

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 8, № 2
2023**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 8, № 2
2023**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 8, No. 2, 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, № 2, 2023

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Е.А. ГребневаИнтерпретация горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза, образующихся на запаздывающей нити двухцепочечной ДНК гена *supF* 125**Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова, А.С. Лелеков, Е.С. Серяк**Декомпозиция спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl. 133**В.В. Рощина, А.Р. Куньев, В.В. Фатерыга, М.М. Шовкун**

Применение микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра для исследования поверхности растительных клеток 137

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Н.И. Новикова, Е.Е. Фесенко

Сравнительный анализ ингибирующих эффектов гипомагнитного поля и комбинированных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами 143

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

С.В. Аксёнова, А.С. Батова, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов

Влияние оксидативного стресса на функционирование глутаматных рецепторов гиппокампа 151

С.Д. Демухамедова, Г.А. АхвердиеваТеоретическое исследование N^1H таутомера карнозина в цвиттерионной форме 159**А.И. Ковалёв, К.В. Пузановский**

Анализ устойчивости в моделировании эволюционных процессов 169

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов

Функциональные и структурные изменения тимуса крыс при воздействии различных доз эндокринного дисраптора 174

Г.А. Набережных, В.Н. Давыдова, Т.Ф. Соловьева

Взаимодействие липополисахарид-связывающих белков с различными формами липополисахаридов 178

В.Ю. Титов, А.Н. Осипов, А.А. Ананкина, И.И. Кочиш

Оксид азота-высокоэффективная ловушка АФК. Возможности клинического использования для диагностики 185

И.Г. Полников, К.Д. Казаринов

Волноводно диэлектрический метод и устройства для измерения концентрации водных растворов и облучения биологических объектов 194

В.Н. Зарубин

Хронофизиотерапия – новое направление в медицинской биофизике 199

И.В. Клименко, Е.В. Китушина, А.В. Лобанов

Особенности взаимодействия гемина и Zn^{II} -комплекса тетра(4-пиридил)порфирина с гексамолибденоникелат-полианионом в водных средах 203

Е.А. Безгачева, Е.В. Бигдай

Предполагаемый механизм влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность 207

А.В. Гисич, Е.С. Ястребова

Исследование возможности измерения гликированного гемоглобина методом сканирующей проточной цитометрии 212

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ**Г.Х. Бабаева, Н.А. Мусаев**

Действие экстрактов из *Artemisia L.* на плазматическую мембрану в условиях стресса 219

К.Ф. Сергейчев, Н.А. Лукина, Л.М. Апашева, М.И. Будник, Е.Н. Овчаренко

Влияние растворов пероксида водорода разных составов на прорастание семян огурца 224

CONTENTS

Volume 8, No. 2, 2023

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

H.A. Grebneva

Interpretation of hot spots of ultraviolet mutagenesis formed on a lagging strand of double-stranded DNA of the supF gene.....125

D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova, A.S. Lelekov, E.S. Seryak

Decomposition of the absorption spectrum acetone extract of microalgae *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl.133

V.V. Roshchina, A.R. Kunyev, V.V. Fateryga, M.M. Shovkun

Application of microspectrofluorimeter/microspectrophotometer for the study of the surface of plant cells137

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, N.I. Novikova, E.E. Fesenko

Comparative analysis of the inhibitory effects of the hypomagnetic field and combined magnetic fields on the production of reactive oxygen species (ROS) by neutrofiles143

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

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

Effect of oxidative stress on the functioning of glutamate receptors in the hippocampus151

S.D. Demukhamedova, G.A. Akverdieva

Theoretical study of the carnosine N¹H tautomer in the zwitterionic form159

A.I. Kovalev, K.V. Puzanovsky

Stability analysis in simulation of evolutionary processes169

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov

Functional and structural changes in the rat thymus induced by different doses of endocrine disruptor.....174

G.A. Naberezhnykh, V.N. Davydova, T.F. Soloveva

Interaction of lipopolysaccharide-binding proteins with various forms of lipopolysaccharides.....178

V.Yu. Titov, A.N. Osipov, A.A. Anankina, I.I. Kochish

Nitric oxide is a highly efficient ROS trap. Possibility of clinical use for diagnostics185

I.G. Polnikov, K.D. Kazarinov

Waveguide dielectric method and devices for measuring the concentration of aqueous solutions and irradiation of biological objects.....194

V.N. Zarubin

Chronophysiotherapy - a new direction in medical biophysics199

I.V. Klimenko, E.V. Kitushina, A.V. Lobanov

Peculiarities of heme and Zn^{II}-complex tetra(4-pyridyl)porphyrin interaction with hexamolibdenicelate-polyanion in aqueous media..... 203

E.A. Bezgacheva¹, E.V. Bigdaj²

Possible mechanism of influence of short-term hypoxia on olfactory sensitivity 207

A.V. Gisich, E.S. Yastrebova

Investigation of the possibility of measuring glycated hemoglobin by scanning flow cytometry.... 212

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES**G.Kh. Babayeva, N.A. Musayev**

Action of extracts from Artemisia L. on the plasmatic membrane under stress conditions..... 219

K.F. Sergeychev, N.A. Lukina, L.M. Apasheva, M.I. Budnik, E.N. Ovcharenko

Influence of solutions of hydrogen peroxide of different compositions on the seeds germination..... 224

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ГОРЯЧИХ ПЯТЕН УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО МУТАГЕНЕЗА, ОБРАЗУЮЩИХСЯ НА ЗАПАЗДЫВАЮЩЕЙ НИТИ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ГЕНА *supF*

Гребнева Е.А.

Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина
ул. Р. Люксембург, 72, Донецк, 83114, РФ, e-mail: grebneva@gmail.com
Поступила в редакцию 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0598

Аннотация. В настоящее время не ясен механизм образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. Мной была разработана полимеразно-таутомерная модель механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза и было показано, что вероятность образования мутаций зависит от процессов распространения энергии возбуждения по молекуле ДНК. В предложенной мной полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза было показано, что мутации образуются напротив только тех *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, одно или оба основания в которых находятся в редких таутомерных формах. В полимеразно-таутомерной модели механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза мной было показано, что горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза являются те *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, на которые передается больше всего энергии возбуждения. В ряде работ мной были рассчитаны относительные вероятности образования мутаций, образовавшиеся напротив оснований ДНК, входящих в состав *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, появившихся при облучении двухцепочечной ДНК гена *supF*. В данной статье, опираясь на результаты предыдущих расчетов, интерпретируются экспериментальные данные, в которых горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза являются участки ДНК, состоящие из расположенных подряд трех и более пиримидиновых оснований ДНК.
Ключевые слова: УФ-мутагенез, редкие таутомерные формы оснований ДНК, *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, горячие и холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза, передача энергии возбуждения по молекуле ДНК, синглетные уровни оснований ДНК, триплетные уровни оснований ДНК.

Облучение молекулы ДНК ультрафиолетовым светом приводит к повреждениям, при этом циклобутановые пиримидиновые димеры составляют около 80% всех повреждений [1,2]. В результате синтеза ДНК [3,4] только 5–10% циклобутановых пиримидиновых димеров [5] приводят к мутациям. Чаще всего образуются мишеные мутации замены оснований, когда мутации появляются напротив циклобутановых пиримидиновых димеров и одно основание ДНК заменяется другим основанием [6]. На некоторых участках ДНК, содержащих пиримидиновые димеры мутации, образуются очень часто [7,8]. Такие участки ДНК называются горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза. На других участках ДНК мутации образуются очень редко или никогда, это – холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза [7,8].

Общепринятая полимеразная модель мутагенеза [9] опирается на предположение о том, что причиной мутаций являются случайные ошибки ДНК-полимераз, которые встраивают напротив матричных оснований ДНК такие основания, которые не могут образовывать с матричными основаниями водородные связи. Однако, как показывают многочисленные экспериментальные данные [10,11], напротив матричных оснований даже специализированные ДНК-полимеразы встраивают такие основания, которые способны образовывать с матричными основаниями водородные связи. Кроме того, полимеразная модель [9] и другие модели [12-14] претендуют только на объяснение механизма образования мишеных мутаций замены оснований [15]. Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-38], опирающиеся на гипотезу Уотсона и Крика [39] о том, что в основе мутагенеза лежит способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах. Мной был разработан механизм образования редких таутомеров оснований ДНК при облучении двухцепочечной молекулы ДНК ультрафиолетовым светом [16,27]. Для его обоснования были использованы результаты выполненных нами с К. Б. Толпыго нескольких циклов работ, посвященных исследованию свойств возбужденных водородных связей в двухцепочечной молекуле ДНК [31].

Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели механизмов образования мишеных мутаций замены оснований [15,26-29,32,33], мишеных инсерций [21,24,28], мишеных делеций [19,22,28] и мишеных комплексных инсерций [23,25,28]. Мной были разработаны механизмы образования немишеных (появляющихся на, так называемых, не поврежденных участках ДНК) мутаций замены оснований, появляющихся сразу после облучения [17,26], и задерживающихся немишеных мутаций [32]. Мной разработаны механизмы образования мишеных [29] и немишеных [32] задерживающихся мутаций замены оснований. Я показала, что 100% мутаций вызываются мутагенами [34] и разработала полимеразно-таутомерную модель риска образования злокачественных опухолей [34,36,37].

В ряде экспериментальных работ пары оснований ДНК, одно из которых находится в редкой таутомерной форме, были найдены в активных центрах ДНК-полимераз [10,11]. Эти данные являются прямым экспериментальным подтверждением идеи Уотсона и Крика [39] и полимеразно-таутомерных моделей [15-38].

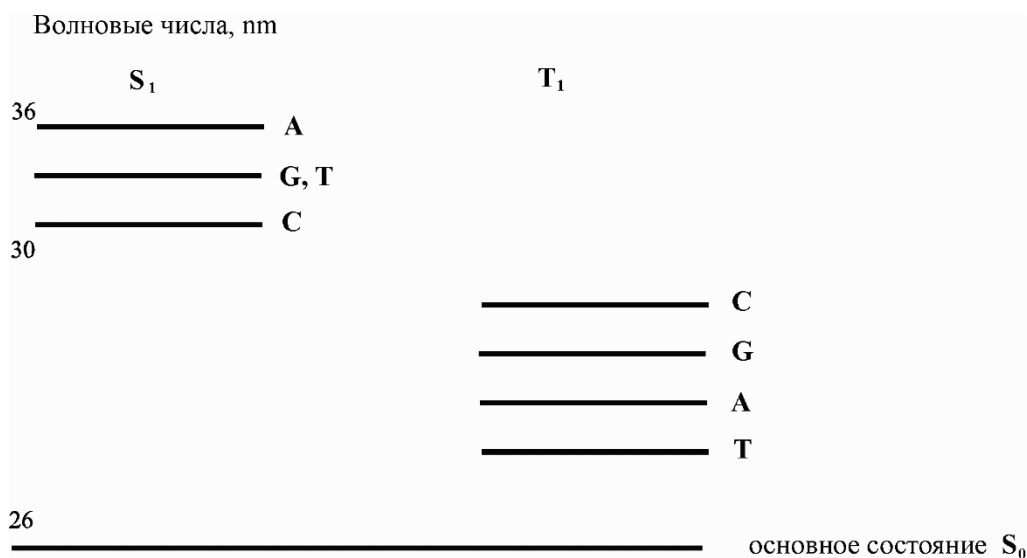


Рисунок 1. Диаграмма энергетических уровней различных оснований ДНК [45]. S_1 – нижний синглетный уровень, T_1 – нижний триплетный уровень

Основы полимеразно-таутомерной модели механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. В ряде работ мной была разработана полимеразно-таутомерная модель образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза [18,35,38]. В экспериментах [7,8] были найдены мишеные мутации замены оснований. Они образовались напротив циклобутановых пиримидиновых димеров. Оказалось, что напротив одних циклобутановых пиримидиновых димеров мутации появляются очень часто, а напротив других мутации появляются очень редко. В рамках полимеразной парадигмы понять это трудно. Ведь она опирается на гипотезу, что единственной причиной мутаций являются случайные ошибки ферментов, встраивающих основания, то есть ДНК-полимераз [9]. Следовательно, во-первых, надо понять почему одни циклобутановые пиримидиновые димеры вызывают мутации, а другие, казалось бы, точно такие же не вызывают мутаций. Как я показала, к мутациям приводят только те циклобутановые пиримидиновые димеры, одно или оба основания в которых находятся в редких таутомерных формах [15-38]. Причем, основания в одних редких таутомерных формах могут приводить только к мутациям замены оснований [15,26-29,32,33], основания в других редких таутомерных формах могут приводить только к делециям или инсерциям [19,21,22,24], а основания в остальных редких таутомерных формах могут приводить только к задерживающимся мутациям [29,32]. Следовательно, согласно полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза холодные пятна ультрафиолетового мутагенеза это циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в канонических таутомерных формах, и, следовательно, напротив них мутации образовываться не могут. А горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза это циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в редких таутомерных формах и напротив них мутации могут образоваться. Но, конечно, не все циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в редких таутомерных формах являются горячими пятнами ультрафиолетового мутагенеза. Как показывают эксперименты [7], напротив одних *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров появляется одна или две мутации, а напротив других точно таких же, может образоваться и 19 мишеных мутаций замены оснований [7]. Следовательно, цель полимеразно-таутомерной модели образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза это – объяснить эти различия в вероятностях образования мутаций на различных участках ДНК.

Источником повреждений молекулы ДНК при облучении ее ультрафиолетовым светом являются ультрафиолетовые кванты энергии, которые поглощает молекула ДНК. К образованию циклобутановых пиримидиновых димеров и редких таутомерных форм оснований ДНК приводит тепловая релаксация возбуждения с триплетного уровня энергии [16]. Она вызывает сильные вынужденные колебания и изменения длин водородных связей. Как показывают экспериментальные данные, по молекуле ДНК может распространяться энергия возбуждения [44], в молекулах ДНК возможна триплет-триплетная миграция энергии [40], на участках с неоднородным нуклеотидным составом возможна миграция энергии на 10–15 нуклеотидных пар [41,42].

