsheet, and the results shown in Table 3 were obtained.

As can be seen in Table 3, the test shows that the p-value is greater than 0.05, indicating that the variances do not have significant differences, so equality of variances is assumed. Since the requirements for applying two-factor Analysis of Variance were met, we proceeded again to use the Excel spreadsheet. The results obtained are shown in Table 4.

As can be seen in Table 4, if F is less than the critical F $2.24132898 < 5.14325285$, it is concluded that there are no significant differences concerning the methods. On the contrary, if there are significant differences where F is greater than the critical F $8.14827786 > 4.757062663$ (Table 4) it can be concluded that there are statistically significant

Table 1. Data showing the percentage of organic matter with different cell potentials

Methods	Treatments			
	0 Volts	0.5 Volts	1.1 Volts	2.2 Volts
ST	44.19	44.19	50.91	33.07
TT	43.48	37.50	45.45	29.51
TE	43.75	53.68	46.34	35.48

Table 2. Data showing the percentage of organic matter at different cell potentials

Shapiro-Wilk Test	0 Volts	0.5 Volts	1.1 Volts	2.2 Volts
W-stat	0.98235356	0.99003646	0.86821869	0.9878123
p-value	0.7455413	0.80904353	0.29047929	0.78872389
alpha	0.05	0.05	0.05	0.05
normal	yes	yes	yes	yes

Table 3. Levene test to determine equality of variances

Levene's Tests	
type	p-value
means	0.095471186
medians	0.240998795
trimmed	0.095471186

Table 4. Analysis of variance of two factors with a single sample per group

Analysis of variance of two factors with a single sample per group,						
Origin of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Average of the squares	F	Probability	Critical Value for F
Methods	71.73252867	2	35.86626434	2.24132898	0.18751651	5.14325285
Treatments	391.167076	3	130.3890253	8.14817786	0.01545379	4.757062663
Error	96.01338669	6	16.00223112			
Total	558.9129913	11				

differences, but the Analysis of Variance does not indicate in which treatment these differences occur. However, if there were differences, Dunnett Test can be applied using the sample called without treatment as a control test to compare it with the other treatments and determine where there are differences. The results are shown in Table 5.

Table 5 shows that it is in the treatment of 2,2 V, where a significant difference is shown with respect to the control treatment. It can be commented that if the p-value is very close to 1, there are no differences in these treatments, but if this value is close to zero or zero, there are differences.

In order to verify the differences in the treatments, we will show other results obtained, applying the method of mean differences, and the results are shown below. See Table 6.

It can be seen in table 6 that if we compare the control treatment called 0 Volts with the 2,2 Volts treatment, the result shows that if there are significant differences, this result coincides with that obtained by applying Dunnett's Test.

CONCLUSIONS

When an experiment is carried out, where it is tried to demonstrate the efficacy of one treatment with respect to another, it is important to know if the data provided by the experiment show significant differences for our investigation, the treatments used to determine the percentage of organic matter, there were 3 methods and 4 treatments; the methods are Without Treatment, Thermal Treatment and Electrochemical and the treatments were with voltage 0, 0.5, 1.1, and 2.2 volts.

In the results obtained, we were able to observe that when comparing the control treatment with the 2,2 treatment, it was evidenced that there are significant differences with respect to the control treatment, as shown in Tables 5 and 6, when applying the Dunnett test and that of Differences of Means.

In conclusion, the Dunnett test indicated that there are significant differences in the analysis process of a water sample with different treatments, which showed us that in the treatment with voltage 2.2 V there was a statistically significant difference with respect to the sample without treatment, a situation which was corroborated with the physical

Table 5. Dunnett test

DUNNETT'S TEST			alpha	0,05					
group	mean	size	ss	df	d-crit				
0 volts	43.80	3	0.25497974						
0.5 volts	45.12	3	132.282336						
1.1 volts	47.57	3	17.1339702						
2.2 volts	32.69	3	18.0746295						
		12	167.745915	8	2.88				
D-TEST									
group	mean	std err	d-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d	
0.5 volts	-1.32	3.73882686	0.35269081	-12.0864712	9.44917147	1	10.7678214	0.28797084	
1.1 volts	-3.76	3.73882686	1.00662524	-14.5314188	7.00422389	1	10.7678214	0.82190606	
2.2 volts	11.12	3.73882686	2.97342587	0.34930316	21.8849459	0.04372891	10.7678214	2.42779206	

Table 6. Test of differences of means

CONTRAST		Alpha	0,05							
Group	contrast	mean	size	ss						
0 volts	1	43.80	3	0.25497974						
0.5 volts		45.12	3	132.282336						
1.1 volts		47.57	3	17.1339702						
2.2 volts	-1	32.69	3	18.0746295						
	0	11.117124	12	167.745915						
T TEST										
std err	t-stat	df	p-value	t-crit	lower	upper	sig	Cohen d	effect r	
3.738826859	2.97342587	8	0.01777791	2.30600414	2.49537432	19.7388747	yes	2.42779206	0.72455241	

experiment carried out. The electrochemical treatment method with voltage 2.2 V is the one that showed the lowest percentage of organic matter, as can be verified in Table 1. And we could say that it was the best treatment.

For future work, 3 repetitions will be applied for each treatment, in order to determine, with more information, if the electrochemical process with voltage 2.2 is the one with the lowest percentage of organic matter, with respect to the other treatments.

References:

1. Esteve-Núñez A. Bacterias productoras de electricidad. Del subsuelo a la pila de combustible. *Temas de Actualidad*, 2008, vol. 45, pp. 34-39.
2. Kaur R., Marwaha A., Chhabra V.A., Kim K.H., Tripathi S.K. Recent developments on functional nanomaterial-based electrodes for microbial fuel cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, vol. 119, p. 109551, doi: 10.1016/j.rser.2019.109551.
3. Potter. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 1911, vol. 84, no. 571, pp. 260-276, doi: 10.1098/rspb.1911.0073.
4. Mateo F., Hernández F., Pérez A., Addi H., Lozano L., Godínez C. Aplicación de la tecnología de Pilas de Combustible Microbianas en depuración de aguas de origen urbano e industrial con producción simultánea de energía eléctrica. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, 2014, vol. 7, pp. 36-38.
5. Czerwińska-Główka D., Krukiewicz K. A journey in the complex interactions between electrochemistry and bacteriology: From electroactivity to electromodulation of bacterial biofilms. *Bioelectrochemistry*, 2020, vol. 131, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107401.
6. Cercado B., Cházaro-Ruiz L.F., Ruiz V., López-Prieto I.deJ., Buitrón G., Razo-Flores E. Biotic and abiotic characterization of bioanodes formed on oxidized carbon electrodes as a basis to predict their performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, vol. 50, pp. 373-381, doi: 10.1016/j.bios.2013.06.051.
7. Humberto Gutiérrez Pulido, Román de la Vara Salazar. Análisis y Diseño de Experimentos. Ed. McGraw-Hill, 2003, pp. 50-80.
8. Montgomery D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. Tercera edición. Editorial Félix Varela. La Habana, 2004.
9. Inot I., Gabriel K.R. A study of the power of several methods of multiple comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, 1975, vol. 70, pp. 574-583.
10. Dean A., Voss D. Design and Analysis of Experiments. *Springer Texts in Statistics*. Springer. Dordrech, 1999.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ДАННЕТА ДЛЯ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА Монтель дель Куэто А.М., Эрнандес Сантьяго А.А., Гонсалес Флорес М., Паломино Хименес К., Мендес Альборес Э., Гонсалес Фуэнтес М.А.

Автономный университет Пуэбла

г. Пуэбла, Мексика; e-mail: marcos.gonzalez@correo.buap.mx

Поступила в редакцию 31.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0646

Аннотация. Микробный топливный элемент – это биоэлектрохимическое устройство, в котором используются микроорганизмы, такие как электрогенные бактерии, способные вырабатывать электричество. Однако вырабатываемая электрическая энергия зависит главным образом от способности микроорганизмов, присутствующих на аноде, разлагать органические вещества, содержащиеся в сточных водах. В данной работе электрохимическая установка, выполненная в виде анода и катода из графитового войлока, была соединена в электрическую цепь для электростимуляции микроорганизмов для усиления биопленки на аноде. В этом смысле в нескольких электрохимических ячейках были установлены разные значения потенциала для оценки химической потребности в кислороде, летучих твердых веществ и увеличения количества бактерий. Метод Даннета использовался для обнаружения существенных различий между обработками, принимая образец без лечения в качестве контрольного образца.

Ключевые слова: Электрогенные бактерии, биопленка, метод Даннета, Сафиро-Уилка, дисперсионный анализ.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕННЫХ И АССОЦИАТИВНЫХ СЕТЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЛЯ ПОИСКА ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ

Туркина В.А.¹, Ярема П.О.¹, Майорова А.А.¹, Орлова Н.Г.², Савина Е.А.^{1,3}, Орлов Ю.Л.^{1,4}

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Трубецкая, 8, стр.2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: orlov@d-health.institute

²Финансовый Университет при Правительстве РФ
Ленинградский проспект, 49/2, г. Москва, 125167, РФ

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, РФ

⁴Институт цитологии и генетики СО РАН

просп. ак. Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090, РФ

Поступила в редакцию 10.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0647

Аннотация. Компьютерная реконструкция генных сетей – наборов взаимодействующих макромолекул, объединенных общей функцией – представляет собой комплексную задачу биоинформатики. Генные сети как графические структуры представляют удобное средство визуализации, дают качественно новую информацию о наборе исследуемых генов, описание их биологических функций. В более широком плане мы рассматриваем ассоциативные генные сети заболеваний, куда входят не только гены и их продукты – белки, метаболиты, некодирующие РНК, лекарственные соединения, но и общие признаки заболеваний – симптомы, фенотипические проявления. Программные инструменты для компьютерной реконструкции графа генной сети активно развиваются в мире, используются в биомедицине. Мы рассматриваем онлайн-доступные инструменты биоинформатики для реконструкции генных сетей по списку генов и соответствующий компьютерный конвейер обработки данных. Анализ структуры генной сети заболевания позволяет выделить узловые гены, как мишени для терапии. Рассмотрены примеры применения онлайн-программ для анализа генной сети глиомы. Предложенный подход может быть масштабирован на другие функциональные наборы генов, связанные с заболеваниями человека. Используя подобные подходы биоинформатики, рассматривались генные сети комплексных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, деменция, шизофрения, рак молочной железы и другие виды рака.

Ключевые слова: биоинформатика, генные сети, глиома, комплексные заболевания, белок-белковые взаимодействия, медицинская информатика.

ВВЕДЕНИЕ

Компьютерная реконструкция генных сетей по списку генов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, позволяет исследовать структуру сети, определять узловые гены и их продукты как возможные мишени терапевтических воздействий [1-3]. Генные сети как графические структуры представляют удобное средство визуализации, дают качественно новую информацию о наборе исследуемых генов, описание их биологических функций [4,5]. В мире активно разрабатываются базы данных и компьютерные инструменты, для анализа генных сетей, в том числе онлайн-доступные программы STRING (<https://string-db.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), PANTHER, ANDVisio, ANDSystem [6-8].

Работа с онлайн программами биоинформатики, объединение их в общий конвейер для последовательного выполнения при исследовании заболеваний важно в медицинском образовании [3,9]. Использование онлайн-доступных программ незаменимо при дистанционном обучении, может эффективно использоваться для самостоятельных работ по биоинформатике [10]. Работа по анализу генов, реконструкции генной сети, и оформлению результатов с использованием инструментов биоинформатики была выполнена студентами на цифровой кафедре Сеченовского Университета (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) (<https://dk.sechenov.ru/>). Применение компьютерной реконструкции генных сетей студентами для задач биотехнологии выполнялось в Новосибирском государственном университете (<https://www-bionet.ssc.ru/icgenomics/>), РУДН, Школе биомедицины ДВФУ. Необходимо развитие собственных программных инструментов, интеграция баз данных по генным сетям, с применением в образовании, дистанционном обучении [11].

Используя онлайн инструменты биоинформатики как методический подход, рассматривались генные сети комплексных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона [12], деменция, шизофрения [1], различные виды опухолей [2], метаболический синдром [13]. В данной работе рассмотрен пример анализа генной сети глиомы. Диффузные глиомы относятся к числу наиболее трудно поддающихся лечению видов рака [14]. Согласно клиническим рекомендациям, стандарт лечения включает в себя хирургическую резекцию опухоли с последующей лучевой и/или химиотерапией, а также использование немногочисленных таргетных методов лечения. Проблемой для эффективного лечения является гематоэнцефалический барьер, который препятствует

проникновению в головной мозг лекарственных средств. Необходимо развитие компьютерных моделей для анализа заболевания и поиска возможных мишеней для терапии.

Известно, что в генезе глиом участвует множество генетических мутаций, которые могут варьировать в зависимости от типа и степени злокачественности опухоли [15]. Одним из наиболее изученных генетических изменений, связанных с глиомами, является мутация гена IDH1. Она наблюдается у приблизительно 70% инфильтрирующих глиом и может прогнозировать более благоприятный исход для пациентов. Также было показано, что мутации в генах IDH1 и IDH2 могут влиять на ответ опухоли на химиотерапию [16]. IDH-мутировавшие глиомы располагаются преимущественно в лобной, височной доле или мозжечке, редко в промежуточном мозге или стволе головного мозга [17]. На МРТ такие глиомы, как правило, ограничиваются одной долей с большими участками поражений и более четкими границами, чем IDH-глиомы дикого типа [18].

Другим важным генетическим изменением является делеция на хромосоме 1p/19q, которая обнаруживается у приблизительно половины опухолей типа "олигодендроглиома" и является взаимоисключающей для астроцитом (TP53). Это изменение связано с более благоприятным прогнозом и может использоваться для выбора подхода к лечению [19].

Кроме того, в генезе глиом могут участвовать мутации в генах, связанных с сигнальными путями роста и пролиферации клеток, таких как гены EGFR, PTEN, TP53, PIK3CA и другие [15,20]. В очень небольшом количестве случаев в клетках с мутациями в генах IDH1 или IDH2 выявлены также изменения в генах PTEN, EGFR, CDKN2A и CDKN2B. Вместе с этим в образцах с немутантными IDH1 и IDH2 встречаемость мутаций гена TP53 была существенно ниже (18%), в то время как мутации генов PTEN, EGFR, CDKN2A и CDKN2B присутствовали намного чаще (74%) [21].

Помимо давно известных и долгое время изучаемых генов, формируются новые группы молекулярных маркеров (KDM1A, HIF1A, EGFR, SMO, MSI2), связанных с канцерогенезом и возможные для использования в таргетной терапии глиальных опухолей [22]. Хотя большинство глиом возникает спорадически без сопутствующего семейного заболевания, существует тесная связь между глиомами и несколькими редкими наследственными синдромами; на эти заболевания приходится менее 5% всех глиом. К таким редким синдромам относятся, прежде всего, синдромы факоматоза (нейрофиброматоз 1, туберозный склероз), синдром Ли-Фраумени, энхондроматоз, синдром семейной атипичной множественной родинки (FAMMM), синдром Рубинштейна-Тайби [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования являлись аннотации функций генов, последовательности и их функциональная разметка. Использовались данные из открытых баз данных NCBI, OMIM (<https://omim.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Для получения списка генов, связанных с наследственной предрасположенностью к заболеванию, использовался интернет-ресурс OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (<https://omim.org/>). Полнотекстовые обзоры со ссылками в OMIM содержат информацию обо всех известных менделевских расстройствах и более чем 16 000 генах. С помощью интегрированного ресурса GeneCards выполнялся поиск и анализ функции генов, играющих ключевую роль в развитии заболевания [24].

Для реконструкции генной сети взаимодействий генов использовался ресурс STRING-DB (<https://string-db.org/>). Взаимодействия включают прямые (физические) и косвенные (функциональные) ассоциации. Для поиска публикаций, описывающих взаимодействия генов, их продуктов, их функциональные ассоциации, использовался инструмент GeneMANIA (<http://genemania.org/>).

Для поиска ассоциированных заболеваний использовался открытый онлайн-ресурс MalaCards (<https://www.malacards.org/>) – интегративная база данных о болезнях и расстройствах организованная в виде "карточек болезней". Для анализа категорий генных онтологий использовались онлайн ресурсы международного консорциума Gene Ontology [25] и DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Анализ генных онтологий для списка генов выполняется с помощью ресурса PANTHER (<https://pantherdb.org/>). Инструмент выполняет анализ белков на основании эволюционных взаимосвязей. Для визуализации генных онтологий был использован онлайн-инструмент gGOST (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>), позволяющий построить график точечных значений категорий генных онтологий.

Дополнительно для расчета возможных трехмерных структур белков и определения их достоверности использовалась программа AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Для целей дополнительной верификации структуры белков использовалась программу PAE viewer (<http://www.subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/paeViewerDemo>).

Отметим, что настоящее время развиваются новые инструменты для анализа ассоциативных сетей – Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), ANDVisio, ANDSystem [7,8], которые могут быть использованы в расширении исследования – поиске ассоциированных генов по литературе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен анализ литературы с целью выявления генов предрасположенности к глиоме. Одним из ключевых генов, участвующих в трансформации нормальной клетки в опухолевую, является ген-супрессор TP53 [20]. Он

является важным клиническим маркером глиомы и, как известно, играет сложную роль в клетках глиомы. Функциональная его роль заключается в поддержании стабильности генома и генетической однородности клеток во всем организме. По мере роста и деления клеток постоянно возникают и накапливаются нарушения структуры ДНК. Это происходит как в результате естественного мутагенеза, так и ошибок в процессе репликации ДНК.

Эволюционно выработалась система устранения данных ошибок, включающая в себя цепь репарационных белков, которые работают лишь в определенных фазах клеточного цикла [26]. Один из них – белок p53, продукт гена TP53. Данный белок синтезируется во всех клетках организма и активируется при повреждении ДНК. Экспрессия TP53 в свою очередь вызывает задержку клеточного цикла либо для устранения повреждений и репарации ДНК, либо для индукции апоптоза. В норме данный механизм поддерживает целостность генома и препятствует приобретению опухолевого фенотипа [27]. Однако, при отсутствии гена TP53 либо наличии его дефекта, клетка не пересекает G1/S-контрольную точку фазы митоза, в результате чего не вступает в S фазу. Накапливаются популяции клетки с множественными нарушениями структуры ДНК, растет нестабильность генома, появляются все новые клоны клеток. В дальнейшем опухолевые клетки участвуют в своеобразном естественном отборе – они становятся все менее чувствительными к действию цитостатиков, с каждым поколением все сильнее нарушается контактное взаимодействие клеток, возникает метастазирование [28].

Мутантный TP53 обнаруживается уже на ранних стадиях заболевания. Установлено, что его мутации связаны с агрессивным течением онкологического заболевания и устойчивостью опухолевых клеток к химио- и лучевой терапии. Многие авторы отмечают, что высокий уровень экспрессии белка p53 связан с низкой общей выживаемостью пациентов [26,27]. Кроме того, мутировавший TP53 усиливает регуляцию MYC, EGFR, PNCA и снижает регуляцию p21, CD95Fas, PTEN [29].

Важную доказанную роль в патогенезе глиомы также играет рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [30]. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) представляет собой трансмембранный гликопротеин, который принадлежит к семейству тирозинкиназных рецепторов (RTKs) и играет важную роль в процессах роста и развития клеток. Он был открыт в 1960 году как рецептор, способный связываться с эпидермальным фактором роста (EGF), регулирующий рост и деление эпителиальных клеток [30,31].

В последние годы также была идентифицирована группа микроРНК, участвующих в инициации глиомы путем нацеливания на ген RAS [32]. Ген RAS, который состоит из KRAS, NRAS и HRAS, является одним из наиболее часто активируемых онкогенов при раке человека. KRAS является преобладающим мутантным геном RAS при раке (84% всех миссенс-мутаций RAS), за ним следует NRAS (12%), HRAS мутирует редко (4%). Ras обладает активностью фермента GTP, который может гидролизовать GTP до GTP-протеина [32]. Ген KRAS (гомолог вирусного онкогена саркомы крысы Кирстен 2) представляет собой протоонкоген, который кодирует небольшой белок-трансдуктор GTPase под названием KRAS. Уже доказано, что полиморфизм гена KRAS связан с риском развития и прогрессированием глиомы. KRAS влияет на воспалительный компонент рака, активируя сигнальные пути MAPK и PI3K, что приводит к высвобождению дополнительных цитокинов IL-6/IL-8 и пролиферации раковых клеток [33, 34].

С помощью баз данных биоинформатики составлен список генов, ассоциированных с глиомой. Запрос “glioma” в базе данных OMIM дал 176 результатов - имен генов. Далее список был уточнен и аннотирован с помощью ресурсов GeneCards, GenBank NCBI.

Список 176 генов был загружен через интерфейс онлайн-ресурса PANTHER (<https://pantherdb.org/>) для поиска значимых категорий генных онтологий для этой группы генов. Использовались 3 основные группы генных онтологий (Gene Ontology): GO biological process - биологические процессы; GO molecular function - молекулярные функции; GO cellular component - клеточные компартменты. В качестве референсного генома выбран *Homo sapiens*. Гены микроРНК не были распознаны программой. Программа производила расчет по 144 идентификаторам. Всего в референсном геноме человека использовалось 20589 генов. Применялась коррекция оценки статистической значимости на множественность гипотез по Бонферрони (<https://pantherdb.org/>).

Было выполнено три аналогичных анализа для групп генных онтологий с ограничением значения уровня значимости P-Value до E-10 для биологических процессов, E-02 для молекулярных функций и E-03 для клеточных компартментов для представления наиболее информативных результатов. Анализ категорий генных онтологий с помощью ресурсов DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), PANTHER (<https://pantherdb.org/>) показал, что самыми значимыми категориями являются: негативная регуляция биологического процесса, регуляция программируемой клеточной гибели, негативная регуляция клеточных процессов, регуляция клеточной гибели. Эти категории относятся к общему клеточному развитию, что связано с нормальным функционированием клеток и тканей. Значимыми категориями являются: связывание идентичных белков, активность димеризации белков, активность гомодимеризации белков, связывание сигнальных рецепторов. Эти категории можно отнести к работе путей передачи межклеточных сигналов, что связано с работой нервной системы.

Такой же список генов был загружен через интерфейс DAVID Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) для поиска значимых категорий генных онтологий. Было идентифицировано 157 генов. Результаты представлены в обобщенной таблице 1.

Таблица 1. Список категорий генных онтологий по DAVID для глиомы

Группа онтологий	Категория онтологий	Число генов	P-value *
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of neuron apoptotic process	13	2,60E-06
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of apoptotic process	19	6,00E-05
GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to hypoxia	10	3,60E-04
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell cycle	12	2,40E-03
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of transcription, DNA-templated	19	2,70E-03
GOTERM_BP_DIRECT	ovarian follicle development	6	3,80E-03
GOTERM_BP_DIRECT	neuron apoptotic process	7	5,10E-03
GOTERM_MF_DIRECT	identical protein binding	30	6,10E-03
GOTERM_BP_DIRECT	cell aging	5	7,20E-03
GOTERM_MF_DIRECT	protein homodimerization activity	18	6,10E-03
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of cell proliferation	14	7,40E-03
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	6	7,40E-03
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	7	9,80E-03

Примечание к таблице: * **P-value** было нормировано с поправкой на множественность гипотез по Бенджамини-Хохбергу.

В построенных таблицах категорий генных онтологий показано присутствие категорий, связанных с апоптозом, что соответствует представлениям о заболевании.

Генная сеть для генов глиомы была реконструирована с помощью ресурса STRING-DB и собственной разработанной программы по визуализации сетей (Дипломные работы студентов по цифровой кафедре Сеченовского университета 2023 года, <https://dk.sechenov.ru/>). Граф включал 150 генов (белков). Гены микроРНК не были распознаны программой. Сеть была перестроена с удалением не связанных генов и заменой нескольких линий связей между узлами сети одной линией с учётом только доказанных взаимодействий со средним уровнем достоверности (параметр STRING-DB, см. <https://string-db.org/>).

Статистика общей построенной сети белок-белковых взаимодействий глиомы: количество узлов – 150; количество ребер - 590; средняя степень связности узла – 7.87; средний локальный коэффициент кластеризации – 0,478; ожидаемое количество ребер - 237; значимость плотности белок-белковых взаимодействий - $< 1,0e-16$. В центре сети находятся белки EGFR и TP53, которые являются известными онкогенами, а также STAT3, KRAS, PIK3CA, IDH1, KDR. Для более детального анализа сеть была перестроена в программе STRING (<https://string-db.org/>) итеративно с учетом только экспериментально доказанных взаимодействий со средним уровнем достоверности (рис. 1).

Несмотря на то, что часть объектов сети не контактировали с другими, сеть достаточно связанная, в ней выделяется центральный сильно связанный кластер генов (здесь и далее, для сети, построенной с помощью STRING, мы говорим о белковых продуктах генов). Это означает, что гены, по крайней мере, частично биологически связаны как группа взаимодействующих макромолекул.

В сети (рис. 1) можно видеть несколько кластеров. Наибольшее число связей - у генов EGFR, TP53, KRAS, из которых EGFR и TP53 являются ранее подробно изученными онкогенами. Сеть была перестроена с удалением не связанных генов и заменой нескольких линий связей между узлами сети в визуализации STRING только одной линией с учётом только доказанных взаимодействий со средним уровнем достоверности. В центре сети - белки EGFR и TP53, которые являются известными онкогенами, а также STAT3, KRAS, PIK3CA, IDH1, KDR.

Для более детального анализа сеть была перестроена итеративно с учетом только экспериментально доказанных взаимодействий. В сети выделяются несколько кластеров. Самый большой кластер включает 7 генов: BCL2, BRCA2, BRE, CHEK2, LZMBTL1, PTEN, TP53. Следующие по количеству вовлеченных узлов кластеры включают гены DNAJA3, DOCK4, EGFR, NF2, PIK3CA, PTPN11 и BRAF, KRAS, LZTR1, NF1 соответственно (рис. 2).

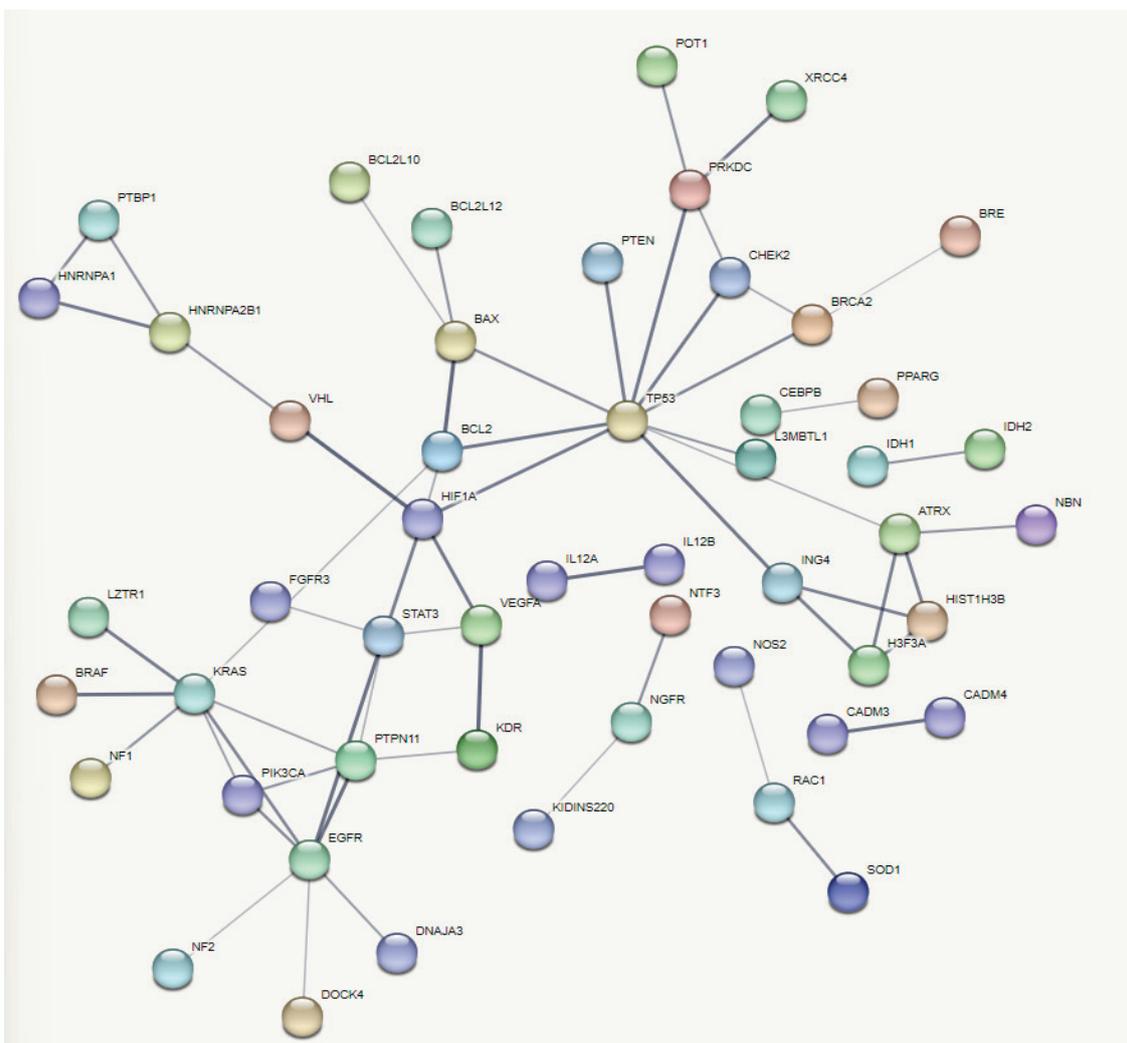


Рисунок 1. Итеративно перестроенная генная сеть генов глиомы (иллюстрация построена с помощью ресурса STRING)

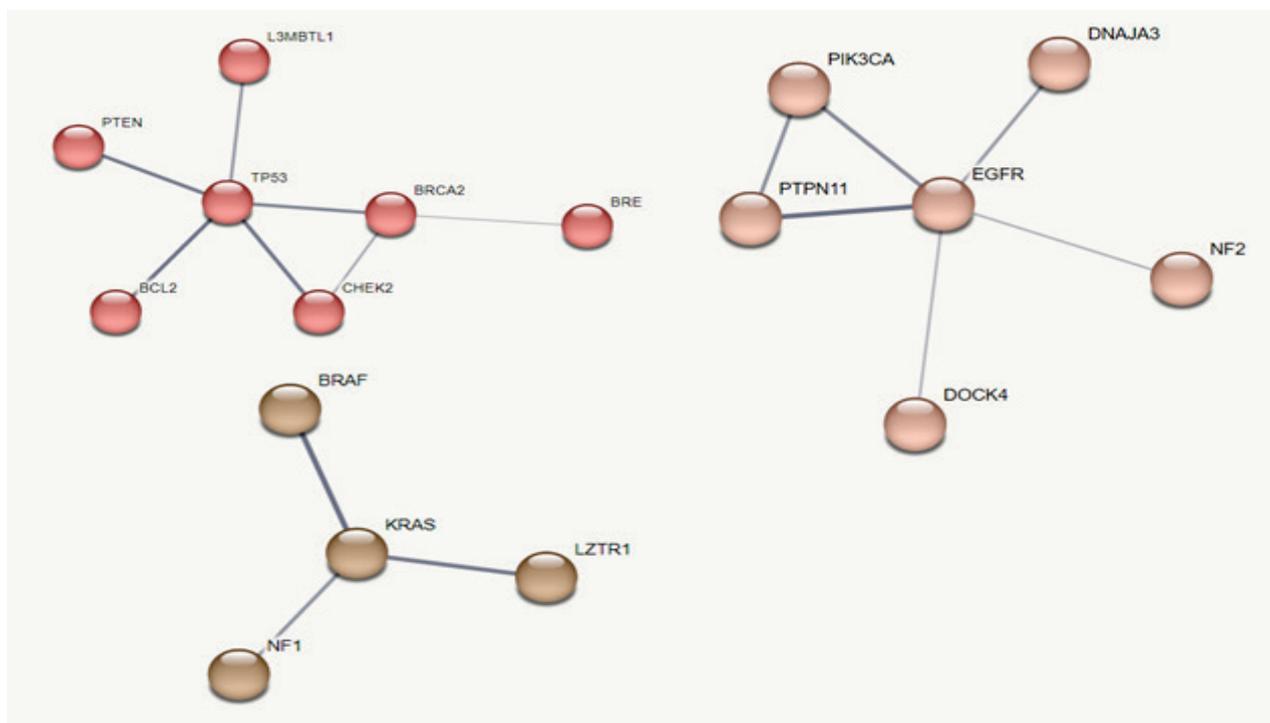


Рисунок 2. Кластеры генной сети глиомы, с узловыми генами TP53, EGFR, KRAS (иллюстрация построена с использованием ресурса STRING)

Наибольшее число связей у генов EGFR, TP53, KRAS, при этом EGFR и TP53 [26] ранее подробно изученные онкогены.

Далее, с помощью ресурса MalaCards (<https://www.malacards.org/>) были определены заболевания, ассоциированные с глиомой. Это глиобластома, и другие опухоли мозга – glioblastoma, malignant astrocytoma, neuroblastoma.

Таким образом, с помощью набора онлайн инструментов биоинформатики была собрана актуальная научная литература по заболеванию глиомой [3], описана роль отдельных генов и их продуктов. Несмотря на то, что глиома занимает небольшую долю от общего числа злокачественных новообразований ЦНС, на сегодняшний день она остается одним из самых агрессивных и тяжелых онкологических заболеваний, которое не поддается эффективному лечению и длительному уходу в ремиссию. Полученная структура геновой сети может быть использована для поиска лекарственных средств, как основа для машинного обучения, дающего дополнительную информацию и функциональную аннотацию [35]. Исследование геновых сетей, их компьютерная реконструкция – активно развивающееся научное направление [2,9], представленное в нашей работе на примере глиомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, в результате работы получен список генов, ассоциированных с глиомой, с использованием баз данных и онлайн-инструментов биоинформатики, определены значимые категории геновых онтологий генов глиомы, показана их связь с онкологическими заболеваниями и реконструирована геновая сеть заболевания [2,3]. Выявлены гены PIK3CA, KRAS, которые потенциально могут быть использованы как мишени для таргетной терапии, а также как молекулярно-генетические маркеры заболевания. Рассмотрены трехмерные структуры белков Pik3CA, KRas, и связывающиеся с ними лиганды [3]. Определение генов глиомы может базироваться на экспериментальных данных транскриптомного секвенирования [36,37].

Разработанный конвейер для компьютерной реконструкции геновых сетей представляет набор интернет-доступных и частично заменяемых программных инструментов – для составления списка генов – OMIM (<https://omim.org/>), GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) и GeneCards (<https://www.genecards.org/>), для анализа геновых онтологий – DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), PANTHER (<https://pantherdb.org/>), для реконструкции геновой сети по списку генов – STRING-DB (<https://string-db.org/>), Metascape (<https://metascape.org>), GeneMANIA (<http://genemania.org/>), MalaCards (<https://www.malacards.org/>), следуя стандартам, предложенным в работах [2,9]. Варианты анализа генов комплексных заболеваний используя новую версию [38] отечественной программы ANDDigest (<https://anddigest.sysbio.ru/>) [7] использовались для анализа генов карциномы печени [39].

Исследование генетической составляющей заболевания начинается с определения релевантных генов по базам данным. Поиск биомедицинской литературы в PubMed, Scopus, ScienceDirect для анализа заболеваний также является активной областью разработки программных средств, используя различные платформы [40,41].