Следовательно, чем больше энергии возбуждения будет передаваться на данное основание ДНК, тем больше вероятность того, что на данном основании ДНК произойдет мутация [18,35,38]. Для расчета относительной вероятности образования мутаций на данном основании ДНК следует использовать соотношение между энергиями синглетного и триплетного уровней энергии различных оснований ДНК (рис. 1), которые были найдены в работе [45]. Кроме того, следует учитывать, что молекулы цитозина гораздо чаще изменяют свое таутомерное состояние, чем молекулы тимина [46]. Опираясь на эти данные, мной были построены диаграммы, описывающая распространение энергии возбуждения по кодирующей (рис. 2) [18] и запаздывающей (рис. 3, 4)

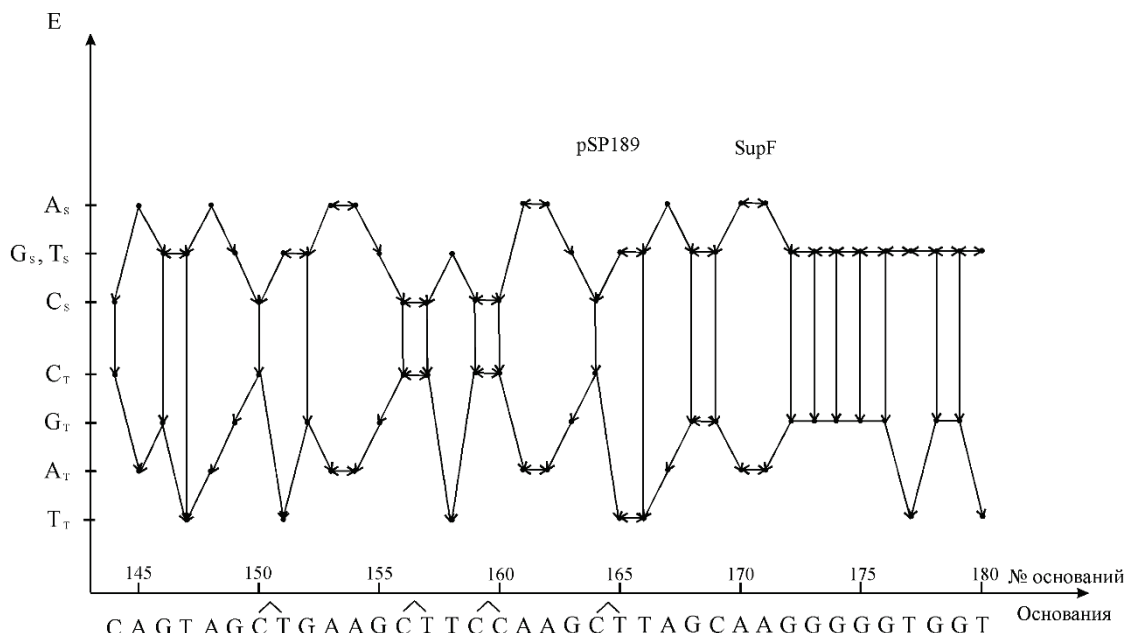


Рисунок 2. Часть участка кодирующей нити ДНК *supF* гена [7]. По оси абсцисс отложены основания и их номера, а по оси ординат – их триплетные и синглетные уровни энергии. Крышечками обозначены *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры [18]

нити ДНК гена *supF* [35,38]. На основе этих диаграмм были рассчитаны относительные вероятности образования мутаций на различных основаниях ДНК [18,35,38]. Сравнение результатов этих расчетов с экспериментальными данными [7,8] показало хорошее соответствие [18,35,38].

Образование больших горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза в кодирующей нити молекулы ДНК *supF* гена. В работе [7] в результате облучения двухцепочечной молекулы ДНК гена *supF* образовалось 122 мутанта. Для того, чтобы максимум мутаций сохранилось, эксцизионная репарация была подавлена. В работе [7] горячими пятнами называются участки ДНК, содержащие как минимум, 5% всех мутаций. В работе [7] на кодирующей нити ДНК *supF* к горячим пятнам авторы отнесли мутации на участках ДНК $C_{122}C_{123}C_{124}$ и сайте C_{156} . На участке $C_{122}C_{123}C_{124}$ образовалось 25 мутаций, а на сайте C_{156} появилось 14 мутаций. Интересно, что на сайте C_{150} не образовалось ни одной мутации. К горячему пятну ультрафиолетового мутагенеза можно отнести также сайт C_{164} , на котором тоже образовалось 8 мутаций [7].

С точки зрения полимеразно-таутомерной модели и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза, большее количество мутаций будут образовываться напротив тех *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, на которые передается большая энергия возбуждения [18,35,38]. Причем, как правило, эти *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры должны содержать хотя бы одну молекулу цитозина. Как показано в полимеразно-таутомерной модели ультрафиолетового мутагенеза, только те *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры могут вызывать мутации, в которых одно или оба основания находятся в редких таутомерных формах [15]. Как известно [46], молекулы цитозина на порядок чаще изменяют свои таутомерные состояния, чем молекулы тимина. Посмотрим, соответствуют ли эти выводы экспериментальным фактам.

Как показано в [38], на *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{156}T_{157}$ передается $4,0 E_T^{Tr}$ энергии возбуждения (E_T^{Tr} – энергия триплетного уровня тимина). На *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{159}C_{160}$ передается $4 E_C^{Tr}$ энергии возбуждения (E_C^{Tr} – энергия триплетного уровня цитозина). На *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{164}T_{165}$ передается $3,625 E_T^{Tr}$ энергии возбуждения. Для того, чтобы понять, много это энергии возбуждения или мало, сравним эти энергии с той энергией возбуждения, которая может передаваться на холодное пятно ультрафиолетового мутагенеза, а именно, на основания $C_{150}T_{151}$, которые могут образовывать *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{150}T_{151}$. Как показано в [38], на *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{150}T_{151}$ передается $2,75 E_T^{Tr}$ энергии возбуждения. Видно, что на *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер $C_{150}T_{151}$, который не приводит к мутациям, передается гораздо меньше энергии возбуждения, чем на те *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, которые вызвали много мутаций.

Давайте проанализируем образование мутаций на горячем пятне на участке ДНК $C_{122}C_{123}C_{124}$, полученном в работе [7]. Как показано в эксперименте [7], напротив цитозина C_{122} образовалось 6 мутаций замены оснований, напротив цитозина C_{123} образовалось 7 мутаций замены оснований и напротив цитозина C_{124} образовалось 12 мутаций замены оснований. В результате облучения этой молекулы ДНК ультрафиолетовым светом на этом участке ДНК могло образоваться несколько *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, причем возможны разные варианты. Цитозин C_{122} может входить в *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры $T_{121}C_{122}$ и $C_{122}C_{123}$. Цитозин C_{123} может входить в *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры $C_{122}C_{123}$ и $C_{123}C_{124}$. Цитозин C_{124} может входить в *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры $C_{123}C_{124}$ и $C_{124}T_{125}$.

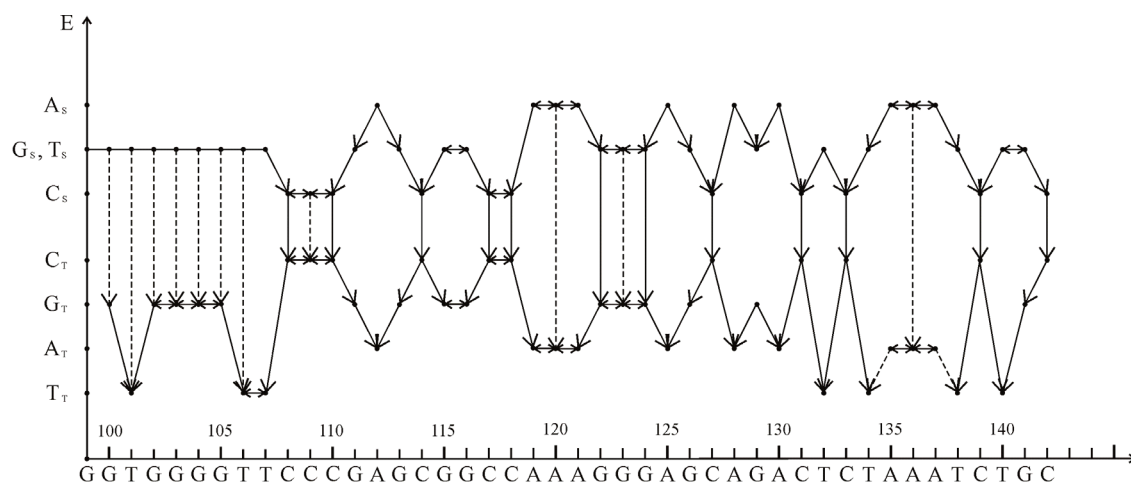


Рисунок 3. Участок запаздывающей нити ДНК *supF* гена, на котором в [7] были получены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза. По оси абсцисс отложены основания и их номера, а по оси ординат – их триплетные и синглетные уровни энергии. В скобках указано количество мутаций, образовавшихся напротив данного основания ДНК [35]

Таким образом, хотя на каждую пару оснований может передаваться не очень много энергии возбуждения, но за счет того, что в каждом случае мутации могут образовываться при образовании двух *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, то вероятность образования мутаций повышается. Мы видим, что этим горячим пятном следует назвать участок ДНК T₁₂₁C₁₂₂C₁₂₃C₁₂₄T₁₂₅, так как он должен включать в себя все *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, которые участвуют в образовании этого горячего пятна.

Образование больших горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза в запаздывающей нити молекулы ДНК *supF* гена. В работе [7] на запаздывающей нити ДНК *supF* к горячим пятнам авторы отнесли мутации на сайте C₁₅₅, так как напротив цитозина C₁₅₅ образовалось 16% всех мутаций. Дополнительно к горячим пятнам можно причислить сайт C₁₀₈, напротив которого образовалось 9 мутаций, а также участки T₁₆₁T₁₆₂C₁₆₃ и T₁₆₇C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃, так как напротив T₁₆₂C₁₆₃ образовалось 7 мутаций, а напротив участка C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃ образовалось 22 мутации. Посмотрим, почему именно на этих участках ДНК образовалось больше мутаций чем на других участках.

В работах [18,35,38] мной были рассчитаны энергии возбуждения, которые могут передаваться на пары оснований, которые могут образовывать *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры. В работе [35] мной была высказана гипотеза, что, используя значения этих энергий, можно оценить относительные вероятности образования мутаций, появляющихся при образовании *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров.

Посмотрим, почему на участке ДНК T₁₀₇C₁₀₈C₁₀₉C₁₁₀ образовалось 11 мутаций, 9 мутаций появилось напротив цитозина C₁₀₈ и одна тандемная мутация появилось на против C₁₀₉C₁₁₀. При облучении этого участка ДНК могли образоваться *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры T₁₀₇C₁₀₈, C₁₀₈C₁₀₉ и C₁₀₉C₁₁₀. Как показано в [35], на *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер T₁₀₇C₁₀₈ передается 4,5 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения (E_{T^{Tr}} – энергия триплетного уровня тимина). На *цис-син* циклобутановый цитозиновый димер C₁₀₈C₁₀₉ передается 4,5 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения (E_{C^{Tr}} – энергия триплетного уровня цитозина), а на *цис-син* циклобутановый цитозиновый димер C₁₀₉C₁₁₀ передается 4,5 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения. Другими словами, на это участок ДНК передается много энергии возбуждения.

Посмотрим, почему на участке ДНК T₁₆₁T₁₆₂C₁₆₃ напротив T₁₆₂C₁₆₃ образовалось 7 мутаций. При облучении этого участка ДНК могли образоваться *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры T₁₆₁T₁₆₂ и T₁₆₂C₁₆₃. Как показывает эксперимент [7], напротив тимина T₁₆₂ образовалась одна мутация, а напротив цитозина C₁₆₃ образовалось 6 мутаций. Поскольку напротив тиминных димеров мутации появляются редко, а обычно мутации образуются напротив молекул цитозина, то участок ДНК T₁₆₁T₁₆₂C₁₆₃ безусловно надо отнести к горячему пятну ультрафиолетового мутагенеза. Как показано в [38], на T₁₆₁T₁₆₂ и на T₁₆₂C₁₆₃ передается по 4,0 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения. То есть передается достаточно много энергии возбуждения. Чтобы образовались *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры и мутации могут образовываться с высокой вероятностью.

Посмотрим, почему на участке ДНК T₁₆₇C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃ образовалось 22 мутации. Как показывает эксперимент [7], напротив цитозина C₁₆₈ образовалось 8 мутаций, напротив цитозина C₁₆₉ образовалось 7 мутаций и напротив тимина T₁₇₀ образовалась 1 мутация, напротив цитозина C₁₇₂ образовалось 2 мутации и напротив цитозина C₁₇₃ образовалось 4 мутации. Как показано в [38], на T₁₆₇C₁₆₈ передается 4,5 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения, на C₁₆₈C₁₆₉ передается 5 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения, на C₁₆₉T₁₇₀ передается 4,125 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения, на T₁₇₀T₁₇₁ передается 5,75 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения, на T₁₇₁C₁₇₂ передается 5,75 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения, на C₁₇₂C₁₇₃ передается 3,25 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения. Для сравнения на T₁₄₈C₁₄₉, C₁₅₂T₁₅₃, T₁₅₃T₁₅₄, передается по 3,25 E_{T^{Tr}} энергии возбуждения; на C₁₇₄C₁₇₅ и C₁₇₅C₁₇₆ передается по 3,25 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения, а на C₁₇₈C₁₇₉ передается по 3,25 E_{C^{Tr}} энергии возбуждения. Как получено в экспериментах [7], напротив этих оснований не

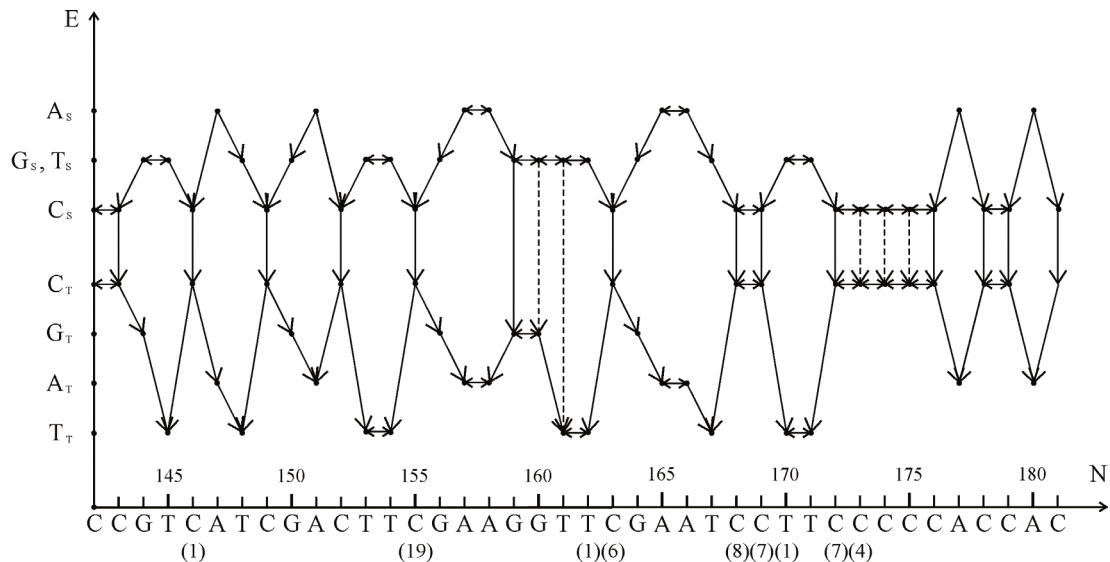


Рисунок 4. Часть участка запаздывающей нити ДНК *supF* гена, на котором в [7] были получены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза. По оси абсцисс отложены основания и их номера, а по оси ординат – их триплетные и синглетные уровни энергии. В скобках указано количество мутаций, образовавшихся напротив данного основания ДНК [38]

появились ни одной мутации, кроме того. Рядом с ними находятся молекулы пуринов. Участок ДНК T₁₆₇C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃ является горячим пятном ультрафиолетового мутагенеза по нескольким причинам, во-первых, на основания, входящие в этот участок ДНК, передается много энергии, а во-вторых, он состоит из одних пиримидинов, так что вероятность образования мутаций напротив каждого из оснований увеличивается.

Выводы. В экспериментах [7] были найдены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза (участки ДНК, на которых образовалось много мутаций) полученные при облучении молекулы ДНК *supF* гена, кодирующего супрессорную транспортную РНК. При облучении молекулы ДНК ультрафиолетовым светом чаще всего образуются циклобутановые пиримидиновые димеры. В [7] были найдены, так называемые, мишеные мутации замены оснований, образующиеся напротив *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров. В экспериментах [7] было найдено 122 мутанта молекулы ДНК *supF* гена. Так много мутантов было найдено потому, что в этих экспериментах была подавлена эксцизионная репарация, отвечающая за удаление циклобутановых димеров. В работе [7] горячими пятнами называются участки ДНК, содержащие как минимум, 5% всех мутаций. На кодирующей нити молекулы ДНК *supF* гена были найдены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза: участок ДНК C₁₂₂C₁₂₃C₁₂₄ и сайты C₁₅₆ и C₁₆₄. На запаздывающей нити молекулы ДНК *supF* гена в работе [7] были найдены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза: сайты C₁₅₅ и C₁₀₈, а также участки ДНК T₁₆₁T₁₆₂C₁₆₃ и T₁₆₇C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃.