Отметим появление новых онлайн инструментов составления и анализа списка генов, дополняющих стандартный поиск – Geneshot и Enrichr (<https://maayanlab.cloud/geneshot/>). Реконструкция геновой сети по списку генов также может быть эффективно выполнена новыми средствами, такими как NDEx (<https://www.ndexbio.org/>). Необходима дальнейшая интеграция баз данных биоинформатики с помощью графов для сопоставления данных, получения интегрированной информации по аннотации функций генов, РНК и белков – отметим новый онлайн инструмент BioGraph (<http://andromeda.matf.bg.ac.rs:54321/>) [42].

Представленные подходы анализа геновых сетей и их применения широко обсуждались на серии конференций по биоинформатике и регуляции структуры генома, и системной биологии – Bioinformatics of Gene Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB), проходящей в Новосибирске с 1998 года (<https://bgrssb.icgbio.ru/2022/>), и представленной в специальных выпусках международных научных журналов *International Journal of Molecular Sciences* ("25 Anniversary of Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Conference Series", https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/0LGA6103S5), *Frontiers in genetics* (<https://www.frontiersin.org/research-topics/40408/bioinformatics-of-genome-regulation-and-systems-biology-volume-iii>) [43], *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* (<https://dblp.org/db/journals/jbcb/jbcb11.html>) [44], *Journal of Integrative Bioinformatics* (<https://www.degruyter.com/journal/key/jib/17/4/html>) [45,46].

Институтом цифровой медицины Сеченовского университета проводится разработка программных инструментов для медицинской информатики [47,48], работает новый формат дополнительного образования – Цифровая кафедра (<https://dk.sechenov.ru/>). В 2023 году на Кафедре защищено несколько дипломов по разработке программных средств реконструкции и визуализации геновых сетей, и анализу их структуры. Применение программного конвейера инструментов биоинформатики для глиомы представлено в данной работе. Использование геновых сетей как параметра при создании предсказательных моделей машинного обучения показало свою эффективность для поиска лекарственных средств [49,50] и должно развиваться далее, опираясь на отечественные программные ресурсы [6,38].

Благодарности. Работа поддержана грантом бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0020 "Системная биология и биоинформатика: реконструкция, анализ и моделирование структурно-функциональной организации и эволюции геновых сетей человека, животных, растений и микроорганизмов". Авторы признательны П.А. Иванову-Ростовцеву и А.Ю. Потаповой за техническую помощь.

Список литературы / References:

1. Дохоян А.Ю., Глущенко М.В., Орлов Ю.Л. Реконструкция геной сети шизофрении для поиска генов-мишеней. *Ульяновский медико-биологический журнал*, 2022, т. 3, с. 6-22, doi: 10.34014/2227-1848-2022-3-6-22 [Dokhoyan A.Y., Glushchenko M.V., Orlov Y.L. Reconstruction of schizophrenia gene network to search for target genes. *Ulyanovsk Medical Biological Journal*, 2022, vol. 3, pp. 6-22 (In Russ.)].
2. Gubanov N.V., Orlova N.G., Dergilev A.I., Oparina N.Y., Orlov Y.L. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2021, vol. 18, p. 20210031, doi: 10.1515/jib-2021-0031.
3. Туркина В.А., Майорова А.А., Дергилев А.И., Красильникова А.А., Ланских Д.В., Кумейко В.В., Орлов Ю.Л. Компьютерный анализ структуры геной сети глиобластомы и опухолей мозга. *Сборник научных трудов VII Съезда Биофизиков России*: в 2 томах, том 1 - Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023, с. 294-295, doi: 10.26297/SbR6.2023.001 [Turkina V.A., Maiorova A.A., Dergilev A.I., Krasilnikova A.A., Lanskih D.V., Kumeiko V.V., Orlov Yu.L. Computer analysis of the structure of the gene network of glioblastoma and brain tumors. Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia: in 2 volumes, vol. 1 - Krasnodar: Printing house of FGBOU VO "KubGTU", 2023, pp. 294-295 (In Russ.)].
4. Anashkina A.A., Leberfarb E.Y., Orlov Y.L. Recent Trends in Cancer Genomics and Bioinformatics Tools Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, p. 12146, doi: 10.3390/ijms22212146.
5. Klimontov V.V., Koshechkin K.A., Orlova N.G., Sekacheva M.I., Orlov Y.L. Medical Genetics, Genomics and Bioinformatics-2022. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 10, p. 8968, doi: 10.3390/ijms24108968.
6. Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biol.*, 2011, vol. 11, no. 3-4, pp. 149-161, doi: 10.3233/ISB-2012-0449.
7. Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics*, 2020, vol. 21, suppl. 11, p. 228, doi: 10.1186/s12859-020-03557-8.
8. Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V. et al. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst Biol.*, 2015, vol. 9, suppl. 2, p. S2, doi: 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
9. Орлов Ю.Л., Шадеркин И.А., Орлова Н.Г., Рябков И.В., Лебедев Г.С. Цифровизация медицинского образования и телемедицина. *Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях*. Всероссийский симпозиум и школа-конференция молодых ученых, 27 октября - 3 ноября, 2021, Севастополь, Россия. Сборник трудов симпозиума. М.: Издательский дом "Граница", 2021, 355 с. 340-341 [Orlov Y.L., Shaderkin I.A., Orlova N.G., Ryabkov I.V., Lebedev G.S. Digitalization of Medical Education and Telemedicine. *Physico-Chemical Methods in Interdisciplinary Environmental Research*. All-Russian Symposium and School-Conference of Young Scientists, October 27 - November 3, 2021, Sevastopol, Russia. Symposium Proceedings. Moscow: "Granitsa" Publishing House, 2021, pp. 340-341 (In Russ.)].
10. Orlova N.G., Orlov Y.L. Problems of developing online training courses for students in digital disciplines using bioinformatics as an example. In: *Proceedings of the International Conference "Scientific research of the SCO countries: synergy and integration"*. Scientific publishing house Infinity, 2022, pp. 58-65.
11. Орлов Ю.Л., Анашкина А.А., Рябков И.В., Лисненко А.А., Лебедев Г.С. Цифровизация образования в медицине: дистанционное преподавание биоинформатики и научные исследования с использованием интернет-технологий. *Наука в инновационном процессе*: Материалы Международной научно-практической конференции (Москва, 1–2 декабря 2021 г.). М.: ИПРАН РАН, 2021, с. 222-226, doi: 10.37437/9785912941719-21-ss2 [Orlov Y.L., Anashkina A.A., Ryabkov I.V., Lisenko A.A., Lebedev G.S. Digitalization of Medical Education: Remote Teaching of Bioinformatics and Scientific Research Using Internet Technologies. *Science in the Innovative Process*: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (Moscow, December 1–2, 2021). Moscow: IPHRAS RAS, 2021, pp. 222-226 (In Russ.)].
12. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г., Иванова Е.Н., Мозылева Ю.А., Анашкина А.А. Реконструкция геной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. *Биомедицинская химия*, 2021, т. 67, вып. 3, с. 222-230, doi: 10.18097/PBMC20216703222 [Orlov Y.L., Galieva A.G., Orlova N.G., Ivanova E.N., Mozylova Y.A., Anashkina A.A. Reconstruction of the Parkinson's disease gene network for target gene identification. *Biomedical Chemistry*, 2021, vol. 67, iss. 3, pp. 222-230 (In Russ.)].
13. Тийс Р.П., Осипова Л.П., Галиева Э.Р., Личман Д.В., Воронина Е.Н., Мелихова А.В., Орлов Ю.Л., Филипенко М.Л. Полиморфизм вариантов гена N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) и анализ геной сети. *Биомедицинская химия*, 2021, т. 67, вып. 3, с. 213-221, doi: 10.18097/PBMC20216703213 [Tiis R.P., Osipova L.P., Galieva E.R., Lichman D.V., Voronina E.N., Melikhova A.V., Orlov Y.L., Filipenko M.L. Polymorphism of N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene variants and gene network analysis. *Biomedicinskaya himiya*, 2021, vol. 67, no. 3, pp. 213-221 (In Russ.)].
14. Osborn A.G., Louis D.N., Poussaint T.Y., Linscott L.L., Salzman K.L. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 2022, vol. 43, no. 7, pp. 928-937, doi: 10.3174/ajnr.A7462.

15. Byun Y.H., Park C.-K. Classification and Diagnosis of Adult Glioma: A Scoping Review. *Brain & Neurorehabilitation*. Korean Society for Neurorehabilitation, 2022, vol. 15, no. 3, pp. 3-5.
16. Chang S., Yim S., Park H. The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism. *Exp Mol Med.*, 2019, vol. 51, no. 6, pp. 1-17, doi: 10.1038/s12276-019-0230-6.
17. Qi S., Yu L., Li H. et al. Isocitrate dehydrogenase mutation is associated with tumor location and magnetic resonance imaging characteristics in astrocytic neoplasms. *Oncol Lett.*, 2014, vol. 7, no. 6, pp. 1895-1902, doi: 10.3892/ol.2014.2013.
18. Carrillo J.A., Lai A., Nghiemphu P.L. et al. Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 2012, vol. 33, no. 7, pp. 1349-1355, doi: 10.3174/ajnr.A2950.
19. Gritsch S., Batchelor T.T., Gonzalez Castro L.N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*, 2022, vol. 128, no. 1, pp. 47-58, doi: 10.1002/cncr.33918.
20. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Orlov Y.L., Churkina M.I., Berezina O.V., Gurazheva A.A., Ageeva T.A., Seregina O.B., Maksimov V.N. The Methylation of the p53 Targets the Genes MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A and MIR-34B/C in the Tumor Tissue of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Genes*, 2022, vol. 13, no. 8, p. 1401, doi: 10.3390/genes13081401.
21. Коновалов Н.А., Асютин Д.С., Шайхаев Е.Г., Капровой С.В., Тимонин С.Ю. Молекулярные биомаркеры астроцитом головного и спинного мозга. *Acta Naturae* (русскоязычная версия), 2019, т. 11, к. 2, № 41, с. 17-27 [Kononov N.A., Vasyutin D.S., Shaikhaev E.G., Kaprov S.V., Timonin S.Yu. Molecular biomarkers of astrocytomas of the brain and spinal cord. *Acta Naturae*, 2019, vol. 11, no. 2, no. 41, pp. 17-27 (In Russ.)].
22. Пушкин А.А., Тимошкина Н.Н., Росторгуев Э.Е. Экспрессионный статус 15-ти генов в глиальных опухолях головного мозга. *Исследования и практика в медицине*, т. 6, № Спецвыпуск, 2019, с. 230 [Pushkin A.A., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E. Expression status of 15 genes in glial tumors of the brain. *Research Practical Medicine Journal*, vol. 6, no. Special issue, 2019, p. 230 (In Russ.)].
23. Davis M.E. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin. Oncol. Nurs.*, 2018, vol. 34, no. 5, pp. 420-429, doi: 10.1016/j.soncn.2018.10.001.
24. Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I. et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, vol. 54, pp. 1.30.1-1.30.33, doi: 10.1002/cpbi.5.
25. Aleksander S.A., Balhoff J. et al. The Gene Ontology Consortium, The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 2023, vol. 224, no. 1, iyad031, pp. 2-12, doi: 10.1093/genetics/iyad031.
26. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N., Orlov Y.L., Seregina O.B. Clinical aspects of TP53 gene inactivation in diffuse large B-cell lymphoma. *BMC Med Genomics*, 2019, vol. 12, suppl. 2, pp. 35, doi: 10.1186/s12920-019-0484-9.
27. Xu Y., Tong X., Yan J., Wu X., Shao Y.W., Fan Y. Short-Term Responders of Non-Small Cell Lung Cancer Patients to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Display High Prevalence of TP53 Mutations and Primary Resistance Mechanisms. *Transl. Oncol.*, 2018, vol. 11, no. 6, pp. 1364-1369, doi: 10.1016/j.tranon.2018.08.010.
28. Побырзин В.В. Изменение экспрессии гена-супрессора TP53 в тканях крыс при экспериментальном аскаридозе на различных сроках наблюдения во время воспроизведения опухолевой модели глиомы крыс C6 in situ. *Международный научно-исследовательский журнал*, 2022, т. 9, № 123, с. 1, doi: 10.23670/IRJ.2022.123.20 [Pobyarzhin V.V. Changes in TP53 suppressor gene expression in rat tissues in experimental ascariasis at different observation periods during reproduction of the rat glioma C6 tumor model in situ. *International research journal*, 2022, vol. 9, no. 123, p. 1 (In Russ.)].
29. Tran P.M.H., Tran L.K.H., Satter K.B., Purohit S., Nechtman J., Hopkins D.I., Dos Santos B., Bollag R., Kolhe R., Sharma S., She J.X. Retrospective Validation of a 168-Gene Expression Signature for Glioma Classification on a Single Molecule Counting Platform. *Cancers (Basel)*, 2021, vol. 13, no. 3, p. 439, doi: 10.3390/cancers13030439.
30. Cohen S. Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. *J. Biol. Chem.*, 1962, vol. 237, no. 6, pp. 1555-1562.
31. Levi-Montalcini R., Booker B. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1960, vol. 46, no. 3, p. 373.
32. Tan S., Spear R., Zhao J., Sun X., Wang P. Comprehensive Characterization of a Novel E3-Related Gene Signature with Implications in Prognosis and Immunotherapy of Low-Grade Gliomas. *Front Genet.*, 2022, vol. 13, p. 905047, doi: 10.3389/fgene.2022.905047.
33. Wen J., Zhao W., Shu X. A novel cuproptosis-related LncRNA signature: Prognostic and therapeutic value for low grade glioma. *Front. Oncol.*, 2023, vol. 12, p. 1087762, doi: 10.3389/fonc.2022.1087762.
34. Xie J., Sun J., Feng J., Yang F., Wang J., Wen T., Nie Q. Kernel Differential Subgraph Analysis to Reveal the Key Period Affecting Glioblastoma. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, p. 318, doi: 10.3390/biom10020318.
35. Zhao B.-W., Su X.-R., Hu P.-W., Huang Y.-A., You Z.-H., Hu L. iGRLDTI: an improved graph representation learning method for predicting drug-target interactions over heterogeneous biological information network. *Bioinformatics*, 2023, vol. 39, no. 8, p. 2, btad45, doi: 10.1093/bioinformatics/btad451.
36. Babenko V.N., Gubanov N.V., Bragin A.O., Chadaeva I.V., Vasiliev G.V., Medvedeva I.V., Gaytan A.S., Krivoshapkin A.L., Orlov Y.L. Computer Analysis of Glioma Transcriptome Profiling: Alternative Splicing Events.

Journal of Integrative Bioinformatics, 2017, vol. 14, no. 3, p. 20170022, doi: 10.1515/jib-2017-0022.

37. Babenko V.N., Bragin A.O., Spitsina A.M., Chadaeva I.V., Galieva E.R., Orlova G.V., Medvedeva I.V., Orlov Y.L. Analysis of differential gene expression by RNA-seq data in brain areas of laboratory animals. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2016, vol. 13, no. 4, pp. 292, doi: 10.2390/biecoll-jib-2016-292.

38. Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The New Version of the ANDDigest Tool with Improved AI-Based Short Names Recognition. *Int J Mol Sci.*, 2022, vol. 23, no. 23, p. 14934, doi: 10.3390/ijms232314934.

39. Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Antropova E.A., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Primary and Secondary micro-RNA Modulation the Extrinsic Pathway of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Biol. (Mosk)*, 2023, vol. 57, no. 2, pp. 165-175, doi: 10.1134/S0026893323020103.

40. Brix T.J., Berentzen M., Becker L., Storck M., Varghese J. Development of a Command Line Interface for the Analysis of Result Sets from Automated Queries to Literature Databases. *Stud Health Technol Inform.*, 2023, vol. 302, pp. 162-166, doi: 10.3233/SHTI230095.

41. Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database (Oxford)*, 2011, vol. 2011, baq036, pp. 1-12, doi: 10.1093/database/baq036.

42. Veljkovic A.N., Orlov Y.L., Mitic N.S. BioGraph: Data Model for Linking and Querying Diverse Biological Metadata. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 8, p. 6954, doi: 10.3390/ijms24086954.

43. Orlov Y.L., Baranova A.V. Editorial: Bioinformatics of Genome Regulation and Systems Biology. *Front Genet.*, 2020, vol. 11, pp. 625, doi: 10.3389/fgene.2020.00625.

44. Orlov Y.L., Hofstaedt R.M., Kolchanov N.A. Introductory note for BGRS/SB-2014 special issue. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2015, vol. 13, no. 1, p. 1502001, doi: 10.1142/S0219720015020011.

45. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of multiple transcription factors binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2021, vol. 19, no. 1, p. 20200036, doi: 10.1515/jib-2020-0036.

46. Orlov Y., Dobrovolskaya O., Chen M., Hofstadt R. Bioinformatics of genome regulation and structure – 2020 papers collection. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2020 vol. 17, no. 4, p. 20200038, doi: 10.1515/jib-2020-0038.

47. Карпов О.Э., Клименко Г.С., Лебедев Г.С. Применение интеллектуальных систем в здравоохранении. *Современные наукоемкие технологии*, 2016, т. 7, с. 38-43 [Karpov O.E., Klimenko G.S., Lebedev G.S. Application of intelligent systems in healthcare. *Modern high technologies*, 2016, vol. 7, pp. 38-43 (In Russ.)].

48. Lebedev G., Polikarpov A., Golubev N., Tyurina E., Serikov A., Selivanov D., Orlov Y. The Geographic Information System of the Russian Ministry of Health. In: Czarnowski I., Howlett R., Jain L. (eds) *Intelligent Decision Technologies. IDT 2020. Smart Innovation, Systems and Technologies*, 2020, vol. 193, pp. 403-411. Springer, Singapore, doi: 10.1007/978-981-15-5925-9_34.

49. Xing X., Yang F., Li H. et al. Multi-level attention graph neural network based on co-expression gene modules for disease diagnosis and prognosis. *Bioinformatics*, 2022, vol. 38, no. 8, pp. 1-6, 2178-2186, doi: 10.1093/bioinformatics/btac088.

50. Oloulade B.M., Gao J., Chen J., Al-Sabri R., Wu Z. Cancer Drug Response Prediction with Surrogate Modeling-Based Graph Neural Architecture Search. *Bioinformatics*, 2023, btad478, doi: 10.1093/bioinformatics/btad478.

RECONSTRUCTION OF GENE AND ASSOCIATIVE NETWORKS OF DISEASES TO SEARCH FOR TARGET GENES

Turkina V.A.¹, Iarema P.O.¹, Mayorova A.A.¹, Orlova N.G.², Savina E.A.^{1,3}, Orlov Y.L.^{1,4}¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University)*Trubetskaya 8-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: vasundel@mail.ru*² Financial University under the Government of the Russian Federation*Leningradsky Ave, 49.2, Moscow, 125167, Russia*³ Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS*Vavilova str., 32, Moscow, 119991, Russia*⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS*Lavrentieva str., 10, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: orlov@d-health.institute*

Received 10.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0647

Abstract. Computer reconstruction of gene networks—sets of interacting macromolecules with common functions – is a complex task in bioinformatics. Gene networks, presented as graphical structures, offer a convenient means of visualization and provide qualitatively new insights into the set of studied genes and their biological functions. Expanding further, we explore associative gene networks related to diseases. These networks encompass not only genes and their products (proteins, metabolites, non-coding RNA and drug compounds) but also common disease indicators (symptoms, phenotypic manifestations). Software tools aimed at reconstructing gene network graphs are undergoing active development worldwide and find significant utility in biomedicine. We evaluate available online bioinformatics tools for gene network reconstruction based on gene lists and corresponding computer analysis pipelines. We delve into examples showcasing the utilization of online programs for analyzing the glioma gene network. The proposed approach can be extended to other functional gene sets linked to diseases. Scrutinizing the structure of disease-associated gene networks enables the identification of pivotal genes, which can serve as therapeutic targets. Employing similar bioinformatics strategies, gene networks of intricate disorders such as Parkinson's disease, dementia, schizophrenia, breast cancer, and other cancers have been explored. We delve into the applications of computer programs for gene network analysis and address pedagogical aspects of the field.

Key words: *bioinformatics, gene networks, glioma, complex diseases, protein-protein interactions, medical informatics.*

ФОТОМЕТРИЯ МДА В РАСТВОРАХ: СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПРЯМЫХ ДАННЫХ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ И АНАЛИЗА ПРОИЗВОДНЫХ СПЕКТРОВ ОПТИЧЕСКОГО ПОГЛОЩЕНИЯ

Смирнова О.Д.¹, Калашникова И.В.¹, Курбатов Г.А.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение НИЦ «Курчатовский институт»
ул. Площадь Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ; e-mail: smirnova@ksana@ya.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Ленинские горы, д. 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 04.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0648

Аннотация. Проанализированы спектры поглощения продуктов реакции водных экстрактов тканей мышей с тиобарбитуровой кислотой, с целью определения в них содержания малонового диальдегида (МДА). Концентрация МДА является важной частью анализа окислительно-восстановительного статуса тканей, что существенно при исследовании воспалительных реакций, например, после различных стрессовых воздействий, а также при изучении старения. В обычной практике концентрацию МДА в растворе рассчитывают по его оптической плотности при 532 нм, соотнося с аналогичными растворами реакции с заданными концентрациями тетраметоксипропана (ТМП). Нами показано, что при субмикромольном содержании МДА флуктуации неспецифического фонового уровня оптической плотности растворов могут быть соразмерны с величиной реального сигнала поглощения образующегося окрашенного аддукта. Растворы экстрактов биологических тканей, в силу дополнительного содержания белков, липидов и углеводов, обладают мутностью, искажающей спектр поглощения нелинейно. Однако вторые производные спектров лишены искажений фонового рассеяния и могут быть использованы при автоматическом программном расчете содержания интересующего пигмента. Получение корректных производных осложняется необходимостью сглаживания исходных спектральных зависимостей. Мы использовали сглаживание методом скользящей средней, а также фильтром Савицкого – Голея с полиномом третьей степени. Сопоставлены данные, полученные на основе измерения оптических плотностей растворов при 532 нм, с таковыми на основе анализа вторых производных их спектров поглощения, а также на основе интегральных сумм вторых производных в диапазоне 520-550 нм. Результаты расчётов при помощи анализа вторых производных дали в 2-5 раз меньшее содержание МДА, чем полученные на основании оптических плотностей в максимуме поглощения пигмента, однако их сходимость, особенно при использовании интегральных сумм, оказалась существенно лучше, чем для нулевого порядка, и результирующие погрешности были в 2-3 раза меньшими.

Ключевые слова: спектроскопия производных, сглаживание спектров, малоновый диальдегид (МДА), печень, лёгкие и головной мозг мышей, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

При количественном измерении содержания пигментов в биологических экстрактах спектрофотометрическими методами исследователи могут заметить спектральные искажения вследствие многокомпонентного рассеяния растворов [1]. Флуктуации общего уровня оптической плотности вблизи полосы поглощения целевого вещества могут быть сопоставимы с амплитудой его поглощения в анализируемом экстракте, что ухудшает чувствительность и точность определения. В то же время известно, что низкочастотный шум типа сплошного фонового поглощения или рассеяния отбрасывается в режиме производной спектроскопии [2], а высокочастотный – возможно подавить в режиме сглаживания [3]. Однако, по мере увеличения порядка взятия производных увеличивается и уровень шума [4,5]. Поэтому в качестве оптимального решения удобно использовать вторые производные спектров поглощения.

Спектроскопия малонового диальдегида (МДА), продукта перекисного окисления липидов, основана на специфическом полосе поглощения вблизи 532 нм его продукта реакции в кислой среде с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [6-8]. Малоновый диальдегид и другие тиобарбитуровые реактивные вещества (TBARS) конденсируются с двумя эквивалентами ТБК с образованием флуоресцентного красного производного, которые и детектируют спектрофотометрически [6-10]. В большом количестве методик рекомендуется просто измерение оптической плотности растворов при 532 нм. По её результатам для калибровочных растворов 1,1,3,3-тетраметоксипропана (используемого в качестве стандарта, предполагая, что 1 моль ТМП даёт такое же количество пигмента в реакции с ТБК, что и 1 моль МДА) получают калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации. При этом сходимость данных, получаемых разными исследователями, оставляет желать лучшего [9]. Более того, измеряемые количества МДА часто представляют в виде отношения к содержанию общего белка в растворе, что также вносит дополнительные вариации и погрешности в результаты.

Данная работа фокусируется на спектроскопии TBARS для определения содержания МДА в водных экстрактах тканей мышей, что является полезным инструментом в анализе окислительно-восстановительного статуса тканей при различных стрессовых воздействиях, в том числе после ионизирующего облучения [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы ткани самок и самцов мышей линии C57Bl/6J, возрастом около 10 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № НГ-1/109ПР от 13.02.2020). Животных декапировали, извлекали головной мозг, лёгкие и печень, органы взвешивали и гомогенизировали в 1,15% растворе KCl с добавлением 0,05% бутилгидрокситолуола в виде его 10% раствора в метаноле (для предотвращения дальнейшего окисления). Гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 14000g и 4°C, отбирали супернатанты, – которые подвергали реакции в кислой среде с раствором ТБК в течение 60 минут при 90°C. При этом к 0,5 мл экстракта добавляли 0,5 мл 1% Тритон-Х100 в 0,05N-HCl и 0,5 мл 0,67% ТБК в 0,05N-NaOH. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры, добавляли по 0,25 мл 40% трихлоруксусной кислоты для осаждения белка и, после 20-минутного центрифугирования при 14000 g и 25°C, отбирали супернатант для спектрофотометрического анализа.

Спектрофотометрию растворов проводили в 2-мм кварцевых кюветках на спектрофотометре Shimadzu UV3600 при средней скорости сканирования, с шагом 0,1 нм, с временным интервалом 0,1 с, при ширине щели 2 нм в диапазоне 450-600 нм. Данные, полученные для растворов с ТМП, использовали для построения калибровочных зависимостей данных функции оптической плотности от концентрации МДА. Затем из данных для оптических плотностей растворов с экстрактами тканей по этим зависимостям рассчитывали содержание МДА в 10% экстрактах.

Для анализа вторых производных спектры оптической плотности $f(x)$ подвергали сглаживанию методом скользящей средней по 39 точкам, т.е. внутри 4-нм диапазона, а также, в качестве способа сравнения, кубическими сплайнами на скользящем 10-нм интервале фильтром Савицкого – Голея [11] с шириной окна в 100 точек. От сглаженных функций строили первую производную $f'(x)$, которую также сглаживали и после рассчитывали вторую производную $f''(x)$. Для полноты учёта разброса данных сигнала поглощения рассчитывали также интегральные суммы второй производной внутри пика поглощения $\int_{520}^{550} f''(x)$.

Содержание белка в экстрактах тканей при этом определяли по методу Смита, в реакции с бичинхониновой кислотой [12]. В качестве стандарта использовали свежеприготовленный раствор 10 мг/мл БСА в 1,15% растворе KCl. Реакцию и фотометрию проводили в 96-луночных планшетах. Спустя 30 мин реакции при 37°C оптическую плотность растворов измеряли на планшетном фотометре iMark с фильтром 570 нм. По полученным данным оптических плотностей для различных концентраций БСА получали калибровочную зависимость оптической плотности от содержания белка, – на основании которых определяли среднее содержание белка в каждом отдельном экстракте по 3 точкам гомогената ткани различного разведения. При расчёте данных по МДА относительно содержания белка отношение рассчитывали для каждого отдельного образца ткани отдельного животного, вычисляли отношение измеренной в нём концентрации МДА к измеренной в нём концентрации белка, – а затем эти данные усредняли по группе из 5 образцов данной ткани для разных животных. Статистические различия выборок определяли с использованием t-критерия Стьюдента двухвыборочным тестом с неравными двусторонними дисперсиями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вид спектров поглощения растворов стандарта (ТМП) разной концентрации и их вторых производных представлен на рисунке 1.

Обобщенные калибровочные графики зависимости значения оптической плотности на длине волны 532 нм, производных второго порядка и их интегральных сумм 520-550 нм от концентрации ТМП имели вид, представленный на рисунке 2 а-в.

На основе полученных линейной аппроксимацией этих калибровочных зависимостей (рис. 2а, 2в) от концентрации ТМП в растворе (x): значений оптической плотности в максимуме $f_{532\text{нм}}(x)$, соответствующего значения второй производной $f''_{532\text{нм}}(x)$ (б) и площади ее пика от 520 до 550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (в) по аналогичным данным растворов реакции экстрактов тканей с ТБК (см. пример на рис. 3) – было рассчитано содержание МДА в соответствующих 10% экстрактах.

Можно заметить, что исходные спектры оптической плотности сильно варьируют вследствие флуктуации неспецифического фонового уровня поглощения раствора. Еще в большей степени такие скачки общего фонового поглощения наблюдались для растворов реакции экстрактов тканей, несмотря на суммарно двойное центрифугирование. Примеры спектров растворов реакции с ТБК для гомогенатов печени самок мышей представлены на рисунке 3.

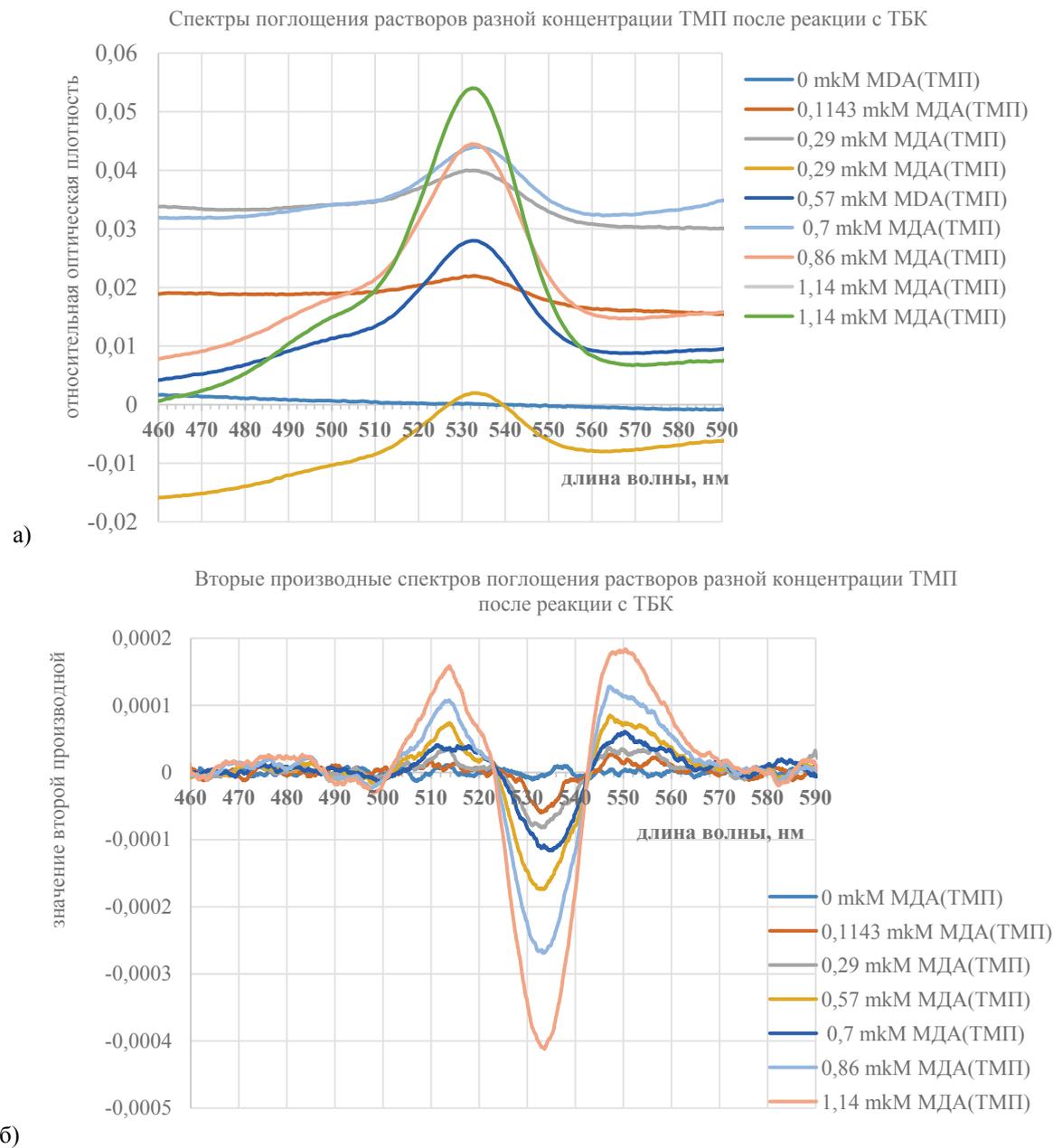


Рисунок 1. Примеры спектров оптической плотности растворов реакции различных концентраций ТМП с ТБК (а) и их вторых производных (б)

Можно заметить, что общий уровень фонового поглощения растворов флукуирует с амплитудой большей, чем сигнал поглощения окрашенного аддукта в этих растворах. Поэтому для корректного учета содержания пигмента в растворе единственного значения оптической плотности в максимуме поглощения недостаточно, – необходимы математические преобразования данных, с учетом значений оптической плотности на участках спектра, где нет поглощения целевого вещества.

В результате обратных расчетов по аппроксимирующим зависимостям значений разных порядков производной функций оптической плотности от содержания МДА были рассчитаны количества МДА в растворах реакции тканей мышей, отдельно для каждой особи, и затем они были усреднены по 5 значениям для каждой экспериментальной группы. Средние значения содержания МДА в растворе каждого типа ткани, полученные с использованием различного типа сглаживающих процедур, представлены в таблице 1, а также наглядно отображены на гистограммах рисунке 4. Гистограмма 4б сопоставляет разные способы сглаживающих процедур и отражает хорошую сходимость при анализе именно интегральных сумм пика второй производной.

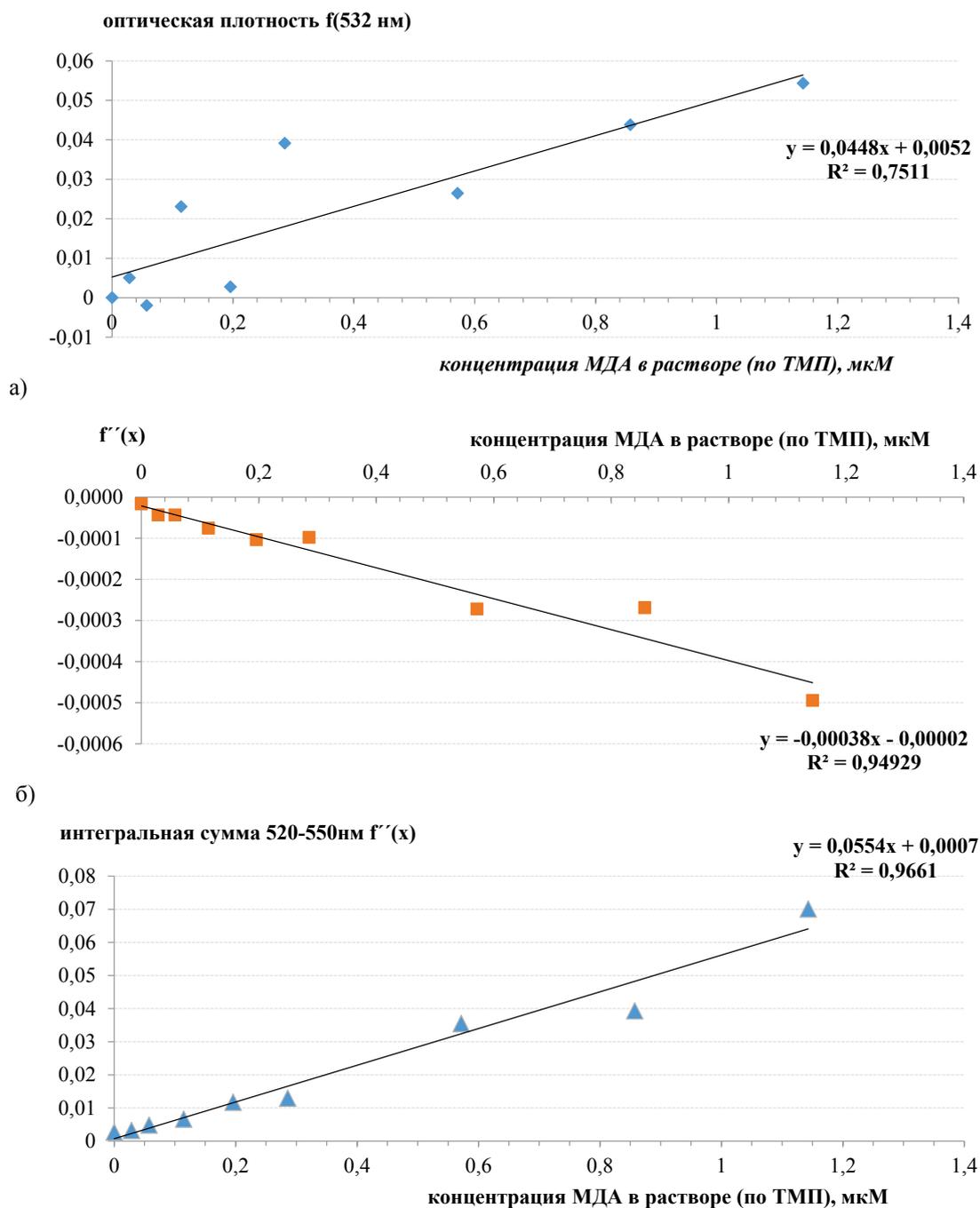
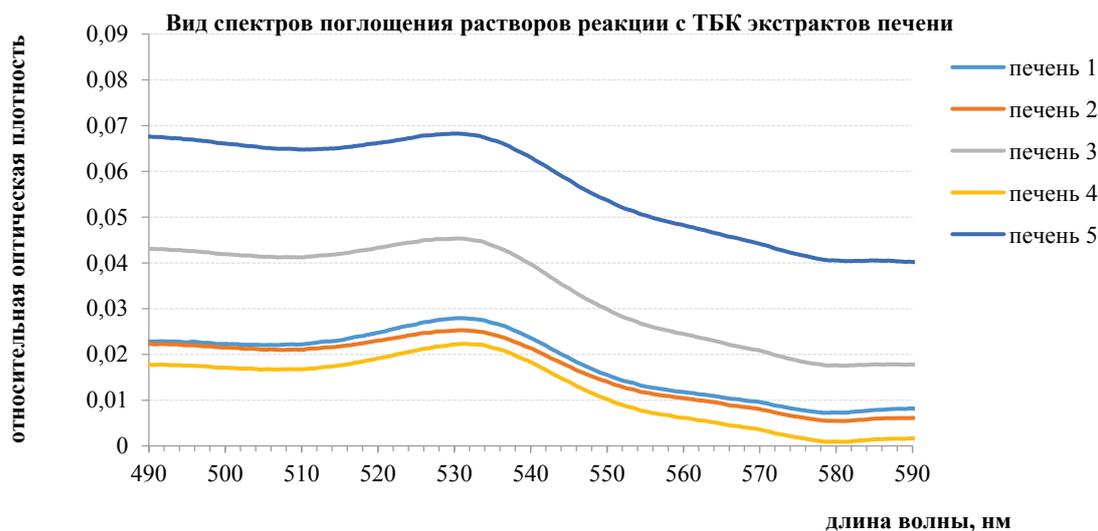


Рисунок 2. Значения оптической плотности при 532 нм для различных концентраций ТМП и построение аппроксимирующей зависимости на их основе (а), а также зависимостей для соответствующих значений второй производной $f''_{532\text{нм}}(x)$ (б) и площади ее пика от 520 до 550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (в)

Из полученных данных видно, что вследствие, по-видимому, повышенной мутности экстрактов биологических тканей, данные по содержанию пигмента, полученные только на основании значений оптической плотности на одной длине волны, получаются завышенными, с сильной вариацией. Анализ вторых производных функции поглощения показывает лучшую сходимость для растворов одинакового типа и поэтому видится более корректным для использования в расчётах содержания МДА. Общая сходимость между различными сглаживающими процедурами обнаруживается лучшей при использовании в расчетах интегральных сумм $\int_{520}^{550} f''(x)$.

Чтобы отнести полученные количества МДА в экстрактах к содержанию в них белка, как это принято при представлении данных во многих исследованиях, для нормализации количества клеточной массы [9], реакция на белок была проведена в соответствии с методикой [12] – и были рассчитаны количества белка по данным калибровочной зависимости по стандартному раствору БСА 10 мг/мл, представленной на рисунке 5.



а)



б)

Рисунок 3: Примеры спектров оптической плотности 5 образцов продуктов реакции экстрактов печени самок мышей с ТБК (а) и соответствующих вторых производных (б)

Таблица 1. Содержание МДА в экстрактах тканей (П – печень, Л – лёгких и М – мозга) в группах самок (♀) и самцов (♂) мышей, рассчитанные по оптической плотности при 532 нм, а также после сглаживания двумя способами на основании функций аппроксимации, показанных на рисунке 2. Представлены средние по 5 особям значения ± стандартная ошибка среднего (* обозначены обнаруженные достоверные различия между выборками самцов и самок по 5 особей)

пол и орган	Концентрация МДА, мкМ				
	$f_{532\text{нм}}$	Сглаживание скользящими средними		Сглаживание фильтром Савицкого-Голея	
		$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$	$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$
♀П	2,62±0,74	0,93±0,06	0,91±0,04*	1,18±0,06	1,09±0,05
♂П	4,51±1,10	0,85±0,09	0,54±0,08	0,77±0,11	0,64±0,10
♀Л	2,34±0,53	0,52±0,09	0,52±0,10	0,69±0,10	0,63±0,12
♂Л	1,58±0,12	0,59±0,10	0,34±0,04	0,50±0,08	0,37±0,05
♀М	1,10±0,83	0,29±0,03*	0,19±0,01	0,25±0,01	0,17±0,01
♂М	2,48±2,1	0,42±0,05	0,23±0,04	0,28±0,05	0,21±0,06

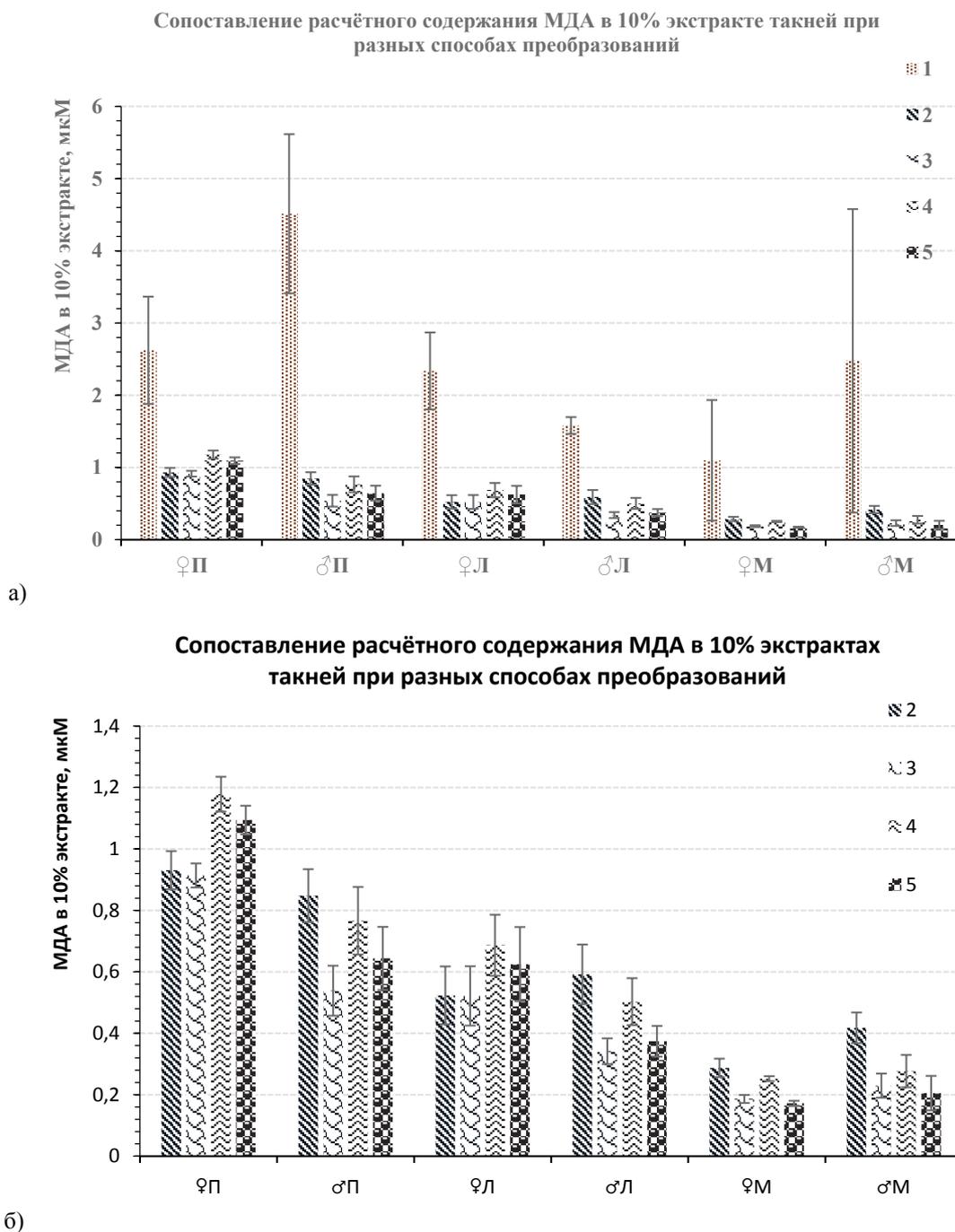


Рисунок 4. Сопоставление данных рассчитанного различными способами содержания МДА в экстрактах тканей: по данным поглощения в максимуме $f_{532\text{нм}}$ (столбики 1 на рис. 4а), а также по значениям второй производной при 532 нм (столбики 2 и 4) и площади её пика 520-550 нм в виде интегральной суммы $\int_{520}^{550} f''(x)$ (столбики 3 и 5), после разных сглаживающих процедур: столбцы 2 и 3 – скользящей средней, столбцы 4 и 5 – после предварительных преобразований фильтром Савицкого-Голея. Гистограмма 4б наглядно отражает хорошую сходимость данных при анализе именно интегральных сумм пика второй производной

По результатам аналогичной реакции растворов с исследуемыми экстрактами тканей были рассчитаны количества белка в каждом 10% экстракте для каждого раствора отдельного животного по данным его 3 различных разведений, опираясь на аппроксимирующую зависимость, представленную на рисунке 5. Далее, используя рассчитанные прежде разными способами количества МДА в 10% экстракте, рассчитывали отношение содержания МДА к белку. Полученные средние значения представлены в таблице 2. Измеренное таким образом количество белка в 10% экстрактах тканей очень варьировало внутри каждой группы и в сильной степени зависело от температурных режимов экстракции.

Содержание белка в экстрактах печени самцов было проведено с изменением методики и не будет здесь рассмотрено.

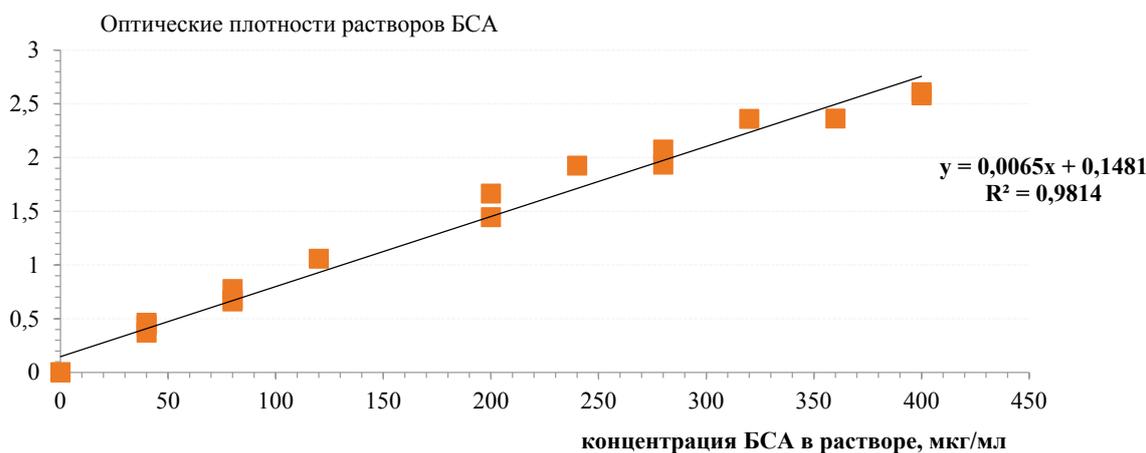


Рисунок 5. Калибровочная зависимость оптической плотности растворов 30-минутной реакции БСА с бицинхониновой кислотой и Cu_2SO_4

Оценка содержания белка описанным методом подвержена тем же искажениям, приводящим к высоким погрешностям, как и при определении содержания МДА и, возможно, стоило бы провести аналогичную процедуру спектрального анализа всех использованных растворов реакции с бицинхониновой кислотой и Cu_2SO_4 в диапазоне 550–650 нм. Этот ретроспективный вывод будет нами учтён при дальнейших исследованиях.

По данным расчетов, полученных после сглаживания методом скользящей средней, в 10% экстрактах печени нет различий по содержанию МДА между самцами и самками. В 10% экстрактах лёгких не обнаружено различий по содержанию МДА между самцами и самками. При сглаживании скользящими средними в экстрактах мозга обнаружены различия по содержанию МДА между самцами и самками только при расчёте с опорой на значение второй производной при 532 нм (но не при использовании её интегральных сумм), – с более низкими значениями МДА у группы самок по сравнению с самцами. При сглаживании фильтром Савицкого-Голея таких различий не выявлено. Обобщая эти данные, можно сделать вывод об отсутствии достоверных различий в уровне МДА ткани печени, лёгких и головного мозга между самцами и самками мышей линии C57Bl/6J.

Между двумя методами сглаживания проявились достоверные различия только в случае экстрактов печени самцов: данные, сглаженные скользящим средним, полученные при помощи интегральных сумм пика второй производной отличаются от полученных при её значении на 532 нм. При этом данные значений второй производной при 532 нм не различаются с данными, полученными после сглаживаний фильтром Савицкого-Голея с полиномами третьей степени. Сходимость данных между разными способами учёта второй производной после сглаживания кубическими полиномами, в целом, лучше.

Из сопоставления полученных данных мы заключили, что слепое использование единственного значения оптической плотности на одной длине волны не отражает реальную амплитуду пика и даёт завышенные результаты, получаемые с высокой погрешностью, которую уменьшает использование метода анализа вторых производных спектров. Вычленение истинной амплитуды сигнала поглощения можно сделать при графическом анализе спектров, что затруднительно при множественных рутинных измерениях. Напротив, сглаживание и расчёт производных легко автоматизируется, что упрощает получение итоговых результатов и улучшает сходимость данных.

Таблица 2. Содержание МДА на 1 мг белка в экстрактах тканях мышей, при использовании разных способов сглаживания, усреднённые по 5 образцам каждого 10%-экстракта Представлены средние по 5 особям значения \pm стандартная ошибка среднего (* обозначены достоверные межполовые различия выборок по 5 особей)

пол и орган	содержание белка, мг/мл	МДА/белок, нмоль/мг				
		$f_{532\text{нм}}$	Сглаживание скользящими средними		Сглаживание фильтром Савицкого-Голея	
			$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$	$f''_{532\text{нм}}(x)$	$\int_{520}^{550} f''(x)$
♀П	8,8 \pm 0,8	0,32 \pm 0,11	0,109 \pm 0,013	0,106 \pm 0,010	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
♀Л	8,9 \pm 0,8	0,27 \pm 0,07	0,058 \pm 0,009	0,058 \pm 0,007	0,077 \pm 0,007	0,069 \pm 0,010
♂Л	8,6 \pm 1,3	0,21 \pm 0,05	0,077 \pm 0,023	0,045 \pm 0,011	0,067 \pm 0,020	0,049 \pm 0,013
♀М	5,4 \pm 0,7	0,23 \pm 0,17	0,057 \pm 0,009	0,036 \pm 0,004	0,049 \pm 0,007	0,034 \pm 0,004
♂М	8,2 \pm 1,4	0,48 \pm 0,46	0,060 \pm 0,019	0,034 \pm 0,013	0,041 \pm 0,017	0,032 \pm 0,016

Сопоставление полученных концентраций МДА с другими исследованиями [7-9, 13-15] показывает, что значения, полученные на основании оптических плотностей только на одной длине волны максимума поглощения, лучше согласуются данными, полученными аналогичным методом [14]. Однако спектральный анализ показывает некорректность такой методики, а результаты, полученные методом анализа вторых производных, лучше согласуются с данными, получаемыми методами ВЭЖХ и газовой хромато-масс-спектрометрии [9,13-15].

Также на получаемые значения МДА в экстрактах тканей в сильной степени влияет использование либо нет антиоксидантов, в частности БГТ. Можно предположить, что этот момент также является важной причиной широкого разброса данных, получаемых разными исследователями при измерениях МДА. В большинстве публикаций при описаниях метода о введении БГТ не упоминается. Согласно нашим экспериментальным исследованиям, без введения ТБК в гомогенат ткани, определяемый в нём уровень МДА описанным методом оказывается в несколько раз выше, чем с добавлением ТБК, и растёт со временем хранения экстракта (данные здесь не представлены). Это может быть следствием реакций эндогенных ферментов тканей с липидами при гомогенизации. Эффект полностью нивелируется введением антиоксиданта. Поэтому для чистоты результатов анализа мы рекомендуем вводить БГТ или иной антиоксидант на стадии гомогенизации. Ещё одним существенным параметром является температура охлаждения смеси после реакции с ТБК. Если до начала реакции количество белка в экстракте стоит минимизировать, например, холодным центрифугированием, то после появления аддукта для стабильности результирующего коллоидного раствора плавные понижения температуры ниже комнатной могут привести к образованию окрашенного нерастворимого осадка. В то же время, резкое замораживание и оттаивание не изменяет детектируемое содержание МДА в нём.

В конечные данные с соотношением МДА к белку также вносит погрешность методика анализа на белок, основанная на анализе оптической плотности на одной длине волны, которая также может быть улучшена по сходимости данных при анализе производных спектров поглощения получаемых растворов.

ВЫВОДЫ

Визуализация спектральных данных оптического поглощения растворов реакции экстрактов тканей животных с ТБК показывает, что метод измерения единственного значения оптической плотности на одной длине волны обладает неудовлетворительной точностью для анализа содержания МДА в нём. Показано, что расчетные количества МДА, полученные на основании только значений оптической плотности растворов реакции тканей с ТБК при 532 нм, могут быть в несколько раз выше данных, получаемых при анализе производных функций поглощения. Анализ вторых производных спектров показывает лучшую сходимость и в несколько раз меньшую вариацию. Наиболее корректным способом расчета нам видится использование интегральных сумм второй производной на участке пика поглощения пигмента, отражающих заметаемую ею площадь пика, что учитывает возможные спектральные уширения. Также показано, что получаемые значения могут зависеть от способа сглаживания исходных спектров поглощения.

Анализ содержания МДА в тканях печени, лёгких и головного мозга самцов и самок мышей не выявил существенных различий между полами.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в получении данных научному сотруднику «Курчатовского института» Малахову С.Н.

Также авторы выражают огромную благодарность Токтомаматову М.Н. и его научному руководителю д.м.н., проф., зав. лаб. адаптационной медицины ФФМ МГУ, Архипенко Ю.В. за идею спектроскопии производных в применении к определению содержания МДА, опубликованную в открытом источнике в виде курсовой работы «Оценка уровня малонового диальдегида в крови».

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «Оптика» НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы / References:

1. Пушкарева А.Е. *Методы математического моделирования в оптике биоткани*. Учебное пособие. СПб: СПбГУ ИТМО, 2008, 103 с. [Pushkareva A.E. *Methods of mathematical modeling in biotissue optics*. Study guide. St. Petersburg: St. Petersburg State University ITMO, 2008, 103 p. (In Russ.)].
2. Bridge T.P., Fell A.F., Wardman R.H. Perspectives in derivative spectroscopy, Part 1-Theoretical principles. *JSDS*, 1987, vol. 103, no 1, pp.17-27, doi: 10.1111/j.1478-4408.1987.tb01081.x.
3. O'Haver, Thomas C. and T.H. Begley. Signal-to-noise ratio in higher order derivative spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1981, vol. 53, pp. 1876-1878, doi: 10.1021/AC00235A036.
4. Sahini K., Nalini Dr.C.N. A review on derivative spectroscopy and its benefits in drug analysis. *IJCRT*, 2020, vol. 8, iss. 12, ISSN: 2320-2882.
5. Howard M., Workman Jr. Derivatives in Spectroscopy. Part II - The True Derivative. *Spectroscopy*, 2003, vol. 18, no. 9, p. 25.
6. Костюк А.И., Котова Д.А., Демидович А.Д. и др. Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии. *Вестник РГМУ*, 2019, 1, с. 50-57 [Kostyuk A. I.,

- Kotova D.A., Demidovich A.D. et al. Changes in key parameters of lipid metabolism in rat brain tissues during permanent ischemia. *Bulletin of RSMU*, 2019, vol. 1, pp. 50-57 (In Russ.).
7. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 95, no. 2, pp. 351-358.
 8. Moselhy H.F., Reid R.G., Yousef S., Boyle S.P. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J. Lipid Res.*, 2013, vol. 54, pp. 852-858.
 9. Domijan A.-M., Ralic J., Brkanac S.R., Rumora L., Zanic-Grubisic T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomedical Chromatography*, 2015, vol. 29, iss. 1, pp. 41-46.
 10. Gulbahar O., Aricioglu A., Akmansu M., and Turkozer Z. Effects of Radiation on Protein Oxidation and Lipid Peroxidation in the Brain Tissue. *Transplantation Proceedings*, 2009, vol. 41, pp. 4394-4396.
 11. Savitzky A., Golay M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Analytical Chemistry*, 1964, vol. 36, no. 8, pp. 1627-1639.
 12. Smith P.K., Krohn O.H., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, vol. 150, no. 1, pp. 76-85.
 13. Zelzer S., Oberreither R., Bernecker C., Stelzer I., Truschnig-Wilders M., Fauler G. Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry-comparison with high-performance liquid chromatography methology. *Free Radic Res.*, 2013, vol. 47, no. 8, pp. 651-656, doi: 10.3109/10715762.2013.812205.
 14. Ran Y., Wang R., Gao Q., Jia Q., Hasan M., Awan M.U., Tang B., Zhou R., Dong Y., Wang X., Li Q., Ma H., Deng Y., Qing H. Dragon's blood and its extracts attenuate radiation-induced oxidative stress in mice. *J Radiat Res.*, 2014, vol. 55, no. 4, pp. 699-706.
 15. Tsikas D., Rothmann S., Schneider J.Y., Suchy M.-T., Trettin A., Modun D., Stuke N., Maassen N., Frolich J.C. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 α and nitric oxide (NO). *Journal of Chromatography B*, 2016, vol. 1019, pp. 95-111.

MDA PHOTOMETRY IN SOLUTIONS: COMPARISON OF METHODS OF DIRECT OPTICAL DENSITY DATA AND DERIVATIVE SPECTROSCOPY

Smirnova O.D.¹, Kalashnikova I.V.¹, Kurbatov G.A.²

¹ Federal State Budgetary Institution SIC "Kurchatov Institute"

Kurchatov Square str., Moscow, 123182, Russia; e-mail: smirnovaoksana@ya.ru

² Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 1, p. 2, Moscow, 119991, Russia

Received 14.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0648

Abstract. In this study, we analyzed the absorption spectra of the reaction products of aqueous extracts of mouse tissues with thiobarbituric acid, with the aim to determine the concentration of malonic dialdehyde (MDA) in them. The concentration of MDA is an important part of the analysis of the redox status of tissues, which is important in the study of inflammatory reactions, for example, after various stressful effects, as well as in the study of aging. In normal practice, they calculate the concentration of MDA in a solution by its optical density at 532 nm, then these data are related with similar solutions of the tetramethoxypropane (TMP) reaction with known concentration. We have shown that in cases of submicromolar MDA content, fluctuations in the nonspecific background level of the optical density of solutions can be commensurate to the magnitude of the actual absorption signal of the resulting colored adduct. Solutions of biological tissue extracts, due to the additional content of proteins, lipids and carbohydrates, are characterized by turbidity, which distorts the absorption spectrum non-linearly. The second derivatives of the absorption spectra deprived of background scattering distortions and can be used for automatic software calculation of the pigment content. Obtaining correct derivatives is complicated by the need to smooth the original spectra. We used two smoothing methods: the moving average method and the Savitsky-Goley filter with a polynomial of the third degree. We compared the data obtained on the basis of measuring the optical densities of solutions at 532 nm with those based on the analysis of the second derivatives of their absorption spectra, and also on the basis of integral sums of the second derivatives in the range of 520-550 nm. The results of calculations using the second derivatives gave 2-5 times lower concentrations of MDA than those obtained from optical densities at the maximum absorption of the adduct. At the same time, the convergence of the data, especially when using integral sums of the second derivatives, turned out to be significantly better than for the zero order, and the resulting errors were 2-3 times smaller.

Key words: derivative spectroscopy, smoothing of spectra, malondialdehyde (MDA), liver, lungs and brain of mice, oxidative stress.

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ В МЕДИЦИНЕ: ГРАФЕН И ПОЛИГРАФЕН КАК ВОЗМОЖНОЕ СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ ПРИ ОНКОЛОГИИ КИШЕЧНИКА

Ботин А.С.^{1,2}, Машал Д.А.¹, Попова Т.С.², Ризк М.Г.Х.¹, Кордова А.В.¹

¹ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»,
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

Поступила в редакцию 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0649

Аннотация. В работе рассматривается одно из важнейших направлений в современной фармакологии – адресная доставка лекарственных препаратов, а именно направленный транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, которая реализуется при помощи носителей, имеющих, как правило, размеры в десятки или сотни нанометров, различную природу и химическое строение. Обсуждается доставка противоопухолевых препаратов с помощью наночастиц. Имобилизация лекарств на наноносителях позволяет повысить их биодоступность. Различные производные графена – оксид графена (GO) и восстановленный оксид графена (RGO) – тестируются в качестве носителей для доставки лекарств. Для адресной доставки лекарств в онкологии есть несколько подходов. Первый, простой – прикрепление, как низко-, так и высокомолекулярного препарата на поверхность носителя напрямую. Препарат доксорубин, прочно связанный с поверхностью оксида графена и высвобождается только в кислотной среде опухоли. Второй, более сложный способ – прикрепить к поверхности носителя не только действующее вещество, но и направляющие молекулы – лиганды. Иногда сам лиганд может быть одновременно и лекарством. ПолиГрафен (ПГ) – оригинальный модифицированный аналог терморасщепленного графита, получен в виде новой формы расширенного графита, после многократной химической модификации и термоактивации приводится к характеристикам слоистого материала со стопками углеродных монослоев меньшей кратности (от 5 до 50), вплоть до одиночных листов графена. Приведены результаты испытаний ПГ в качестве действующей основы для иммобилизации ферментов, в частности, на примере противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. Эти данные указывают на перспективность возможного биомедицинского применения ПГ в онкологии, а именно, при лечении рака кишечника. Модифицированные формы графена и полиграфена следует рассматривать как новый переносчик лекарственных средств.

Ключевые слова: графен, полиграфен, доставка лекарств, онкология кишечника.

Введение. Актуальность исследуемой темы обусловлена высокой ролью графена как средства доставки лекарств. Одним из важнейших направлений в современной фармакологии является адресная доставка лекарственных препаратов. Такая доставка предполагает направленный транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, органа или клетки. Она реализуется при помощи носителей, имеющих, как правило, размеры в десятки или сотни нанометров, различную природу и химическое строение.

В последние годы большинство ученых заняты поиском высокоэффективного переносчика лекарств в организме человека. Такой переносчик должен быть точным, безопасным, общедоступным, иными словами – эффективным. В частности, исследованы магнитные частицы и углеродные нанотрубки, липосомы и биополимеры в качестве средства доставки лекарств.

Целью данной работы является оценка возможности применения графена и графенсодержащих углеродных носителей, как объектов и способов направленной доставки лекарств. Наряду с проведением анализа, систематизацией и обобщением существующих данных, изложить результаты собственных исследований. Для этого необходимо рассмотреть следующие аспекты задачи: 1) описать особенность структуры графена; 2) охарактеризовать уникальные свойства графена; 3) рассмотреть способы применения графена; 4) изучить возможности использования графена в доставке лекарств.

Одним из перспективных и стремительно развивающихся направлений современной фармакологии является адресная (или таргетная) доставка лекарственных препаратов. Несмотря на достижения медицины в лечении ряда заболеваний, многие лекарственные препараты обладают серьезным недостатком – негативным воздействием на интактные ткани.

Начиная с последних десятилетий 20-го века, активно разрабатывается доставка противоопухолевых препаратов с помощью наночастиц. Наночастицы проникают в опухоль благодаря так называемому эффекту «повышенной проницаемости и удержания» [1].

Наноносители. Имобилизация лекарств на наноносителях позволяет повысить их биодоступность, улучшая растворимость и обеспечивая преодоление различных барьеров, например, гематоэнцефалического барьера, снизить влияние на организм в целом, в то же время целенаправленно воздействуя на поврежденную область. Имобилизованные на наноносителях препараты открывают новые перспективы для эффективного лечения различных очаговых патологических процессов, например, раковых опухолей, патологии сердца, в том числе ишемической болезни сердца, воспалительных процессов и т. д.

Использование систем из лекарственных препаратов, закрепленных на химически модифицированных нанодисперсных носителях, способных отвечать изменением структуры на стимуляцию со стороны окружающей среды, дает новые интересные возможности для управления процессом направленной доставки препаратов, поскольку наночастица перестает быть пассивным переносчиком лекарства и становится активным участником процесса доставки. Преимущества таких наночастиц особенно очевидны в ситуации, когда изменения физико-химических свойств вне или во внутриклеточной среде являются уникальными для определенного патологического процесса или заболевания. К таким свойствам среды относят pH, температуру и окислительно-восстановительное равновесие [2].

В качестве носителей лекарственных препаратов в настоящее время наиболее активно изучаются углеродные нанотрубки, липосомы, полимеры, дендримеры, фуллерены, магнитные наночастицы, нанодисперсные кремнеземы [3].

По данным, вплоть до настоящего времени, наибольшую долю (56%) среди «нанолекарств», одобренных для терапии, составляют липосомы [4]. Как известно, липосомы - это сферические пузырьки из двойного слоя липидов размером 25-100 нм, заполненные жидкостью. Липосомы эффективны, потому что состоят из нативных липидов и обладают высоким сродством к клеточным мембранам [1].

Большое значение в доставке лекарств имеют углеродные наночастицы. В их состав помимо нанотрубок, фуллеренов, наноалмазов, входит и графен.

Графен. Графен – одна из аллотропных модификаций углерода. Графен представляет собой sp^2 -гибридизированный материал, состоящий из отдельных монослоев графита и получаемый различными методами, в том числе и такими как химическое осаждение, рост при высоком давлении и температуре и др. [5]. Данный двумерный кристалл состоит из одиночного слоя атомов углерода, которые собраны в гексагональную решетку [6].

Открыт графен был в 2004 году двумя российскими физиками – Андреем Геймом и Константином Новоселовым. Ученые смогли выделить графен - двумерный материал, состоящий из одноатомного слоя углерода [7], хотя теоретические расчеты предсказали существование графена ещё более 50 лет назад, но получить графен удалось только спустя десятилетия.

Его атомы образуют шестиугольные кольца, похожие на пчелиные соты, причем он напоминает множество ароматических молекул (таких как бензол), связанных между собой в одной плоскости.

Начиная с 2008 года, производные графена – оксид графена (Graphene Oxide - GO) и восстановленный оксид графена (Reduced Graphene Oxide - RGO) – тестируются в качестве носителей для доставки лекарств. Они обладают исключительными физико-химическими свойствами. Оксид графена может содержать различные кислородсодержащие группы: эпоксидные, гидроксильные, карбонильные и карбоксильные [5].

К числу уникальных свойств графена относят исключительную электронную проводимость, теплопроводность, механическую прочность. Высокая механическая прочность графена сочетается в нем с легкостью, гибкостью, эластичностью, электропроводностью и биосовместимостью.

То, что графен очень легкий, было ясно многим и, что это свойство можно эффективно использовать в разных целях. В результате в 2017 году был разработан графеновый аэрогель на 99% состоящий из воздуха. Было доказано, что материал выдерживает вес в 4000 раз больше своего собственного [8].

Самым удивительным свойством графена большинство ученых считают то, что он сам может выделять и поглощать энергию. Графен хоть и двумерен, но практически никогда не бывает совершенно плоским. Его структура напоминает скорее «рябь на воде» - случайные колебания атомов создают на поверхности конформационные «волны», которые выгибаются попеременно то в одну, то в другую сторону, генерируя и поглощая энергию [9].

Уникальные свойства графена обусловлены, благодаря особой природе его носителей заряда – они ведут себя подобно релятивистским частицам.

Графен в электронике. Подтверждением тому, что графен является перспективным материалом для электроники, стали результаты исследований, проведенных Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V. и другими. В ходе работ было установлено, что графен является исключительно малошумящим электронным материалом, что делает его перспективным не только для химических детекторов, но и для других применений, где требуются локальные зонды, чувствительные к внешнему заряду, магнитному полю или механическому напряжению [10].

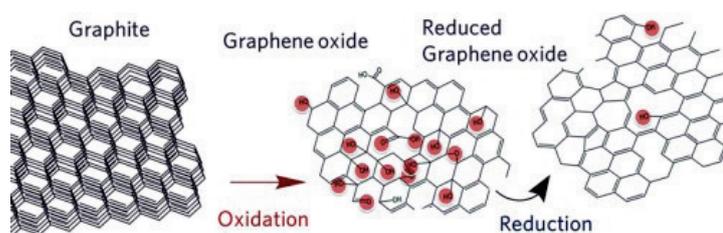


Рисунок 1. Получение из исходного графита некоторых производных графена - оксида графена (Graphene Oxide) и восстановленного оксида графена (Reduced Graphene Oxide) <https://mavink.com>

Принцип действия графеновых устройств основан на изменении их электропроводности, за счет молекул газа, адсорбированных на поверхности графена и действующих как доноры или акцепторы.

Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V. и др. выявили следующие характеристики графена: 1) во-первых, графен является строго двумерным материалом и весь его объем подвергается воздействию поверхностных адсорбатов, что максимизирует их эффект; 2) во-вторых, графен обладает высокой проводимостью, проявляя металлическую проводимость; 3) в-третьих, графен имеет мало кристаллических дефектов, что обеспечивает низкий уровень избыточного шума, вызванного их тепловым переключением; 4) в-четвертых, графен позволяет проводить четырехзондовые измерения на однокристаллическом устройстве с электрическими контактами, которые являются омическими и имеют низкое сопротивление. Все эти функции способствуют созданию уникальной комбинации, которая максимизирует отношение сигнал/шум до определенного уровня. Таким образом, графен достаточно электронно бесшумный для использования в одноэлектронных детекторах, работающих при комнатной температуре, и в сверхчувствительных датчиках магнитного поля или механического напряжения, в которых разрешение часто ограничено шумом.

Вследствие своей сверхвысокой площади поверхности и отличной подвижности электронов, графен и графенсодержащие композиционные материалы используются для модификации электродов в электрохимическом зондировании различных биомолекул с высокой чувствительностью, включая глюкозу, ДНК и белки.