Целью данной работы является интерпретация экспериментальных данных [7], в частности, интерпретация механизма образования больших пятен ультрафиолетового мутагенеза. В рамках общепринятой полимеразной парадигмы мутагенеза не удастся объяснить механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. Мной предложена альтернативная, полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза и в ее рамках разработана полимеразно-таутомерная модель механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. В предыдущих работах мной было показано, что к мишенным мутациям замены оснований приводят те *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, основания которых находятся в определенных редких таутомерных формах. Полимеразно-таутомерная модель механизма образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза основана на гипотезе о том, что мутации чаще образуются при образовании тех *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, на которые передается больше всего энергии возбуждения. Используя, полученные мной в предыдущих работах, энергии возбуждения, которые предаются на основания молекулы ДНК *supF* гена, были изучены горячие пятна ультрафиолетового мутагенеза молекулы ДНК *supF* гена.

Сравнение энергии возбуждения, которые предаются на *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, которые приводят к большому количеству мутаций и которые не вызывают мутаций, показано, что чем больше энергия возбуждения, которая передается на данный *цис-син* циклобутановый пиримидиновый димер, тем больше мутаций вызывает данный димер. Показано, что горячими пятнами следует назвать участки ДНК T₁₂₁C₁₂₂C₁₂₃C₁₂₄T₁₂₅, C₁₆₄T₁₆₅, T₁₅₄C₁₅₅, T₁₀₇C₁₀₈, T₁₆₂C₁₆₃, T₁₆₁T₁₆₂C₁₆₃ и T₁₆₇C₁₆₈C₁₆₉T₁₇₀T₁₇₁C₁₇₂C₁₇₃, так как они должны включать в себя все *цис-син* циклобутановые пиримидиновые димеры, которые участвуют в образовании этих горячих пятен. Оказалось, что на больших участках ДНК, содержащих соседние пиримидиновые основания, даже если на данные пиримидиновые основания передается среднее количество энергии возбуждения, мутации образуются часто. Причиной является то, что так как одна и та же мутация может образовываться при образовании двух *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров, то вероятность образования мутаций повышается.

Список литературы / References:

1. Banyasz A., Vayá I., Changenet-Barret P., Gustavsson T., Douki T., Markovitsi D. Base pairing enhances fluorescence and favors cyclobutane dimer formation induced upon absorption of UVA radiation by DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 14, pp. 5163-5165.
2. Besaratinia A., Yoon J.I., Schroeder C., Bradforth S.E., Cockburn M., Pfeifer G.P. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2011, vol. 25, no. 9, pp. 3079-3091.
3. Hendel A., Ziv O., Gueranger Q., Geacintov N., Livneh Z. Reduced efficiency and increased mutagenicity of translesion DNA synthesis across a TT cyclobutane pyrimidine dimer, but not a TT 6-4 photoproduct, in human cells lacking DNA polymerase η . *DNA Repair*, 2008, vol. 7, no. 10, pp. 1636-1646.
4. Vasquez-Del C.R., Silverstein T.D., Lone S., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A.K. Role of human DNA polymerase κ in extension opposite from a *cis-syn* thymine dimer. *Journal of Molecular Biology*, 2011, vol. 408, no. 2, pp. 252-261.
5. Lawrence C.W., Banerjee S.K., Borden A., LeClerc J.E. T-T cyclobutane dimers are misinstructive, rather than non-instructive, mutagenic lesions. *Molecular and General Genetics*, 1990, vol. 222, no. 1, pp. 166-169.
6. Santiago M.J., Alejandro-Durán A., Ruiz-Rubio M. Analysis of UV-induced mutation spectra in *Escherichia coli* by DNA polymerase η from *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Research*, 2006, vol. 601, no. 1-2, pp. 51-60.
7. Parris C.N., Levy D.D., Jessee J., Seidman M.M. Proximal and distal effects of sequence context on ultraviolet mutational hotspots in a shuttle vector replicated in xeroderma cells. *Journal of Molecular Biology*, 1994, vol. 236, no. 2, pp. 491-502.
8. Canella K.A., Seidman M.M. Mutation spectra in supF: approaches to elucidating sequence context effects. *Mutation Research*, 2000, vol. 450, no. 1-2, pp. 61-73.
9. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutation Research*, 2002, vol. 510, no. 1, pp. 55-70.
10. Bebenek K., Pedersen L.C., Kunkel T.A. Replication infidelity via a mismatch with Watson-Crick geometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 5, pp. 1862-1867.
11. Wang W., Hellinga H.W., Beese L.S. Structural evidence for the rare tautomer hypothesis of spontaneous mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 43, pp. 17644-17648.
12. Данилов В.И., Михалева О.В., Слюсарчук О.Н., Стюарт Дж.Дж., Альдерфер Дж.Л. О новом механизме мутаций, индуцируемых УФ-светом. Теоретическое изучение двухпротонной фототаутомеризации в модельных парах оснований ДНК. *Биополимеры и клетка*, 1997, т. 13, № 4, с. 261-268 [Danilov V.I., Mikhaleva O.V., Slysarchuk O.N., Stewart J.J., Alderfer J.L. On a new mechanism of mutations induced by UV light. Theoretical study of two-proton phototautomerization in model DNA base pairs. *Biopolymers and Kletka*, vol. 13, no. 4, pp. 261-268 (In Russ.)].
13. Podolyan Y., Gorb L., Leszczynski J. *Ab initio* study of the prototropic tautomerism of cytosine and guanine and their contribution to spontaneous point mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, 2003, vol. 4, no. 7, pp. 410-421.
14. Danilov V.I., Anisimov V.M., Kurita N., Hovorun D.M. MP2 and DFT studies of the DNA rare base pairs: the molecular mechanism of spontaneous substitution mutations conditioned by tautomerism of bases. *Chemical Physics Letters*, 2005, vol. 412, no. 4-6, pp. 285-293.
15. Grebneva H.A. Nature and possible mechanisms formation of potential mutations arising at emerging of thymine dimers after irradiation of double-stranded DNA by ultraviolet light. *Journal of Molecule Structure*, 2003, vol. 645, pp. 133-143.
16. Grebneva H.A. A model for targeted substitution mutagenesis during SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2006, vol. 47, no. 9, pp. 733-745.
17. Гребнева Е.А. Три источника потенциальных немиссенных ультрафиолетовых мутаций. Сборник трудов VI Всеукраинской научно-технической конференции. Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. Украина, г. Севастополь, 26-30 апреля 2010, с. 15-18 [Grebneva E.A. *Three sources of potential untargeted ultraviolet mutations*. Proceedings of the VI All-Ukrainian Scientific and Technical Conference. Topical issues of theoretical and applied biophysics, physics and chemistry. Ukraine, Sevastopol, April 26-30, 2010, pp. 15-18 (In Russ.)].
18. Гребнева Е.А. Природа и механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. Доклады НАН Украины, 2012, № 10, с. 181-187. [Grebneva E.A. Nature and mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2012, no. 10, p. 181-187. (In Russ.)].
19. Гребнева Е.А. Механизм образования делеций при синтезе ДНК, содержащей *cis-syn* циклобутановые цитозинового димеры. Материалы VIII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии», Севастополь, 23-27 апреля 2012, с. 88-90 [Grebneva E.A. *The mechanism of deletion formation during the synthesis of DNA containing cis-syn cyclobutane cytosine dimers*. Proceedings of the

VIII International Scientific and Technical Conference “Actual Issues of Biological Physics and Chemistry”, Sevastopol, April 23-27, 2012, pp. 88-90 (In Russ.).

20. Гребнева Е.А. Механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетовых мишенных мутаций замены оснований. Материалы IX Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии», Севастополь, 23-27 апреля 2013, с. 18-20 [Grebneva E.A. *Mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet targeted base substitution mutations*. Proceedings of the IX International Scientific and Technical Conference "Actual Issues of Biological Physics and Chemistry", Sevastopol, April 23-27, 2013, pp. 18-20 (In Russ.)].

21. Гребнева Е.А. Механизмы мишенных мутаций сдвига рамки считывания – появление инсерций при склонном к ошибкам или SOS синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминового димеры. *Молекулярная биология*, 2014, т. 48, № 4, с. 531-542 [Grebneva H.A. Mechanisms of targeted frameshift mutations – insertion formation under error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Molecular Biology (Moscow)*, 2014, vol. 48, no. 4, pp. 457-467 (In Russ.)].

22. Grebneva H.A. A polymerase – tautomeric model for targeted frameshift mutations: deletions formation during error-prone or SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Journal of Photonic Materials and Technology*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 19-26.

23. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных сложных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминового димеры. *Доклады НАН Украины*, 2015, № 5, с. 145-154 [Grebneva E.A. Mechanisms for the formation of targeted complex insertions during the synthesis of a DNA molecule containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2015, no. 5, pp. 145-154 (In Russ.)].

24. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных инсерций при склонном к ошибкам или SOS-синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминового димеры. Материалы X Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». Севастополь 17-21 августа 2015, с. 70-74 [Grebneva E.A. *Mechanisms of formation of targeted insertions during error-prone or SOS synthesis of DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers*. Proceedings of the X International Scientific and Technical Conference “Actual Issues of Biological Physics and Chemistry. Sevastopol August 17-21, 2015, pp. 70-74 (In Russ.)].

25. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель механизма образования мишенных сложных инсерций при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминового димеры. Материалы XI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» в 2 томах, Севастопольский государственный университет, т. 1, 298 с., Украина, Севастополь 25-29 апреля 2016, с. 156-160 [Grebneva E.A. *Polymerase-tautomeric model of the mechanism of formation of targeted complex insertions during the synthesis of DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers*. Proceedings of the XI International Scientific and Technical Conference "Actual Issues of Biological Physics and Chemistry" in 2 volumes, Sevastopol State University, vol. 1, 298 p., Ukraine, Sevastopol April 25-29, 2016, pp. 156-160 (In Russ.)].

26. Grebneva H.A. A polymerase-tautomeric model for radiation-induced bystander effects: a model for untargeted substitution mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in rare tautomeric forms. *International Journal of Molecular Biology: Open Access*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 1-14.

27. Grebneva H.A. A Polymerase-tautomeric model for targeted substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International Journal of Molecular Biology: Open Access*, 2016, vol. I, no. 1, pp. 1-16.

28. Grebneva H.A. *Polymerase-tautomeric model for ultraviolet mutagenesis: targeted base substitution and frameshift mutations caused by cis-syn cyclobutane thymine dimers*. Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017, 132 p.

29. Grebneva H.A. A polymerase-tautomeric model for radiation-induced genomic instability: targeted delayed substitution mutations during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International Journal of Molecular Biology: Open Access*, 2018, vol. 3, pp. 125-141.

30. Grebneva H.A. Paradigm change in mutagenesis: polymerase-tautomeric models for targeted, delayed and untargeted ultraviolet mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *International Journal of Molecular Biology: Open Access*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 1-15.

31. Гребнева Е.А. Теория тепловой релаксации энергии возбуждения водородных связей в ДНК. Ее вклад в ультрафиолетовый мутагенез. Saarbrucken, Germany. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2019, 345 с. [Grebneva E.A. *Theory of thermal relaxation of the excitation energy of hydrogen bonds in DNA. Its contribution to ultraviolet mutagenesis*. Saarbrucken, Germany. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2019, 345 p. (In Russ.)].

32. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model for untargeted delayed base substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in some rare tautomeric forms. *Journal of Oncology Research*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 24-37.

33. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric models for *A-rule* during error-prone and SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers or thymines and adenines in some rare tautomeric forms. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 2019, vol. 14, pp. 51-68.

34. Grebneva H.A. 2020. Polymerase-tautomeric cancer risk model: the formation of 100% mutations is due to exposure to mutagens. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 2020, vol. 15, pp. 13-28.

35. Гребнева Е.А. Метод предсказания относительных вероятностей образования *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров и редких таутомерных форм оснований ДНК на любых сайтах двунитевой ДНК. *Физика*

- и техника высоких давлений, 2021, т. 31, № 3, с. 88-103 [Grebneva H.A. Method for calculating the relative probabilities of the formation of *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers and rare tautomeric forms of DNA bases at any sites of double-stranded DNA. *Fizika and Tekhnika Visokih Davleniy*, 2021, vol. 31, no. 3, pp. 88-103 (In Russ.)].
36. Гребнева Е.А. Процент мутаций, образующихся под воздействием мутагенов. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 1, с. 101-113. [Grebneva E.A. The percentage of mutations that are formed under the influence of mutagens. *Fizika and Tekhnika Visokih Davleniy*, 2022, vol. 32, no. 1, pp. 101-113 (In Russ.)].
37. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель риска образования злокачественных опухолей. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 4, с. 99-104 [Grebneva E.A. Polymerase-tautomeric model of the risk of malignant tumor formation. *Fizika and Tekhnika Visokih Davleniy*, 2022, vol. 32, no. 4, pp. 99-104 (In Russ.)].
38. Гребнева Е.А. Модель образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза на участке двухцепочечной ДНК *supF* гена. *Физика и техника высоких давлений*, 2023, т. 33, № 2, с. 101-111. [Grebneva E.A. A model for the formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis in the double-stranded DNA region of the *supF* gene. *Fizika and Tekhnika Visokih Davleniy*, 2023, vol. 33, no. 2, pp. 101-111 (In Russ.)].
39. Watson J.D., Crick F.H.C. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1953, vol. 18, pp. 123-131.
40. Hauswirth W., Daniels M. Excited states of the nucleic acids: polymeric forms. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, 1976, vol. 1, pp. 109-167.
41. Galley W.C. On the triplet states of polynucleotide-acridine complexes. I. triplet energy delocalization in the 9-aminiaacridine-DNA complex. *Biopolymers*, 1968, vol. 6, pp. 1279-1296.
42. Rahn R., Shulman R., Longworth J. Phosphorescence and electron-spin resonance studies of the UV-excited triplet state of DNA. *The Journal of Chemical Physics*, 1966, vol. 45, pp. 2955-2965.
43. Векшин Н.Л. *Фотоника биологических структур*. Пушchino: Институт биологической физики АН СССР, 1988, 51 с. [Vekshin N.L. *Photonics of biological structures*. Pushchino: Institute of Biological Physics of the Academy of Sciences of the USSR, 1988, 51 p. (In Russ.)].
44. Векшин Н.Л. *Перенос возбуждения в макромолекулах*. Итоги науки и техники. Серия Радиационная химия. Фотохимия, т. 7. М.: ВИНТИ, 1989, 164 с. [Vekshin N.L. *Transfer of excitation in macromolecules*. Results of science and technology. Series Radiation Chemistry. Photochemistry, vol. 7. M.: VINITI, 1989, 164 p. (In Russ.)].
45. Lamola A.A., Gamane T. Sensitized photodimerization of thymine in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1967, vol. 58, no. 2, pp. 443-446.
46. Novak M.J., Lapinski L., Kwiatkowski J.S., Leszczynski J. Molecular structure and infrared spectra of the DNA bases and their derivatives: theory and experiment. *Computational chemistry: reviews of current trends*. J. Leszczynski Ed., Wold Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, River Edge, NJ, 1997, vol. 2, pp. 140-182.
47. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. *DNA repair and mutagenesis*. Washington: ASM Press, DC 1995.
48. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. *DNA repair and mutagenesis*. part 3. ASM Press, 2006.
49. Lockshin R.A., Zakeri Z. (eds.). *When cells die II: A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*. John Wiley & Sons, 2004, 572 p.

INTERPRETATION OF HOT SPOTS OF ULTRAVIOLET MUTAGENESIS FORMED ON A LAGGING STRAND OF DOUBLE-STRANDED DNA OF THE *supF* GENE

Grebneva H.A.