С другой стороны, так как графен выступает в качестве важнейшей составляющей некоторых электропроводящих композитных материалов, которые применяют с целью модернизации современного специального медицинского оборудования.

На основе графена разрабатываются прототипы различных электронных и оптоэлектронных устройств. К числу таковых устройств можно отнести газовые сенсоры с экстремальной чувствительностью, графеновый одноэлектронный транзистор, жидкокристаллические дисплеи и солнечные батареи (в качестве прозрачного проводящего электрода), спиновый транзистор, графеновые полевые транзисторы, графеновые выпрямители, умножители частоты и высокочувствительные фотодетекторы.

Графен в биомедицине. В 2017 году было показано, что графен можно применять в лечении рака поджелудочной железы. Авторы работы использовали оксид графена с фолиевой кислотой и ПЭГ в качестве носителя для коротких интерферирующих РНК (киРНК). Они «выключают» гены HDAC1 и K-Ras, ответственные за рост злокачественных опухолей, и вызывают смерть раковых клеток. Комбинация такой генной терапии и терапии инфракрасным излучением подавляет рост опухоли *in vivo* более чем на 80% [11].

Графен используют как контрастное вещество при МРТ и КТ. А при добавлении графена в смесь ПЦР увеличивается выход ДНК [7].

В качестве еще одного вида использования графена в медицине следует выделить графеновую бумагу (GO). Такая бумага обладает выраженным антибактериальным действием. Было показано, что бумага легко расправляется с колониями кишечной палочки (*E.coli*). Преимущество такого способа борьбы с бактериями состоит в том, что оксид графена действует только на патогены, здоровые клетки при этом не затрагиваются. Благодаря этому оксид графена может также применяться в качестве материала для покрытия поверхности для имплантата.

Taras Nayak и др. обнаружили у графена способность ускорять дифференцировку стволовых клеток [12].

Gaurav Lalwani и др. в ходе исследований установили способность графена селективно связывать антитела [13]. Эти свойства графена объясняют то, что он может использоваться в клеточной инженерии.

Alessandra Fabbro и др. в своем исследовании отмечают, что из графена делают даже живляемые в организм электроды [14].

Графен для таргетной диагностики и фототермической терапии. Еще одной областью применения графена являются системы адресной или таргетной доставки диагностических, лекарственных средств, а также средств таргетной терапии.

В настоящее время активно исследуются возможности использования графена в поставке лекарств/генов, биологического обнаружения и визуализации, антибактериальных материалов как биосовместимого каркаса для клеточной культуры.

Наноразмерный графен и оксид графена обладают фотолуминесцентными свойствами. Отличная фотостабильность этих материалов обеспечивает их использование для биологической визуализации. Они также могут производить интенсивное тепло под действием лазерного излучения, что позволяет им служить фототермическими агентами при лечении рака [15].

Применение графена в фототермической терапии является новым перспективным направлением. Этот вид лечения использует генерацию тепла в результате поглощения света фоточувствительными агентами в больших клетках. Чтобы избежать повреждения здоровых клеток, поглощение должно быть в ближнем ИК-диапазоне (700-1100 нм). Графен проявляет заметный фототермический эффект благодаря сильному оптическому поглощению в этой области спектра. Экспериментально подтверждена противораковая активность нано-G и нано-GO. Впервые нанографен был успешно использован для фототермического уничтожения опухоли в естественных условиях, было изучено взаимодействие *in vivo* нанографеновых листов (NGS) с полиэтиленгликолем (ПЭГ) покрытием методом флуоресцентной маркировки. Проведенное исследование стало первым успехом использования углеродных наноматериалов для эффективной фототермической терапии

in vivo путем внутривенного введения и предполагает большие перспективы графена в биомедицинских приложениях, таких как лечение рака [16].

Флуоресцентная визуализация in vivo показала удивительно высокое поглощение NGS опухолью в нескольких моделях ксенотрансплантата опухоли мыши. Отличаясь от «пегелированных» углеродных нанотрубок, пегелированные NGS демонстрировали несколько интересных моделей поведения in vivo, включая высокоэффективное пассивное таргетирование опухоли и относительно низкое удержание в ретикулоэндотелиальных системах. Затем было использовано сильное оптическое поглощение NGS в ближней инфракрасной области (NIR) для фототермической терапии in vivo, достигая сверхэффективной абляции опухоли после внутривенного введения NGS и маломощного лазерного облучения NIR на опухоль. Кроме того, никакой очевидный побочный эффект пегелированного NGS не был отмечен для введенных мышей гистологией, химией крови и полным анализом панели крови в пилотном исследовании токсичности.

Эффективность фототермического лечения зависит от размеров частиц G, GO и химии поверхности. Считаются перспективными многофункциональные наноконструкции G (GO, RGO) с парамагнитными частицами и противоопухолевыми препаратами. Используя такие наноконструкции, можно сочетать хемо- и фототермическую терапию, обеспечить точную адресную доставку.

Графен для направленной доставки БАВ. Первые исследования в области применения графена как способа доставки лекарств были проведены в 2008 году по аналогии с успешным применением углеродных нанотрубок в биомедицине [17]. Исследования по доставке лекарства в организм и терапии от рака, показали, что высокоэффективная загрузка лекарственного средства обеспечивается благодаря чрезвычайно большой поверхности графена, которая «обнажала» каждый атом поверхности.

В отличие от привычной химиотерапии, при которой препараты, подавляющие рост раковых клеток, странствуют по всему кровотоку и равномерно распределяется во всех частях организма, использование графена делает этот процесс точным и направленным.

Из-за сложного строения человеческого тела и труднодоступного расположения опухолей используют несколько разных стимулов одновременно. Согласно исследованиям, гибридная везикула на основе оксида графена не только вмещает большую дозу противоопухолевого препарата доксорубицина (DOX), но также может последовательно высвобождать его при инфракрасном облучении и под действием кислой внутриклеточной среды. При лазерном облучении везикула «лопается», и в полость клетки выходят молекулы DOX, закрепленные на чешуйках оксида графена. Затем в дело вступает кислотная среда - за счет понижения pH DOX высвобождается и направляется в ядро клетки [18].

Такие гибридные подходы повышают эффективность доставки лекарства и позволяют снизить его дозировку, а, следовательно, уменьшить побочные эффекты [19, 20].

Вообще, системы доставки на основе графена развиваются в двух направлениях: доставка лекарств и доставка генетического материала.

Для адресной доставки лекарств есть несколько подходов. Первый, наиболее простой - прикрепление препарата на поверхность носителя напрямую. Например, как доксорубин, прочно связанный с поверхностью оксида графена и высвобождающийся только в кислотной среде опухоли, как уже отмечалось ранее. Более сложный способ - прикрепить к поверхности носителя не только действующее вещество, но и направляющие молекулы - лиганды. Этими лигандами могут быть, например, поликлональные антитела, фолиевая кислота или трансферрин. Они распознают клетки-мишени и связываются с ними. Иногда лиганд может быть одновременно и лекарством. К примеру, было показано, что противоопухолевый белок TRAIL может связываться с поверхностью раковых клеток [21].

Что касается доставки генетического материала, то генная терапия для лечения таких заболеваний, как болезнь Паркинсона, кистозный фиброз (муковисцидоз) и различные виды рака, требует наличия транспортера для защиты целевого гена от разрушения. В 70% случаев для этого исследователи используют вирусные векторы. Но учитывая их непредсказуемость, многие пытаются создать синтетические аналоги на основе липосом или производных графена. Гибридные наноконструкции на основе графена вмещают большой объем ДНК или РНК, защищают их от деградации и облегчают поглощение клеткой. «Загрузить» нуклеиновые кислоты на графеновые чешуйки можно благодаря гидрофобным и характерным для ароматических молекул π - π взаимодействиям. Последние образуются между кольцевыми структурами нуклеотидов и шестиугольной решеткой углерода в оксиде графена. Предполагается, что участие в этом также принимают и силы Ван-дер-Ваальса. Другие исследования показывают, что двойная спираль лучше связывается с оксидом графена при высокой концентрации соли и низком уровне pH [22; 23].

С другой стороны, для ранней диагностики рака и других заболеваний, благодаря работам, проводимым в МФТИ увеличена чувствительность биосенсоров на основе поверхностного плазмонного резонанса с помощью оксида графена. В ходе исследований было установлено, что сенсоры с покрытием из оксида графена в несколько раз точнее реагируют на молекулы, чем их «чистый собрат» [24]. По мнению исследователей, данное открытие способно облегчить лабораторные исследования медицинских препаратов.

Важно отметить, что наряду с очевидными преимуществами у графена были и существенные недостатки. С одной стороны, большая площадь поверхности позволяет разместить на одном слое графена множество молекул - масса лекарства может быть в два раза больше, чем масса самого носителя [19]. Графен, благодаря своему строению, имеет большую площадь поверхности, что способствует переносу большего количества молекул биологически активных веществ [25]. Но для медицинских применений графен нужно растворить в

биологических жидкостях, при этом не дав чешуйкам слипнуться друг с другом. Ученые доказали, что в своем первоначальном виде материал гидрофобен, поэтому растворить его можно только с помощью неполярного растворителя или поверхностно-активных веществ (ПАВ) [26]. Главная проблема в том, что молекулы ПАВ и растворителя остаются на поверхности графена и не делают препарат безопасным. Более того, в 2011 году исследователи обнаружили, что даже чистый графен сам по себе может быть весьма токсичным - он вызывал гибель мышинных макрофагов. Причина - высокая концентрация активных форм кислорода внутри клетки [27].

Поэтому в биомедицине предпочитают использовать альтернативные формы графена. Сейчас самый распространенный препарат - оксид графена. Он содержит множество гидрофильных групп (например, карбоксильные). Это повышает биосовместимость материала и предотвращает слипание чешуек друг с другом.

Другой способ модифицировать графен - покрыть его полиэтиленгликолем (ПЭГ), декстраном или альгинатом. Эти вещества увеличивают время циркуляции, биосовместимость и растворимость графена. Что, в свою очередь, уменьшает его токсичность и негативные последствия для организма [20].

Полиграфен. Углеродный нанокompозит ПолиГрафен - ПГ (PolyGraphene - PG), полученный в виде вспененного графита после гидротермической обработки модифицированного графита, стал взаимодействовать в качестве сорбента PG с широким спектром органических загрязнителей. Изучены сорбционные свойства углеродного материала на примере полиграфена (ПГ) в отношении органических загрязнителей.

PG – версия ультрадисперсного углеродного сорбента, который был разработан на основе модифицированного кислородсодержащего расширенного графита (OCEG). Такие материалы, как PG, обладают очень высокой абсорбционной способностью, особенно в отношении гидрофобных соединений (1:30 - 1: 100). Поскольку оболочки бактерий и вирусов, а также многие токсины являются гидрофобными, формы графита, полученные путем термического разложения, могут эффективно сорбировать и удерживать токсины, антибиотики, вирусные частицы, патогенные микроорганизмы и многие ксенобиотики (например, диклофенак). Эти факты указывают на возможные биотехнологические применения ПГ.

Электронная микроскопия различных образцов ПГ показала, что этот материал представляет собой стопку графеновых листов с кратностью 1-10-100, в зависимости от технологии приготовления. Повторная химическая модификация и термоактивация позволяют получать материал со стопками меньшей частоты, вплоть до отдельных листов графена. Исследованы различные технологические варианты получения PG, и наилучший вариант был определен с точки зрения соотношения функциональных характеристик и стоимости получаемого сорбента.

Было показано, что ПГ можно использовать в нескольких областях: в качестве активной основы и модификатора, в качестве иммуносорбента - основного биоактивного компонента тест-систем для иммунодиагностики вирусных инфекций; поглотитель для очистки воды от вредных примесей - в том числе биологических; поглотитель для стерилизации воздуха.

Исследование стерилизации жидких сред показало, что ПГ-фильтры способны задерживать и инактивировать до 10^6 клеток на 1 мг сорбента. Исследование фильтров на основе ПГ показало, что вода из загрязненного открытого источника (городской пруд) после однократной фильтрации через фильтр с ПГ приобретает свойства питьевой воды в соответствии с санитарными показателями. Присутствие окисленных

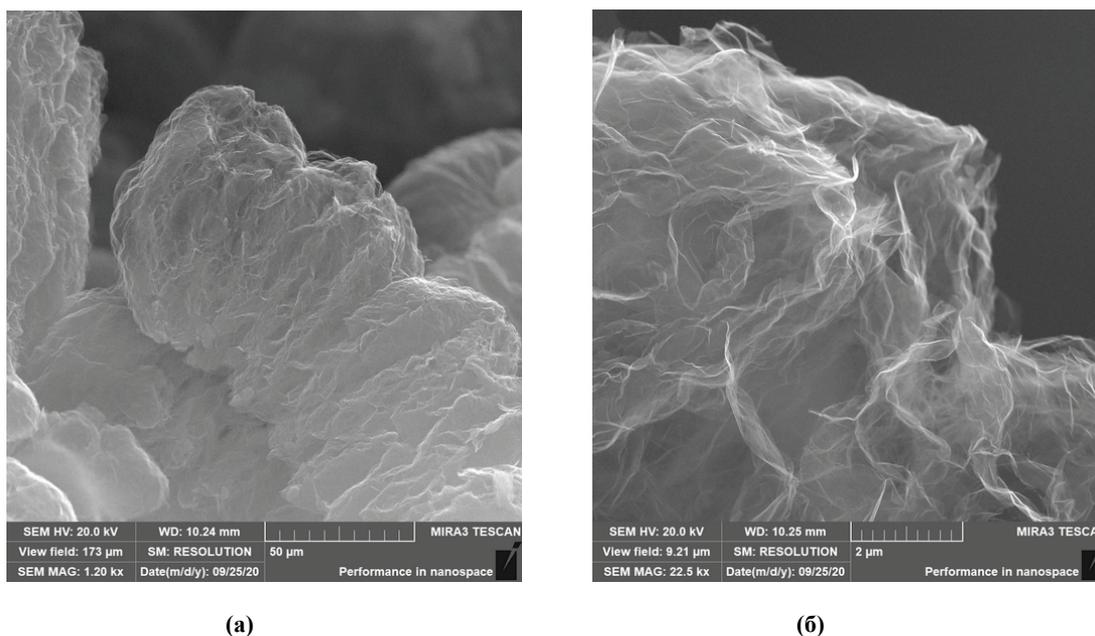


Рисунок 1. Изображения ПолиГрафена (PolyGraphene - PG), полученные на разных увеличениях (а) и (б) с помощью Сканирующего Электронного Микроскопа (СЭМ) – Scanning Electron Microscope (SEM) TESCAN MIRA

углеродных остатков дает PG способность связывать ионы тяжелых металлов. Фильтры, сочетающие ПГ с активированным углем, обладали наивысшей эффективностью. В этом варианте фильтр способен удалять не только ионы металлов, но и ионы хлора.

Использование PG для очистки газовых смесей имеет еще одну привлекательную перспективу: химическая модификация остатков углерода (окисление) позволяет легировать сорбент каталитическими добавками, которые, например, могут окислять монооксид углерода до диоксида, а также выполнять другие функции детоксикации.

Сорбенты на основе PG могут служить основой для создания сложных систем с введением дополнительных компонентов, обладающих специфическими сорбционными характеристиками. Это говорит о том, что сорбенты на основе ПГ являются перспективным материалом для различных применений в области экологии окружающей среды и эндоэкологии - нормализации параметров внутренней среды организма.

Полиграфен для доставки лекарств при онкологии кишечника. Для изучения возможности иммобилизации противоопухолевых ферментов в структуру ПолиГрафена в качестве модельного объекта был взят фермент L-лизин- α -оксидаза (LLAO) из гриба штамм *Trichoderma harzianum* Rifai F 180. L-лизин- α -оксидаза отечественного штамма обладает: 1) ярко выраженной противораковой активностью, подавляя ряд разнообразных онкологических новообразований; 2) высокой антивирусной активностью, в том числе подавляя вирусы герпеса I и II типов и другие; 3) важнейшими свойствами ингибирования ВИЧ инфекции.

В частности, было показано, что фермент LLAO обладает широким спектром противоопухолевого действия, что создает перспективы применения данного фермента в химиотерапии. Имеются данные о предварительных исследованиях в отношении применения фермента у человека [28-34].

К ферментным препаратам такого рода имеется ряд требований: способность легко проникать через мембраны клеток; низкая аллергенность и иммуногенность; высокая стабильность при физиологических условиях среды (рН и температуре); большой период полужизни; медленное выведение из организма.

Для создания композита ПолиГрафен добавляли к раствору, содержащему фермент LLAO (при концентрациях 0,1 - 1,0 мг/мл); смесь помещали на шейкер, а надосадочную жидкость исследовали на наличие фермента LLAO в реакции. В осадке оставался ЭнзимоСорбент, представлявший собой ПолиГрафен и иммобилизованный на нем фермент LLAO [35].

Результаты экспериментов по иммобилизации (сорбции) LLAO на ПГ - успешная сорбция фермента LLAO на ПГ. Специфической технологической особенностью ПГ как сорбента является необходимость заполнения всей его ажурной структуры раствором с сорбатом, в котором проводились его испытания.

Важнейшим результатом является оценка удельной активности фермента LLAO в адсорбированном на ПГ состоянии, которая снизилась всего на единицы процентов по сравнению с удельной активностью LLAO в растворе, что отражает практически нативную активность композита LLAO + ПГ.

Проанализированы результаты испытаний ПГ в качестве действующей основы для иммобилизации ферментов, в частности, на примере противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. Эти данные указывают на перспективность возможного биомедицинского применения ПГ в онкологии, а именно, при лечении рака кишечника. Изучаются взаимодействия углеродного сорбента нового поколения ПолиГрафен с иммобилизованным противоопухолевым ферментом со структурой слизистой кишечника при наличии очагов онкологии на стенках, для локализованного использования ПГ+ОнкоПрепарат общего и селективного действия.

Таким образом, модифицированные формы графена и полиграфена следует рассматривать как новый переносчик лекарственных средств: противоопухолевых препаратов, антибиотиков, антител и других биологически активных веществ. В отличие от традиционной химиотерапии, при которой препараты свободно распространяются по кровотоку и равномерно распределяются по всему организму, использование специальных углеродных наноносителей делает процесс точечным или направленным.

Заключение. Рассмотрены физико-химические свойства графена, полиграфена, их пространственная структура, особенности строения и свойств полиграфена, а также варианты получения графена и его производных.

Показано, что графен и полиграфен обладают уникальной структурой и исключительными физическими и химическими свойствами, из которых следует множество возможностей для их применения - это и биосенсоры на основе графеновых транзисторов, и графеновые носители для биологической визуализации, и системы доставки лекарственных препаратов. Одним из важнейших способов применения графена и полиграфена является именно доставка лекарств.

Только в последние несколько лет, модифицированные формы графена и полиграфена стали широко испытывать в качестве новых переносчиков лекарственных средств: противоопухолевых препаратов, антибиотиков, антител и даже генетического материала.

Описаны выдающиеся свойства фермента L-лизин- α -оксидазы (LLAO), широкий спектр возможностей его биомедицинского применения: в противоопухолевой и антивирусной терапии.

Показана возможность иммобилизации LLAO на полиграфене с практически полным сохранением удельной активности. В частности, противораковые свойства наблюдаемого адсорбированного фермента указывают на перспективу его применения в медицине, для создания активных противоопухолевых энтеросорбентов, как средств для лечения онкологии кишечника с применением локальной энзимотерапии и отказом от хирургических вмешательств.

Применение графена в медицине не ограничивается только системами доставки. У графена обнаружена способность ускорять дифференцировку стволовых клеток и селективно связывать антитела, что знаменует перспективу его использования в клеточной инженерии.

Список литературы/References:

1. Абашкин Д. Наночастицы - инструмент адресной доставки лекарств [Abashkin D. *Nanoparticles as a tool for targeted drug delivery* (In Russ.)].
2. Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A. et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release*, 2008, vol. 126, no. 3, pp. 187-204.
3. Torchilin V.P. *Nanoparticulates as drug carriers*. London: Imperial College Press, 2006, 724 p.
4. Ventola C.L. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. *P&T a peer-reviewed journal for formulary management*, 2017, vol. 42, no. 12, pp. 742-755.
5. Yuqin Xiao, Yoong Xin Pang, Yuxin Yan, Ping Qian, Haitao Zhao, Sivakumar Manickam, Tao Wu, Cheng Heng Pang; Synthesis and Functionalization of Graphene Materials for Biomedical Applications: Recent Advances, Challenges, and Perspectives. *Adv. Sci.*, 2023, vol. 10, p. 2205292, doi: 10.1002/advs.202205292.
6. Ушакова С.А. Использование графена в медицине. *Научные исследования и разработки 2018 года: сборник материалов IV Международной научно-практической конференции*. Новосибирск: Изд-во ООО «Центр развития научного сотрудничества», 2018, с. 15-19 [Ushakova S.A. The use of graphene in medicine. *Scientific research and development in 2018: a collection of materials of the IV International Scientific and Practical Conference*. Novosibirsk: Publishing House of LLC "Center for the Development of Scientific Cooperation", 2018, p. 15-19 (In Russ.)].
7. Полякова М. 2D-почтальон: системы доставки лекарств на основе графена [Polyakova M. *2D Postman: Graphene-Based Drug Delivery Systems* (In Russ.)].
8. Han Hu, Zongbin Zhao, Wubo Wan, Yury Gogotsi, Jieshan Qiu. Ultralight and Highly Compressible Graphene Aerogels. *Adv. Mater.*, 2013, vol. 25, pp. 2219-2223.
9. Li D., Kaner R.B. MATERIALS SCIENCE: Graphene-Based Materials. *Science*, 2008, vol. 320, pp. 1170-1171.
10. Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V. et al. Detection of Individual Gas Molecules Adsorbed on Graphene. *Nat. Mater., Nature Materials*, 2007, vol. 6, no. 9, pp. 652-655, doi: 10.1038/nmat1967.
11. Feng Yin, Kuan Hu, Yangzi Chen, Mengying Yu, Dongyuan Wang, et. al. SiRNA Delivery with PEGylated Graphene Oxide Nanosheets for Combined Photothermal and Genetherapy for Pancreatic Cancer. *Theranostics*, 2017, vol. 7, pp. 1133-1148.
12. Nayak T.R., Andersen H., Makam V.S., Khaw C., Bae S. et. al. Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ACS Nano.*, 2011, vol. 5, pp. 4670-4678.
13. Lalwani G., Henslee A.M., Farshid B., Lin L., Kasper F.K., et. al. Two-Dimensional Nanostructure-Reinforced Biodegradable Polymeric Nanocomposites for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 2013, vol. 14, pp. 900-909.
14. Fabbro A., Scaini D., Leon V., Vazquez E., Cellot G. et. al. Graphene-Based Interfaces Do Not Alter Target Nerve Cells. *ACS Nano*, 2016, vol. 10, pp. 615-623.
15. Постнов В.Н. и др. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера*, 2013, № 6 (30), с. 16-27 [Postnov V.N. Nanoscale carriers for drug delivery. *Biotechnosphere*, 2013, no. 6 (30), pp. 16-27 (In Russ.)].
16. Kai Yang et. al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Letters*, 2010, vol. 10, no. 9, pp. 3318-3323, doi: 10.1021/nl100996u.
17. Liangzhu Feng, Zhuang Liu. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2011, no. 6, pp. 317-324.
18. Jibin Song, Xiangyu Yang, Orit Jacobson, Lisen Lin, Peng Huang et. al. Sequential Drug Release and Enhanced Photothermal and Photoacoustic Effect of Hybrid Reduced Graphene Oxide-Loaded Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles for Cancer Therapy. *ACS Nano*, 2015, vol. 9, pp. 9199-9209.
19. Zhuqing Wang, Lucio Colombi Ciacchi, Gang Wei. Recent Advances in the Synthesis of Graphene-Based Nanomaterials for Controlled Drug Delivery. *Applied Sciences*, 2017, vol. 7, p. 1175.
20. Jingquan Liu, Liang Cui, Dusan Losic. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*, 2013, vol. 9, pp. 9243-9257.
21. Jiang T., Sun W., Zhu Q., Burns N.A., Khan S.A. et. al. Furin-Mediated Sequential Delivery of Anticancer Cytokine and Small-Molecule Drug Shuttled by Graphene. *Adv. Mater.*, 2015, vol. 27, pp. 1021-1028.
22. Vincent M., Lazaro I. de, Kostarelos K. Graphene materials as 2D non-viral gene transfer vector platforms. *Gene Ther.*, 2017, vol. 24, pp. 123-132.
23. Yuqi Yang, Abdullah Mohamed Asiri, Zhiwen Tang, Dan Du, Yuehe Lin. Graphene based materials for biomedical applications. *Materials Today*, 2013, vol. 16, pp. 365-373.
24. Абаев М. Графен и плазмонный резонанс для будущего медицины. *Наука и жизнь*, 2015, № 11, с. 78-80 [Abaev M. Graphene and plasmon resonance for the future of medicine. *Science and life*, 2015, no. 11, pp. 78-80 (In Russ.)].
25. Поройский С.В., Носаева Т.А., Коняева Н.В. Использование графена и наноматериалов на его основе в медицине. *Волгоградский научно-медицинский журнал*, 2014, № 3, с. 9-10 [Poroisky S.V., Nosaeva T.A.,

Konyaeva N.V. The use of graphene and nanomaterials based on it in medicine. *Volgograd scientific medical journal*, 2014, no. 3, p. 9-10 (In Russ.).

26. Hongqian Bao, Yongzheng Pan, Yuan Ping, Nanda Gopal Sahoo, Tongfei Wu et. al. Chitosan-Functionalized Graphene Oxide as a Nanocarrier for Drug and Gene Delivery. *Small*, 2011, vol. 7, no. 11, pp. 1569-1578.

27. Yang Li, Ying Liu, Yujian Fu, Taotao Wei, Laurent Le Guyader et. al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 2012, vol. 33, pp. 402-411.

28. Amano M. et al. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. *The Journal of Biochemistry*, 2015, no. 6 (157), pp. 549-559.

29. El-Shanawany A. et al. Purification, characterization and antitumor activity of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai AUMC No 848. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 2018, no. 9 (5), pp. 350-367.

30. Torii S., Naito M., Tsuruo T. Apoxin I, a Novel Apoptosis-inducing Factor with L -Amino Acid Oxidase Activity Purified from Western Diamondback Rattlesnake Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, no. 14 (272), pp. 9539-9542.

31. Подборонов В.М. и др. Доклинические испытания противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. *Антибиотики и химиотерапия*, 2010, № 9-10 (55), с. 33-36 [Podboronov V.M. Preclinical trials of the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase. *Antibiotics and chemotherapy*, 2010, no. 9-10 (55), pp. 33-36 (In Russ.)].

32. Покровский В.С., Трещалина Е.М. Ферментные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения. *Клиническая онкогематология*, 2014, № 1 (7), с. 28-38 [Pokrovsky V.S., Treschalina E.M. Enzyme preparations in oncohematology: topical areas of experimental research and prospects for clinical use. *Clinical oncohematology*, 2014, no. 1 (7), pp. 28-38 (In Russ.)].

33. Смирнова И.П. и др. Изучение действия противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum* Rifai F180 на окисление L-лизина методом капиллярного электрофореза. *Антибиотики и химиотерапия*, 2014, № 3-4 (59), с. 12-15 [Smirnova I.P. et al. Study of the effect of the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from the *Trichoderma harzianum* Rifai F180 culture on the oxidation of L-lysine by capillary electrophoresis. *Antibiotics and chemotherapy*, 2014, no. 3-4 (59), pp. 12-15 (In Russ.)].

34. Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Botin A.S., Siatkin S.P., Kuznetsov V.I., Myandina G.I., Nurmuradov M.K. Amino oxidase activities of antitumor enzyme producer from *Trichoderma*. *Drug Invention Today*, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 758-762.

35. Ботин А.С., Буравцев В.Н., Полетаев А.И., Смирнова И.П. Возможность иммобилизации ферментов в структуру полиграфена на примере L-лизин-альфа-оксидазы. *Труды 2-й Международной научно-практической конференции «Графен и родственные структуры: синтез, производство и применение»*, 2017, с. 36-39 [Botin A.S., Buravtsev V.N., Poletaev A.I., Smirnova I.P. Possibility of immobilization of enzymes in the structure of polygraphene on the example of L-lysine-alpha-oxidase. *Proceedings of the 2nd International Scientific and Practical Conference "Graphene and related structures: synthesis, production and application"*, 2017, pp. 36-39 (In Russ.)].

CARBON NANOCOMPOSITES IN MEDICINE: GRAPHENE AND POLYGRAPHENE AS POSSIBLE DRUG DELIVERY VEHICLE FOR INTESTINAL ONCOLOGY**Botin A.S.^{1,2}, Mashal D.A.¹, Popova T.S.², Rizk M.G.H.¹, Cordova A.V.¹**¹ Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)
*Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru*² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine
Bolshaya Sukharevskaya sq., 3, Moscow, 129090, Russia; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru
Received 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2023.0649

Abstract. The paper considers one of the most important directions in modern pharmacology - targeted delivery of medicines, namely the directed transport of medicinal substance to given area of body, which is realized with help of carriers, which, as a rule, have sizes of tens or hundreds of nanometers, different nature and chemical structure. The delivery of antitumor drugs using nanoparticles is being discussed. Immobilization of drugs on nanocarriers makes it possible to increase their bioavailability. Various graphene derivatives - graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (RGO) - are being tested as carriers for drug delivery. There are several approaches for targeted drug delivery in oncology. The first, simple one is the attachment of both low- and high-molecular preparation to the surface of the carrier directly. The drug doxorubicin is firmly bound to surface of graphene oxide and is released only in acidic environment of tumor. The second, more complex method is to attach to surface of carrier not only active substance, but also guiding molecules - ligands. Sometimes ligand itself can be a drug at the same time. Polygraphene (PG) is an original modified analogue of thermally split graphite, obtained in the form of new form of expanded graphite, after repeated chemical modification and thermal activation, it is reduced to the characteristics of a layered material with stacks of carbon monolayers of smaller multiplicity (from 5 to 50), up to single sheets of graphene. The results of tests of PG as an effective basis for the immobilization of enzymes are presented, in particular, on the example of antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase. These data indicate prospects of possible biomedical use of PG in oncology, namely, in treatment of intestinal cancer. Modified forms of graphene and polygraphene should be considered as new carrier of drugs.

Key words: *graphene, polygraphene, drug delivery, intestinal oncology.*

SAFETY OF CARBON NANOCARRIERS IN BIOMEDICAL APPLICATIONS: BIOCOMPATIBILITY OF GRAPHENE AND ITS DERIVATIVES

Botin A.S.^{1,2}, Rizk M.G.H.¹, Popova T.S.², Cordova A.V.¹

¹ RUDN University named after Patrice Lumumba

Miklukho-Maklaya St, 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru

² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine

Bolshaya Sukharevskaya Square, 3, Moscow, 129090, Russia; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

Received 29.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0650

Abstract. The article considers one of the most important factors allowing to determine the possibility of wide and safe use of graphene nanoobjects in modern biomedicine - this is the biocompatibility factor, namely, the interaction of a graphene-containing substance with a given part of the body, which is realized at different scales and at different levels of organization of living matter. Graphene and its derivatives have shown exceptional properties and potential for various applications. While graphene derivatives as graphene-oxide (GO), reduced graphene-oxide (rGO), few-layers graphene (FLG), and multi-layers graphene (MLG) exhibit similar properties to graphene, more research is needed to address scalability and cost-effectiveness for practical applications. In tissue engineering, graphene-based materials have shown promise in scaffolds, biosensors, and drug delivery systems, but optimizing biocompatibility and functionalization strategies are crucial for safe and effective use. This work is a try to better understanding the complex interactions between graphene and biological systems, including cells, tissues, and organs, which is necessary for future research and expanding the use of graphene in biomedical applications.

Key words: *graphene, biocompatibility, functionalization, biomedical applications.*

Introduction. Graphene, a two-dimensional material consisting of a single layer of carbon atoms, has garnered much attention in recent years due to its exceptional mechanical, electrical, and optical properties. As a result, it has been extensively investigated for its potential use in various fields such as electronics, energy, and biomedical applications. The latter is of particular interest due to its unique biocompatibility properties, which make it a promising candidate for developing biosensors, drug delivery systems, and tissue engineering scaffolds.

The biocompatibility of graphene and its derivatives is an active area of research, with numerous studies investigating the material's interactions with biological systems at various scales, ranging from single cells to tissues and organs. Understanding the mechanisms underlying the biocompatibility of graphene is essential for the safe and effective use of this material in biomedical applications.

This article will provide an overview of the current state of knowledge regarding the biocompatibility of graphene and its derivatives. We will discuss the various factors that affect the biocompatibility of graphene, including its physicochemical properties, functionalization strategies, and dosage. Additionally, we will highlight the latest research on the interactions between graphene and different biological systems, including cells, tissues, and organs. Finally, we will discuss the challenges and future prospects of using graphene and its derivatives in biomedical applications.

Graphene and Its Derivatives. Despite its tremendous potential, the practical application of graphene is still limited by the high cost, limited availability, and lack of scalable production methods. Therefore, researchers have explored graphene derivatives, which exhibit properties similar to graphene and can be synthesized at a lower cost [1].

Graphene oxide (GO) is a widely used graphene derivative due to its low cost, ease of synthesis, and functional groups on its surface that enable the functionalization and dispersion of graphene in various solvents and matrices [2]. Reduced graphene oxide (rGO) is obtained by the chemical or thermal reduction of GO, which restores the sp² hybridization and electronic properties of graphene [3]. Few-layer graphene (FLG) and multilayer graphene (MLG) are graphene derivatives that consist of several layers of graphene sheets stacked together. FLG is characterized by a few (2-5) layers of graphene, while MLG can have more than ten layers [4].

Graphene and its derivatives have a wide range of applications in various fields. In biomedical applications, graphene and its derivatives have been explored for drug delivery, biosensing, and tissue engineering scaffolds due to their biocompatibility and high surface area [5]. Studies have investigated the biocompatibility of graphene with different biological systems, ranging from single cells to tissues and organs. Graphene's high surface area and surface chemistry make it a suitable material for immobilizing biological molecules and detecting biomarkers. Furthermore, graphene-based drug delivery systems have shown promise in delivering therapeutic agents to specific sites in the body.

Applications of Graphene in Tissue Engineering. The unique characteristics of graphene make it an ideal material for a broad range of applications, including tissue engineering. Tissue engineering is the interdisciplinary field of applying engineering principles to develop biological substitutes for damaged or missing tissues. Graphene has been found to have tremendous potential in tissue engineering applications due to its biocompatibility, electrical conductivity, and mechanical properties [2-4].

One of the most promising applications of graphene in tissue engineering is as a scaffold material. Graphene scaffolds have been shown to promote cell adhesion, proliferation, and differentiation [5]. Additionally, graphene's electrical conductivity can stimulate cells' growth and aid in tissue regeneration [6]. Furthermore, graphene's mechanical properties, such as its high tensile strength and flexibility, make it an excellent candidate for developing scaffold materials for various tissues, including bone, cartilage, and skin [7].

Graphene's unique electrical properties also make it a potential candidate for developing biosensors for various biomedical applications. Biosensors developed using graphene-based materials have shown promising results in detecting various biomolecules, such as glucose, cholesterol, and proteins [6]. Graphene's high surface area and its ability to transfer electrons efficiently make it an ideal material for developing biosensors [9]. Additionally, graphene's high biocompatibility makes it a safe material for biomedical applications [10].

Moreover, graphene-based materials can also be used as drug delivery vehicles in tissue engineering. Graphene-based drug delivery systems can enhance drug bioavailability and improve therapeutic efficacy [11]. Graphene's large surface area and high drug-loading capacity make it an excellent candidate for developing drug delivery systems. Furthermore, graphene's biocompatibility and low toxicity make it a safe material for drug delivery applications [12].