Donetsk Institute of Physics and Technology named after A.A. Galkina
R. Luxembourg st., 72, Donetsk, 83114, Russia, e-mail: grebneva@gmail.com

Received 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjpc.2023.0598

Abstract. At present, the mechanism of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis is not clear. I developed a polymerase-tautomeric model of the mechanism of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis and showed that the probability of mutation formation depends on the processes of propagation of excitation energy along the DNA molecule. In my proposed polymerase-tautomeric model of ultraviolet mutagenesis, it was shown that mutations are formed opposite only those *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers, one or both of which are in rare tautomeric forms. In the polymerase-tautomeric model of the mechanism of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis, I have shown that the hot spots of ultraviolet mutagenesis are those *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers to which the most excitation energy is transferred. In a number of works, I calculated the relative probabilities of mutations formed opposite the DNA bases that are part of the *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers that appeared upon irradiation of double-stranded DNA of the *supF* gene. In this article, based on the results of previous calculations, I interpret experimental data in which hot spots of ultraviolet mutagenesis are DNA regions consisting of three or more pyrimidine DNA bases arranged in a row.

Key words: UV mutagenesis, rare tautomeric forms of DNA bases, *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers, hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis, excitation energy transfer along the DNA molecule, singlet levels of DNA bases, triplet levels of DNA bases.

ДЕКОМПОЗИЦИЯ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS* NORTH. GEITL.

Чернышев Д.Н.¹, Ключкова В.С.¹, Лелеков А.С.², Серяк Е.С.¹

¹ Севастопольский государственный университет

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

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

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

Поступила в редакцию 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbps.2023.0599

Аннотация. В работе проведено описание спектров поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* математическими моделями каротиноидов и хлорофиллов в области от 400 до 700 нм. Полученные значения концентрации пигментов хорошо согласуются со стандартными методами. Модель спектра поглощения ацетонового экстракта *A. platensis* может быть использована для определения концентрации хлорофилла *a* и каротиноидов без применения методов хроматографии. Показано отсутствие вклада хлорофилла *b* в суммарный спектр поглощения. Реализован метод математического разделения спектра поглощения ацетонового экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения.

Ключевые слова: кривые Гаусса, спирулина, каротиноиды, хлорофилл *a*, аппроксимация, ацетоновый экстракт, спектры поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Методы измерения концентрации пигментов микроводорослей и разделения их смеси представляют собой методически трудную задачу в практическом и теоретическом плане. При работе с интенсивными культурами микроводорослей необходимо использовать такие методы, которые позволяют определять концентрацию пигментов за достаточно короткое время. В большинстве исследований оценка концентрации выделенных пигментов определяется спектрофотометрическим методом. Стандартная биохимическая методика [1] предполагает экстракцию фотосинтетических пигментов микроводорослей каким-либо полярным растворителем, центрифугирование и спектрофотометрирование образцов с последующим расчётом содержания пигментов по известным экстинкциям. Однако такой подход позволяет оценить только те пигменты микроводорослей, максимумы поглощения которых не перекрываются, что делает невозможным разделение каротиноидов. Для решения этой проблемы используют методы тонкослойной, жидкостной хроматографии, которые требуют специализированного оборудования и длительной пробоподготовки.

Один из простых способов разделения и идентификации пигментов микроводорослей — это декомпозиция спектра ацетонового экстракта математическими моделями. Спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием субъединиц (хромофорных групп). Такие группы имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволило количественно описать зависимость поглощения хлорофиллов и каротиноидов от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан [2,3]. В предыдущей работе [4], предложено использовать кривые Гаусса для описания поглощения каждого пигмента. Каждый отдельный пик был описан выражением:

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

где $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед; D_{\max} – амплитуда пика, отн. ед; λ_i – длина волны, нм; λ_{\max} – положение максимума пика, нм; σ – полуширина пика, нм.

В настоящей работе было выполнено разделение и анализ накладывающихся полос пигментов в спектре поглощения экстракта методом аппроксимации с использованием табличного процессора MS Excel при реализации надстройки «Поиск решения». При этом оптимизировалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений стремились к нулю, поиск решения проводился методом общего понижающего градиента (ОПГ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась на базе кафедры «Физика» СевГУ (г. Севастополь). Объектом исследования являлась спирулина *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl., полученная из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция гидробионтов Мирового океана». Выращивание проводилось в фотобиореакторе объёмом 1 л на среде Заррук [5] (для приготовления среды использовалась дистиллированная вода) методом накопительной культуры. В качестве источника освещения применялась

световая решётка из люминесцентных ламп Philips Daylight 54-765. Средняя освещённость рабочей поверхности составляла 5 клк. Барботаж: 0,5 л воздуха на литр культуры в минуту.

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [1,6]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре Unicо 4802, в диапазоне от 400 до 800 нм, в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными каротиноидами *A. platensis* являются бета-каротин, зеаксантин и миксоксантофилл, представленные в процентах от общих каротиноидов в отношении 35 %, 31 %, 24 % [7]. В модели Куппера [2] бета-каротин и зеаксантин имеют сходные спектры поглощения, разделить их математически невозможно, поэтому целесообразно использовать только одну модель, которая описывает сумму бета-каротина и зеаксантина. Кроме того, в ацетоновом экстракте спирулины в небольшом количестве содержится эхинонен, криптоксантин [7] и феофитин. На начальном этапе моделирования в общую модель, описывающую спектр поглощения ацетонового экстракта, были включены следующие модели пигментов – хлорофилл *a*, феофитин, бета-каротин (=зеаксантин), миксоксантофилл, эхинонен и криптоксантин. Оказалось, что рассчитанные концентрации феофитина, эхинонена и криптоксантина – незначительные и стремятся к нулю. Поэтому в окончательную модель спектра вошли только хлорофилл *a*, бета-каротин (=зеаксантин) и миксоксантофилл. Отметим, что единицами измерения концентрации методом GPS [2] является мкмоль/л.

Реализован метод математического разделения спектра поглощения ацетонового экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения. Спектр поглощения экстракта приближали с помощью математической модели, в которой неизвестными параметрами являются концентрации хлорофилла *a*, зеаксантина, миксоксантофилла. Было проведено описание спектров поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *A. platensis* алгебраической суммой гауссиан в области от 400 до 750 нм. Полученные значения концентрации пигментов хорошо согласуются со стандартными методами [1,6] (расчет по точкам D_{480} и D_{662}).

На рисунке 1 представлен пример декомпозиции спектра поглощения ацетонового экстракта спирулины. Всего было обработано 24 спектра, коэффициент детерминации R^2 составлял от 0,996 до 0,999, что говорит о высокой точности предлагаемой модели. Среди каротиноидов во всех экстрактах преобладала смесь бета-каротина и зеаксантина.

Получены парные значения ($n = 25$) концентраций хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов, вычисленные разными методами (рис. 2). Коэффициент корреляции составил 0,9968 для хлорофилла *a*, 0,9976 для суммы каротиноидов, что свидетельствует о высокой связи между значениями концентраций, рассчитанных разными методами.

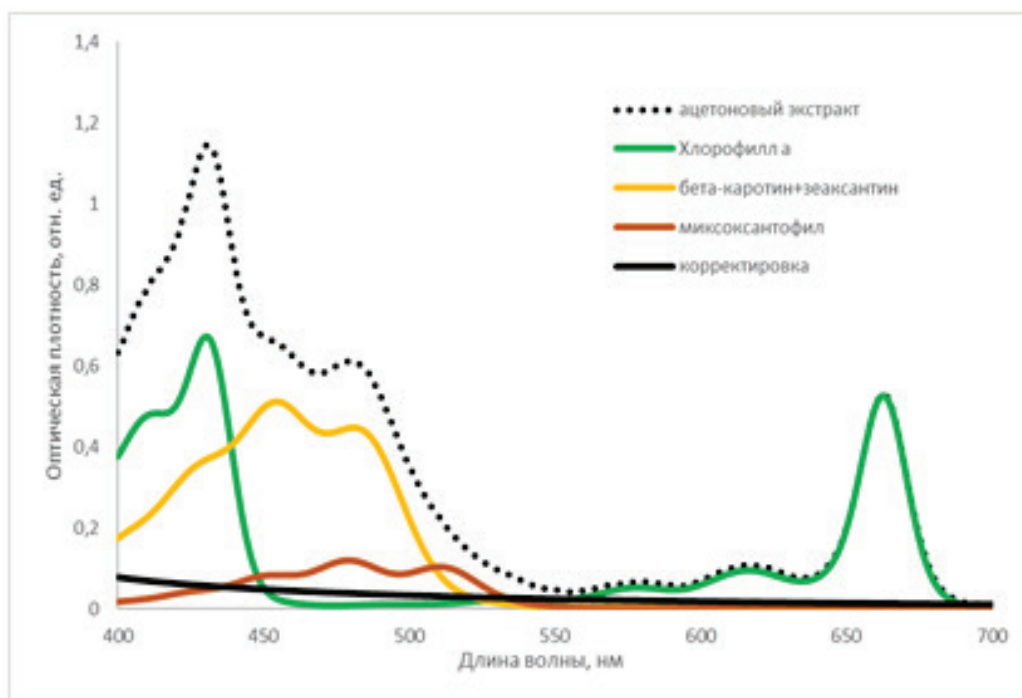


Рисунок 1. Пример разделения спектра поглощения ацетонового экстракта *A. platensis* методом GPS

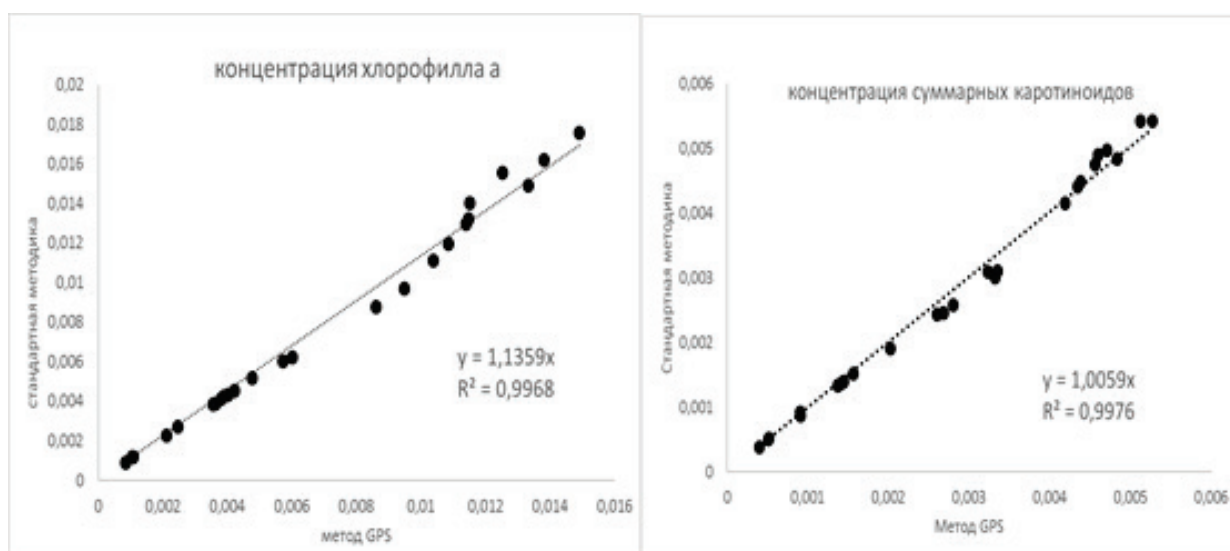


Рисунок 2. Зависимость между результатами (г/л), полученными стандартным методом и методом кривых Гаусса (GPS)

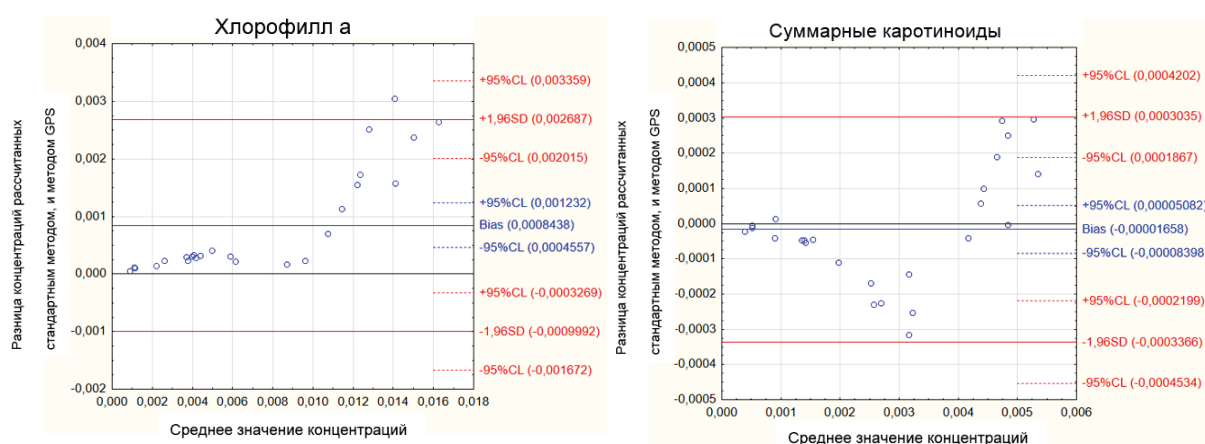


Рисунок 3. Диаграммы Блэнда-Алтмана, сравнения значений концентраций (г/л), рассчитанных по стандартной методике и методом GPS

При сравнении значений концентрации, полученных различными методами, был применен метод Блэнда-Алтмана [8] (рис. 3). Было установлено, что все концентрации хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов находятся в пределах двух стандартных отклонений разности концентраций, что говорит о согласованности измерений, полученных разными способами. Средняя разность методов с 95 % доверительным интервалом для хлорофилла *a* составила 0,0008438 [0,0004557; 0,001232], суммарных каротиноидов 0,00001658 [-0,00008398; 0,00005082]. В предложенном способе расчета в табличном процессоре все характеристики модели могут быть изменены (коэффициенты экстинкции, характеристики отдельных пиков).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что многими исследователями отмечается наличие хлорофилла *b* в клетках спирулины [9], результаты моделирования свидетельствуют об отсутствии вклада данного пигмента в суммарный спектр поглощения. При добавлении в общую модель спектра хлорофилла *b* его расчётная концентрация стремится к нулю. Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Так же реализация данного метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр. Используя данный метод можно увидеть, что в точке спектра 662 вклад вносит только хлорофилл *a*, а в точке 480 только каротиноиды.

Авторы готовы выслать файл для автоматизации расчета в программе Microsoft Excel на электронную почту всем заинтересованным лицам.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ, № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, 1997, 661 p.
2. 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.
3. Barsanti L. et al. Absorption microspectroscopy, theory and applications in the case of the photosynthetic compartment. *Micron.*, 2007, vol. 38, no. 3, pp. 197-213.
4. Чернышев Д.Н., Клочкова В.С. Разделение нативного спектра поглощения культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 217-221 [Chernyshev D.N., Klochkova V.S. Separation of the native absorption spectrum of *Arthrospira (Spirulina) platensis* culture. *Actual Questions of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 217-221 (In Russ.)].
5. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée*. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D these, 1966, 114 p.
6. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли суммарных каротиноидов в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North*. Geitl.: учебно-методическое пособие. РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, Севастополь, 2017, 12 с. [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North*. Geitl.: training manual. RAS, Institute of Marine Biological Research. A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 12 с. (In Russ.)].
7. Aakermann T. et al. A comparison of the carotenoids of strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria). *Biochemical systematics and ecology*, 1992, vol. 20, no. 8, pp. 761-769.
8. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International journal of nursing studies*, 2010, vol. 47, no. 8, pp. 931-936.
9. Piovan A., Battaglia J., Filippini R. et al. Pre- and early post-treatment with *Arthrospira platensis (Spirulina)* extract impedes lipopolysaccharide-triggered neuroinflammation in microglia. *Front. Pharmacol*, 2021, vol. 12, doi: 10.3389/fphar.2021.724993.

**DECOMPOSITION OF THE ABSORPTION SPECTRUM ACETONE EXTRACT OF MICROALGAE
ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS NORTH. GEITL.
Chernyshev D.N.¹, Klochkova V.S.¹, Lelekov A.S.², Seryak E.S.¹**

¹ Sevastopol State University

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

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

Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia

Received 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0599

Abstract. We have described the absorption spectra of acetone extract of the microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis* by mathematical models of carotenoids and chlorophylls in the range from 400 to 700 nm. The obtained values of pigment concentrations agree well with standard methods. A model of the absorption spectrum of acetone extract of *A. platensis* can be used to determine the concentration of chlorophyll a and carotenoids. The absence of chlorophyll b contribution to the total absorption spectrum was shown. The method of mathematical separation of acetone extract absorption spectrum in Microsoft Excel program was implemented. Calculations performing approximations of pigment concentrations by minimizing the sum of squares of deviations between the true absorption spectrum and its mathematical model have been performed using the spreadsheet processor with the help of the solution search tool.

Key words: gaussian curves, spirulina, carotenoids, chlorophyll a, approximation, acetone extract, absorption spectra.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРА / МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Рощина В.В.¹, Куньев А.Р.¹, Фатерыга В.В.², Шовкун М.М.³

¹ Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

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

² Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского-природный заповедник РАН, филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
с. Курортное, г. Феодосия, 298188, РФ

³ Приокско-Террасный государственный природный биосферный заповедник
Данки, Серпуховский городской округ, Московская обл., 142200, РФ
Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0600

Аннотация. С помощью микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург) получены спектры флуоресценции и поглощения интактных клеток растений можжевельника высокого *Juniperus excelsa*, зопника клубненосного *Phlomis tuberosa*. белокопытника ложного *Petasites spurius*, василька шероховатого *Centaurea scabiosa* и купыря лесного *Anthriscus sylvestris*. Полученные спектры собственной флуоресценции и поглощения дали возможность тестировать состав соединений снаружи клеточной стенки. Эта аппаратура позволила обнаружить на поверхности интактных клеток присутствие секретов, включающих вторичные метаболиты с максимумами флуоресценции в области 530-550 нм, характерными для фенольных соединений. В спектрах поглощения листьев обнаружены максимумы в области 580-620 нм, что свойственно голубым пигментам азуленам. Присутствие азуленов на поверхности клеток подтверждено кратковременной экстракцией этих пигментов этанолом или ацетоном. Подобный методический подход рекомендован для экспресс-анализа интактных поверхностей растительных клеток.

Ключевые слова: азулены, поглощение, секреторные продукты, фенолы. флуоресценция, экскреты.

Памяти Валерия Николаевича Карнаухова

ВВЕДЕНИЕ

Изучение поверхности растений до сих пор не являлось отдельной задачей биофизических работ. Между тем, это важно для понимания механизмов защиты растительной клетки, поскольку на ее поверхности могут присутствовать, а также выделяться в виде экскретов разнообразные соединения. Эта проблема могла быть рассмотрена с применением техники микроспектрофлуориметрии и микроспектрофотометрии [1,2]. Задачей нашей работы было изучить с помощью такой аппаратуры поверхность клеток различных видов. Основное внимание предполагалось сосредоточить на объектах, обладающих серебристой или голубой окраской и у которых могли быть голубые пигменты азулены, что ранее связывали с устойчивостью к озону [3].

МЕТОДЫ

Объекты. В качестве объектов исследований были выбраны виды охраняемых и/или лекарственных растений: листья и шишкоягоды можжевельника высокого *Juniperus excelsa* Vieb. (сем. Cupressaceae) из Карадагского заповедника (собраны в октябре 2022 г.), Феодосия, Крым, листья купыря лесного *Anthriscus sylvestris* Hoffm. (сем. Umbelliferae), собранные в мае-июне 2022-2023 годов в государственном заказнике “Степной” г.Пущино, и произрастающих также в Приокско-Террасном заповеднике, в том числе из списка растений Красной книги Подмосковья, зопника клубненосного *Phlomis tuberosa* L. (сем. Labiatae), белокопытника ложного *Petasites spurius* (Reitz.) Reichenb. (сем. Asteraceae), василька шероховатого *Centaurea scabiosa* L. (сем. Asteraceae) L. Общий вид исследованных поверхностей представлен на рис.1. Для сравнения были выбраны и растения, известные присутствием азуленов [4], полынь горькая *Artemisia absinthium* L. и тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L. (сем. Asteraceae).

Спектральные методы. Поглощение и собственную флуоресценцию клеток измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью микроспектрофотометра/ микроспектрофлуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Спектры поглощения наших объектов представлены как первая производная кривых по Золотареву [5]. Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, и микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (США). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95 % этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 10 мин согласно работе [3]) в 1- 0,5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью вышеупомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра. с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США).



Рисунок 1. Общий вид поверхностей объектов с серебристой и голубой окраской.

- (а) – хвоя и шишкоягоды можжевельника высокого в сентябре-октябре,
 (б) и (в) – листья белокопытника ложного и зопника клубненосного в мае,
 (г) – листья купыря лесного в мае, (д) – листья василька шероховатого в мае-июне

Экстракция и хроматография азуленов. Для обнаружения азуленов получали экстракты-смывы с интактной поверхности 100% ацетоном или 95 % этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение 10 мин) [3]. Экстракты хроматографировали на бумаге Ватман № 1 без или после пропитки вазелином или на тонкослойных силикагелевых пластинах Силуфола, как это было описано ранее для пыльцы ряда семенных растений и микроспор хвоща полевого [3]. Были зарегистрированы их спектры поглощения и флуоресценции для сравнения с данными, полученными на интактных клетках. Средняя погрешность эксперимента в три-четыре повторения была рассчитана для каждого варианта и контроля соответственно. Концентрацию азуленов (A , в молях, молекулярная масса азулена 128,18) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

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

где D_{580} – оптическая плотность при 580 нм; ϵ – молярный коэффициент экстинкции $328 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; l – толщина слоя жидкости в кювете.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала, а также может быть защитным барьером, если она включает в себя соответствующие компоненты, защищающие клетку от любых повреждений. С помощью микроскопии проходящего света и флуоресцентной микроскопии, включая также микроспектрофлуориметрию и микроспектрофотометрию, исследовали поверхность наших видов, получив их фотографические изображения, спектры флуоресценции и поглощения.

Как видно на рисунке 1, эти образцы имели голубоватый и синий цвет, что предполагает присутствие синих пигментов – сесквитерпеновых лактонов, таких как азулены. Окраска не принадлежала антоциану, потому что она не изменялась при сдвигах pH, когда мы действовали кислотой или щелочью.

В проходящем свете люминесцентного микроскопа исследуемые поверхности выглядели как темно- или светло-зеленая картинка, но при возбуждении зеленым или синим светом клетки флуоресцировали. Изображения различались в зависимости от наличия секрета (смолы) или его отсутствия, как например у можжевельника (рис. 2). Если поверхность хвои была свободна от смолы (а), она флуоресцировала неярким зеленым светом. Напротив, секрет, выделяемый на поверхность хвои (з), светится ярко зелено-желтым или синим цветом при возбуждении светом 430 нм (1) или 360-380 нм (2), соответственно. Кристаллы смолы флуоресцировали подобно жидким секретам (з). Поверхность без секрета светила в зеленой области с максимумом 530 нм при возбуждении 430 нм, что свойственно некоторым флавоноидам [6]. Жидкий и кристаллический секреты в этих условиях имели более высокую интенсивность свечения в максимуме 540-550 нм (рис. 1д). При этом небольшой максимум 680 нм указывал на свечение хлорофилла. Возбуждение ультрафиолетовым светом 360-380 нм в варианте без секрета не приводило к свечению в синей области спектра, однако сам секрет люминесцировал с заметной интенсивностью (рис. 2г, 2; рис. 2 д, 2). Более того, в спектре флуоресценции секрета отмечали максимумы 480-490, 560 и 600 нм, что могло относиться соответственно к смеси различных фенолов с терпеноидами или свечению флавоноидов типа рутин [6].

Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометре существует вариант дифференцирования для идентификации максимумов в спектрах поглощения [5]. Первая производная спектра внешнего отражения для полос низкой интенсивности позволяет непосредственно определить положение максимума полосы поглощения (рис. 2).

На рисунке 2 приведен пример спектров поглощения для вечнозеленого вида можжевельника высокого. У него в спектрах поглощения поверхностей хвои и шишкоягод (верхние участки графиков) отчетливо видны максимумы в области 580-615 нм, свойственные азуленам. Верхние участки спектров поглощения дают информацию о составе компонентов поверхности, в дальнейшем будем рассматривать именно их. Так в спектрах

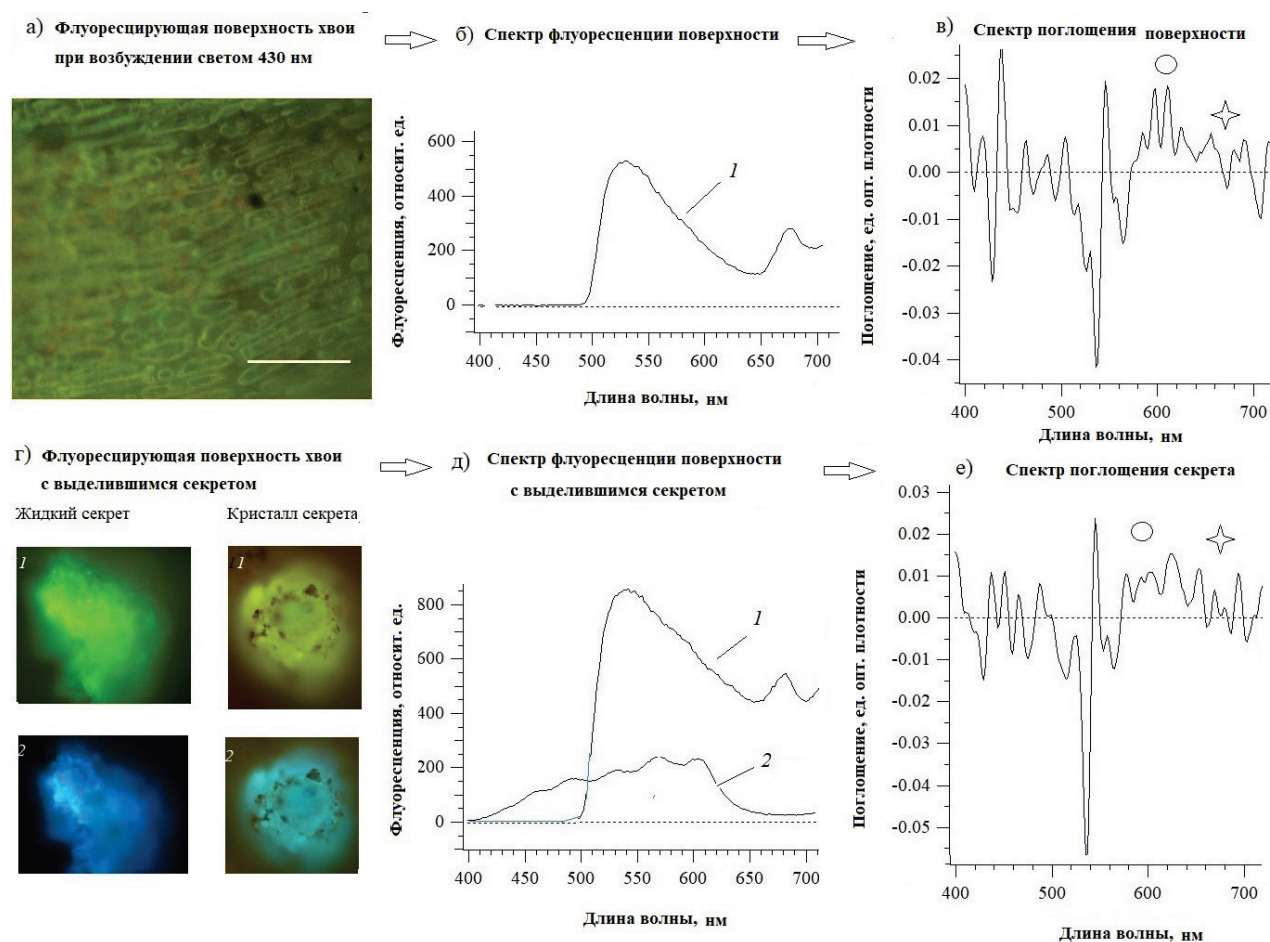


Рисунок 2. Анализ спектральных характеристик поверхности образцов на примере хвои можжевельника высокого. (а) – вид флуоресцирующей поверхности без секрета и (г) с выделившимся жидким и кристаллизованным секретом под люминесцентным микроскопом, где общий масштаб 100 мкм; (б) спектры собственной флуоресценции при возбуждении светом 430 нм (1) или 360-380 нм (2). (в) и (е) – спектры поглощения по методу Золотарева [5], где круги – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимумы 660-666 нм, относящиеся к хлорофиллу

поглощения можжевельника (рис. 2в, рис. 2е) видны максимумы в области 580-615 нм, свойственные азуленам, и 660-666 нм, характерные для хлорофилла [3].

Для тестирования присутствия азуленов на поверхности других исследованных видов изучали спектры поглощения также, как и у можжевельника высокого (рис. 3). Заметим, что у данных растений серебристая или голубая окраска может исчезать после мая-июня, когда она наиболее заметна. Максимумы в области 580-620 нм обнаружены у всех исследованных травянистых видов. Есть различия в спектрах нижней и верхней поверхностей листьев. Мы сравнили данные с такими растениями, как полынь горькая и тысячелистник обыкновенный, где установлено присутствие азуленов в продуктах их дистилляции как фармакологического сырья [4]. Для нашей аппаратуры значимыми считаются максимумы порядка 0,05 единиц оптической плотности, как у полыни горькой. Видно, что максимумов в исследуемой области может быть несколько, что, по-видимому, характерно для различных по структуре голубых пигментов [4]. Максимальная интенсивность в этой области отмечена для полыни горькой – около 0,3 единиц оптической плотности, что хорошо согласуется с известным литературным источником [4], опирающимся на исследования содержания азуленов в продуктах дистилляции этого вида. Значимые интенсивности максимумов в области азуленов (равны или больше 0,05 единиц оптической плотности) обнаружены у всех исследованных растений, причем иногда они больше, чем максимумы хлорофилла, находящегося уже внутри клеток. Видимо, заметное количество синих пигментов находится на поверхности клеточной стенки, например в кутикуле.