Factors Influencing the Biocompatibility of Graphene. The biocompatibility of graphene is influenced by various factors, including size, shape, surface chemistry, concentration, and aggregation state.

The size and shape of graphene can affect its biocompatibility. Smaller graphene sheets can be internalized by cells and potentially cause cytotoxicity, while larger sheets may be more biocompatible. Additionally, graphene oxide sheets with rounded edges have been found to be less toxic than sheets with sharp edges [7].

Surface chemistry is another important factor that influences the biocompatibility of graphene. The presence of functional groups on graphene's surface can affect its interaction with biological systems. For example, the presence of carboxylic groups can enhance the solubility and biocompatibility of graphene, while the presence of amino groups can increase its toxicity [8].

The concentration of graphene also plays a role in its biocompatibility. High concentrations of graphene can cause cell death and induce inflammation, while lower concentrations may be more biocompatible. Additionally, the aggregation state of graphene can affect its biocompatibility. Aggregated graphene can induce inflammation and oxidative stress, while dispersed graphene may be more biocompatible.

Other factors that may influence the biocompatibility of graphene include its purity, crystallinity, and surface charge. Purer and more crystalline graphene may be less toxic, while the surface charge can affect its interaction with biological systems.

Functionalization Strategies for Enhancing Graphene's Biocompatibility. Functionalization strategies have been developed to tailor graphene's physicochemical properties to specific biomedical applications. Functionalization of graphene can be achieved by attaching various molecules and atoms to its surface, such as peptides, proteins, polymers, and nanoparticles. Additionally, functionalization with polymers can increase the stability and solubility of graphene in biological fluids and enhance its biocompatibility.

Functionalization of graphene can be achieved by attaching various molecules and atoms to its surface, such as peptides, proteins, polymers, and nanoparticles. One of the most common methods for functionalizing graphene is covalent functionalization, where molecules are attached to the surface through covalent bonds. This method ensures strong binding between the functional molecules and graphene, but it may also alter graphene's physicochemical properties [9].

Non-covalent functionalization is another strategy for functionalizing graphene, where molecules are attached to the surface through non-covalent interactions such as electrostatic forces, hydrogen bonding, and van der Waals forces. Non-covalent functionalization can preserve the intrinsic properties of graphene and enhance its biocompatibility [10].

Functionalization strategies can also be used to tailor the surface charge of graphene, which is a critical factor affecting its interaction with biological systems. The surface charge of graphene can be controlled by functionalizing it with charged molecules such as polymers or nanoparticles [11].

Functionalization of graphene can also enhance its solubility in biological fluids, which is necessary for its effective use in biomedical applications. The functionalization of graphene with polymers or surfactants can increase its solubility and stability in aqueous solutions [12].

Dosage-Dependent Effects of Graphene on Biological Systems. The dosage of graphene is an important factor that influences its effects on biological systems. Several studies have shown that graphene exhibits a dosage-dependent effect on biological systems. At low doses, graphene has been reported to enhance cell proliferation and differentiation, promote wound healing, and have anti-bacterial and anti-inflammatory effects. For instance, Luo et al. demonstrated that low concentrations of graphene oxide enhanced the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells [13]. Additionally, Shanmugam et al. reported that low concentrations of graphene oxide could promote wound healing in mice [14].

However, at high doses, graphene can be cytotoxic and induce inflammation and oxidative stress in cells. The cytotoxicity of graphene has been found to be influenced by various factors such as size, shape, surface chemistry, and concentration. For example, smaller graphene sheets may be more cytotoxic due to their increased cellular uptake [15]. Moreover, graphene oxide with high oxygen content has been found to induce greater oxidative stress than reduced graphene oxide with low oxygen content [6].

The dosage-dependent effects of graphene on biological systems have been observed in both in vitro and in vivo studies. For instance, Jasim et al. reported that high doses of graphene oxide could induce liver toxicity in mice [16]. Similarly, Wu et al. found that high doses of graphene could induce inflammation in human lung cells [17].

Interactions between Graphene and Cells. Understanding the interactions between graphene and cells is crucial for the safe and effective use of graphene in biomedical applications.

Several studies have investigated the interactions between graphene and cells. Graphene has been found to interact with cells in different ways, depending on factors such as size, shape, surface chemistry, and concentration. For example,

small graphene sheets with high surface area have been found to be more cytotoxic than larger sheets [18]. Additionally, graphene oxide with carboxyl or hydroxyl groups on its surface has been found to be more biocompatible than graphene oxide without these functional groups [19].

The interaction between graphene and cells can also affect cell behavior and functions. For instance, Qi et al. found that graphene oxide could promote the differentiation of human neural stem cells into neurons [20]. Moreover, Devi G.V et al. reported that graphene could induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [21]. On the other hand, several studies have reported that graphene can induce cytotoxicity, inflammation, and oxidative stress in cells [22].

The interaction between graphene and cells is also influenced by the protein corona that forms around graphene upon its contact with biological fluids. The protein corona can affect the biocompatibility and toxicity of graphene by altering its interactions with cells. For example, the protein corona formed around graphene oxide can reduce its cytotoxicity by shielding its surface groups that can induce cytotoxicity [23].

Interactions between Graphene and Tissues. Various factors, such as size, shape, surface chemistry, and concentration, determine the way graphene interacts with tissues. Depending on these factors, graphene can interact with tissues in different ways. For instance, larger graphene sheets with more layers are less harmful to cells than smaller ones [24]. The interaction between graphene and tissues can also affect tissue functions and responses. For example, Liu et al. reported that graphene could enhance the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [25]. Moreover, graphene oxide has been found to induce angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, which can be potentially useful for tissue regeneration [26]. However, graphene can also induce inflammation and oxidative stress in tissues, leading to tissue damage [15].

The interactions between graphene and tissues are also influenced by the protein corona that forms around graphene upon its contact with biological fluids. The protein corona can affect the biocompatibility and toxicity of graphene by altering its interactions with tissues [27]. For example, the protein corona formed around graphene oxide can reduce its cytotoxicity by shielding its surface groups that can induce cytotoxicity [28].

Interactions between Graphene and Organs. Several studies have investigated the interactions between graphene and organs. For example, graphene has been shown to accumulate in the liver, spleen, and lungs of mice after intravenous injection, indicating its potential toxicity to these organs [24]. In contrast, graphene oxide has been found to accumulate primarily in the spleen and to a lesser extent in the liver and lungs [29]. Furthermore, graphene has been shown to interact with the brain and induce changes in its functions, although the underlying mechanisms are not fully understood [30].

The interactions between graphene and organs can also affect the organ functions and responses. For example, graphene oxide has been shown to induce apoptosis and impair the functions of immune cells in the spleen [31]. Moreover, graphene has been found to enhance the functions of pancreatic β cells, which could be potentially useful for the treatment of diabetes [32]. However, graphene can also induce inflammation and impair the functions of heart cells, leading to cardiac dysfunction [33].

The interactions between graphene and organs are also influenced by several factors, including the size, shape, surface chemistry, and concentration of graphene. The protein corona that forms around graphene upon its contact with biological fluids can also affect its interactions with organs [23]. Therefore, it is important to carefully control these factors to minimize the potential toxicity of graphene to organs.

Challenges and Future Prospects for the Use of Graphene in Biomedical Applications. Despite the potential benefits, several challenges exist in the development and application of graphene-based biomedical technologies. One of the major challenges is the potential toxicity of graphene and its derivatives. Studies have shown that the size, shape, and surface functionalization of graphene can influence its biocompatibility [34],[24]. Thus, careful consideration must be given to the design and preparation of graphene-based materials to ensure their safety and efficacy *in vivo*.

Another challenge is the difficulty in achieving scalable production and processing of graphene-based materials [35]. The synthesis of high-quality graphene is still a complex and expensive process, limiting its widespread use in biomedical applications. Furthermore, the lack of standardization in the characterization of graphene materials can hinder the reproducibility and comparability of results [36].

Despite these challenges, graphene-based technologies show great potential in biomedical applications. Graphene-based nanomaterials have been investigated for their potential use as drug delivery systems [37]. The large surface area and high drug-loading capacity of graphene oxide make it an attractive candidate for drug delivery applications [38]. Moreover, graphene oxide has been shown to enhance the therapeutic efficacy of anticancer drugs by promoting their uptake by cancer cells [39].

In addition to drug delivery, graphene-based biosensors have also been developed for the detection of various biomolecules, including proteins and DNA [40]. The high sensitivity and specificity of graphene-based biosensors make them promising for early disease diagnosis and monitoring. Graphene-based materials have also been investigated for their potential use in tissue engineering [41]. The high conductivity of graphene and its derivatives make them attractive for neural tissue engineering applications, while the high mechanical strength of graphene has been utilized in the development of scaffolds for bone tissue engineering.

Interaction between PolyGraphene and Intestine. In this part, we will give, as a good example, the result of designing an effective tool and choosing a method for safe use in medical practice of graphene-containing carbon material PolyGraphene (PG). The rationale for the prospects of this development was the results of studying the interaction of such a graphene-like carbon product as PolyGraphene with tissues and internal walls of the intestine.

In fact, a carbon nanocomposite of PolyGraphene (PG) obtained as expanded graphite after hydro-thermic treatment

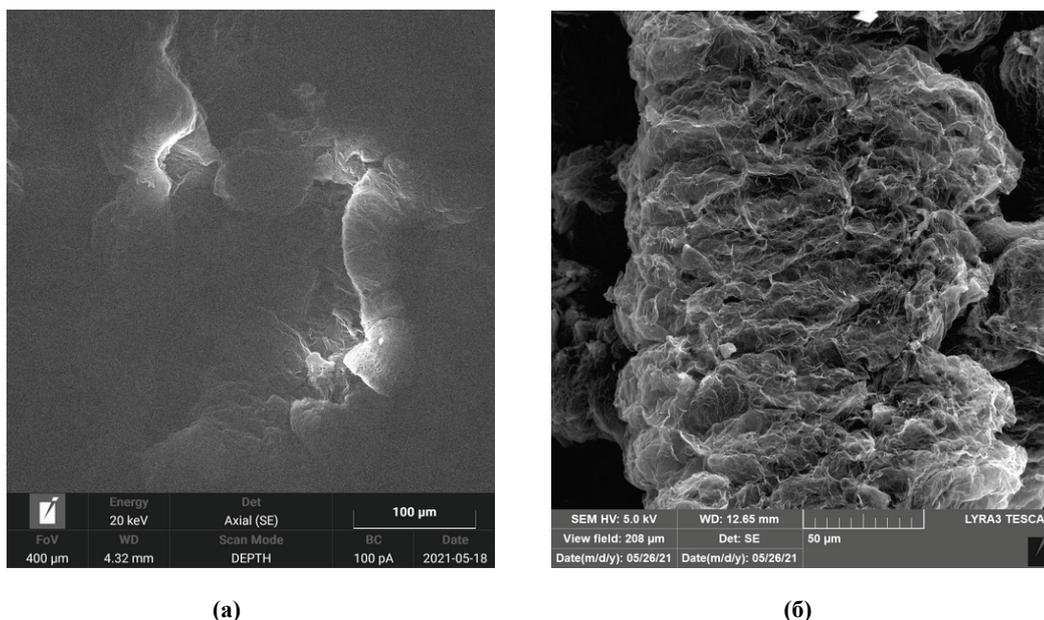


Figure 1. Image (a) of a PolyGraphene (PG) obtained using a Transmission Electron Microscope (TEM) - JEOL JEM-2100; Image (b) of a PolyGraphene (PG) obtained using a Scanning Electron Microscope (SEM) - TESCAN LYRA

of modified graphite became to be able to interact as sorbent PG with wide range of organic pollutants. To date, it was studied the sorption properties of carbon material as an example of PolyGraphene (PG) concerning of organic pollutants. PG - version of ultrafine carbon sorbent, which was developed on the basis of the modified oxygen-containing expanded graphite (OCEG). Materials like PG have a very high absorption capacity, especially with respect to hydrophobic compounds (1:30 - 1: 100). For this reason, such materials are effectively used for the purification of aqueous solutions and suspensions from a wide range of organic pollutants (from benzene to oils). Since the envelopes of bacteria and viruses, as well as many toxins, are hydrophobic, forms of graphite obtained by thermal decomposition can effectively sorb and retain toxins, antibiotics, virus particles, pathogenic microorganisms, and many xenobiotics (for example, diclofenac). These facts indicate possible biomedical and biotechnological applications of PG.

Electron microscopy of various samples of PG showed that this material is a stack of graphene sheets with a multiplicity of 1-10-100, depending on the preparation technology (Figure 1). Repeated chemical modification and thermo-activation allows to obtain a material with stacks of lesser frequency, up to single sheets of graphene. Various technological options for producing PG were investigated and the best option was determined in terms of the ratio of functional characteristics and the cost of the resulting sorbent.

During experiments it was studied a new form of an oxygen-containing expanded graphite, which after repeated thermal activation and chemical modification with using ultrasound results in a material with stacks of carbon layers with higher multiplicity (10-40), but containing both single sheets of graphene. It is possible to include this material in classification of nanocomposite sorbents and the graphene-containing carbon forms. The authors introduce a new classification of this type of material and see it as an Oxidized PolyGraphene (OPG).

Enterosorption - the method based on linking and removal from the digestive tract (DT) with the medical or preventive purpose of endogenous or exogenous substances, metabolites, various products of a microbic origin.

The last achievements in the field of physiology and pathology of digestion allow to consider enterosorption mechanisms from mass exchange positions between the internal and enteral medium. In this regard, enterosorbents can be estimated not only as effective remedies of a detoxication of an organism, but also as a factor, in itself having essential impact on activity of the digestive and transport conveyor and an exchange of the main nutrients.

Though materials and manufacturing techniques of sorbents significantly differ, the main medical requirements to enterosorbents remain rather constant: 1) convenient pharmaceutical form and lack of unpleasant organoleptic properties of a preparation; 2) not toxicity - preparations in the course of passing up through a gastrointestinal tract shouldn't collapse to fragments which can be soaked up and make negative impact on bodies and systems; 3) preparations shouldn't injure the mucous; 4) there has to be a good evacuation warning a sorbent congestion in an intestines gleam; 5) high sorption ability to the deleted components; 6) at not selective sorbents possibility of sorption of useful nutrients has to be minimum; 7) lack of a desorption in process of advance through a gastrointestinal tract, lack of dependence from pH of medium.

Objective. The study of the interaction of OPG with the structure of the mucous of small intestine to determine possibility of using the OPG for detoxification general and selective action.

Conditions of experiments. Histologic research of a small intestine. For 20 rats through a probe was entered PolyGraphen's suspension into initial department of a duodenum. After 2.5 hours for receiving samples of biomaterial to rats was done euthanasia according to the European bio-ethical standards of manipulations with laboratory animals.

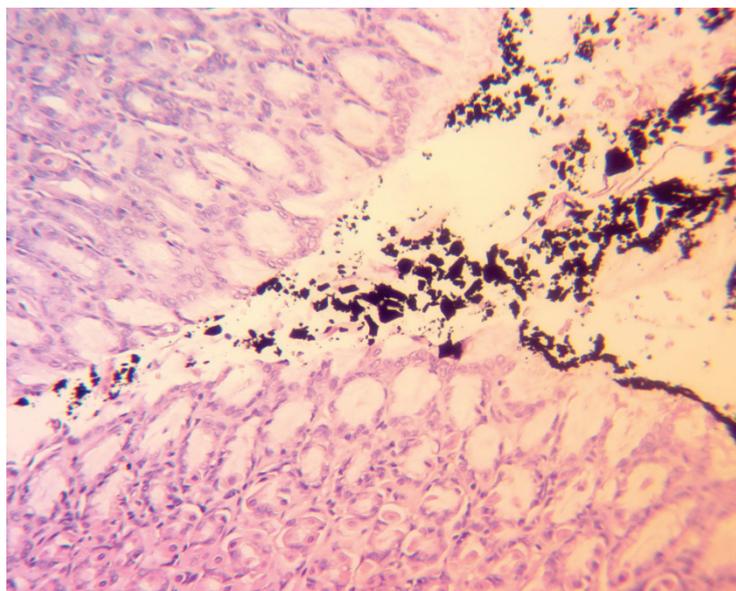


Figure 2. Oxidized PolyGraphene remains as a part of a himus and in the field of near wall of a mucous membrane of intestine. OPG does not enter the intercellular space in the epithelium, does not penetrate into the cells and doesn't get directly to a surface of cages of an epithelium

Further was opened an abdominal cavity of rats, was cuted sites of medial department of a duodenum, initial department of lean gut and distal department of ileum gut. Samples placed in the cooled fixating solution and processed according to the standard scheme for histologic research (Figure 2).

Experiments clearly show that Oxidized PolyGraphene remains as a part of a himus and in the field of near wall of a mucous membrane of intestine. OPG does not enter the intercellular space in the epithelium, does not penetrate into the cells and doesn't get directly to a surface of cages of an epithelium that treats as large poly-particles of OPG (100-500 microns), and smaller poly-particles (10-50 microns). At one-time introduction of OPG, it goes as transit goods through a small intestine, without being late and without getting directly to a surface of an intestinal epithelium which is closed by a continuous dense mucous bed, and also in space between intestinal fibers. OPG works, mainly in a gleam of intestines and at a surface of a mucous layer, without having direct negative destructive effect on cells of an intestinal epithelium and OPG has a large capacity.

The results of tests OPG as acting basis for the enterosorbents of new generation indicate a good promising potential for wide medical applications of PolyGraphene.

Conclusion. The unique properties of graphene and its derivatives have generated significant interest for potential applications in biomedicine. While GO, rGO, FLG, and MLG exhibit similar properties to graphene, more research is necessary to address scalability and cost-effectiveness for practical applications. In the field of tissue engineering, graphene-based materials have shown remarkable potential in scaffolds, biosensors, and drug delivery systems, due to their ability to mimic the properties of natural tissues and cells. However, to translate these applications into clinical settings, optimizing the biocompatibility and functionalization strategies of graphene-based materials is crucial for safe and effective use.

Furthermore, understanding the complex interactions between graphene and biological systems is necessary to mitigate potential risks and optimize performance in biomedical applications. The dosage of graphene is an important factor that influences its effects on biological systems, and the biocompatibility and toxicity of graphene need to be carefully studied and optimized for safe use.

As such, further research is needed to develop reliable and effective methods for large-scale synthesis and production of graphene and its derivatives, as well as to optimize their properties and performance for specific applications. With continued innovation and development, it is possible that graphene-based materials will play a critical role in shaping the future of technology, medicine, and other industries.

References:

1. Zhang Y.I., Zhang L., Zhou C. Graphene and Related Applications. *Acc. Chem. Res.*, 2013, vol. 46, pp. 2329-2339.
2. Hummers W.S., Offeman R.E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, vol. 80, no. 6, p. 1339, doi: 10.1021/ja01539a017.
3. Park S., Ruoff R.S. Chemical methods for the production of graphenes. *Nat. Nanotechnol.*, 2009, vol. 4, no. 4, pp. 217-224, doi: 10.1038/nnano.2009.58.
4. Lu X., Yu M., Huang H., Ruoff R.S. Tailoring graphite with the goal of achieving single sheets. *Nanotechnology*, 1999, vol. 10, no. 3, pp. 269-272, doi: 10.1088/0957-4484/10/3/308.

5. Schwierz F. Graphene transistors. *Nat. Nanotechnol.*, 2010, vol. 5, no. 7, pp. 487-496, doi: 10.1038/nnano.2010.89.
6. Hu W. et al. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano*, 2010, vol. 4, no. 7, pp. 4317-4323, doi: 10.1021/nn101097v.
7. Lin L. et al. Size-dependent effects of suspended graphene oxide nanoparticles on the cellular fate of mouse neural stem cells. *Int. J. Nanomedicine*, 2020, vol. 15, pp. 1421-1435, doi: 10.2147/IJN.S225722.
8. Rasanani A.H., Kaffashi B., Seyfi J., Ahmadi S. Probing the effect of graphene surface chemistry on compatibility, crystallinity, and viscoelastic response of polylactic acid/polyvinylidene fluoride blends. *Mater. Today Commun.*, 2022, vol. 30, no. January, p. 103188, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103188.
9. Sontakke A.D., Tiwari S., Purkait M.K. A comprehensive review on graphene oxide-based nanocarriers: Synthesis, functionalization and biomedical applications. *FlatChem*, 2023, vol. 38, no. February, p. 100484, doi: 10.1016/j.flatc.2023.100484.
10. Rahman M. et al. Chapter 13 - Functionalized graphene-based nanomaterials for drug delivery and biomedical applications in cancer chemotherapy. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, 2019, pp. 429-460, doi: 10.1016/B978-0-12-816504-1.00011-9.
11. Samantara A.K., Acharya C., Satpathy D., Panda C.R., Bhaskara P.K., Sasmal A. Chapter 13 - Functionalized graphene: An unique platform for biomedical application. *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*, 2018, pp. 545-584, doi: 10.1016/B978-0-12-813691-1.00013-0.
12. Maktedar S.S., Mehetre S.S., Avashthi G., Singh M. In situ sonochemical reduction and direct functionalization of graphene oxide: A robust approach with thermal and biomedical applications. *Ultrason. Sonochem.*, 2017, vol. 34, pp. 67-77, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.05.015.
13. Luo Y. et al. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, vol. 7, no. 11, pp. 6331-6339, doi: 10.1021/acsami.5b00862.
14. Shanmugam D.K. et al. Efficacy of Graphene-Based Nanocomposite Gels as a Promising Wound Healing Biomaterial. *Gels*, 2022, vol. 9, no. 1, p. 22, doi: 10.3390/gels9010022.
15. Qu G. et al. Graphene oxide induces toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. *ACS Nano*, 2013, vol. 7, no. 7, pp. 5732-5745, doi: 10.1021/nn402330b.
16. Jasim D.A. et al. The impact of graphene oxide sheet lateral dimensions on their pharmacokinetic and tissue distribution profiles in mice. *J. Control. Release*, 2021, vol. 338, no. August, pp. 330-340, doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.028.
17. Wu J., Yang R., Zhang L., Fan Z., Liu S. Cytotoxicity effect of graphene oxide on human MDA-MB-231 cells. *Toxicol. Mech. Methods*, 2015, vol. 25, no. 4, pp. 312-319, doi: 10.3109/15376516.2015.1031415.
18. Tu Z. et al. Combination of Surface Charge and Size Controls the Cellular Uptake of Functionalized Graphene Sheets. *Adv. Funct. Mater.*, 2017, vol. 27, no. 33, doi: 10.1002/adfm.201701837.
19. Cheng C. et al. Biopolymer functionalized reduced graphene oxide with enhanced biocompatibility via mussel inspired coatings/anchors. *J. Mater. Chem. B*, 2013, vol. 1, no. 3, pp. 265-275, doi: 10.1039/c2tb00025c.
20. Qi Z. et al. Enhancement of neural stem cell survival, proliferation and differentiation by IGF-1 delivery in graphene oxide-incorporated PLGA electrospun nanofibrous mats. *RSC Adv.*, 2019, vol. 9, no. 15, pp. 8315-8325, doi: 10.1039/c8ra10103e.
21. Devi Y.G.V., Nagendra A.H., Shenoy S.P., Chatterjee K., Venkatesan J. Fucoidan-Incorporated Composite Scaffold Stimulates Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Mar. Drugs*, 2022, vol. 20, no. 10, doi: 10.3390/md20100589.
22. Priyadarsini S., Mohanty S., Mukherjee S., Basu S., Mishra M. Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *J. Nanostructure Chem.*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 123-137, doi: 10.1007/s40097-018-0265-6.
23. Feng R., Yu F., Xu J., Hu X. Knowledge gaps in immune response and immunotherapy involving nanomaterials: Databases and artificial intelligence for material design. *Biomaterials*, 2020, vol. 266, no. October, p. 120469, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120469.
24. Yang K., Zhang S., Zhang G., Sun X., Lee S.T., Liu Z. Graphene in mice: Ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.*, 2010, vol. 10, no. 9, pp. 3318-3323, doi: 10.1021/nl100996u.
25. Liu Y. et al. Single-layer graphene enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2016, vol. 12, no. 6, pp. 1270-1284, doi: 10.1166/jbn.2016.2254.
26. Pourmadadi M., Shayeh J.S., Arjmand S., Omidi M., Fatemi F. An electrochemical sandwich immunosensor of vascular endothelial growth factor based on reduced graphene oxide/gold nanoparticle composites. *Microchem. J.*, 2020, vol. 159, no. June, p. 105476, doi: 10.1016/j.microc.2020.105476.
27. Zhu S., Liu Y., Gu Z., Zhao Y. Research trends in biomedical applications of two-dimensional nanomaterials over the last decade – A bibliometric analysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2022, vol. 188, p. 114420, doi: 10.1016/j.addr.2022.114420.
28. Machova I. et al. The bio-chemically selective interaction of hydrogenated and oxidized ultra-small nanodiamonds with proteins and cells. *Carbon N.Y.*, 2020, vol. 162, pp. 650-661, doi: 10.1016/j.carbon.2020.02.061.
29. Cosnier S. et al. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *J. Biosens. Bioelectron*, 2010, vol. 26, no. 9, p. 4785, doi: 10.1021/la100886x.

30. Cellot G. et al. Bonding of Neuropeptide Y on Graphene Oxide for Drug Delivery Applications to the Central Nervous System. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2022, vol. 5, no. 12, pp. 17640-17651, doi: 10.1021/acsnm.2c03409.
31. Rhazouani A. et al. Synthesis and Toxicity of Graphene Oxide Nanoparticles: A Literature Review of in Vitro and in Vivo Studies. *Biomed Res. Int.*, 2021, vol. 2021, doi: 10.1155/2021/5518999.
32. Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 13-22, doi: 10.1038/nnano.2010.246.
33. Raslan A., Saenz del Burgo L., Ciriza J., Luis Pedraz J. Graphene oxide and reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine. *Int. J. Pharm.*, 2020, vol. 580, no. December 2019, p. 119226, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119226.
34. Kurantowicz N. et al. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles After Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, vol. 10, no. 1, doi: 10.1186/s11671-015-1107-9.
35. Novoselov K.S., Fal'ko V.I., Colombo L., Gellert P.R., Schwab M.G., Kim K. A roadmap for graphene. *Nature*, 2012, vol. 490, no. 7419, pp. 192-200, doi: 10.1038/nature11458.
36. Ji H., Sun H., Qu X. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, vol. 105, pp. 176-189, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.009.
37. Bai R. G. Hussein G.A. Chapter 11 - Graphene-based drug delivery systems. *Biomimetic Nanoengineered Materials for Advanced Drug Delivery*, 2019, pp. 149-168, doi: 10.1016/B978-0-12-814944-7.00011-4.
38. Wu J. et al. Graphene oxide used as a carrier for adriamycin can reverse drug resistance in breast cancer cells. *Nanotechnology*, 2012, vol. 23, no. 35, doi: 10.1088/0957-4484/23/35/355101.
39. Costa F.J.P. et al. Development of Thiol-Maleimide hydrogels incorporating graphene-based nanomaterials for cancer chemo-photothermal therapy. *Int. J. Pharm.*, 2023, vol. 635, no. February, doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122713.
40. Kuila T., Bose S., Khanra P., Mishra A.K., Kim N.H., Lee J.H. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, vol. 26, no. 12, pp. 4637-4648, doi: 10.1016/j.bios.2011.05.039.
41. Park J. et al. Graphene oxide flakes as a cellular adhesive: Prevention of reactive oxygen species mediated death of implanted cells for cardiac repair. *ACS Nano*, 2015, vol. 9, no. 5, pp. 4987-4999, doi: 10.1021/nn507149w.

БЕЗОПАСНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОНОСИТЕЛЕЙ В БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЯХ: БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ГРАФЕНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Ботин А.С.^{1,2}, Ризк М.Г.Х.¹, Попова Т.С.², Кордова А.В.¹

¹ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru
Поступила в редакцию 29.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0650

Аннотация. В статье рассматривается один из важнейших факторов, позволяющих определить возможность широкого и безопасного применения графеновых нанообъектов в современной биомедицине - это фактор биосовместимости, а именно взаимодействие графенсодержащего вещества с заданным участком организма, который реализуется на разных масштабах и на разных уровнях организации живой материи. Графен и его производные продемонстрировали исключительные свойства и потенциал для различных применений. Хотя производные графена, такие как оксид графена (GO), восстановленный оксид графена (rGO), многослойный графен (FLG) и многослойный графен (MLG), обладают свойствами, сходными со свойствами графена, необходимы дополнительные исследования для решения проблемы масштабируемости и экономической эффективности для практических применений. В тканевой инженерии материалы на основе графена показали себя многообещающими в качестве каркасов, биосенсоров и систем доставки лекарств, но оптимизация стратегий биосовместимости и функционализации имеет решающее значение для безопасного и эффективного использования. Эта работа представляет собой попытку лучше понять сложные взаимодействия между графеном и биологическими системами, включая клетки, ткани и органы, что необходимо для будущих исследований и расширения использования графена в биомедицинских приложениях.

Ключевые слова: графен, биосовместимость, функционализация, биомедицинские приложения.

САМООРГАНИЗАЦИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ВИРУСОВ: НАНО-ПРОЦЕСС СБОРКИ ГОЛОВОК (КАПСИДОВ) И УКЛАДКИ ДНК НА ПРИМЕРЕ ХВОСТАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ (ЛЯМБДА, T4)

Ботин А.С.^{1,2}, Пулин А.М.¹, Гаврилов А.В.¹, Попова Т.С.², Кордова А.В.¹

¹ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

Поступила в редакцию 29.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0651

Аннотация. Актуальность проблемы. Широкое и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов не только в медицине, но и в сельском хозяйстве, животноводстве, пищевой промышленности привело к распространению мультирезистентных штаммов, устойчивых к наиболее распространенным антибактериальным препаратам. В поисках альтернативных стратегий профилактики и контроля бактериальной инфекции все чаще обращают внимание на бактериофаговую (фаговую) терапию. Располагая широким диапазоном возможностей генной инженерии, эти бактериальные вирусы могут быть модифицированы с целью достижения точного контроля и обнаружения бактерий и, таким образом, послужить новым источником антимикробных средств. Кроме применения в антимикробной терапии, фаги также могут быть использованы как транспортные системы для доставки препаратов, как вакцины или же могут быть использованы для наносборки новых материалов, так как сами фаги, их фрагменты и компоненты являются нанообъектами и функционирующими наномашинами, процесс сборки которых чрезвычайно актуален. Целью данной статьи является: проведение анализа и обобщение важнейшей информации по теме бактериофагов, методов их определения и эффективной трансформации в современной науке, оценка достижений современных исследований в области процесса сборки головок (капсидов) и укладки внутрикапсидной ДНК у хвостатых бактериофагов (фаг лямбда и фаг T4), производство генно-модифицированных фагов и обзор основных перспектив развития данного направления.

Ключевые слова: вирусы, бактериофаги, самосборка капсидов, укладка ДНК, нанообъекты, фаготерапия.

Введение. Фундаментальная проблема бактериофагов. Первое косвенное свидетельство существования бактериофагов получил английский учёный Эрнест Ханкин, который в 1896 году написал о целебных свойствах вод Ганга и Джамна в Индии. Ханкин выяснил, что вода обладала антибактериальными свойствами по отношению к возбудителю холеры, сохранявшимися после фильтрации, но пропадающими после кипячения. К тому моменту вирусы, как микроскопические патогены, обладающие способностью проникать через бактериальные фильтры, были уже известны, однако учёный не высказал никаких предположений относительно вирусной природы открытого им эффекта. Наряду с этим известно, что российский микробиолог Н. Ф. Гамалея в 1898 году, впервые наблюдал явление лизиса сибирезвённой палочки под влиянием перевиваемого агента, но он также не описал этот агент в качестве вируса бактерий и не продолжил его исследования. Поэтому открывателями бактериофагов принято считать англичанина Фредерика Туорта и канадско-французского учёного Феликса д'Эрелля. В 1915 году английский ветеринарный микробиолог Ф. Туорт (F.W. Twort) описал явление «стекловидной трансформации» стафилококка, которое было названо «феномен Туорта». В своей работе он наблюдал разрушение стафилококка перевиваемым фильтрующимся агентом. Таким образом он впервые открыл вирус бактерий [1]. Для развития исследований в области бактериофагии особое значение имели работы французского и канадского учёного Феликса д'Эрелля (F. d'Herelle). В 1917 г. он сообщил, что из фекальных масс больных дизентерией ему удалось выделить особый литический фактор (вирус), способный проходить через бактериальные фильтры, размножаться на дизентерийных бактериях и вызывать при этом их лизис. Для обозначения этого вируса д'Эрелль впервые предложил название бактериофаг. Им же впервые было показано присутствие бактериофагов в составе микрофлоры человека и животных [2]. Таким образом, факт участия бактериофагов в функционировании нормального микробиоценоза тела животных и человека известен на протяжении почти 100 лет, однако данные о взаимном влиянии популяций фагов и их хозяев, а также о роли фагов в функционировании сообщества все ещё очень скудны и разрознены. Понимание особенностей эколого-физиологических взаимоотношений в тройственной системе «бактерии - фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой [3]. Исследования бактериофагов в 1930-1950х годах привели к формированию современной концепции вируса [4]. Фаговые исследования также дали начало молекулярной генетике и молекулярной биологии. Преимущественно на модели бактериофагов были впервые описаны молекулярные основы биологических процессов, особенно на ранних этапах развития молекулярной генетики и молекулярной микробиологии [5]. В настоящее время исследования по молекулярной биологии вирусов бактерий носят более специальный характер, будучи в основном направлены на изучение фагов как самостоятельного биологического явления, нежели на их использование в качестве модели для расшифровки универсальных биологических процессов.

Жизненные циклы бактериофагов. Можно выделить несколько этапов жизненного цикла прокариотических вирусов, которые характерны также и для большинства вирусов эукариот: адсорбция, высвобождение нуклеиновой кислоты из белковой оболочки, экспрессия и репликация нуклеиновой кислоты, сборка вириона, выход потомства вируса из инфицированной клетки [6]. Адсорбция фагов происходит в два этапа. Первый этап адсорбции это определение поверхностных клеточных структур, этот этап является обратимым и фаг имеет шанс диссоциировать от клетки без потери инфекционности. Во время второго этапа, происходит прочное связывание между структурой фага (например, осевой хвостовой фибриллой) и рецептором, которое запускает процесс необратимой перестройки вириона и высвобождение нуклеиновой кислоты. После адсорбции, механизмы вирусной частицы обеспечивают проникновение сквозь оболочки бактериальной клетки (к примеру, с помощью специфических фаговых ферментов, локализованных в хвосте или капсиде) и нуклеиновая кислота транспортируется в клетку, тогда как капсид остаётся на внешней поверхности клетки (только в случае семейства *Cystoviridae* происходит проникновение в клетку внутреннего нуклеокапсида вириона). После проникновения в клетку генетический материал вируса или встраивается в хозяйский геном, или остаётся в цитоплазме [7]. Существует несколько типов жизненных циклов бактериофагов: литический, лизогенный, псевдолизогенный и хронические инфекции [7, 8]. В литическом цикле фаг переключает клеточный метаболизм в направлении продукции новых фагов, которые освобождаются вследствие лизиса клетки. В лизогенном цикле, геном умеренного фага как правило интегрируется в геном хозяйской клетки и существует в нем неограниченное время в стадии покоя (профаг) и реплицируется вместе с хозяином. В некоторых клетках спонтанно или под воздействием внешних факторов может происходить индукция профага, при которой он вырезается из хромосомы и переходит к литическому развитию, заканчивающемуся синтезом вирусных частиц и лизисом клетки. При хронической инфекции потомство фагов постоянно выходит из заражённой хозяйской клетки посредством почкования или экстрюзии без лизиса. Клетка при этом сохраняет жизнеспособность в течение более или менее длительного времени. Наименее изученный жизненный цикл вирусов – псевдолизогенный. Феномен псевдолизогении был описан [8] как явление, где есть постоянное производство фагов в присутствии избытка хозяйских клеток. То есть, фаговый лизис не приводит к смерти культуры, а скорее находится в состоянии, в котором высокая численность фага сосуществует с экспоненциальной фазой роста хозяйских клеток.