Для подтверждения данных о присутствии азуленов на поверхности клеток, полученных спектральным методом, были сделаны их определения в экстрактах-смывах этанолом и ацетоном с интактной поверхности листьев в кратковременной 10 минутной экстракции. Как показано в таблице 1, наибольшее количество азуленов свойственно зопнику клубненосному, что согласуется с его синеватой окраской на снимке интактных листьев (рис. 1). В меньшем количестве данные пигменты видны и у белокопытника ложного (возможно связано с опушением и большой сочностью-оводненностью листьев). По данным таблицы 1, в хвое можжевельника высокая концентрация азуленов выше, чем в шишко-ягодах при расчете на 1 г свежей массы. Шишкоягоды, собираемые в осенне-зимний период, содержат больше влаги, чем хвоя. Если сравнить с данными, полученными ранее для древесных растений [3,7], то количество азуленов у можжевельника высокого значительно выше, чем у таких хвойных серебристых видов, как кедр атласский, серебристая ель, сосна мелкоцветковая, но близко к их содержанию на поверхности у эвкалипта пепельного, облепихи крушиновидной, лоха серебристого [7]. Однако у травянистых растений, таких как клевер луговой и клевер белый с постоянной синеватой окраской листьев

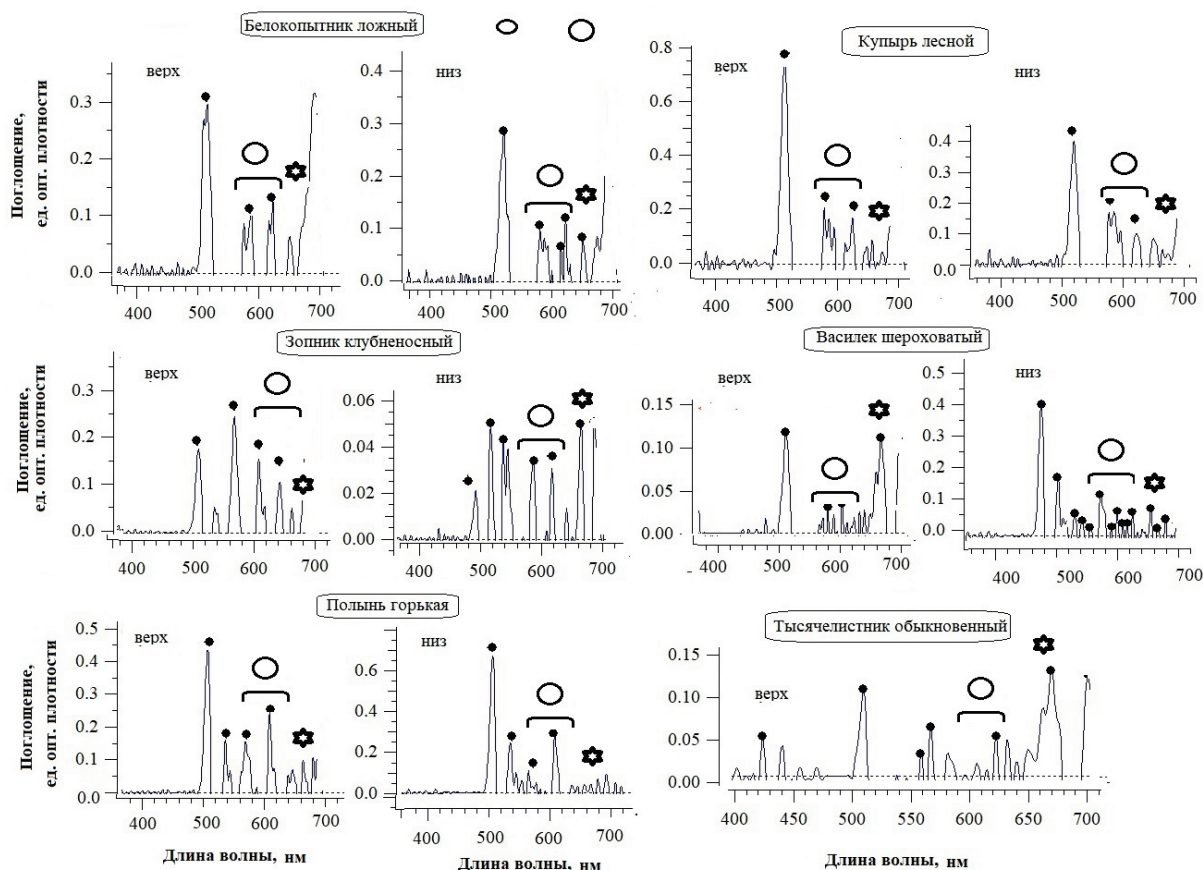


Рисунок 3. Спектры поглощения поверхностей травянистых растений. Кружки– максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимумы 660-666 нм, характерные для хлорофилла

Таблица 1. Присутствие азуленов в 10 минутных экстрактах -смывах ряда растений

Вид растения	Часть растения	Азулены, мг/г сырой массы
Белокопытник ложный	Лист	0,367±0,11
Зопник клубненосный	Лист	6,45 ±0,20
Можжевельник высокий	Хвоя	1,76±0,30
Можжевельник высокий	Шишкочагоды	1,46±0,20

количество азуленов близко к тому, что наблюдается у белокопытника ложного [7]. Отметим, что голубая окраска видна лишь в мае-июне у исследованных травянистых видов зопника клубненосного и белокопытника ложного, а позднее она исчезает, поскольку интенсивность ультрафиолетовой радиации ослабевает к этому времени.

Использованная аппаратура позволила судить о присутствии голубых пигментов азуленов на поверхности у ряда растений не только с видимой серебристой или голубой окраской как у можжевельника, но и у объектов, где такая окраска видна, в основном, в весенний сезон. В отличие от использованных травянистых видов у можжевельника высокого голубая окраска хвои постоянна, что определяется высоким уровнем ультрафиолетовой радиации в горной местности Крымского заповедника. Полагают, что азулены представляют собой оптический фильтр для ультрафиолета и озона [3,7]. Тест на присутствие азуленов может быть полезен в экологическом мониторинге, поскольку в определенной мере характеризует устойчивость вида к озону и повышенной ультрафиолетовой инсоляции.

Азулены растений известны как сильные антиоксиданты, их применение описано подробно в фармацевтике и медицине, а также в аналитических технологиях [8,9]. Использование в данной работе микроспектрофлуориметра/микроспектрофотометра позволяет тестировать присутствие азуленов у растений, чтобы предварительно оценить потенциал перспективных видов как фармакологического сырья, поскольку лечебное действие азуленов довольно хорошо известно [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектральные методы, такие как микроспектрофлуориметрия и микроспектрофотометрия, позволяют изучать клеточные поверхности растений и анализировать возможные компоненты из собранного в минимальных количествах материала. Особенно это важно для растений, произрастающих в заповедниках и охраняемых заказниках, где встречаются краснокнижные растения. Флуоресценция в видимой области спектра часто выявляет присутствие секреторных продуктов, экскретируемых на поверхность из клетки и содержащих защитные соединения, такие как фенолы и терпеноиды. Спектральные методы предварительного тестирования на наличие азуленов по спектрам поглощения могут быть рекомендованы в лабораторной практике и не требуют большого количества материала для анализа. Они могут быть применены для оценки устойчивости к негативному воздействию окружающей среды (УФ-облучение, озон и т.д.) и качества видов, перспективных в качестве фармакологического сырья.

Список литературы / References:

1. Karnaukhov V.N., Yashin V.A., Kulakov V.I., Vershinin V.M., Dudarev V.V. Apparatus for investigation of fluorescence characteristics of microscopic objects. *USA Patent*, 1982, vol. 354, no. 4, iss. 114, pp. 1-14.
2. Karnaukhova N.A., Sergievich L.A., Karnaukhov V.N. Application of microspectral analysis to study intracellular metabolism in single cells and cell systems. *Natural Science*, 2010, vol. 2, no. 5, pp. 444-449
3. Рощина В.В., Яшин В.А., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62, doi: 10.1134/S1990747822010081 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuniyev A.R., Soltani G.A., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biological Membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62 (In Russ.)].
4. Коновалов Д.А. Природные азулены. *Растительные ресурсы*, 1995, т. 31, № 1, с.101-130 [Konovalov D.A. Natural azulenes. *Plant Resources*, 1995, vol. 31, no. 1, pp.101-130 (In Russ.)].
5. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и Спектроскопия*, 2012, т. 112, № 1, с. 150-154 [Zolotarev V.M. Application of differentiation in reflection spectroscopy. *Optics and Spectroscopy*, 2012, vol. 112, no. 1, pp. 150-154 (In Russ.)].
6. Roshchina V.V. *Fluorescing World of Plant Secreting Cells*. Enfield, Jersey, Plymouth: Science Publisher, 2008, 338 p.
7. Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 36-39, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0480 [Roshchina V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. Azulenes of the leaf surface as a protective optical filter. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 36-39 (In Russ.)].
8. Bakun P., Czarzynska-Goslinska, B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med Chem Res*, 2021, vol. 30, pp. 834-846, doi: 10.1007/s00044-021-02701-0.

9. Murfin L.C., Lewis S.E. Azulene - a Bright core fore sensing and imaging. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 2, pp. 353-362, doi: 10.3390/molecules26020353.

APPLICATION OF MICROSPECTROFLUORIMETER/MICROSPECTROPHOTOMETER FOR THE STUDY OF THE SURFACE OF PLANT CELLS

Roshchina V.V.¹, Kunyev A.R.¹, Fateryga V.V.², Shovkun M.M.³

¹ Institute of Cell Biophysics RAS, FIC PNBC RAS

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

² Karadag Research Station T.I. Vyazemsky named -Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences, Branch of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences

Kurortnoye, Feodosia, 298188, Russia

³ Prioksko-Terrasny State Nature Biosphere Reserve

Danki, Serpukhov City District, Moscow Region, 142200, Russia

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0600

Abstract. The fluorescence and absorbance spectra of intact plant leaf cells from juniper *Juniperus excelsa*, Jerusalem-sage *Phlomis tuberosa*, butterbur *Petasites spurius*, centaury *Centaurea scabiosa* and wild chervil *Anthriscus sylvestris* have been obtained using the microspectrofluorimeter/microspectrophotometer MSF-15 (LOMO, St. Petersburg). The obtained spectra of autofluorescence and absorbance made it possible to test the composition of compounds outside the cell wall. This tool is able to detect the presence of secretions on the surface of intact cells, including secondary metabolites with the fluorescence maxima in the region of 530-550 nm, characteristic of phenolic compounds. In the absorbance spectra of leaves, maxima were found in the region of 580-620 nm, which is peculiar to blue pigments azulenes. The presence of azulenes on the surface of cells has been confirmed by short-term extraction of these pigments with ethanol or acetone. Similar methodical approach has been recommended for rapid analysis of intact surfaces of plant cells.

Key words: *absorbance, azulenes, fluorescence, phenols, secretory products, spectra.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНГИБИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ГИПОМАГНИТНОГО ПОЛЯ И КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА (АФК) НЕЙТРОФИЛАМИ

Новиков В.В.¹, Яблокова Е.В.¹, Шаев И.А.¹, Новикова Н.И.², Фесенко Е.Е.¹

¹ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290. РФ; e-mail: docmag@mail.ru

² Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
просп. Науки, 6, г. Пушкино, 142290, РФ

Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbps.2023.0601

Аннотация. В работе показано, что снижение фоновой продукции активных форм кислорода (АФК) в перитонеальных нейтрофилах мышей после кратковременного (40 минут) пребывания в гипوماгнитных условиях (остаточное поле ~ 10 нТл) при физиологических температурах, выявляемое методом люцигенин-зависимой хемиллюминесценции, не сопровождается нарушением хемиллюминесцентного ответа на активаторы респираторного взрыва: формилированный пептид N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) и форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА). Эти результаты получены методами активированной хемиллюминесценции с использованием люцигенина и люминола и различных комбинаций применения активаторов продукции АФК (ФМА и/или fMLF). В отличие от этого, действие комбинированных параллельных постоянного (индукция 60 мкТл) и переменного (диапазон амплитуд 60-180 нТл, частота 49,5 Гц) магнитных полей (КМП) приводит к снижению хемиллюминесцентного ответа на эти активаторы. Эти данные свидетельствуют о различных источниках АФК, реагирующих на действия определенных режимов КМП и гипوماгнитного поля в нейтрофилах. Проведенное исследование, в совокупности с ранее полученными результатами, позволяет исключить системы, контролируемые респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на кратковременную депривацию магнитного поля.

Ключевые слова: гипوماгнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, люминол, хемиллюминесценция.

Ранее мы показали, что в результате пребывания нейтрофилов в ослабленном (в ~ 2500 раз) с помощью системы магнитных экранов геомагнитном поле (ГМП) фоновая продукция активных форм кислорода (АФК) в них существенно снижалась [1]. Эти результаты были получены методами флуоресцентной спектроскопии с использованием проникающих в клетку флуоресцентных зондов (дихлордигидрофлуоресцеина-диацетата и дигидрорадамина 123), а также методом хемиллюминесцентного анализа с использованием люцигенина [2], активатора хемиллюминесценции, относительно селективного для супероксидного радикала [3]. При добавке малых концентраций (<1 мкМ) активаторов респираторного взрыва, формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата, в случае детекции флуоресцентным методом этот эффект гипوماгнитного поля (гипоМП) сохранялся, но по величине соответствовал эффектам, полученным в опытах без этих активаторов [1]. На основании этих результатов было сложно сделать однозначные выводы об основных источниках АФК, реагирующих на изменение этих магнитных условий. Далее с использованием ингибиторного анализа в опытах на неактивированных нейтрофилах мы показали, что добавка динитрофенола - разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях практически полностью нивелирует различия в продукции АФК между контрольными (ГМП) и опытными (гипоМП) группами, в отличие от дифенилйодония – неспецифического ингибитора НАДФН-оксидазы, добавка которого приводила к снижению продукции АФК в обоих случаях и сохранению различий между контролем и опытом [2]. Также на величину эффекта гипоМП влияла добавка ротенона (ингибитора 1 комплекса ЭТС в митохондриях) [4]. Все эти результаты в большей степени свидетельствовали о роли митохондрий, а не НАДФН – оксидазы в эффектах ослабленного ГМП.

Комбинированные постоянные и переменные магнитные поля (КМП), напротив, вызывают в основном стимулирующие эффекты на продукцию АФК в нейтрофилах, что было отмечено многими авторами [5-8]. Однако обнаружены определенные режимы (например: ПМП 60 мкТл, ПеМП 60-180 нТл, частота 49,5 Гц), вызывающие ингибирующий эффект [9]. В случае КМП ингибирующий эффект проявляется при предварительной обработке полем нейтрофилов и последующем введении активаторов респираторно взрыва, как снижение хемиллюминесцентного ответа на эти активаторы. Для более полного сравнения ингибирующих эффектов гипوماгнитного поля и ингибирующих эффектов этих КМП были проведены специальные эксперименты, чтобы определить, как пребывание в гипоМП влияет на хемиллюминесцентный ответ нейтрофилов на введение активаторов респираторного взрыва.

Действие гипоМП проверяли на способность осуществлять преактивацию (прайминг)/деактивацию нейтрофилов. Для проверки этого действия суспензия нейтрофилов предварительно инкубировалась на протяжении 40 минут в гипوماгнитных условиях, а затем к ней добавляли активатор хемиллюминесценции люминол (или люцигенин) и один из активаторов респираторного взрыва, формилированный

пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) или другой активатор генерации АФК, форболовый эфир, форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА). Также применялись варианты совместного использования этих двух активаторов продукции АФК, о чем будет сказано ниже.

Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использованы лабораторные мыши самцы линии Balb/c массой 24–26 г, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Для выполнения измерений в рамках одного экспериментального дня использовалась суспензия нейтрофилов, полученная из одной мыши. Выделение клеток проводилось в день проведения измерений. Для получения клеток в перитонеальную полость мыши было инъецировано 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 16 часов животных умерщвляли методом перикальней дислокации, и их брюшную полость промывали тремя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 1 час при 4° С. Эта процедура позволяла снизить спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемилюминесцентным ответом, что обеспечивало возможность работы с ними в течение экспериментального дня. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%.

Для выполнения опытов образцы получали путем разведения суспензии нейтрофилов модифицированной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл. Образцы по 0,25 мл находились в круглодонных кюветках из полистирола (d = 1,2 см, l = 5,5 см), в которых в дальнейшем проводили измерение хемилюминесценции. Нейтрофилы инкубировали при 37±0,1°С в течение 40 минут. Заданная температура поддерживалась циркуляционным водным термостатом УН 4 (MLW, Германия).