Фаг лямбда (фаг λ) – это умеренный бактериальный вирус *E. coli* двухцепочечной геномной ДНК. Был впервые обнаружен Э. Ледербергом (E.M. Lederberg) в 1950 году [10]. Через 3 года А. Львов при исследовании генетических элементов (плазмид и эписом) у бактерий открыл способность фага лямбда встраиваться в геном бактерии *E. coli* в состоянии профага и передаваться в ряду поколений как генетический элемент [9]. Встроенный фаг Львов назвал профагом, а бактерию, в которую был встроен геном – лизогенной.

Бактериофаг лямбда состоит из головки икосаэдрической формы и хвоста. На его конце имеются боковые нити. Имеется белковая оболочка, в состав которой входит около 15 белков. Они кодируются вирусным геномом. Интеграция фага происходит путем генетической рекомбинации на определенном сайте бактериального генома – сайт *attL*. Обмен генетической информацией осуществляется с образованием структуры Холлидея и в присутствии двух белков: бактериального IHF и фагового Int, которые, связываясь с определенным сайтом кольцевого генома фага (*attP*), образуют интрасому [11].

Фаг лямбда может развиваться по лизогенному и литическому пути в зависимости от характера взаимодействия клетки-хозяина и вируса. Литический жизненный цикл заключается в производстве новых фаговых частиц и высвобождении вирусного потомства в среду, влечет гибель клетки-хозяина. При лизогенном пути фаговый геном встраивается в хромосому *E. coli* и может передаваться следующим поколениям [12].

Фаг лямбда является одним из наиболее детально изученных живых организмов на Земле. В связи с этим его используют как модельный объект в генетических исследованиях. В генной инженерии данный фаг применяют в качестве вектора для клонирования, так как молекула ДНК бактериофага лямбда имеет участок, не являющийся необходимым для его развития. Поэтому его можно вырезать и заменить любым другим аналогичным по размеру фрагментом ДНК, а затем путем размножения рекомбинантного бактериофага осуществить клонирование. Для создания библиотек генов одними из самых распространенных и являются векторы на основе фага λ . В связи с тем, что жизненный цикл бактериофага лямбда может идти двумя путями, фагу «приходится делать выбор» в пользу либо лизогенного, либо литического пути. Выбор пути осуществляется на основе простого механизма переключения генов. Это делает бактериофаг удобным объектом для изучения регуляции генной экспрессии [12].

Данный бактериофаг также применяют для лечения некоторых бактериальных заболеваний (холеры, дизентерии) без риска для здоровья. Зачастую препаратами на основе бактериофагов заменяют антибиотики, особенно при резистентности бактерий к антибиотикам.

Бактериофаг лямбда (λ), или колифаг λ , является фагом, специализированным на *E. coli*. Принадлежит к семейству *Siphoviridae*. Его частица, или вирион, состоит из капсида (головки), представляющего собой полый белковый кристалл, отростка и нитей (фибрилл) на конце отростка [13]. В капсиде заключен геном фага – двунигетевая линейная ДНК длиной 48502 п.н., обладающая липкими 5'-концами, которые еще называют *cos*-концами (*cosL* и *cosR*). Геном включает 32 гена, кодирующих белки капсида (7 белков), отростка (11 белков) и имеющих регуляторную роль (14 генов). Сегмент генома размером около 20 тыс. п.н. отвечает за процесс встраивания ДНК фага в геном хозяина (рис. 1.)

Enterobacteria phage λ

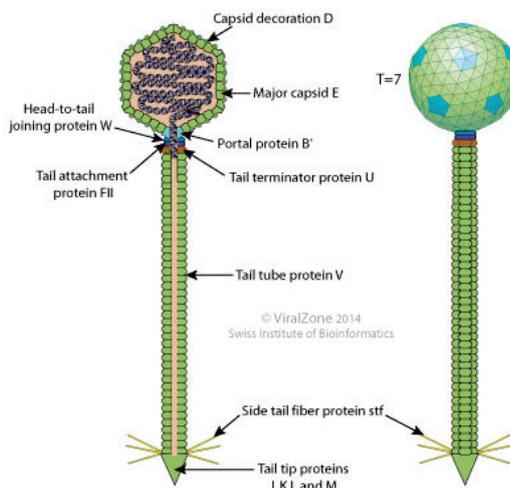


Рисунок 1. Бактериофаг лямбда (λ), или колифаг λ , является фагом, специализированным на *E. coli*. Принадлежит к семейству Siphoviridae. Его частица, или вирион, состоит из капсида (головки), представляющего собой полый белковый кристалл, отростка и нитей (фибрилл) на конце отростка

Стратегия клонирования. Третья часть ДНК фага лямбда, около 20 кб, расположенных в середине, несущественна для размножения фага и ответственна за встраивание в хромосомную ДНК [14].

Этот сегмент можно заменить чужеродной ДНК. Рекомбинантная ДНК будет реплицироваться как фаговая ДНК по литическому пути развития. Фаговая ДНК упаковывается в головки в цитоплазме клеток *E. coli*. Упаковочная реакция лежит в основе клонирования: смешав в пробирке пустые головки, рекомбинантную ДНК и отростки можно получить зрелые фаговые частицы.

ДНК фага лямбда имеет два *SamHI*-сайта, фланкирующих участок размером около 20 кб. При гидролизе фаговой ДНК рестриктазой *SamHI* образуются три фрагмента – L-левое плечо, которое содержит информацию о

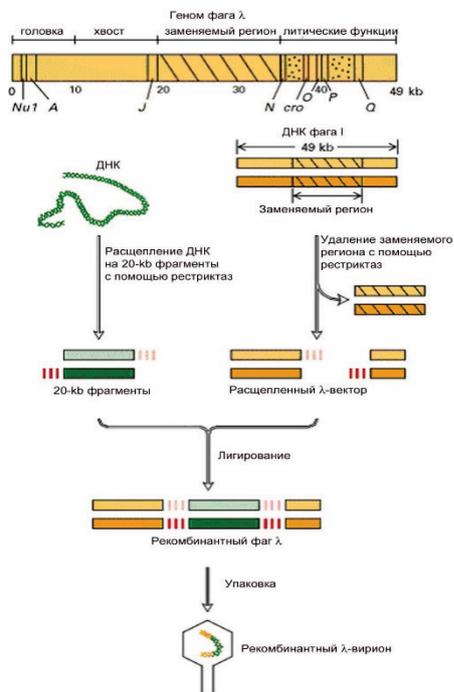


Рисунок 2. Структура генома фага и конструирование векторов на основе бактериофага лямбда [http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology /recombinant DNA and Genomics]. ДНК фага лямбда - это линейная двухцепочечная молекула размером около 48502 п.н. (пар нуклеотидов) с одноцепочечными 5'концами из 12 нуклеотидов. Их называют *cos*-концами (*cos*-сайтами), они взаимокomплементарны и могут спариваться друг с другом с образованием кольцевой молекулы. В зрелых вирионах ДНК находится в форме линейной молекулы, попадая в клетку, ДНК циклизуется по *cos*-сайтам и функционирует в кольцевой форме

головке и отростке фага лямбда, R-правое плечо, которое содержит информацию о репликации фаговой ДНК и лизисе бактериальной клетки (рис. 2). Средний сегмент ДНК кодирует белки, ответственные за интеграцию в хромосомную ДНК. Этот участок фаговой ДНК замещается чужеродной ДНК. ДНК, предназначенная для клонирования, предварительно расщепляется рестриктазой BamHI, рестрикты фракционируют и отбирают фрагменты размером до 20 кб (рис. 2). Оба препарата, фаговую и чужеродную ДНК смешивают в одной пробирке и обрабатывают ДНК-лигазой. Лигированная смесь будет содержать разные комбинации ДНК, в том числе и восстановленную ДНК фага лямбда [16]. Далее рекомбинантные молекулы смешивают с головками и отростками фага лямбда, и *in vitro* происходит самосборка зрелых фаговых вирионов. *Правило таково, что в фаговые головки упаковываются только фрагменты около 50 кб, ДНК по размеру более 52 кб не уместится в головку, ДНК по размеру менее 38 кб после упаковки дает не инфицирующие фаговые частицы.*

На следующем этапе необходимо отделить рекомбинантные фаги. Для этого ими инфицируют клетки *E. coli*, в хромосому которых интегрирован фаг P2. Клетки *E. coli*-P2 приобретают иммунитет на другие бактериофаги, способные встраиваться в хромосому. Поэтому инфицировать такие клетки способны только рекомбинантные бактериофаги с deletированной областью интеграции. Полноценные фаги лямбда не включаются в клетки *E. coli*-P2 [14].

Структура фага Т4. Наиболее полная структурная информация на сегодняшний день имеется о фаге Т4, дцДНК-содержащем вирусе, относящемся к семейству Myoviridae и инфицирующим *E. coli*. Вирион Т4 состоит из капсида и сокращаемого хвоста, который оканчивается базальной пластинкой с 6 длинными фибриллами. По данным криомикроскопии капсид Т4 имеет форму вытянутого икосаэдра длиной 1200 Å (120 nm) и шириной 860 Å (86 nm) [13]. Основной белок капсида, gp23 (48.7 кДа, 930 копий в капсиде), формирует гексагональную решетку с триангуляционными числами [14] $T_{end} = 13$ для концов и $T_{mid} = 20$ для середины [13]. Расстояние между соседними гексомерами gp23 составляет ~140 Å (14 nm). Одиннадцать вершин капсида занимают пентамеры специального вершинного белка gp24 (47.2 кДа), а двенадцатую вершину занимает додекамер gp20, который является порталным белком и служит для прикрепления хвоста и выхода ДНК [15].

Основными белками капсида Т4 являются gp23, gp24, gp20, Hoc и Soc и для большинства из них известны кристаллические структуры [16]. Gp23 образует стенку капсида, gp24 расположен на вершинах, gp20 – порталный белок. Считается, что белок, занимающий вершины икосаэдра, gp24, является более поздним приобретением в ходе эволюции [17]. Hoc (highly antigenic outer capsid protein) имеет форму гантели и располагается в центре каждого гексона, образованного gp23, и Soc (small outer capsid protein) имеет палочкообразную форму и встраивается между гексонами. Оба эти белка необязательны и прикрепляются к капсиду после его сборки [17, 19]. Отсутствие этих белков не сказывается на воспроизводстве фагов и их способности инфицировать. Soc взаимодействует с 2 соседними молекулами gp24, склеивая соседние гексоны. Прикрепленные Soc тримеризуются с образованием олигомера из трёх молекул, формируя жесткий каркас, укрывающий структуру капсида. Hoc (highly antigenic outer capsid protein) не вносит изменений в стабильность капсида, однако, его Ig-подобный домен расположенный на поверхности может взаимодействовать с клеточной поверхностью, что способствует выживанию фага [17].

Упакованная ДНК Т4 имеет много общих черт с ДНК других хвостатых фагов: ДНК конденсирована до плотности ~500 мг/мл, расстояние между тяжами ДНК составляет 2.5 nm. ДНК Т4 упакована в ориентации, параллельной продольной оси капсида вокруг внутреннего белкового тела [20]. Один из внутренних белков Т4, IP18, впрыскивается в клетку вместе с ДНК для ее защиты от эндонуклеаз *E. coli* [21,22]. Gp2 – белок, защищающий концы фаговой ДНК от эндонуклеаз клетки-хозяина, также находится внутри капсида [23].

ДНК внутри капсида преимущественно имеет В-форму [24]. Отрицательные заряды фосфатных групп уравниваются аминами, полиаминами, одно- и двувалентными катионами. Среди всех положительно заряженных аминокислот только лизин, находящийся в составе внутренних белков контактирует с фосфорами ДНК, что позволяет предполагать, что внутренние белки образуют с ДНК специальные структуры [17].

Сравнительное строение вирусной частицы бактериофага Т4 и бактериофага Лямбда.

Бактериофаг Т4: Этот бактериофаг, как и все Т-четные колифаги относится к сложным вирусам, т.е. он состоит из икосаэдрической головки диаметром 650 Å (65nm) и длиной 950 Å (95nm), и отростка или хвоста. Капсид головки состоит из капсомеров, внутри него находится плотно упакованная двухцепочечная линейная ДНК и фермент транскриптаза в неактивном состоянии. Отросток фага имеет сложное строение. Он состоит из полого стержня, покрытого чехлом, который заканчивается базальной пластинкой с шипами и нитями. Все структуры отростка состоят из белков. В области базальной пластинки находится фермент бактериофаговый лизоцим, который способен разрушать пептидогликан муреин клеточной стенки бактерий. Здесь же имеется АТФ-аза, которая регенерирует энергию для сокращения чехла отростка бактериофага.

Бактериофаг Лямбда: Сложный фаг. Икосаэдрический капсид диаметром 50nm образован молекулами шести разных белков. Хвост длиной 135nm включает белки 11 типов. Содержит линейную двухцепочечную ДНК. На 5/-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов – липкие концы (cos-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку, липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки хозяина и образуется кольцевая молекула.

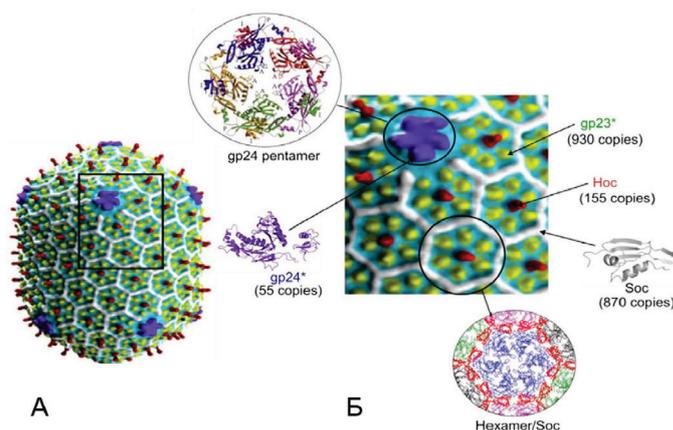


Рисунок 3. Сборка головок (капсидов): у всех хвостатых фагов способ укладки полипеттидной цепи (фолд) капсидных белков идентичен (А - общий план, Б – ячейка). [[http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular Cell Biology/recombinant DNA and Genomics](http://www.ncbi.nih.gov/book/Molecular_Cell_Biology/recombinant_DNA_and_Genomics)]

Сборка головок (капсидов) хвостатых бактериофагов. В настоящее время накоплен большой массив данных, свидетельствующих о том, что у всех хвостатых фагов способ укладки полипеттидной цепи (фолд) капсидных белков идентичен. Это косвенно подтверждается общностью их происхождения [25].

Морфогенез капсида (головки) хвостатых фагов инициируется порталным белком, который может связываться с другими морфогенетическими белками вируса для образования инициирующего комплекса. Этот комплекс инициирует сборку более крупной промежуточной структуры – так называемой проголовки (или прокапсида), которая затем подвергается протеолитическому процессингу, упаковке ДНК и расширению, что приводит к образованию законченной головки фага [26].

У фага Т4 и родственных вирусов инициирующий комплекс проголовки, состоящий из порталного белка gp20 и морфогенетического фактора gp40, прикрепляется к внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Однако это является скорее исключением, и у большинства бактериофагов сборка проголовок осуществляется в цитоплазме. Стенка капсида формируется как правило одним единственным белком — главным белком капсида, который образует как гексамеры, из которых сложены грани икосаэдра, так и пентамеры, расположенные в вершинах проголовки. В некоторых случаях эти функции могут быть разделены. Так у фага Т4 главный белок капсида gp23 образует только гексамеры, а вершины заняты отдельным белком - gp24, который, однако, гомологичен gp23 и также обладает характерным НК97-фолдом. Весьма важно, что хотя проголовки имеют такую же укладку субъединиц, как и зрелые капсиды, их форма менее угловатая, и часто ближе к сфере, чем к икосаэдру. Контакты между соседними олигомерами главного белка капсида менее жесткие, поэтому можно говорить об определенной кривизне поверхности этой структуры [27].

Рост стенки проголовки предположительно происходит «снизу вверх» – от порталного комплекса до противоположной ему вершины, однако окончательно это пока не выяснено. При этом субъединицы белка капсида могут присоединяться к растущей структуре как в виде мономеров, так и в виде предварительно сформированных пента- и гекса-меров. Так как головки фагов часто имеют достаточно большие размеры, то одних физико-химических свойств самих субъединиц главного белка капсида не достаточно для соблюдения правильного размера образующейся проголовки, и необходим контроль со стороны вспомогательной структуры. Этот контроль осуществляется при помощи внутреннего скаффолда (от англ. scaffold – строительные леса, каркас). Белок скаффолда может быть закодирован отдельным геном, обычно находящимся в геноме непосредственно перед геном белка оболочки, или представлять собой N-концевой домен белка оболочки.

Большинство фагов кодируют отдельный белок скаффолда. Эти белки обычно состоят из 2–3 α -спиралей, уложенных антипараллельно, в результате чего субъединицы белка скаффолда имеют палочкообразную форму. Субъединицы скаффолда образуют полимерную структуру, но детали ее организации неизвестны. Для фага Т4 по данным электронно-микроскопических исследований изолированных скаффолдов (naked scaffold), накапливающихся при инфекции мутантами, лишенными главного белка капсида (gp23), была предложена модель со спиральной симметрией. В соответствии с этой моделью скаффолд построен из нескольких (6-8) лент (напоминающих веревочные лестницы), собранных из палочковидных субъединиц белка скаффолда gp22, закрученных вокруг общей оси. Считается, что эта структура растет «вверх» от инициирующего порталного комплекса. Стенка капсида полимеризуется поверх скаффолда. Из-за вытянутой формы субъединиц и их спиральной укладки диаметр скаффолда оказывается достаточно точно детерминирован, что диктует строго определенный размер собирающейся проголовки (триангуляционное число Т) [27, 28].

Надо понимать, что на размер проголовки также оказывает существенное (часто и определяющее) влияние, и структура самого главного капсидного белка, гексамер которого имеет диаметр около 145 Å (14,5 нм), и небольшие отличия его формы могут диктовать наиболее выгодную кривизну поверхности проголовки (и, соответственно, определять ее триангуляционное число). Тем не менее, как правило, сам по себе капсидный

белок обычно способен собираться в структуры с различной кривизной (и, соответственно, размером), поэтому скаффолд может диктовать выбор правильного варианта сборки. Кроме этого, многие вирусы, например, фаг T4, а также фаги, phiEco32, 9g, phag29 и многие другие, обладают вытянутой головкой. Поэтому помимо механизма контроля диаметра существует необходимость контроля степени удлинения проголовки. Детали этого механизма не известны, однако имеющиеся не прямые данные указывают, что размер ограничивается в результате взаимодействия растущих скаффолда и стенки капсида [25].

По существующим представлениям в начале сборки формируется нижняя гемисферическая крышечка проголовки (5 равносторонних граней, окружающих порталную вершину), после чего структура растет в длину, сохраняя тот же диаметр. Наконец, в какой-то момент происходит событие, останавливающее рост проголовки и запускающее формирование верхней гемисферической крышечки. Косвенные данные указывают, что таким событием может быть критическое накопление сдвига фаз между молекулярными решетками скаффолда и стенки капсида, которые имеют различную симметрию и различную периодичность. Тем не менее, достоверно определить природу сигнала, останавливающего удлинение, пока не удается.

У некоторых небольших фагов отдельной полимерной структуры скаффолда, по-видимому, не образуется. В этих случаях субъединицы скаффолда связываются с соседними субъединицами полимеризующейся стенки капсида, и образуют контакты между собой, в результате чего скаффолд диктует определенное значение радиуса кривизны стенки проголовки, которое соответствует правильному значению числа T [29]. Так действует, например, белок скаффолда фага P2 gpO. Этот белок также обладает протеазной активностью, которая обеспечивает процессинг проголовки при созревании. Однако, по всей видимости, такой механизм пригоден лишь для формирования относительно небольших изометричных головок, таких как T=7 головка фага P2.

У некоторых, сравнительно немногих фагов, отдельные белки скаффолда отсутствуют. Вместо этого главный белок капсида имеет дополнительный N-концевой домен, формирующий длинный выступ в виде вытянутого треугольника – так называемый дельта-домен. Дельта-домены соседних субъединиц взаимодействуют друг с другом, в результате чего сформированная проголовка напоминает морского ежа, вывернутого наизнанку. В этой структуре вытянутые дельта-домены играют роль радиальных распорок, длина которых детерминирует диаметр прокапсида. Таким образом происходит сборка проголовок у колифагов T5 и HK97. Но если у T5 для образования капсида правильного размера необходимо участие порталного белка, то белок фага HK97 может собираться в икосаэдры такого же размера, что и головка фага (T=7), без помощи каких бы то ни было иных вирусных белков.

Вполне вероятно, что более детальное исследование структур скаффолдов, собранных из отдельного белка, обнаружит у многих фагов значительное сходство со структурой, образуемой дельта-доменами, однако пока такие данные отсутствуют.

Белки скаффолда или дельта-домены фагов являются также матрицей для присоединения различных внутренних белков, которые должны находиться внутри зрелого капсида. В большинстве случаев такие белки инжектируются вместе с ДНК или непосредственно перед ней и выполняют различные функции: от организации канала для транспорта генома через периплазматическое пространство (в основном у подовирусов) до первичного преобразования клетки для нужд репликации вируса – ингибирование антивирусных систем и/или клеточных макромолекулярных синтезов, завершение интернализации геномной ДНК и другие, не всегда понятные функции [25]. Так, например, у фагов, родственных T4, имеется несколько внутренних IP белков (от англ. internal protein). Интересно, что последовательности этих белков часто подвергаются латеральному переносу (модульные перестановки), но на N-конце все они несут весьма консервативную последовательность – так называемый сигнал упаковки. По-видимому, этот пептид взаимодействует с белком скаффолда gp22, что приводит к локализации IP белков внутри проголовки. Интересно, что используя данные сигналы упаковки, можно добиться упаковки в капсид T4 гетерологичных белков, например, флуоресцентного белка GFP.

Помимо небольших мономерных белков, в клетку бактерии некоторые фаги доставляют достаточно крупные и даже мультисубъединичные белки, такие как, например, вирионная РНК-полимераза подовируса №4. Загрузка их в капсид происходит также в момент сборки проголовки, до стадии упаковки ДНК [29, 30].

После завершения сборки оболочки проголовки происходит ее процессинг.

У большинства фагов для этого необходима активация протеазы проголовки, которая также является компонентом внутреннего скаффолда. У фага T4 протеаза gp21 образует сердцевинную часть скаффолда, у других фагов отдельные структуры, формируемые протеазой, не описаны. Протеаза активирует себя при помощи автопротеолиза. Активированные молекулы протеазы процессируют другие молекулы протеазы, вызывая и их активацию. Природа сигнала, запускающего процессинг первых субъединиц проголовочной протеазы, пока не установлена.

Протеаза производит расщепление белка скаффолда, а также удаление части аминокислотной последовательности белка оболочки [25]. Дельта-домены, если они используются в качестве скаффолда, также удаляются при протеолитическом процессинге. Поэтому у многих фагов молекулярная масса главного белка капсида в составе зрелых частиц оказывается заметно меньше, чем у полипептида, кодируемого соответствующим геном. Сами молекулы протеазы также расщепляются, и продукты гидролиза удаляются через поры в оболочке проголовки. Важно отметить, что несмотря на высокую активность, протеазы проголовки обладают строгой специфичностью к аминокислотной последовательности в участке расщепления (например, gp21 фага T4 узнает сайт (I или L)PPE), поэтому белки или их фрагменты, лишенные таких мотивов, остаются не расщепленными.

У фагов родственных T4 протеолитический процессинг сопряжен с отсоединением проголовки от поверхности цитоплазматической мембраны, где происходит ее сборка. Возможно, у некоторых других фагов, у которых процессы морфогенеза определенным образом локализованы в клетке, процессинг также может приводить к изменению локализации проголовок в клетке, однако точных данных об этом нет. У фага P22 разборка скаффолда не связана с протеолитическим расщеплением. Структура деполимеризуется в процессе упаковки ДНК, причем палочкообразные субъединицы белка скаффолда удаляются сквозь отверстия в оболочке проголовки и могут использоваться повторно для сборки новых фаговых частиц [31].

После сборки и протеолитического процессинга собранные проголовки становятся пригодны для упаковки фаговой ДНК. Упаковка осуществляется через канал портового белка за счет энергии АТФ. Здесь же важно отметить, что процесс упаковки *in vivo* является триггером расширения проголовки. Обычно расширение происходит, когда упаковано около 1/3 генома. При расширении субъединицы оболочки капсида поворачиваются, претерпевая лишь небольшие изменения в третичной структуре, и формируют более прочную укладку. При этом диаметр проголовки увеличивается примерно в 1,4 раза, а объем - примерно в 2 раза [32].

Икосаэдрическая форма капсида делается более четко выраженной, а стенка расширенной проголовки становится тоньше, хотя ее устойчивость к различным физическим и химическим воздействиям резко возрастает.

У фага НК97 именно в момент расширения проголовки происходит продевание полипептидной цепи субъединиц главного белка головки через петли соседних субъединиц и ковалентное перешивание, что создает структуру, похожую на кольчугу (chainmail structure). Поэтому капсиды фага НК97, а также их искусственные аналоги, получаемые из рекомбинантного белка головки gp5, очень прочны и для их разборки требуется использовать гидролиз протеазами. Эти свойства создают ряд интересных возможностей для применения белка капсида фага НК97 в бионанотехнологиях [32].

Процесс расширения проголовки напоминает сборку конструкций, элементы которых сначала устанавливаются под углом, а потом с усилием приводят в окончательное положение «в распор». Так, например, собирают многие типы складных лодок, по похожему принципу открывается купол зонтика. Однако, в отличие от раскрытия зонтика, процесс расширения проголовки является энергетически выгодным. Если *in vivo* его запускает, по-видимому, давление упакованной ДНК, то *in vitro* расширение можно вызвать небольшим нагреванием препарата процессированных проголовок. Оно может происходить и спонтанно.

После расширения на поверхности капсида образуются сайты для присоединения декорирующих белков головки. Их присоединение обычно не связано с другими процессами, поэтому декорирующие белки могут быть присоединены и позднее, к уже собранным частицам, в том числе *in vitro* [32, 33].

После завершения упаковки ДНК к головке присоединяется белок, завершающий головку (head completion protein, иногда называемый привратником (gate keeper protein)). Этот белок образует додекамерное кольцо снизу портового белка. Его присоединение завершает морфогенез головки и препятствует самопроизвольному выходу ДНК.

Упаковка ДНК хвостатых бактериофагов. Морфогенетический процесс, при котором ДНК упаковывается в АТФ-зависимой реакции в предварительно собранные прокапсиды, является общим свойством всех хвостатых бактериофагов, а также герпес-вирусов животных, которые, как считается, имеют с хвостатыми фагами отдаленного общего предка. Таким образом, процесс упаковки вирусной ДНК является очень древним [25]. Синтез ДНК большинства фагов приводит к образованию конкатемерных молекул, состоящих из нескольких копий геномной последовательности вируса, объединенных «голова к хвосту». Поэтому упаковка сопряжена с разрезанием конкатемера на индивидуальные геномные молекулы. Различные способы этого разрезания (стратегии упаковки) приводят к образованию различных вариантов организации вирионной ДНК [34].

Процесс упаковки катализируется белковым комплексом - терминазой. Это название связано с тем, что первые найденные нульмутанты по гену терминазы в непремиссивных условиях формировали пустые головки, то есть имели незаконченный, «нетерминированный» процесс сборки капсидов. Терминазы являются неструктурными (то есть не включаемыми в состав вириона) морфогенетическими белками. У подавляющего большинства фагов они состоят из субъединиц двух типов, большой и малой. Малая субъединица (TerS) терминазы обычно имеет размер 130-250 а.к. и обеспечивает узнавание сайта начала упаковки, в то время как большая субъединица (TerL) - белок размером 500-700 а.к. является АТФазой и нуклеазой, вносящей иницирующий и терминирующий разрывы в конкатемерную ДНК. В искусственных системах упаковки *in vitro* некоторых фагов процесс можно осуществить с помощью только большой субъединицы, хотя это и приводит к сильному снижению эффективности.

И TerS, и TerL обычно формируют олигомеры в виде колец. Олигомер малой субъединицы (часто октамер или додекамер) связывается с ДНК-субстратом (в редких случаях распознавании сайта упаковки могут участвовать и другие белки; так, у фага T7, по-видимому, вирусная РНКП gp1 в комплексе с gp3.5 при транскрипции с конкатемера делает паузу в районе правого конца генома и рекрутирует упаковочный комплекс, который начинает упаковку ДНК справа налево, против направления транскрипции) [35].

При этом ДНК не продевается через канал TerS, но, возможно, оборачивается вокруг него. Связавшись с ДНК, олигомер TerS рекрутирует молекулу большой субъединицы терминазы TerL, эндонуклеазная активность которой служит для внесения иницирующего разрыва. У фага T4 в инициации участвуют сразу два додекамера малой субъединицы gp16. Они связываются с ДНК и взаимодействуют между собой и после этого рекрутируют большую субъединицу gp17. В результате образуется два комплекса ДНК - (gp16)₂gp17, способные связываться с проголовкой [25]. После взаимодействия с портовым белком проголовки комплекс присоединяет еще 4

молекулы большой субъединицы терминазы gp17, которые образуют пентамерное кольцо вокруг нити ДНК. На этом формирование упаковочного комплекса завершается.

По-видимому, участие в инициации упаковки одновременно двух додекамеров gp16 связано с тем, что у T4, в отличие от большинства других фагов, сайт начала упаковки и ее направление относительно генома выбираются практически произвольно (не детерминированы специфическими последовательностями). Поэтому один иницирующий разрыв можно использовать для формирования сразу двух упаковочных комплексов. Организация упаковочного аппарата в виде кольцевой пентамерной структуры, присоединенной снизу к додекамерному поральному белку проголовки, является общей чертой всех изученных в этом отношении хвостатых бактериофагов. У подовируса *Vacillus subtilis* φ29 для формирования комплекса необходимо еще кольцо из пяти молекул так называемой упаковочной РНК (pRNA), которое присоединяется снизу к поральному белку. У других фагов РНК в состав упаковочного комплекса не входит.

Сформированный комплекс проталкивает ДНК внутрь проголовки за счет энергии гидролиза АТФ, расходуя одну молекулу АТФ на 2 п.н. упаковываемой ДНК. Интересно, что расход АТФ не зависит от того, какое количество ДНК уже упаковано (и, соответственно, насколько сильно преодолеваемое сопротивление) [25]. Относительно механизма генерации силы, проталкивающей ДНК, идут активные дискуссии. В настоящее время наиболее убедительно описывает имеющиеся структурные и экспериментальные данные модель «радиального поршневого мотора», в соответствии с которой ДНК-связывающие домены молекул большой субъединицы терминазы поочередно присоединяются к ДНК, подтягиваются примерно на 0,7 нм (две пары нуклеотидов) вверх и освобождают ДНК. Различные фазы процесса сопровождаются связыванием АТФ, его гидролизом и высвобождением АДФ и фосфата. При этом все перемещения доменов обусловлены электростатическими силами, возникающими вследствие сближения или удаления разноименно заряженных аминокислотных остатков, которое происходит вследствие связывания АТФ или диссоциации продуктов его гидролиза. После того как объем головки оказывается заполнен, эндонуклеазная активность большой субъединицы терминазы вносит в ДНК терминирующий разрыв [36].

Точный механизм, который позволяет упаковочному мотору чувствовать заполнение головки, пока не известен, однако мутации, влияющие на плотность упаковки ДНК некоторых фагов (например, SPP1), обнаруживаются в поральном белке и затрагивают аминокислотные остатки, экспонированные в полость канала. Необходимость заполнения капсида для успешного завершения упаковки (headful mechanism) лежит в основе стратегий, приводящих к формированию протяженной концевой избыточности (концевых повторов) вирионной ДНК и/или к кольцевым перестановкам. Однако даже у фагов, имеющих строго определенные концы вирионной ДНК, таких как фаг лямбда, большие делеции, пусть даже несущественных для литического размножения генов, вызывают сильное снижение жизнеспособности вируса, поскольку у мутантов при достижении упаковочным комплексом *cos*-сайта, определяющего границы соседних копий генома на конкатемере, проголовка еще не заполнена, что сильно подавляет внесение терминирующего разрыва.

Cos-сайты *Cos*-сайт бактериофага λ представляет собой длинный сегмент ≈200 bp, который необходим как для иницирования, так и для завершения упаковки генома из конкатемерной ДНК [36]. Участок, где терминаза вводит ступенчатые ники для генерации связных концов, называется *cosN*. Ранее считалось, что наличие *cosN* сайта достаточно для упаковки ДНК [37]. Однако более поздние исследования показали, что *cos*-сайт является сложным и состоит из трех и, возможно, четырех различных подсайтов. Как инициация, так и прекращение упаковки требуют дуплексного никирования на *cosN*-сайте [38, 39]. Кроме того, эффективная инициализация требует наличия дочернего сайта *cosB*, который находится после *cosN* сайта. Терминация требует наличия *cosQ*, дочернего сайта, который расположен перед *cosN* [40, 41]. Последовательность I2 расположена между *cosN* и *cosB*, также играет особую роль в эффективной упаковке ДНК [36]. Таким образом, полная *cos*-последовательность состоит из нескольких подсайтов, каждый из которых играет определенную роль в распознавании, обработке и упаковке вирусной ДНК.

Сайт *cosN* - участвует в разрезании цепи ДНК за счет активности терминазы. Сайт *cosB* удерживает терминазу, пока она отсекает и разделяет цепи [37]. Сайт *cosQ* следующей космиды (поскольку репликация катящегося круга часто приводит к линейным конкатемерам) удерживается терминазой после того, как предыдущая космида была упакована, чтобы предотвратить деградацию клеточными ДНКазам [41].

Фаготерапия. Вирусная фаготерапия или фаготерапия - терапевтическое использование бактериофагов для лечения патогенных бактериальных инфекций. Фаговые ферменты – основной фактор воздействия на бактерию-мишень. Фаговые лизины - это гидролитические ферменты, которые разрушают пептидогликаны клеточной стенки, способствуя высвобождению фага при уничтожении бактерий. Лизины обладают эффективностью по отношению к специфическим пептидогликанам в клеточной стенке, их специфичность зависит от вида или рода, эта характеристика является существенной. Многие из сконструированных лизинов обладают лучшей антимикробной активностью, чем большинство антибиотиков ранее и не обладали [42].

Эндолизины - это ферменты, используемые бактериофагами в конце их цикла репликации для разрушения пептидогликана бактерии-хозяина изнутри, что приводит к лизису клеток и высвобождению вирионов-потомков. Из-за отсутствия внешней мембраны в клеточной стенке грамположительных бактерий эндолизины могут получать доступ к пептидогликану и уничтожать эти организмы при наружном применении, что делает их интересными кандидатами в противомикробные препараты, особенно в свете растущей устойчивости бактерий

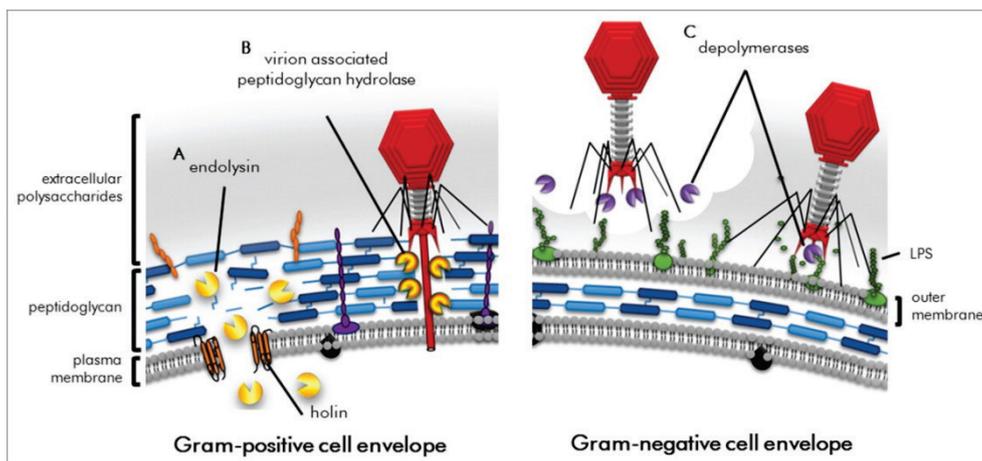


Рисунок 4. Схема лизиса грамположительных бактериальных клеток экзогенно введенными эндолизинами. Эндолизин расщепляет связи внутри пептидогликана, и высокое внутреннее давление клетки выталкивает плазматическую мембрану, что приводит к осмосису (лизису извне). Обобщенная структура пептидогликана иллюстрирует участки расщепления по типам эндолизина: гликоцидазы (а именно глюкозаминидаза и мурамидазы), амидазы и эндопептидазы [43, 44]

к лекарственным средствам. В данное время рассматривается модульная структура этих ферментов, в которой разделены функции связывания с клеточной стенкой и каталитические функции, а также их механизм действия, литическая активность и потенциал в качестве противомикробных средств [43].

Продолжается дальнейший скрининг новых эндолизиннов или разработка ферментов на основе эндолизина с переносчиками через внешнюю мембрану, что, как ожидается, расширит применение эндолизиннов в качестве терапевтических средств как для здоровья человека, так и для здоровья животных. Тем не менее, завершающиеся клинические испытания двух стафилолитических эндолизиннов в ближайшее время смогут обеспечить необходимую эффективность и безопасность этого класса противомикробных средств для борьбы с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью у пациентов (рис. 4) [43,44].

Заключение.

Жизненный цикл бактериофагов состоит из двух стадий: литической стадии, когда фаги размножаются внутри бактерий и лизируют бактерии, и лизогенной стадии, когда фаг находится в стационарной стадии, где размножение фагов отсутствует. Понимание жизненного цикла фагов имеет фундаментальное значение для понимания преимуществ фагов в качестве средств биологического контроля и того, как работают сконструированные фаги.

Бактериофаги являются альтернативой в конкуренции с противомикробными препаратами, поскольку фаги обладают такими преимуществами, как очень высокая специфичность к бактерии-мишени, способность к долгосрочному воздействию, они активны в отношении делящихся или не делящихся бактериальных клеток, обеспечивают эффективное уничтожение бактериальных биопленок и являются способными транспортерами для адресной доставки нуклеиновых кислот.

В эпоху растущего числа патогенов с множественной лекарственной устойчивостью и нехватки новых антибиотиков, растет потребность в обновлении старых и открытии новых противомикробных препаратов для лечения бактериальных инфекций. В этом контексте, полученные доклинические и клинические данные убедительно доказывают полезность фаговых эндолизиннов против целого ряда преимущественно грамположительных бактериальных патогенов, причем количество эндолизиннов, которые могут воздействовать и на грамотрицательные патогены, также растет.

Особое внимание уделяется молекулярной инженерии как средству оптимизации эндолизиннов для конкретных применений, создаются новые разработки, которые могут сделать эти белки активными в отношении грамотрицательных и внутриклеточных патогенов, и обобщаются самые последние применения эндолизиннов в области медицины, безопасности пищевых продуктов, сельского хозяйства и биотехнологии.

Специфичность бактериофагов уникальна. Бактериофаги селективно заражают специфические бактерии специализированными рецепторными молекулами, расположенными в клеточной стенке или мембране, такими как липополисахариды, тейхоевые кислоты и порины. Сконструированные фаги, понимание биологии бактериофагов и разработка новых инженерных инструментов для модификации ДНК позволяют разрабатывать новые стратегии уничтожения патогенов

Кроме того, особая способность бактериофага вводить нуклеиновые кислоты была использована и для создания совершенно новых стратегий, таких как введение генов для обеспечения бактериостаза, синтеза вредных соединений или вставки генов для восстановления устойчивости к антибиотикам.

Развитие методов генной инженерии в сочетании с нанотехнологиями приводит к пониманию того, что кроме применения в антимикробной терапии, фаги также могут быть использованы как транспортные системы для адресной доставки препаратов, таких как вакцины, или же могут быть использованы для наносборки новых

макромолекулярных структур и наноконструкций, так как сами фаги, их фрагменты и компоненты являются нанообъектами и функционирующими наномашинами, освоение процесса сборки которых позволяет развивать принципиально новые подходы, используя преимущества специфичности фагов.

С другой стороны, большой объем капсида фага Т4 позволяет осуществлять одновременную доставку нескольких генов и белков в клетку человека. В настоящее время уже подтверждена вместимость вектора на основе бактериофага Т4, в который удалось упаковать ген дистрофина. После этого было показано, что груз вектора можно использовать и для редактирования генома. С этой целью был выбран терапевтически значимый сайт – ген бета-гемоглобина (HBB) на 11-й хромосоме человека. Работа проведена на клеточной линии HEK293T (эмбриональная почка человека). Конструкция, представляющая собой комплекс Cas9-HBB гидРНК, успешно выполнила редактирование 20–25% клеток. Также был получен вектор, с помощью которого можно выполнить одновременное редактирование в двух разных, не связанных между собой участках генома [45].

В подобного рода исследованиях был продемонстрирован широкий спектр молекул, который может быть включен в искусственный вирусный вектор (ИВВ). К ним относятся белки размером от 27 до 516 кДа, нуклеиновые кислоты от 100 п.н. до 20–40 т.п.н., РНК-белковые, ДНК-белковые, белок-белковые комплексы, что означает новую эру фаговой инженерии и молекулярного конструирования на наномасштабах для применения бактериофагов, и разработки новых генно- и нано- инженерных инструментов и методов для медицины, биотехнологии, фармацевтики, безопасности пищевых продуктов, сельского хозяйства.

Список литературы / References:

1. Twort F.W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 1915, vol. 186, no. 4814, pp. 1241-1243.
2. d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *CR Acad. Sci.*, 1917, Paris, vol. 165, pp. 373-375.
3. Letarov A.V., Golomidova A.K., Tarasyan K.K. Ecological basis for rational phage therapy. *Acta Naturae*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 60-72.
4. Summers W.C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 130-133, doi: 10.4161/bact.20757.
5. Calendar R. *The bacteriophages*. Springer Science & Business Media., 2012, vol. 1, 596 p.
6. Duckworth D.H. History and basic properties of bacterial viruses. In *Phage ecology*, 1987, Singapore: John Wiley and Sons, pp. 1-44.
7. Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 28, no. 2, pp. 127-181, doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
8. Ackermann H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.*, 2007, vol. 152, no. 2, pp. 227-243, doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
9. Lwoff A. Lysogeny. *Bacterid. Rev.*, 1953, vol. 17, pp. 269-237.
10. Lederberg E.M. Lysogenicity in Escherichia coli strain K-12, *Microbial Genetics Bulletin*, 1950, vol. 1.
11. Тощкий В.Н. *Генетика*. Одесса: Астропринт, 2002 [Totsky V.N. *Genetics*. Odessa: Astroprint, 2002 (In Russ.)].
12. Пташне М. *Переключение генов: Регуляция генной активности и фаг лямбда*. Москва: Мир, 1988 [Ptashne M. *Gene switching: Regulation of gene activity and the lambda phage*. Moscow: Mir, 1988 (In Russ.)].
13. Fokine A., Chipman P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov V.V., Rao V.B., Rossmann M.G. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, vol. 101, pp. 6003-6008.
14. Caspar D.L., Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1962, p. 27.
15. Driedonks R.A., Engel A., Ten-Heggeler B., Driell V. Gene 20 product of bacteriophage T4 its purification and structure. *J. Mol. Biol.*, vol. 152, pp. 641-662.
16. Fokine A., Leiman P.G., Shneider M.M., Ahvazi B., Boeshans K.M., Steven A.C., Black L.W., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, vol. 102, pp. 7163-7168.
17. Rao V.B., Black L.W. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virol. J.*, 2010, vol. 7.
18. Ishii T., Yanagida M. The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro. *J. Mol. Biol.*, 1977, vol. 109.
19. Ishii T., Yamaguchi Y., Yanagida M. Binding of the structural protein soc to the head shell of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 1978, vol. 120, pp. 533-544.
20. Cerritelli M.E., Cheng N., Rosenberg A.H., McPherson C.E., Booy F.P., and Steven A.C. Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, 1997, vol. 91, pp. 271-280.
21. Bair C.L., Black L.W. A type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 366, pp. 768-778.
22. Bair C.L., Rifat D., Black L.W. Exclusion of glucosyl- hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein inhibitor IPI*. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 366, pp. 779-789.
23. Wang G.R., Vianelli A., Goldberg, E.B. Bacteriophage T4 self- assembly: in vitro reconstitution of recombinant gp2 into infectious phage. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, pp. 672-679.

24. Yu T.-Y., Schaefer J. REDOR NMR characterization of DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 382, pp. 1031-1042.
25. Letarov A. V. *Modern Concepts of Bacteriophage Biology*. DeLi, Moscow, 2019.
26. Fokine A., Rossmann M.G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 2014, vol. 4, e28281.
27. Leiman P.G., Arisaka F., van Raaij M.J., Kostyuchenko V.A., Aksyuk A.A., Kanamaru S., Rossmann M.G. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Viol. J.*, 2010, vol. 7, pp. 355, doi: 10.1186/1743-422X-7-355.
28. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 243-258, doi: 10.1007/s12275-014-4087-z.
29. Chaikeratisak V., Nguyen K., Egan M.E., Erb M.L., Vavilina A., Pogliano J. The Phage Nucleus and Tubulin Spindle Are Conserved among Large Pseudomonas Phages. *Cell Rep.*, 2017, vol. 20, pp. 1563-1571, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.064.
30. Sun S., Kondabagil K., Gentz P.M., Rossmann M.G., Rao V.B. The structure of the ATPase that powers DNA packaging into bacteriophage T4 procapsids. *Mol. Cell.*, 2007, vol. 25, pp. 943-949.
31. Taylor N.M.I., van Raaij M.J., Leiman P.G. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Mol. Microbiol.*, 2018, vol. 108, pp. 6-15, doi: 10.1111/mmi.13921.
32. Taylor N.M., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H., Leiman P.G. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature*, 2016, vol. 533, pp. 346-52, doi: 10.1038/nature17971. PubMed PMID: 27193680.
33. Davidson A.R., Cardarelli L., Pell L.G., Radford D.R., Maxwell K.L. Long noncontractile tail machines of bacteriophages. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, vol. 726, pp. 115-142, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_6.
34. Casjens S.R., Molineux I.J. Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, vol. 726, pp. 143-179, doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_7.
35. Duda R.L., Teschke C.M. The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences. *Curr. Opin. Virol.*, 2019, vol. 36, pp. 9-16, doi: 10.1016/j.coviro.2019.02.001.
36. Cue D., Feiss M. Bacteriophage λ DNA packaging: DNA site requirements for termination and processivity. *J. Mol Biol.*, 2001, vol. 311, pp. 233-240.
37. Feiss M., Kobayashi I., Widner W. Separate sites for binding and nicking of bacteriophage lambda DNA by terminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, vol. 80, no. 4, pp. 955-959.
38. Feiss M., Widner W., Miller G. et al. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: Location of the sites of terminase binding (cosB) and nicking (cosN). *Gene.*, 1983, vol. 24, no. 2-3, pp. 207-18.
39. Hohn B. DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage λ DNA. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 1983, vol. 80, pp. 7456-7460.
40. Miwa T., Matsubara K. Lambda phage DNA sequences affecting the packaging process. *Gene.*, 1983, vol. 24, pp. 199-206.
41. Cue D., Feiss M. A site required for termination of packaging of the phage lambda chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993, vol. 90, no. 20, pp. 9290-9294.
42. Laglaguano J.C., Cordova A.V. Bacteriophages applications in agriculture. *Bionatura Conference Series, Bionatura Latin American Journal of Biotechnology and Life Sciences*, 2019, vol 2, no. 1, doi: 10.21931/RB/CS/2019.02.01.24.
43. Roach D.R., Donovan D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 2015, vol. 5, no. 3, doi: 10.1080/21597081.2015.1062590
44. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.*, 2012, vol. 7, no. 10, pp. 1147-1171.
45. Zhu J. et al. Design of bacteriophage T4-based artificial viral vectors for human genome remodeling. *Nature Communications*, 2023, vol. 14, p. 2928, doi: 10.1038/s41467-023-38364-1.

SELF-ORGANIZATION IN VIRUSES FORMATION: THE NANO-PROCESS OF ASSEMBLING HEADS (CAPSIDS) AND LAYING DNA ON THE EXAMPLE OF TAILED BACTERIOPHAGES (LAMBDA, T4)**Botin A.S.^{1,2}, Pulin A.M.¹, Gavrilov A.V.¹, Popova T.S.², Cordova A.V.¹**¹ Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)
*Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru*² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine
Bolshaya Sukharevskaya sq., 3, Moscow, 129090, Russia; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru
Received 26.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0651

Abstract. The relevance of the problem. The widespread and uncontrolled use of antibacterial drugs not only in medicine, but also in agriculture, animal husbandry, and the food industry has led to the spread of multi-resistant strains resistant to the most common antibacterial drugs. In search of alternative strategies for the prevention and control of bacterial infection, attention is increasingly being paid to bacteriophage (phage) therapy. With a wide range of genetic engineering capabilities, these bacterial viruses can be modified to achieve precise control and detection of bacteria and thus serve as a new source of antimicrobial agents. In addition to being used in antimicrobial therapy, phages can also be used as transport systems for drug delivery, as vaccines, or can be used for nanosembly of new materials, since phages themselves, their fragments and components are nanoobjects and functioning nanomachines, the assembly process of which is extremely relevant. The purpose of this article is: to analyze and summarize the most important information on the topic of bacteriophages, methods of their determination and effective transformation in modern science, to evaluate the achievements of modern research in the process of assembling heads (capsids) and laying intracapsid DNA in caudate bacteriophages (phage lambda and phage T4), the production of genetically modified phages and a review of the main prospects for the development of this direction.

Key words: *viruses, bacteriophages, self-assembly of capsids, DNA stacking, nanoobjects, phage therapy.*

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО ИЗМЕНЕНИЯ СОЛЕННОСТИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ

Лавриченко Д.С., Ткачук А.А., Кладченко Е.С., Андреева А.Ю.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: dlavrichenko01@gmail.com
Поступила в редакцию 29.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0652

Аннотация. В настоящей работе при помощи методов проточной цитометрии и лазерной дифракции проведен анализ функционального состояния гемоцитов (осмотическая хрупкость, соотношение типов клеток в гемолимфе, способность к продукции активных форм кислорода – АФК) средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), акклиматизированных к низкой (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰) и высокой солености (24 ‰, 30 ‰). Акклимация к различной солености приводила к разнонаправленному изменению клеточного состава гемолимфы мидий, наиболее выраженный эффект наблюдался при низкой солености. При этом, как в условиях низкой, так и высокой солености отмечен рост внутриклеточной концентрации АФК в гемоцитах, что может свидетельствовать о развитии окислительного стресса. Кроме этого, при всех изменениях солености был зафиксирован сдвиг кривой осмотической хрупкости. Результаты настоящей работы показали, что средиземноморская мидия обладает выраженной толерантностью к кратковременным (48 ч) колебаниям солености, при этом снижение солености сопровождалось более выраженными функциональными изменениями. В свою очередь сдвиг кривой осмотической стойкости свидетельствует об участии клеточных механизмов осморегуляции у средиземноморских мидий при адаптации к краткосрочному изменению солености.

Ключевые слова: гемоциты, клеточный состав гемолимфы, активные формы кислорода, соленость, осмотическая хрупкость.

Соленость считается одним из основных экологических факторов, влияющих на функциональное состояние двустворчатых моллюсков. Согласно прогнозам Межправительственной группы экспертов по изменению климата в ближайшие годы ожидается увеличение частоты экстремальных осадков [1], стоки которых в прибрежные морские участки могут привести к резким колебаниям солености. Среди возможных последствий колебания солености выделяют сокращение видового разнообразия и исчезновение крупных видов гидробионтов, в том числе являющихся объектами добычи или культивирования в мировой пищевой промышленности [2,3]. Наибольшее значение соленость имеет для прибрежных экосистем и эстуариев, где сконцентрированы марихозяйства [4]. В отличие от открытых вод, соленость прибрежных акваторий значительно меняется в связи с колебаниями температуры, действием осадков, приливов и отливов, штормов [5,6], а также с ростом глобальной средней температуры поверхности моря и таянием ледяных шапок и ледников [7,8].

Морские двустворчатые моллюски составляют около 14 % объемов мировой добычи водных биологических ресурсов. При этом более 89% глобального производства моллюсков осуществляется путем аквакультурного выращивания. [9] Вместе с тем, эффективность аквакультуры моллюсков во многом определяется состоянием водной среды, и дальнейшее развитие отрасли возможно только с учетом глобальных проблем Мирового океана, таких как колебание солености. [10]

В настоящем исследовании мы оценили ряд параметров, связанных с иммунитетом (клеточный состав гемолимфы, способность к спонтанной продукции АФК, доля мертвых гемоцитов гемоцитов), после воздействия гипо- и гиперсоленостных стрессовых условий окружающей среды на двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

Двустворчатые моллюски размещались в пластиковых аквариумах емкостью 50-70 л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды (концентрация кислорода 7-8 мг л⁻¹, рН = 8,2, температура 18-20 °С) на период адаптации не менее 1 недели. Мидии были разделены на 5 групп: контроль (18 ‰), опытные гипосоленые (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰), опытные гиперсоленые (24 ‰, 30 ‰). Снижение солености в экспериментальных аквариумах достигалось путем постепенного разбавления воды в аквариумах дистиллированной водой со скоростью 2 ‰ в сутки. Повышение солености осуществляли путем ежедневного добавления морской соли в аквариумы со скоростью 2 ‰ в сутки. После достижения желаемого уровня солености (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰, 24 ‰, 30 ‰) моллюски содержались в данных условиях в течение 2 дней, а затем производился сбор проб и анализ показателей. На протяжении всего эксперимента, включая период акклиматизации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду, с сохранением значения солености. Моллюсков кормили смесью микроводорослей (*Tetraselmis viridis* (штамм IBSS-25) из коллекции Отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, 5-10 мл смеси на каждые 50 литров аквариумной воды). Гемолимфа отбиралась по стандартным протоколам [11]. Непосредственно сразу после отбора анализировали клеточный состав гемолимфы, способность гемоцитов к продукции активных форм кислорода и осмотическую хрупкость гемоцитов при помощи методов проточной цитометрии и лазерной дифракции.

Для идентификации типов клеток в гемолимфе готовую суспензию окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе 10 мкмоль л⁻¹, время инкубации – 40 мин в темноте). Содержание ДНК в гемоцитах мидий анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале FL1.

Оценка способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода проводилась методом проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA). 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль л⁻¹. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1.

Долю мертвых гемоцитов в суспензии определяли при помощи флуоресцентного красителя propidium iodide (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Процент мертвых гемоцитов от общего числа клеток оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL2 цитометра.

Степень гемолиза определяли на основе регистрации рассеянного частицами света под разными углами [12-14]. Исследование осмотической хрупкости проводили путем серийных разведений клеточных суспензий дистиллированной водой (по 1-2 мл) с постепенным снижением осмолярности и добавлением соответствующего объема гемоцитов для поддержания константы концентрации клеток. На каждой ступени разбавления осмолярность контролировали криоскопическим осмометром OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). Диапазон осмолярности от 461 до 55 мОсм/кг был использован для построения классической кривой осмотической хрупкости [15]. Процент гемолиза рассчитывали исходя из 100% -ного гемолиза на наиболее гипоосмотической стадии теста - 55 мОсм л⁻¹. Для количественного описания осмотической хрупкости гемоцитов использовалась точка 10% гемолиза (Н10), 50% гемолиза (Н50) и 90% гемолиза отражающие осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 10%, 50% и 90% клеток в образце, соответственно [16]. Ширину распределения гемоцитов по осмотической хрупкости (W), характеризующую однородность клеточной популяции, рассчитывали, как $W = H10 - H90$ (мОсм/кг).

Широкий диапазон соленостной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации [7,17]. У мидий, находящихся в гипоосмотических условиях (опытные группы 6 ‰, 10 ‰, 14 ‰), отмечено снижение показателя Н50 кривой осмотической стойкости: лизис 50 % клеток в суспензии наблюдался при более низких значениях осмолярности среды. Так, при солености 14 ‰ показатель Н50 составил 46,2±4,0 мОсм/кг ($p > 0,05$), при солености 10 ‰ - 35,7±3,0 мОсм/кг, а при 6 ‰ – 16,4±2,0 мОсм/кг ($p < 0,05$). В условиях экспериментального повышения солености (опытные группы 24 ‰, 30 ‰) лизис гемоцитов мидий начинался при более высоких значениях осмолярности. В экспериментальной группе, инкубированной при солености 24 ‰, Н50 был равен 70,6±11,4 мОсм/кг, а после воздействия солености 30 ‰ – 90,0±9,1 мОсм/кг (рис. 1).

Аналогичным образом при гипоосмотической нагрузке в гемоцитах мидий сдвигались и значения Н90 и Н10 кривой осмотической стойкости. В контрольной группе моллюсков Н90 было равно 15,8±3,3 мОсм/кг. Гипоосмотический стресс приводил к снижению данного показателя: при солености 14 ‰ он был равен 9,7±1,9 мОсм/кг, при 10 ‰ – 6,7±1,8 мОсм/кг, а при 6 ‰ – 4,9±0,8 мОсм/кг. Обратная тенденция наблюдалась в группе моллюсков, испытывающих экспериментальное повышение солености. В опытных группах 24 ‰ и 30 ‰ лизис 90 % гемоцитов отмечался при 21,6±5,2 мОсм/кг и 28,5±7,8 мОсм/кг соответственно.

У мидий контрольной группы в гемолимфе агранулоциты и гранулоциты составляли около 50 %. В условиях гиперосмотической нагрузки (группа 24 ‰) доля гранулоцитов снижалась до 37 ‰ ($p < 0,05$), однако у мидий, акклиматизированных к солености 30 ‰, клеточный состав гемолимфы не отличался от контроля (18 ‰). В

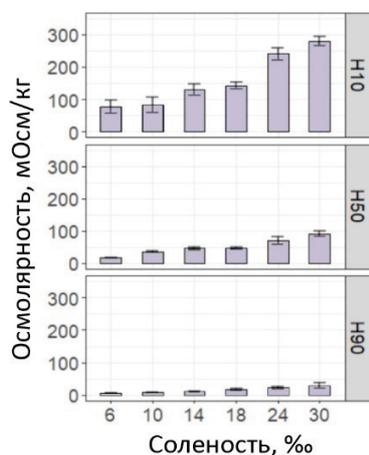


Рисунок 1. Сдвиг параметров осмотической хрупкости гемоцитов *M. galloprovincialis* после акклимации к условиям к различной солености

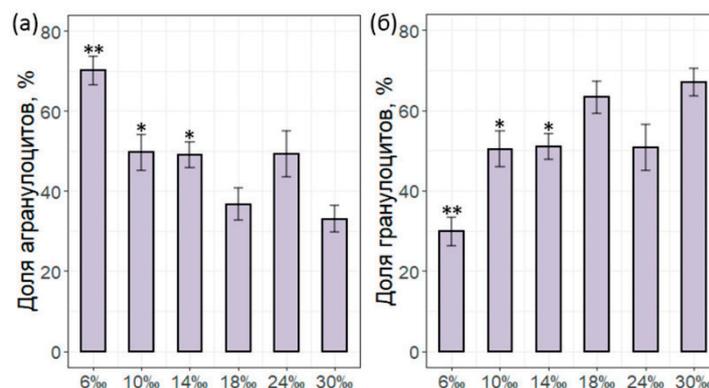


Рисунок 2. Клеточный состав гемолимфы *M. galloprovincialis* в условиях акклимации к различной солености. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). (а) – относительная доля агранулоцитов, (б) – относительная доля гранулоцитов

условиях гипоосмотической нагрузки у мидий, подвергшихся воздействию солености 14 ‰ и 10 ‰, не зафиксировано статистически значимых изменений в клеточном составе гемолимфы, однако, при наименьшей экспериментальной солености (6 ‰) у моллюсков отмечалось достоверное снижение доли гранулоцитов более чем в 1.8 раза относительно контроля ($p < 0,05$).

Эффективность клеточного иммунного ответа мидий в условиях экспериментальных колебаний солености определялась по уровню продукции в гемоцитах активных форм кислорода (АФК) методом проточной цитометрии на основании анализа интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных красителем DCF-DA. У всех опытных групп в гемоцитах отмечалось достоверное увеличение спонтанной продукции АФК ($p < 0,05$). Интересно, что чем больше отличалась соленость в опытной группе от контроля, тем выше были показатели флуоресценции красителя DCF-DA, что свидетельствовало о высокой концентрации АФК в цитоплазме гемоцитов. Наибольший рост продукции АФК отмечался при экспериментальном снижении солености (в особенности в группе 6 ‰) ($p < 0,05$). Рост уровня внутриклеточного содержания АФК при изменении солености среды был характерен и для агранулоцитов, и для гранулоцитов мидий. Исходя из полученных данных, выявлено, что колебания солености оказывают существенное воздействие на показатели клеточного иммунного ответа гемоцитов мидий.

Доля мертвых гемоцитов в суспензиях определялась на основании цитометрического анализа флуоресценции клеток, окрашенных красителем йодистый пропидий (propidium iodide, PI). Уровень смертности гемоцитов в контрольной (18 ‰) и опытных группах (засоление и распреснение среды) не превышал 4 ‰ и достоверно не различался. Таким образом, вероятно, кратковременные изменения солености не приводят к гибели клеток гемолимфы мидий.

Колебания солености среды были ассоциированы с достоверными изменениями клеточного состава гемолимфы в различных опытных группах, сравнительный анализ не выявил единого тренда в наблюдаемых различиях - ни в отношении направлении сдвига клеточного состава (преобладание определенного типа клеток), ни во взаимосвязи с направлением изменений солености (распреснение, или засоление). Вероятно, наблюдаемые изменения клеточного состава гемолимфы мидий являлись следствием сторонних процессов, и не зависели напрямую от колебаний солености среды. Известно, что физиологический стресс как неспецифическая реакция организма возникает при действии любых неблагоприятных факторов среды, и зачастую сопровождается избыточной продукцией АФК (супероксидный анион и перекись водорода), которые обладают высокой

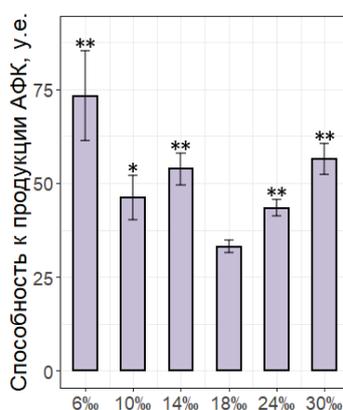


Рисунок 3. Влияние экспериментальных колебаний солености на уровень спонтанной продукции АФК в гемоцитах мидий (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

цитотоксичностью по своей природе окисляя липиды, белки, нуклеиновые кислоты [18]. В частности, изменение солености, также может способствовать увеличению выработки АФК, что влияет на функциональные показатели гемоцитов моллюсков - уровень генерации АФК, осмотическую стойкость, интенсивность дыхания [19]. В настоящем исследовании показано, что акклимация моллюсков к гипоосмотической среде приводит к сдвигу осмотической кривой в сторону жесткости, в то время как постепенное увеличение солености сопровождается смещением кривой в сторону увеличения осмотической хрупкости гемоцитов. Среди неспецифических (нетоксических) причин, влияющих на деформируемость мембран клеток животных, выделяют окислительный стресс [20]. Вместе с тем, в нашем исследовании увеличение уровня внутриклеточных АФК гемоцитами не сопровождалось ростом их хрупкости. В группе моллюсков, содержащихся в условиях низкой солености, увеличение уровня АФК в гемоцитах не приводило к снижению показателя максимального набухания клеток гемолимфы перед лизисом. Отсутствие изменений в свойствах мембраны может объясняться высокой активностью антиоксидантного комплекса в гемоцитах мидий и эффективной нейтрализацией избыточных АФК, продуцируемых в результате изменений солености. Учитывая, что доля мертвых гемоцитов в суспензиях клеток также не менялась, можно предположить, что, изменения показателей осмотической стойкости гемоцитов связаны с внутриклеточной адаптацией клеток к сдвигу осмолярности внешней среды, то есть о наличии у мидий клеточных механизмов соленостной адаптации.

Таким образом, колебания солености среды были ассоциированы с достоверными изменениями клеточного состава гемолимфы мидий, которые, однако, не имели общих закономерностей. Вероятно, наблюдаемые изменения в относительной доли гранулоцитов и агранулоцитов в гемолимфе мидий являлись следствием функционального ответа организма на изменение осмолярности, и не зависели напрямую от колебаний солености среды. Хотя снижение солености до 6 ‰ не было связано с гибелью моллюсков в эксперименте, наблюдаемые изменения в системе гемолимфы, свидетельствует о неспособности мидий компенсировать негативное воздействие распреснения. Наименьшие изменения отмечались в экспериментальном диапазоне солености 14-24 ‰, что, вероятно, является неким допустимым пределом кратковременных изменений солености для данного вида моллюсков.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-26-00165 «Функциональный и иммунный статус двустворчатых моллюсков-объектов марикультуры в условиях действия факторов глобальных изменений климата».

Список литературы / References:

1. Hoegh-Guldberg O., Jacob D. et al. Impacts of 1.5 °C global warming on natural and human systems. *Global warming of 1.5 °C*, 2018.
2. Zonn I.S. Environmental issues of the Caspian. *The Caspian sea environment*, 2005, pp. 223-242.
3. Zaitsev Y. *Introduction to the Black Sea Ecology*, 2008.
4. Barbier E.B., Hacker S.D., Kennedy C., Koch E.W., Stier A.C., Silliman B.R. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological monographs*, 2011, vol. 81, no. 2, pp. 169-193.
5. Chen K., Kuang C., Wang L., Chen K., Han X., Fan J. Storm surge prediction based on long short-term memory neural network in the East China Sea. *Applied Sciences*, 2021, vol. 12, no. 1, p. 181.
6. Coughlan M., Cronin P., Ryan F. Survey research: Process and limitations. *International Journal of Therapy and Rehabilitation*, 2009, vol. 16, no. 1, pp. 9-15.
7. Velez C., Figueira E., Soares A.M., Freitas R. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of the Total Environment*, 2016, vol. 566, pp. 260-268.
8. Velez C., Figueira E., Soares A.M., Freitas R. Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 176, pp. 141-150.
9. Wijsman J.W. M., Troost K., Fang J., Roncarati A. Global production of marine bivalves. Trends and challenges. *Goods and services of marine bivalves*, 2019, pp. 7-26.
10. Ahmed N., Thompson S., Glaser M. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability. *Environmental management*, 2019, vol. 63, pp. 159-172.
11. Andreyeva A.Yu., Gostyukhina O.L., Kladchenko E.S., Vodiasova E.A., Chelebieva E.S. Acute hypoxic exposure: effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 2021, vol. 169, p. 105389.
12. Mindukshev I.V., Krivoshlyk V.V., Dobrylko I.A., Goncharov N.V., Vivulanets E.V., Kuznetsov S.V., Krivchenko A.I. Abnormalities of elastic and transporting properties of red blood cells under development of apoptosis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, vol. 4, pp. 22-31.
13. Gambaryan S., Subramanian H., Kehrler L., Mindukshev I., Sudnitsyna J., Reiss C., Rukoyatkina N., Friebe A., Sharina I., Martin E., Walter U. Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis. *Cell Communication and Signaling*, 2016, vol. 14, pp. 1-12.
14. Sudnitsyna J.S., Skvertchinskaya E.A., Dobrylko I.A., Nikitina E.R., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P., Mindukshev I.V. Human erythrocyte ammonium transport is mediated by functional interaction of ammonium (RhAG) and anion (AE1) transporters. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2016, vol. 10, pp. 301-310.

15. Singh T.S., Verma T.N. An assessment study of using Turel Kongreng (river mussels) as a source of heterogeneous catalyst for biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, vol. 20, p. 101185.
16. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L. P. et al. Red cell properties after different modes of blood transportation. *Frontiers in physiology*, 2016, vol. 7, p. 288.
17. Carregosa V., Velez C., Soares A.M., Figueira E., Freitas R. Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, vol. 177, pp. 1-9.
18. Huang H.-Y., Lin Y.-C.-D., Li J. et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database. *Nucleic acids research*, 2020, vol. 48, no. D1, pp. D148-D154.
19. Suski M.Sc.J.M., Lebieczinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Mitochondrial bioenergetics: Methods and protocols*, 2018, pp. 357-381.
20. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, 2014, vol. 5, p. 84

THE EFFECT OF SHORT-TERM SALINITY CHANGES ON THE FUNCTIONAL FEATURES OF MEDITERRANEAN MUSSEL HEMOCYTES

Lavrichenko D.S., Tkachuk A.A., Kladchenko E.S., Andreeva A. Yu.

FRC “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS

Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: dlavrichenko01@gmail.com

Received 29.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0652

Abstract. In this work, using the methods of flow cytometry and laser diffraction, the analysis of the functional state of hemocytes (osmotic fragility, the ratio of cell types in the hemolymph, the ability to produce ROS) was carried out of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), acclimatized to low (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰) and high salinity (24‰, 30 ‰). Acclimation to different salinity led to a multidirectional change in the cellular composition of the hemolymph of mussels, the most pronounced effect was observed at low salinity. At the same time, both in conditions of low and high salinity, an increase in the intracellular concentration of ROS in hemocytes was noted, which may indicate the development of oxidative stress. In addition, with all changes in salinity, a shift in the osmotic fragility curve was recorded. The results of this work showed that the Mediterranean mussel has a pronounced tolerance to short-term (48 h) fluctuations in salinity, while the decrease in salinity was accompanied by more pronounced functional changes. In turn, the shift in the osmotic resistance curve indicates the involvement of cellular mechanisms of osmoregulation in Mediterranean mussels in adapting to short-term changes in salinity.

Key words: hemocytes, hemolymph cellular composition, reactive oxygen species, salinity, osmotic fragility.

КРИТИЧЕСКИЕ И ПОРОГОВЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА ДЛЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ (КРАТКАЯ СПРАВКА)

Парфенова И.А.¹, Солдатов А.А.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ, e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0653

Аннотация. Обобщена информация о критических и пороговых концентрациях кислорода для ряда представителей ихтиофауны Черного моря. Показано, что черноморские виды рыб по отношению устойчивости к дефициту кислорода можно условно разделить на две группы. Группа 1 с высокой чувствительностью и низкой устойчивостью к гипоксии, которая представлена преимущественно пелагическими и некоторыми придонными видами рыб (ставрида, смарида, мерланг). Группа 2 с низкой чувствительностью и высокой устойчивостью к гипоксии, представителями которой являются преимущественно донные и ряд придонных видов рыб (скорпена, султанка, звездочет). Среди донных видов наиболее устойчивыми и наименее чувствительными к гипоксии видами является скорпена и бычок-кругляк, которые широко представлены по побережью Черного моря. Для них получены наиболее низкие значения критических и пороговых напряжений кислорода: 33-36 и 4-11 гПа соответственно. Диапазон зависимого дыхания при этом составляет 22-31 гПа.