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (также одновременно проводилась последующая регистрация хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов). В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура – установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл), и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [1,2]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм), и была снабжена внутри специальным индуктором (соленоидом) для проведения размагничивания системы и подачи в случае необходимости слабого постоянного тока для формирования поля, заданной величины. Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Замеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 6). Опыты повторяли не менее трех раз.

После инкубации нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции полученных образцов при добавке в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0,35 мМ. В суспензию нейтрофилов помимо люминола был добавлен активатор генерации АФК: хемотаксический формилованный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. В разных вариантах опытов были использованы и другие концентрации fMLF. Для регистрации хемилюминесценции был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО ДИСОфт, Россия). Для анализа результатов использована программа «PowerGraph».

В части опытов вместо fMLF был добавлен другой активатор генерации АФК – форболовый эфир, форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США), в низких концентрациях (5 или 20 нМ),

В части опытов была использована схема двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [10]. Для этого до начала инкубации в гипомагнитном поле в суспензию клеток был добавлен активатор генерации АФК – ФМА в концентрации (5 нМ), а после окончания инкубации хемилюминесцентный ответ регистрировали на введение люминола и пептида fMLF. В этом случае на первом этапе опытов нейтрофилы стимулировали ФМА, агентом с внутриклеточным механизмом действия (имитирующим диацилглицерол и напрямую активирующим мембранную протеинкиназу С [11]), а на втором этапе (при регистрации хемилюминесценции) проводили основную стимуляцию fMLF, агентом с внеклеточным механизмом действия (осуществляющим передачу сигнала через рецепторы fMLP [12]). Такая двойная стимуляция приводила к более полному ответу нейтрофилов на эти стимулы и, следовательно, к возможности повышения чувствительности использованного метода [10].

Наряду с люминол-зависимой хемилюминесценцией регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов для определения спонтанной продукции АФК, а также при использовании активаторов АФК. Для этого после инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечных концентрациях 0,2 или 0,4 мМ. Следует отметить, что в ряде случаев

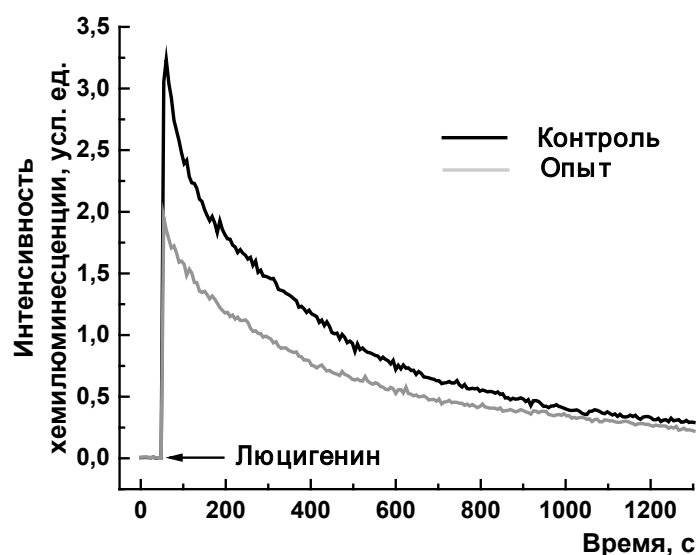


Рисунок 1. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на 0,4 мМ люцигенина после действия «нулевого» МП

дополнительная стимуляция активаторами продукции АФК (ФМА или fMLF) не проводилась, то есть в этих опытах определяли фоновую продукцию супероксидного анион-радикала в нейтрофилах. В других вариантах опытов были использованы fMLF и/или ФМА, в тех же концентрациях и последовательности, что и ранее, при проведении опытов и регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции.

Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента. Значения интенсивности люминесценции соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени: 1 Вольт (В) соответствует ≈ 1000 фотонов / с. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Также для сравнения приведены некоторые данные из ранее опубликованной работы [6] по действию ингибирующих режимов КМП на люминол-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов при стимуляции fMLF.

После инкубации суспензии нейтрофилов в течение 40 минут в гипомангнитных условиях регистрируется существенное снижение (примерно на 30%, с $3,41 \pm 0,36$ В до $2,40 \pm 0,16$ В, $n=6$, $p=0,00029$) хемилюминесцентного сигнала на введение 0,4 мМ люцигенина (Рис.1), что согласуется с данными предыдущих работ. Введение активатора продукции АФК – 1 мкМ fMLF приводит к существенному росту амплитуды сигнала люцигенин-зависимой хемилюминесценции (до $6,37 \pm 0,68$ В в контроле и до $6,05 \pm 0,51$ В в опыте, $n=6$, $p = 0,41921$) и нивелирует различия между контрольными и опытными группами (рис. 2).

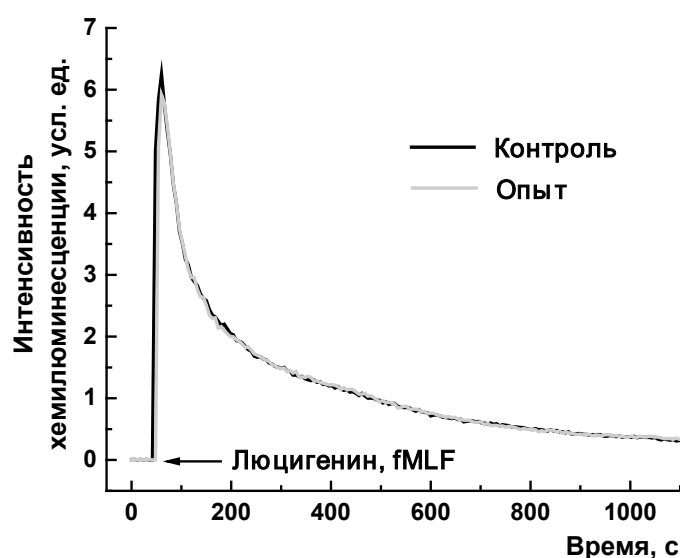


Рисунок 2. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП на 0,4 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF

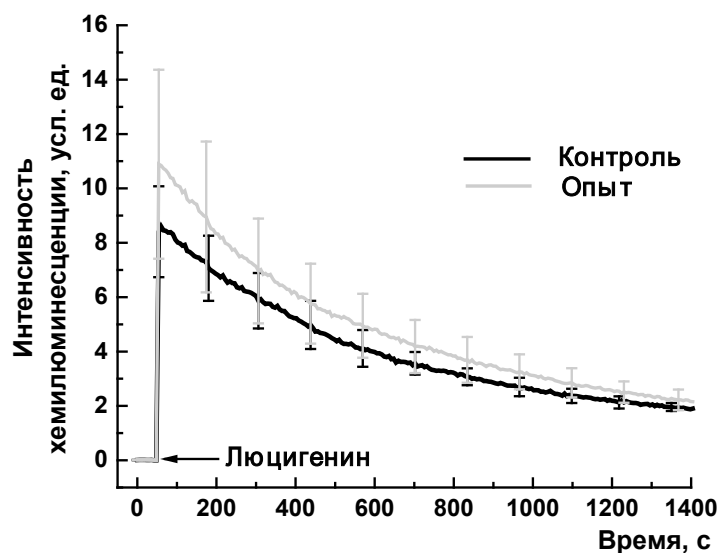


Рисунок 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП в присутствии 5 нМ ФМА на 0,2 мМ люцигенина

Также не проявляются различия при инкубации нейтрофилов в присутствии 5 нМ ФМА и последующем введении 0,2 мМ люцигенина (рис. 3), и в опытах с двойной последовательной стимуляцией 5 нМ ФМА и 1 мкМ fMLF (рис. 4). Таким образом, эти эксперименты, проведенные методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции, в совокупности показывают, что реакция систем нейтрофилов по продукции супероксида на введение активаторов респираторного взрыва после кратковременного пребывания в гипомагнитных условиях полностью сохраняется.

Хемилюминесцентный ответ на введение 0,35 мМ люминола у нейтрофилов после 40 минут пребывания в гипоМП полностью сохраняется (рис. 5). Также не выявлено достоверных отличий (контроль – $7,80 \pm 1,59$ В, опыт – $6,78 \pm 1,31$ В, $n=6$, $p=0,298$) в реакции на введение 2 мкМ fMLF в присутствии люминола (рис. 6), в опытах с двойной последовательной стимуляцией (рис. 7) и в реакции на ФМА (рис. 8). Таким образом, эксперименты, проведенные методом люминол-зависимой хемилюминесценции, дополнительно к опытам с люцигенином, показывают, что продукция и других АФК (перекиси водорода, гипохлорита), помимо супероксида, не нарушается в ответ на активаторы респираторного взрыва после кратковременного пребывания нейтрофилов в гипомагнитных условиях. Единственным выявленным значительным эффектом гипоМП остается снижение фоновой продукции супероксида, регистрируемое в опытах с люцигенином без активаторов продукции АФК.

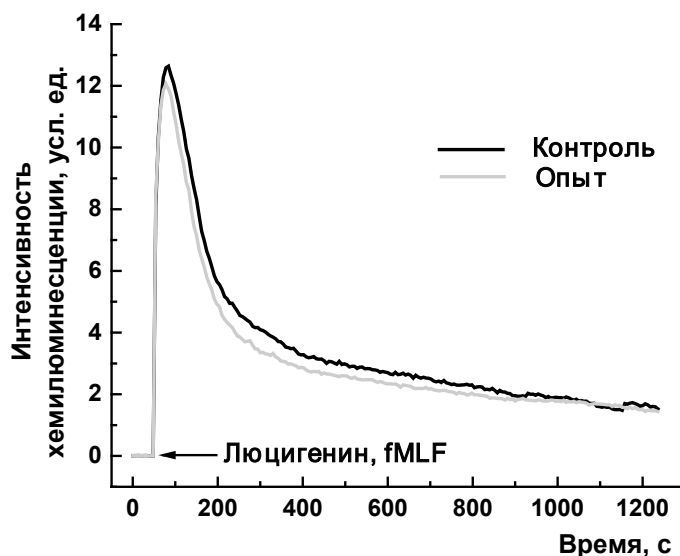


Рисунок 4. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП в присутствии 5 нМ ФМА на 0,2 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF

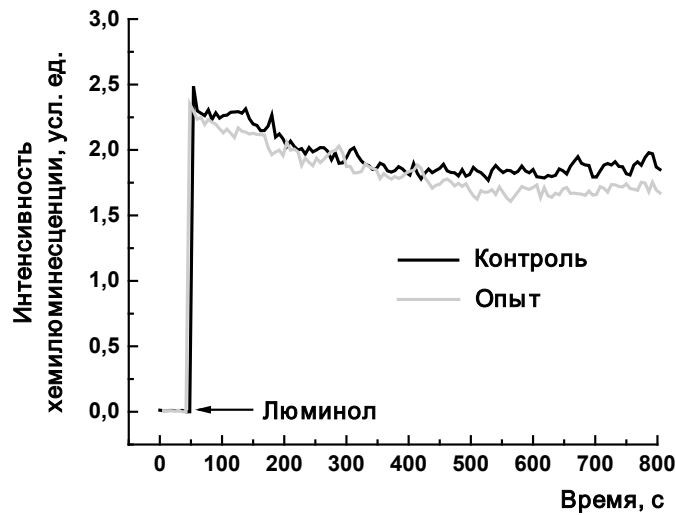


Рисунок 5. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП на добавку 0,35 мМ люминола

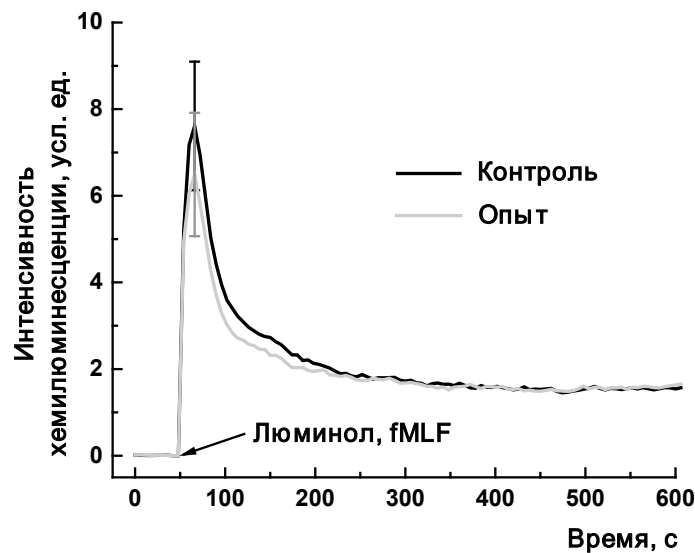


Рисунок 6. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП на 0,35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF

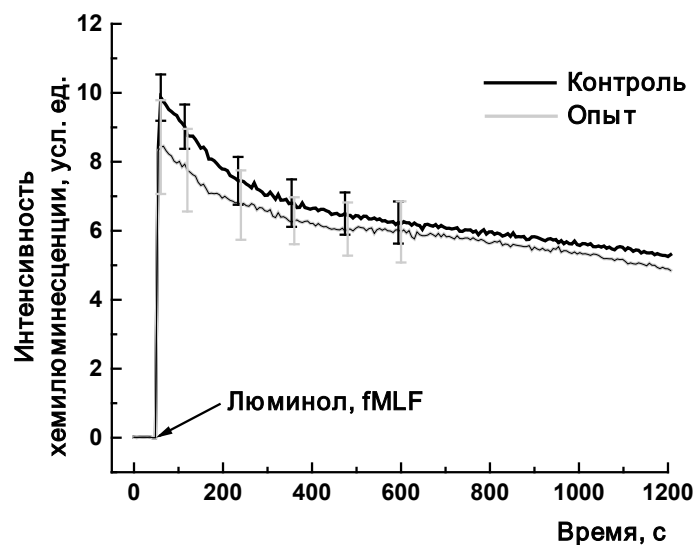


Рисунок 7. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП в присутствии 20 нМ ФМА на 0,35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF

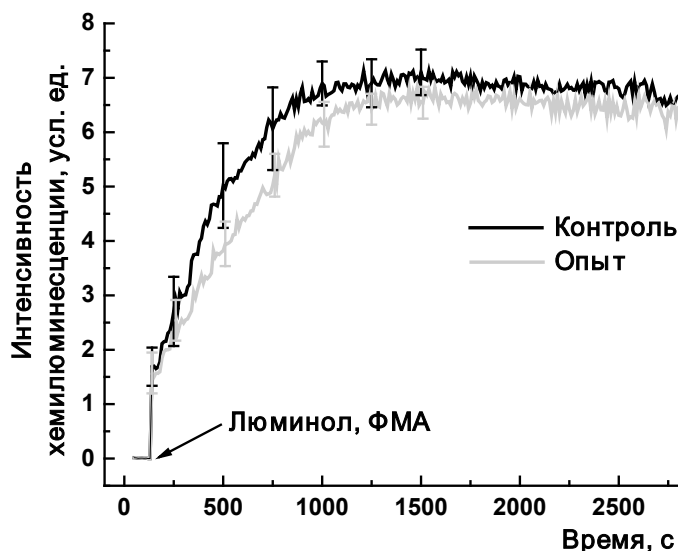


Рисунок 8. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП на 0,35 мМ люминола и 20 нМ ФМА

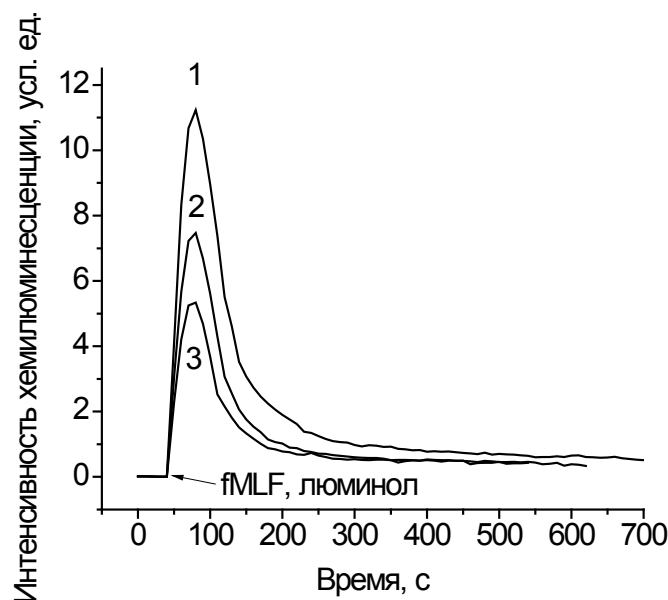


Рисунок 9. Влияние комбинированных магнитных полей с постоянным МП 60 мкТл на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции 1 мкМ fMLF в присутствии люминола [9].