Ключевые слова: критические и пороговые концентрации кислорода, рыбы, Черное море.

Введение. Кислород наряду с температурой и соленостью является одним из важнейших факторов, влияющих на распространение организмов в водной среде [1]. Ограничение водообмена, эвтрофикация, связанная с антропогенной нагрузкой на водоемы, являются основными причинами, приводящими к возникновению зон устойчивого дефицита кислорода [1,2]. В последнее время это явление все чаще захватывает высоко продуктивные шельфовые зоны Мирового океана, приводя к качественной трансформации существующих экосистем [3-7]. Черное море в этой связи не является исключением. Зоны устойчивой придонной гипоксии были обнаружены на его северо-западном шельфе [8-12]. Случаи перманентной гипоксии описаны также для различных черноморских прибрежных акваторий и могут быть связаны, прежде всего, с локальным ограничением водообмена [13].

Оценку устойчивости гидробионтов к дефициту кислорода обычно проводят путем измерения критических (*critical level oxygen*) и пороговых (*lethal level oxygen*) концентраций кислорода. Критические концентрации отражают момент перехода организма на зависимый тип дыхания. С ними связывают понятие чувствительности вида к внешней гипоксии. Пороговые концентрации – гибель особей. Количественно она оценивается при помощи показателей CL_{50} или CL_{100} (смертность 50 или 100 %). По пороговым концентрациям кислорода судят об устойчивости вида к внешней гипоксии. Сведения для представителей черноморской ихтиофауны весьма ограничены. В настоящей работе предпринята попытка обобщить имеющуюся информацию.

Виды с различным уровнем естественной подвижности. Наиболее полная сводка по критическим и пороговым концентрациям кислорода для морских и пресноводных рыб приведена в работе Л.Б. Кляшторина [14]. Она содержит также информацию и о представителях черноморской ихтиофауны. В таблице 1 выбраны результаты по пороговым величинам исключительно для черноморских рыб. Известно, что пороговые концентрации кислорода зависят от температуры. По этим причинам в таблицу включены данные о температуре воды на момент измерений. Из таблицы видно, что для каждого из видов рыб характерен значительный индивидуальный разброс значений. Это может быть следствием не только вариабельности данного показателя, но и не однозначности температурных условий, при которых проводилось измерение. Л.Б. Кляшторин [14] указывает на то, что температурная чувствительность пороговых величин разных видов рыб существенно отличается, что в конечном итоге может повлиять на получаемые результаты.

Черноморские виды, характеристики которых приведены в таблице 1, можно условно разбить на две группы. Одна из них включает ставриду, смариду, султанку и мерланга. Пороговое насыщение кислорода для них составляет 12-15 % насыщения. Другая группа – морской ерш (скорпена) и звездочет характеризуются пороговым насыщением 8-9 %. Анализ особенностей биологии рассмотренных рыб показал, что два последних вида, пороговое напряжение у которых менее 10 %, узко специализированы к донному образу жизни [15]. Следует также отметить, что для скорпены характерна и высокая степень специализации к обеспечению энергетических потребностей за счет углеводов [16,17].

Особенности биологии рыб первой группы несколько иные. Пороговое напряжение ведущей придонный образ жизни султанки составляет 12 %. Пелагические виды – ставрида, смарида и мерланг погибают при более высоком насыщении воды кислородом – 14-15 %. Следует отметить, что энергетический метаболизм у султанки больше ориентирован на утилизацию липидов [18,19]. В какой-то степени этими особенностями метаболизма можно объяснить различия в пороговых величинах между двумя группами рыб. Известно, что катаболизм углеводов может проходить и без участия кислорода, в то время как для окисления липидов он необходим.

Таблица 1. Пороговое насыщение воды кислородом для некоторых видов черноморских рыб при температуре 13-17°C (в среднем 15°C) [14]

Виды рыб	Насыщение воды кислородом, %	
	Размах колебаний	Среднее
Ставрида	9-25	15,2
Смарида	9-23	14,2
Султанка	12-18	12,0
Морской ерш	8-15	8,0
Звездочет	7-24	9,2
Мерланг	13-22	14,2

Таблица 2. Критическое насыщение воды кислородом для некоторых видов черноморских рыб при разных температурах [14]

Виды рыб	Вес рыб	Насыщение воды кислородом, %				
		10°C	15°C	20°C	25°C	28°C
Ставрида	9-16	16,0	22,0	32,5	40,0	-
Смарида	10-14,5	14,6	22,5	30,0	37,0	-
Ласкирь	16-22	16,0	18,6	22,0	34,0	-
Султанка	8-17	17,3	22,5	30,0	31,5	-
Скорпена	22-47	16,0	19,3	21,3	30,0	40,5
Дракончик	12-18	14,0	17,3	17,3	28,0	35,2
Звездочет	27-42	13,3	19,4	26,5	28,7	32,5
Мерланг	9-22	18,6	19,3	21,2	32,0	-

Способность донных и придонных видов рыб выживать при сравнительно низких концентрациях кислорода в среде очень важна, так как именно на этих горизонтах чаще всего образуются гипоксические зоны. Ценность приведенной таблицы несколько снижена вследствие того, что в ней не указаны размеры рыб и их физиологическое состояние. На это указывает и сам автор [14].

Следует добавить, что между двумя группами рассматриваемых выше видов рыб имеются существенные различия в потреблении кислорода в состоянии покоя. Так, при оптимальных условиях скорпена поглощает всего 0,055 мг O_2 г⁻¹ веса тела, а султанка около 0,30 мг O_2 г⁻¹ веса тела [20]. Этот же автор отмечал, что потребление кислорода существенно увеличивается после приема пищи. Так, для султанки увеличение значений данного показателя составляло 1,4- 2,1 раз, а для скорпены от 2,2-6,2 раз. Отсюда следует, что физиологическое состояние рыб может существенно повлиять на величины пороговых концентраций кислорода. В этом также можно усматривать причину существующей вариабельности полученных значений.

Пороговые величины определяют границы толерантности биологического вида. Чувствительность же к дефициту кислорода отражают критические концентрации, когда организм переходит на зависимый тип дыхания. Эти значения более естественны, так как определяют фактические потребности вида в кислороде. Поэтому многие исследователи уделяют внимание именно этому показателю.

Наиболее полная сводка по критическим концентрациям кислорода для рыб Черного моря также приведена в монографии Л.Б. Кляшторина [14] (таблица 2). В отличие от предыдущей таблицы здесь достаточно подробно представлена информация о температурной зависимости критических концентраций кислорода вплоть до температурных границ толерантности вида. Кроме того, указан вес тела исследуемых видов рыб. Единственным недостатком таблицы является то, что она не учитывает функционального состояния организма. Так, если мерланг и ставрида со средним весом тела 20 г могут быть половозрелыми особями, то о скорпене и ласкире этого сказать нельзя. Они скорее являются ювенальными особями.

Из таблицы видно, что чем ниже температура, тем ниже и критическое напряжение кислорода. Следует отметить, что с ростом температуры падает и растворимость кислорода в воде. Поэтому, если перевести процентную зависимость в абсолютную шкалу, то при сохранении данной закономерности роста критического напряжения при увеличении температуры крутизна функции будет менее выражена. Для анализа остановимся на температуре воды 15°C. Это сделано из следующих соображений. В таблице 1 приведены значения пороговых напряжений при 15°C. Данная температура является наиболее комфортной для большинства видов черноморского региона.

При 15°C для ставриды, смариды и султанки критическое напряжение составляет не менее 22,0 % насыщения, а для ласкиря, скорпены, дракончика, звездочета и мерланга не выше 19,4 % насыщения. Если по поводу донных и придонных видов это не вызывает удивления, то с мерлангом ситуация неоднозначна. Пороговое насыщение кислородом для этого вида, такое же, как и для смариды и несколько выше, чем у султанки. Возможно, что это связано с биологическими особенностями вида, в частности способностью его существовать в условиях определенного дефицита кислорода. Ранее отмечалось, что ограниченные скопления мерланга встречаются в гипоксических акваториях северо-западного шельфа Черного моря.

Таблица 3. Отношение критических и пороговых напряжений кислорода для ряда видов черноморских рыб [14]

Виды рыб	Отношение (критическое/пороговое)
Ставрида	1,45
Смарида	1,58
Султанка	1,88
Скорпена	2,41
Звездочет	2,11
Мерланг	1,40

Таблица 4. Критические ($P_{кр.}$) и пороговые ($P_{пор.}$) значения напряжения кислорода в воде для некоторых видов донных рыб (температура воды 15-17°C) [21]; n – число особей

Виды рыб	n	$P_{кр.}$ гПа	$P_{пор.}$ гПа	$P_{кр.-пор.}$ гПа
Кругляк	10	35,6±2,2	4,9±1,1	30,8±2,4
Мартовик	9	41,2±1,8	10,5±0,8	30,7±1,4
Травяник	7	54,3±1,7	14,6±0,8	39,8±1,5
Глосса	8	49,9±1,6	14,7±0,9	35,2±1,6
Скорпена	10	33,1±0,9	10,6±0,7	22,5±1,1

Наряду с определением критических и пороговых концентраций кислорода важно также соотнести эти показатели, определив диапазон от начала зависимого дыхания до гибели организма. Это также было сделано в монографии Л.Б. Кляшторина [14]. Автор определил отношение «критическое/пороговое» для ряда видов черноморских рыб (таблица 3).

Из таблицы 3 видно, что отношение критического к пороговому насыщению кислорода является видоспецифичной величиной и увеличивается в ряду:

мерланг → ставрида → смарида → султанка → звездочет → скорпена. Данный коэффициент, по-видимому, является хорошим критерием, отражающим функциональные резервы устойчивости организма по отношению к внешней гипоксии, и может быть использован в экофизиологических исследованиях.

Донные виды. Сравнительная оценка чувствительности и устойчивости к гипоксии была выполнена на 5-ти видах донных рыб: бычке-кругляке, бычке-мартовике, бычке-травянике, камбале-глоссе и скорпене. Выбор данной группы был обусловлен различиями в их толерантности к дефициту кислорода. Так, мартовик и глосса активны при низких температурах, когда концентрация кислорода в среде достаточно высока [15]. Они вместе с травяником составили группу требовательных к содержанию кислорода в воде видов. Скорпена и кругляк, напротив, встречаются практически по всему побережью Черного моря. Эти виды активны в достаточно широком диапазоне температур и концентраций кислорода [15] и могут длительно находиться вне воды. Результаты определения критических и пороговых напряжений кислорода в воде для данных видов рыб представлены в таблице 4 [21].

Наименее чувствительными к изменению концентрации кислорода в среде оказались кругляк и скорпена. Переход на зависимый тип дыхания у них происходил при наиболее низких напряжениях кислорода в среде – 33-35 гПа. Высокой чувствительностью к дефициту кислорода обладал травяник. Величины критических напряжений у него были на 52,5 % ($p < 0,001$) выше. Мартовик и глосса занимали промежуточное положение. В сравнении со скорпенной различия у них составили соответственно 24,5% ($p < 0,01$) и 50,8 % ($p < 0,001$).

Анализ пороговых напряжений кислорода показал, что наиболее устойчивым к гипоксии видом является кругляк. Гибель его особей наблюдалась при наиболее низких значениях данного показателя – 4,9 гПа. При постановке эксперимента у двух особей кругляка отмечали способность переносить полную аноксию. У остальных рыб пороговые напряжения кислорода были в 2-3 раза выше ($p < 0,001$). Раньше всех погибали особи глоссы и травяника (14-15 гПа). Чуть позже – особи скорпены и мартовика (10-11 гПа).

При сопоставлении критических и пороговых напряжений кислорода Л.Б. Кляшторин [14] использовал их отношение – $P_{кр.}/P_{пор.}$. В таблице 4 вместо этого показателя применяется разница выше указанных значений – $P_{кр.} - P_{пор.}$. Фактически она отражает диапазон зависимого дыхания, свойственный тому или иному виду рыб.

Наиболее существенные различия между критическими и пороговыми величинами отмечены у травяника (около 40 гПа). У остальных видов (кругляка, мартовика и глоссы) диапазон зависимого дыхания находился в пределах 30-35 гПа. Минимальные значения были зарегистрированы для скорпены – 22,5 гПа. Различия между травяником и скорпенной составили 43,5 % ($p < 0,001$). В остальных случаях они были менее выражены: 22-23 % ($p < 0,05-0,01$) для кругляка и мартовика. В отношении глоссы разница не была статистически значима.

Заключение. Из представленной информации следует, что черноморские виды рыб по отношению устойчивости к дефициту кислорода можно условно разделить на две группы:

1. группа с высокой чувствительностью и низкой устойчивостью к гипоксии, которая представлена преимущественно пелагическими и некоторыми придонными видами рыб (ставрида, смарида, мерланг);

2. группа с низкой чувствительностью и высокой устойчивостью к гипоксии, представителями которой являются преимущественно донные и ряд придонных видов рыб (скорпена, султанка, звездочет).

Среди донных рыб наиболее устойчивыми и наименее чувствительными к гипоксии видами являются скорпена и бычок-кругляк, которые широко представлены по побережью Черного моря. Для них получены наиболее низкие значения критических и пороговых напряжений кислорода.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ 121041400077-1)

Список литературы / References:

1. Романенко В.Д. *Основы гидроэкологии*. Киев: Генеза, 2004, 664 с. [Romanenko V.D. *Fundamentals of hydroecology*. Kiev: Geneza, 2004, 664 p. (In Russ.).]
2. Бордовский О.К., Иваненков В.Н. *Химия океана*. М.: Наука, 1979, т. 1, 354 с. [Bordovsky O.K., Ivanenkov V.N. *Ocean Chemistry*. Moscow: Nauka, 1979, vol. 1, 354 p. (In Russ.).]
3. Виноградов М.Е. *Вертикальное распределение океанического зоопланктона*. М.: Наука, 1968, 319 с. [Vinogradov M.E. *Vertical distribution of oceanic zooplankton*. M.: Nauka, 1968, 319 p. (In Russ.).]
4. Duncombe-Rae C.M., Bailey G.W., Neumann T., Plas A., Mouton D., Filipe V., Schuffenhauer I., Franz F., Nelson G. Low oxygen expression and the poleward undercurrent on the Angola-Namibia shelf, July 1999, 10th SAMSS, 2000: Wilderness (South Africa), 22-26 Nov 1999. *Abstracts*, 2000, p. 1.
5. Kuharev N. Extraordinary oxygen regime as a phenomenon of the Arabian upwelling: Life and concentrations of fish in the hypoxia zone - rule or exception? *Int. Conf. for the Paradi Assoc. The Fish. Soc. of Africa*, Grahamstown (South Africa), 1998, 1998, p. 299.
6. McEnroe M., Woodhead P., Crocker C. Life in the extreme environment of an upwelling system: physiological attributes of fishes living in extreme hypoxia in the nutrient-rich Benguela system. *33 Europ. Mar. Biol. Symp.*, 1998, p. 51.
7. Shulman G.E., Chesalin M.V., Abolmasova G.I., Yuneva T.V., Kideys A. Metabolic strategy in pelagic squid of genus *Sthenoteuthis* (Ommastrephidae) as the basis of high abundance and productivity: an overview of the soviet investigations. *Bull. Mar. Sci.*, 2002, vol. 71, no. 2, pp. 815-836.
8. Берлинский Н.Н., Дыханов Ю.М. К вопросу о формировании придонной гипоксии в северо-западной части Черного моря. *Экология моря*, 1991, вып. 38б, с. 11-15 [Berlinskiy N.N., Dykhanov Yu.M. On the formation of bottom hypoxia in the northwestern part of the Black Sea. *Sea Ecology*, 1991, iss. 38b, pp. 11-15 (In Russ.).]
9. Виноградов М.Е., Сапожников В.В., Шушкина Е.А. *Экосистемы Черного моря*. М.: Наука, 1992, 112 с. [Vinogradov M.E., Sapozhnikov V.V., Shushkina E.A. *Ecosystems of the Black Sea*. Moscow: Nauka, 1992, 112 p. (In Russ.).]
10. Зуев Г.В. О структуре и динамике промыслового запаса шпрота в северо-западной части моря. *Экология моря*, 2000, вып. 53, с. 11-14 [Zuev G.V. On the structure and dynamics of the commercial stock of sprat in the northwestern part of the sea. *Sea Ecology*, 2000, iss. 53, pp. 11-14 (In Russ.).]
11. Фащук Д.Я., Самышев Э.З., Себах Л.К., Шляхов В.А. Формы антропогенного воздействия на экосистему Черного моря и ее состояние в современных условиях. *Экология моря*, 1991, вып. 38, с. 19-27 [Faschuk D.Ya., Samyshev E.Z., Sebach L.K., Shlyakhov V.A. Forms of anthropogenic impact on the ecosystem of the Black Sea and its state in modern conditions. *Sea Ecology*, 1991, iss. 38, pp. 19-27 (In Russ.).]
12. Фесюнов О.Е., Назаренко М.Ф. Геоморфологические и экологические особенности зоны гипоксии северо-западного шельфа Черного моря. *Экология моря*, 1991, вып. 37, с. 20-26 [Fesyunov O.E., Nazarenko M.F. Geomorphological and ecological features of the hypoxia zone of the northwestern shelf of the Black Sea. *Sea Ecology*, 1991, iss. 37, pp. 20-26 (In Russ.).]
13. Орехова Н.А., Коновалов С.К. Кислород и сульфиды в донных отложениях прибрежных районов севастопольского региона Крыма. *Океанология*, 2018, т. 58, № 5, с. 739-750 [Orekhova N.A., Konovalov S.K. Oxygen and sulfides in bottom sediments of coastal areas of the Sevastopol region of Crimea. *Oceanology*, 2018, vol. 58, no. 5, pp. 739-750 (In Russ.).]
14. Кляшторин Л.Б. *Водное дыхание и кислородные потребности рыб*. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1982, 68 с. [Klyashtorin L.B. *Water respiration and oxygen needs of fish*. M.: Leg. Pitsh. Prom., 1982, 68 p. (In Russ.).]
15. Световидов А.Н. *Рыбы Черного моря*. М.: Наука, 1964, 551 с. [Svetovidov A.N. *Fishes of the Black Sea*. Moscow: Nauka, 1964, 551 p. (In Russ.).]
16. Беляев В.И., Николаев В.М., Шульман Г.Е., Юнева Т.В. *Тканевый обмен у рыб*. Киев: Наук. думка, 1983, 144 с. [Belyaev V.I., Nikolaev V.M., Shulman G.E., Yuneva T.V. *Tissue metabolism in fish*. Kiev: Nauk. dumka, 1983, 144 p. (In Russ.).]
17. Яковлева К.К., Шульман Г.Е. Соотношение белкового роста и жиронакопления у черноморской скорпены. *Биология моря*, 1977, № 1, с. 78-81 [Yakovleva K.K., Shulman G.E. The ratio of protein growth and fat accumulation in the Black Sea scorpion. *Rus. J. Mar. Biol.*, 1977, no. 1, pp. 78-81 (In Russ.).]
18. Чепурнов А.В. Динамика жировых запасов, качественного состава липидов мышц и гонад у черноморской султанки во время созревания и порционного нереста. *Экология моря*, 1980, вып. 1, с. 80-88 [Chepurnov A.V. Dynamics of fat reserves, qualitative composition of muscle lipids and gonads in the Black Sea sultan during maturation and portion spawning. *Sea Ecology*, 1980, iss. 1, pp. 80-88 (In Russ.).]

19. Шульман Г.Е. *Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб*. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1972, 368 с. [Shulman G.E. *Physiological and biochemical features of annual cycles of fish*. М.: Leg. Pish. Prom., 1972, 368 p. (In Russ.)].

20. Карпевич А.Ф. Потребление кислорода морскими рыбами при различном их физиологическом состоянии. *Вопр. ихтиол.*, 1958, вып. 10, с. 131-138 [Karpevich A. F. Oxygen consumption by marine fish in various physiological conditions. *J. Ichthyol.*, 1958, iss. 10, pp. 131-138 (In Russ.)].

21. Парфенова И.А. Критические и пороговые напряжения кислорода у морских рыб различной толерантности к внешней гипоксии. *VII Міжн. науково-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство»*, Київ, 13-15 трав, Тез. доп., Київ, 2004, с. 53 [Parfyonova I. A. Critical and threshold oxygen stresses in marine fish of different tolerance to external hypoxia. *VII Int. Scientific and Practical Work. Conf. students, postgraduates and young scientists "Ecology. A man. Society"*, Kiev, May 13-15, 2004: Tez. add., Kiev, 2004, p. 53 (In Russ.)].

CRITICAL AND LETHAL OXYGEN CONCENTRATIONS FOR SOME BLACK SEA FISH (SHORT REVIEW)

Parfyonova I.A.¹, Soldatov A.A.^{1,2}

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, RAS

Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia, e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Received 14.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0653

Abstract. Information on critical and lethal oxygen concentrations for some Black Sea fish is summarized. It is shown that the Black Sea fish species can be conditionally divided into two groups with respect to resistance to oxygen deficiency. Group 1 with high sensitivity and low resistance to hypoxia, which is represented mainly by pelagic and some bottom-dwelling fish species (*Trachurus mediterraneus*, *Spicara smaris*, *Merlangius merlangus*). Group 2 with low sensitivity and high resistance to hypoxia, representatives of which are mainly bottom and a number of bottom fish species (*Scorpaena porcus*, *Mullus barbatus barbatus*, *Uranoscopus scaber*). Among these species, the most resistant and least sensitive to hypoxia species are the *S. porcus* and the *Neogobius melanostomus*, which are widely represented along the Black Sea coast. The lowest values of critical and lethal oxygen tensions were obtained for them: 33-36 and 4-11 kPa, respectively. The range of dependent respiration is 22-31 kPa.

Key words: critical and lethal level oxygen, fish, Black Sea.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2023 ГОД

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М.** Конформационные свойства и электронная структура противоопухолевого агента Tyr-Ser-Leu.....№ 1, с. 16-20
- Агаева Г.А., Наджафова Г.З.** Электронные параметры конформационных состояний бета-амилоидного пептида (25-35).....№ 1, с. 21-26
- Галль Л.Н., Кулешова Т.Э., Галль И.Р.** Две формы структурирования воды в протоплазме живых клеток и их роль в биоэнергетике.....№ 3, с. 242-247
- Головченко И.В., Ратников В.Д.** Анализ приведённой модели четырёхкомпонентной системы с учётом теории интерцепторно-протекторного действия.....№ 4, с. 373-376
- Гребнева Е.А.** Интерпретация горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза, образующихся на запаздывающей нити двухцепочечной ДНК гена *supF*.....№ 2, с. 125-132
- Касьяненко Н.А., Бакулев В.М., Артамонова Д.А.** Формирование и изучение многокомпонентных систем, содержащих биологически активные агенты, спектральными и гидродинамическими методами.....№ 3, с. 237-241
- Касьяненко Н.А., Ролич В.И., Никитин Д.А.** Комплексы железа (III) с катехином и их взаимодействие с ДНК.....№ 3, с. 265-270
- Клочкова В.С., Шумейко Д.М., Лелеков А.С.** Размерная структура популяций *Porphyridium purpureum* и *Tetraselmis viridis* при разных режимах культивирования.....№ 4, с. 377-381
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.** Роль оксида азота при действии УФ-В излучения на клетки дрожжей.....№ 1, с. 12-15
- Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гаснева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г.** Поиск потенциальнообразующих ионов в питательном растворе биоэлектрохимической системы.....№ 3, с. 258-264
- Лелеков А.С., Клочкова В.С., Поплавская А.Ю.** Продукционные характеристики накопительной культуры *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin при фотоадаптации.....№ 4, с. 365-372
- Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Новикова Н.И., Фесенко Е.Е.** Сравнительный анализ ингибирующих эффектов гипомангнитного поля и комбинированных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами.....№ 2, с. 143-150
- Рощина В.В., Куньев А.Р., Фатерыга В.В., Шовкун М.М.** Применение микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра для исследования поверхности растительных клеток.....№ 2, с. 137-142
- Суслов М.А., Егоров Д.В., Даминова А.Г., Анисимов А.В., Самигуллин Д.В., Мустафина А.Р., Бочкова О.Д.** Использование парамагнитных флуоресцентных наночастиц и метода спин-эхо ЯМР для комплексного исследования транспорта воды в корнях интактных растений.....№ 3, с. 271-276
- Тимченко Н.Н., Шупова Е.В.** Состояние гемоглобина после замораживания-оттаивания с глицерином.....№ 1, с. 7-11
- Федотова Е.В., Пастон С.В.** Взаимодействие сывороточного альбумина человека с ионами кобальта и катехином.....№ 3, с. 248-257
- Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С., Серяк Е.С.** Декомпозиция спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl.....№ 2, с. 133-136

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

- Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.** Структурная организация молекул лактоферроксинов.....№ 1, с. 33-38
- Аксёнова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Влияние оксидативного стресса на функционирование глутаматных рецепторов гиппокампа.....№ 2, с. 151-158
- Аристархов М.А., Дергилев А.И., Потапова А.Ю., Иванов-Ростовцев П.А., Орлов Ю.Л.** Веб-сервисы для предсказания мишеней микроРНК с помощью нейронных сетей.....№ 4, с. 417-423

- Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Исмаилова Л.И.** Структурная организация молекул сойморфинов№ 1, с. 39-47
- Брильков А.В., Брилькова Е.В., Жабрун И.В., Ганусов В.В., Логинов Ю.Ю., Шуваев А.Н.** Математическое моделирование экспериментальной эволюции трансгенных бактерий: «плазмидный парадокс»№ 4, с. 392-400
- Быстров В.С., Филиппов С.В., Лихачев И.В., Леденева О.Р., Белова Е.В.** Моделирование и компьютерное исследование хиральных свойств пептидных нанотрубок на основе дилейцина№ 4, с. 424-248
- Демухамедова С.Д., Ахвердиева Г.А.** Теоретическое исследование N¹H таутомера карнозина в цвиттерионной форме.....№ 2, с. 159-168
- Исмаилова Л.И., Ахмедов Н.А.** Структурная организация глипролиновой гексапептидной молекулы№ 1, с. 27-32
- Ковалёв А.И., Пузановский К.В.** Анализ устойчивости в моделировании эволюционных процессов.....№ 2, с. 169-173
- Лаптева Е. А., Кравченко Е.М., Одарюк И.Д., Дорошкевич В.С., Баранова О.В.** Моделирование электронных спектров поглощения фенолов и продуктов их ферментативного окисления№ 3, с. 288-292
- Левченко И.Н., Владимиров Г.К., Володяев И.В., Владимиров Ю.А.** Свободные радикалы. особенности хемилюмиесцентной активности катализатора цитохрома *c* в комплексе с кардиолипином№ 3, с. 277-281
- Леденева О.Р., Белова Е.В., Быстров В.С.** Компьютерное моделирование структуры и физических свойств пептидных нанотрубок№ 3, с. 293-300
- Леонтьева С.В.** Вибронные спектры красителя оксазина 750 в водном растворе: расчетное исследование.....№ 4, с. 429-439
- Леонтьева С.В.** Возбуждение красителей пиронина Y и пиронина В в водном растворе: сравнительный теоретический анализ.....№ 3, с. 301-311
- Лесовая Е.Н., Садыкова О.Г., Лобачевский П.Н.** Моделирование динамики гетерогенной опухоли. Влияние облучения протонами отдельно и в сочетании с ингибитором синтеза ДНК – АраЦ№ 4, с. 401-407
- Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Ястребова Е.С.** Использование оптической модели «сплюснутый сфероид» для приближения формы активированного тромбоцита№ 3, с. 282-287
- Митина А.В., Орлова Н.Г., Дергилев А.И., Орлов Ю.Л.** Компьютерные программы оценки сложности текста ДНК для анализа структуры геномов микроорганизмов№ 4, с. 408-416
- Морозова Г.И., Муньос М.М., Иванов А.В., Кулинич Т.М., Романов С.А.** Исследование и моделирование реакций лейкоцитов в крови на γ -облучение с использованием энергетических показателей клеток иммунной сети№ 4, с. 382-391
- Степанов А.В., Попов А.П., Коваленко А.В., Юманов Д.С., Димитриева А.И., Сергеева К.В., Дементьев Д.А., Никольская А.А., Туловчиков В.С., Тетельбаум Д.И.** Генерация гиперзвуковых волн при облучении кремния светом, их распространение и влияние на живые организмы: компьютерное моделирование и эксперимент№ 4, с. 440-446

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Barrera Quiroz R.A., Hernandez Santiago A.A., Zenteno Mateo B., Gonzalez Fuentes M.A., Mendez Albores A., Mendez Albores E.** Comparison of melatonin photodegradation between sunlight and UV irradiation.....№ 3, с. 337-341
- Montiel del Cueto A.M., Hernandez Santiago A.A., Gonzalez Flores M., Mendez Albores E., Gonzalez Fuentes M.A.** Statistical evaluation for bacteria electro-stimulation using the Dunnett method for a microbial fuel cell.....№ 4, с. 453-457
- Zenteno Mateo B., Morales M.A., Serrano R.A., Cervantes Tavera A.M., Jose Israel R.M., Hernandez Santiago A.A.** Generalization of the thermokinetic oregonator model№ 4, с.447-452
- Безгачева Е.А., Бигдай Е.В.** Предполагаемый механизм влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность.....№ 2, с. 207-211
- Ботин А.С., Машал Д.А., Попова Т.С., Ризк М.Г.Х., Кордова А.В.** Углеродные наноконпозиты в медицине: графен и полиграфен как возможное средство доставки лекарств при онкологии кишечника№ 4, с. 477-485

- Ботин А.С., Пулин А.М., Гаврилов А.В., Попова Т.С., Кордова А.В.** Самоорганизация при формировании вирусов: нано-процесс сборки головок (капсидов) и укладки ДНК на примере хвостатых бактериофагов (лямбда, T4) № 4, с. 493-504
- Ботин А.С., Ризк М.Г.Х., Попова Т.С., Кордова А.В.** Безопасность углеродных наночастиц в биомедицинских приложениях: биосовместимость графена и его производных № 4, с. 486-492
- Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.** Регуляция редокс-зависимого механизма адаптации эритроцитов наночастицами диоксида церия № 3, с. 342-346
- Гисич А.В., Ястребова Е.С.** Исследование возможности измерения гликированного гемоглобина методом сканирующей проточной цитометрии № 2, с. 212-218
- Зарубин В.Н.** Хронофизиотерапия – новое направление в медицинской биофизике № 2, с. 199-202
- Клименко И.В., Китушина Е.В., Лобанов А.В.** Особенности взаимодействия гемина и Zn^{II} -комплекса тетра(4-пиридил)порфирина с гексамолибдоникилат-полианионом в водных средах № 2, с. 203-206
- Королева В.А., Панкова С.М., Редько Ю.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.** Влияние УФ-излучения и температуры на активность папаина № 1, с. 59-62
- Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Шипко М.Н., Степович М.А.** Об информативных возможностях и результатах экспериментальных исследований ГРВ-визуализации белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ № 1, с. 84-88
- Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Нестероидный противовоспалительный препарат мелоксикам ослабляет эффект иммуномодулятора глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки № 3, с. 328-332
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И., Симонян А.О.** Антагонист рецепторов сигма-1, соединение BD-1063, подавляет Ca^{2+} -ответы, вызываемые моликсаном в макрофагах № 1, с. 52-58
- Могильная О.А., Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Бондарь В.С.** О субстратной специфичности и некоторых свойствах внеклеточной оксидазы из базидиомицета *Neonothopanus nambi* № 1, с. 71-77
- Набережных Г. А., Давыдова В. Н., Соловьева Т.Ф.** Взаимодействие липополисахарид-связывающих белков с различными формами липополисахаридов № 2, с. 178-184
- Позднякова М.А., Жукова Е.С.** Особенности фотобиомодуляции при онкогенезе в зависимости от интенсивности окислительных процессов в организме крыс № 3, с. 333-336
- Полников И.Г., Казаринов К.Д.** Волноводно диэлектрический метод и устройства для измерения концентрации водных растворов и облучения биологических объектов № 2, с. 194-198
- Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Ле В.М., Могильная О.А., Захарова Ю.В., Сухих А.С., Бондарь В.С.** Кофейная кислота стимулирует свечение мицелия высших грибов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis in vivo* № 1, с. 78-83
- Смирнова О.Д., Калашникова И.В., Курбатов Г.А.** Фотометрия МДА в растворах: сравнение методов прямых данных оптической плотности и анализа производных спектров оптического поглощения № 4, с. 468-476
- Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.** Функциональные и структурные изменения тимуса крыс при воздействии различных доз эндокринного дисраптора № 2, с. 174-177
- Титов В.Ю., Осипов А.Н., Ананкина А.А., Кочиш И.И.** Оксид азота-высокоэффективная ловушка АФК. Возможности клинического использования для диагностики № 2, с. 185-193
- Туркина В.А., Ярема П.О., Майорова А.А., Орлова Н.Г., Савина Е.А., Орлов Ю.Л.** Реконструкция генных и ассоциативных сетей заболеваний для поиска генов-мишеней № 4, с. 458-467
- Федорова М.В., Вознесенский В.И., Созарукова М.М., Харченко А.А., Соснова Е.А., Проскурнина Е.В.** Антиоксидантный потенциал перитонеальной жидкости при раке яичников № 1, с. 63-70
- Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Тимохина Е.П.** Изменения в синтезе половых стероидов у самцов крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ № 1, с. 48-51
- Ястребова Е.С., Владимиров Р.С.** Использование медицинского Nd:YAG лазера в безыгольной венепункции № 3, с. 312-318

Ястребова Е.С., Лагунов Т.А. Влияние прохождения крови через капилляр на основные параметры эритроцитов № 3, с. 319-327

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

Ибрагимова Ж.М., Мухтаров М.М., Шукюрова П.А., Байрамова С.Д. Влияние оксидативного стресса, индуцированного электромагнитным излучением в раннем периоде постэмбрионального развития № 1, с. 89-92

Пионтковский С.А., Минский И.А., Мегер Я.В. Соотношение биомассы желетелого и кормового зоопланктона в Мировом океане № 1, с. 93-98

Савицкий М.А., Кузнецов А.В. Фракционирование планктона с помощью последовательной фильтрации и построение пирамид биоразнообразия № 1, с. 99-110

Шишкина Л.Н., Белецкая П.Д., Дубовик А.С., Машукова А.В., Швыдкий В.О. Механизм воздействия ионов тяжелых металлов на физико-химические свойства фосфолипидов № 1, с. 111-116

Бабаева Г.Х., Мусаев Н.А. Действие экстрактов из *Artemisia L.* на плазматическую мембрану в условиях стресса № 2, с. 219-223

Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Апашева Л.М., Будник М.И., Овчаренко Е.Н. Влияние растворов пероксида водорода разных составов на прорастание семян огурца № 2, с. 224-228

Будник М.И., Сергеев С.Н., Тараскин К.А., Апашева Л.М., Ростовцев Р.А., Уцаповский И.В., Пролетова Н.В., Лобанов А.В., Степнова А.Ф., Казиев Г.З., Овчаренко Е.Н., Барнашова Е.К., Смурова Л.А., Грудзинский А.В. Новый научно-методический подход к экологической обработке семян льна, повышающей всхожесть и предотвращающей слипание посевного материала № 3, с. 347-352

Подольская М.С., Челебиева Э.С., Гостюхина О.Л., Лавриченко Д.С., Кладченко Е.С. Функциональное состояние *Magallana gigas* при заражении *Pione vastifica* № 3, с. 353-357

Лавриченко Д.С., Ткачук А.А., Кладченко Е.С., Андреева А.Ю. Влияние краткосрочного изменения солености на функциональные особенности гемоцитов средиземноморской мидии № 4, с. 505-509

Парфенова И.А., Солдатов А.А. Критические и пороговые концентрации кислорода для некоторых видов черноморских рыб (краткая справка) № 4, с. 510-514