1 – контроль

2 - сумма частот 33; 46; 48,5; 49,5 Гц, амплитуда 480 нТл

3 – 49,5 Гц, амплитуда 120 нТл

В отличие от результатов опытов в гипوماгнитном поле, в опытах при действии ингибирующих продукцию АФК режимов КМП [9], отмечается выраженное снижение ответа нейтрофилов на активаторы респираторного взрыва (рис. 9).

Проведенное исследование, в совокупности с ранее полученными результатами, позволяет более уверенно исключить системы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на депривацию магнитного поля. Напротив, действие определенных комбинаций постоянных и переменных магнитных полей может быть реализовано через эти системы.

Список литературы / References:

1. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488 [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of a «zero» magnetic field on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 365-368 (In Russ.)].

2. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 4,

c. 735-740 [Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A., Fesenko E.E. Decreased production of the superoxide anion radical in neutrophils exposed to a near-null magnetic field. *Biophysics (Moscow)*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 625-630 (In Russ.)].

3. Aasen T.B., Bolann B., Glette J., Ulvik R.J., Schreiner A. Lucigenin-dependent chemiluminescence in mononuclear phagocytes. Role of superoxide anion. *Scand J Clin Lab Invest*, 1987, vol. 47, pp. 673-679.

4. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Валеева Э.Р., Фесенко Е.Е. К вопросу о молекулярных механизмах действия «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 4, с. 720-725 [Novikov V.V., Yablokova E.V., Valeeva E.R., Fesenko E.E. On the molecular mechanisms of the effect of a zero magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 371-375 (In Russ.)].

5. Шаев И.А., Новиков В.В. Влияние слабых переменных магнитных полей на нейтрофильные гранулоциты. Аналитический обзор. *Физика биологии и медицины*, 2023, № 1, с. 26-43, doi: 10.7256/2730-0560.2023.1.40410 [Shaev I.A., Novikov V.V. Influence of weak alternating magnetic fields on neutrophilic granulocytes. Analytical review. *Physics of Biology and Medicine*, 2023, no. 1, pp. 26-43 (In Russ.)].

6. Cuppen J., Gradinaru C., Raap-van Sleuwen B., de Wit A., van der Vegt T., Savelkoul H. LF-EMF Compound block type signal activates human neutrophilic granulocytes in vivo. *Bioelectromagnetics*, 2022, vol. 43, no. 5, pp. 309-316.

7. Poniedzialek B., Rzymiski P., Nawrocka-Bogusz H., Jaroszyk F., Wiktorowicz K. The effect of electromagnetic field on reactive oxygen species production in human neutrophils in vitro. *Electromagn Biol Med*, 2013, vol. 32, no. 3, pp. 333-341.

8. Белова Н.А., Поцелуева М.М., Сребницкая Л.К., Знобищева А.В., Леднев В.В. Регуляция скорости образования активных форм кислорода в перитонеальных нейтрофилах мышей с помощью слабых магнитных полей. *Биофизика*, 2010, т. 55, № 4, с. 657-663 [Belova N.A., Potselueva M.M., Srebnitskaya L.K., Znobishcheva A.V., Lednev V.V. Effects of weak magnetic fields on the production of reactive oxygen species in peritoneal neutrophils in mice. *Biofizika*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 657-663 (In Russ.)].

9. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 1, с. 97-103 [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. A decrease of the respiratory burst in neutrophils after exposure to weak combined magnetic fields of a certain duration. *Biophysics (Moscow)*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 82-87 (In Russ.)].

10. Проскурнина Е.В., Созарукова М.М., Полимова А.М., Прудникова М.А., Аметов А.С., Владимиров Ю.А. Новый хемилуминесцентный метод оценки функциональной активности нейтрофилов при обследовании пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2016, т. 161, № 2, с. 288-291 [Proskurnina E.V., Sozarukova M.M., Polimova A.M., Prudnikova M.A., Ametov A.S., Vladimirov Yu.A. A new chemiluminescent method for assessing the functional activity of neutrophils in the examination of patients with type 2 diabetes mellitus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, vol. 161, no. 2, pp. 288-291 (In Russ.)].

11. Rossi F., Bellavite P., Berton G. et al. The respiratory burst of phagocytic cells: facts and problems. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1982, vol. 141, pp. 283-322.

12. Сафронова В.Г., Габдулхакова А.Г., Миллер А.В. и др. Вариабельность действия инсулина на респираторный взрыв в нейтрофилах. Роль тирозинкиназ и фосфатаз. *Биохимия*, 2001, т. 66, с. 840-849 [Safronova V.G., Gabdulhakova A.G., Miller A.V. et al. Variability of insulin action on respiratory burst in neutrophils. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biokhimiya*, 2001, vol. 66, pp. 840-849 (In Russ.)].

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INHIBITORY EFFECTS OF THE HYPOMAGNETIC FIELD AND COMBINED MAGNETIC FIELDS ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) BY NEUTROPHILS

Novikov V.V.¹, Yablokova E.V.¹, Shaev I.A.¹, Novikova N.I.², Fesenko E.E.¹

¹ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences"

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

² Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Prospekt Nauki, 6, Pushchino, 142290, Russia

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0601

Abstract. The article reveals that a decrease in the background production of reactive oxygen species (ROS) in the peritoneal neutrophils of mice after a short-term (40 minutes) stay in hypomagnetic conditions (residual field ~ 10 nT) at physiological temperatures, detected by the method of lucigenin-dependent chemiluminescence, is not accompanied by a violation of chemiluminescent response to respiratory burst activators: formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) and phorbol ester of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). These results were obtained by activated chemiluminescence using lucigenin or luminol and various combinations of ROS production activators (PMA and/or fMLF). In contrast, the action of combined parallel constant (induction 60 μ T) and alternating (amplitude range 60-180 nT, frequency 49.5 Hz) magnetic fields (CMF) leads to a decrease in the chemiluminescent response to these activators. These data indicate different sources of ROS that respond to certain modes of CMF and hypomagnetic field in neutrophils. The conducted research and the previously obtained results enable to exclude the systems that control the respiratory burst in neutrophils from the main targets and acceptors that respond to short-term deprivation of the magnetic field.

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

ВЛИЯНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГИППОКАМПА

Аксёнова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований

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

Поступила в редакцию 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0602

Аннотация. В настоящей работе предложен модельный подход для анализа свойств нейронных сетей гиппокампа, содержащих модифицированные глутаматные рецепторы. Было проведено молекулярно-динамическое моделирование рецепторов NMDA и AMPA, содержащих в своей структуре повреждения, вызванные действием свободных радикалов. Изучение сетевой активности нейронов с измененной структурой рецепторов проводилось в модели нейронной сети CA3 области гиппокампа. В результате исследования свойств нейронной сети гиппокампа с модифицированной структурой глутаматных рецепторов получены электрофизиологические характеристики известной модели нейронной сети в зависимости от строения ионного канала рецептора. Исходя из анализа изменения проводимостей ионного канала были выявлены различия в амплитуде тета- и гамма-частотных диапазонов в нейронных сетях с различными модельными структурами AMPA- и NMDA-рецепторов. В ходе анализа сетевой активности нейронов были выявлены изменения проводимости ионного канала глутаматных рецепторов и локального потенциала в зависимости от типа повреждения. При значительном снижении проводимости ионного канала глутаматного рецептора в нейронной сети наблюдается падение амплитуды тета-частотных и возрастание гамма-частотных диапазонов. В случае повреждения TYR731 и CYS765 NMDA-рецептора в нейронной сети имеет место увеличение амплитуды тета- и гамма-частотных диапазонов.

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

ВВЕДЕНИЕ

Гиппокамп представляет собой центр управления памятью, который имеет решающее значение при хранении и последующем извлечении событий повседневной жизни для формирования поведения в будущем. Глутаматные рецепторы принимают непосредственное участие в координировании активности сетей нейронов гиппокампа при кодировании, консолидации и извлечении воспоминаний [1,2]. Дисфункция рецепторов глутамата наблюдается при когнитивных нарушениях и ментальных заболеваниях. Понимание механизмов нарушения синаптической пластичности вследствие оксидативного стресса в структурах мозга, связанных с обучением и хранением информации, необходимо для улучшения терапевтических подходов при лечении неврологических расстройств, связанных с потерей памяти.

Рецепторы NMDA и AMPA представляют собой два основных типа ионотропных рецепторов глутамата, участвующих в синаптической передаче [3]. Глутаминовая кислота является главным возбуждающим нейротрансмиттером в центральной нервной системе (ЦНС), который взаимодействует как с ионотропными, так и метаболотропными рецепторами [4].

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

NMDA-рецепторы имеют решающее значение для развития центральной нервной системы, генерации ритмов дыхания, передвижения, а также процессов, лежащих в основе обучения, памяти и нейропластичности. Аномальные уровни экспрессии и измененная функция рецепторов NMDA вовлечены в многочисленные неврологические расстройства и патологические состояния, включая депрессию, шизофрению, болезнь Альцгеймера и аутоиммунный анти-NMDA-рецепторный энцефалит [5,6]. Гипофункция NMDA может привести к когнитивным дефектам, тогда как чрезмерная стимуляция вызывает эксайтотоксичность и последующую нейродегенерацию [7].

Оксидативный стресс. Процессы оксидативного стресса могут активироваться на фоне развития дисбаланса в нейротрансмиттерной системе [3, 4]. С наибольшей вероятностью в белковых молекулах при окислительном стрессе наблюдается модификация цистеина ($Cys \rightarrow Ocs$, сульфоновая кислота), метионина ($Met \rightarrow Omt$, метионин сульфон), тирозина ($Tyr \rightarrow Niy/3ct$, 3-нитротирозин/3-хлортирозин), гистидина ($His \rightarrow Ohi$, 2-оксо-гистидин) и триптофана ($Trp \rightarrow 4pq/Oia$, 5-гидроксириптофан/оксиндол-аланин) [8].

Для оценки воздействия свободных радикалов на структуру глутаматных рецепторов было проведено молекулярно-динамическое моделирование рецепторов NMDA и AMPA, имеющих в своей структуре

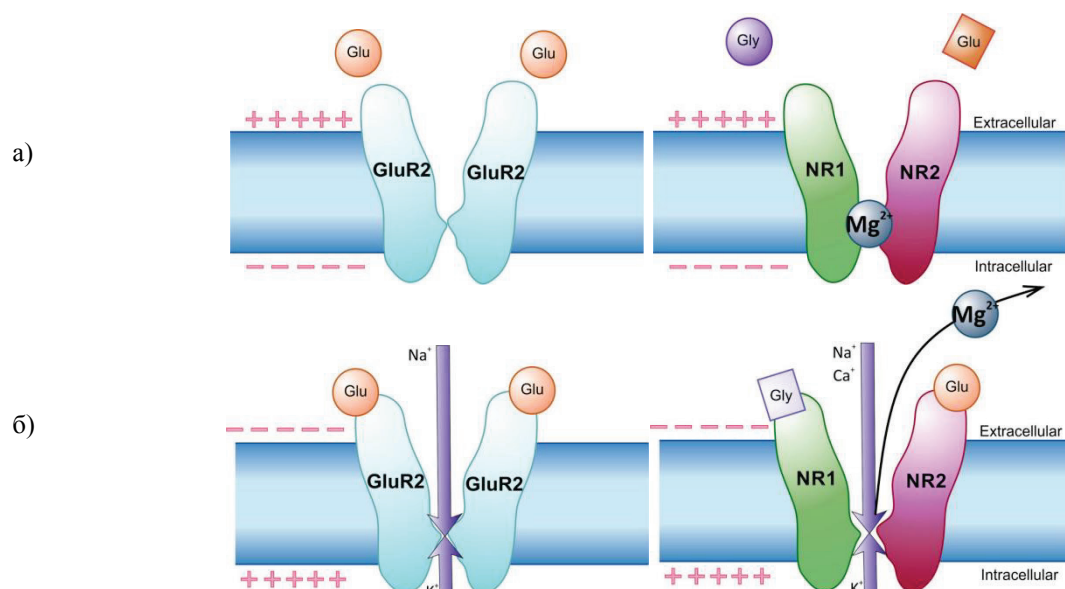


Рисунок 1. Активация глутаматных рецепторов AMPA GluR2 и NMDA NR1/NR2B: а) рецепторы в неактивном состоянии, б) рецепторы в активной конформации

повреждения тирозина Tyr731, 732 и цистеина Cys765, 819, 718, 773 в активной конформации. В качестве исходных трёхмерных моделей были выбраны структуры 6WHT и 6DM1, в активном конформационном состоянии, из базы PDB (табл. 1, рис. 2).

Целью настоящей работы является исследование влияния оксидативного стресса на функционирование глутаматных рецепторов и сетевую активность нейронов гиппокампа. Разработанный вычислительный подход позволяет произвести анализ различных структур глутаматных рецепторов, оценить их электрофизиологические свойства на примере моделей нейронных сетей гиппокампа [9] и воспроизвести паттерны электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки воздействия свободных радикалов на структуру глутаматных рецепторов было проведено молекулярно-динамическое моделирование различных типов рецепторов AMPA и NMDA в активной конформации (табл. 1).

Моделирование влияния оксидативного стресса на глутаматные рецепторы проводилось в несколько этапов (рис. 3). Первоначальным этапом было восстановление недостающих аминокислотных остатков в трёхмерной структуре глутаматных рецепторов с помощью программного пакета MODELLER 10.3. Построение липидного бислоя и сольватирование выполнено в среде Charmm-GUI. Молекулярно-динамическое моделирование проводилось в среде GROMACS версии 5.13.

Исходя из анализа проводимости ионных каналов и распределения ионов магния в каналах рецепторов NMDA, было изучено поведение нейронной сети с каждым типом рецептора NMDA и AMPA, произведен расчёт локального потенциала и определены значения коллективных колебаний (ритмов) нейронной сети гиппокампа. Изучение сетевой активности нейронов с различными типами рецепторов NMDA проводилось в моделях нейронных сетей CA3 [9] области гиппокампа (рис. 5). Для изучения поведений нейронной сети применялся пакет NEURON [10]. Наибольший интерес представляет исследование θ - и γ -ритмов мозга, т.к. они оказывают определяющее влияние на формирование памяти. Гиппокамп вносит наибольший вклад в их генерацию.

В ходе моделирования проводился анализ радиуса ионного канала. Благодаря расчетам удалось визуализировать зависимость радиуса канала r от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, перпендикулярной мембране. Используемая зависимость была использована при расчете отношения проводимостей для различных типов глутаматных рецепторов (табл. 2).

Таблица 1. Номера модифицированных а.о. в рецепторах и их процентное соотношение

Тип повреждения	AMPA (6DM1)		NMDA (6WHT)	
	Модифиц. а.о	Соотношение	Модифиц. а.о	Соотношение
Cys → Ocs	718, 773	3,13%	765, 819 (NR1)	4,17%
Tyr → Niy	732	1,14%	731 (NR2)	1,69%
	Организм	Система экспрессии	Организм	Система экспрессии
	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
PDB DOI	10.1016/j.neuron.2018.07.027		10.1016/j.cell.2020.05.052	

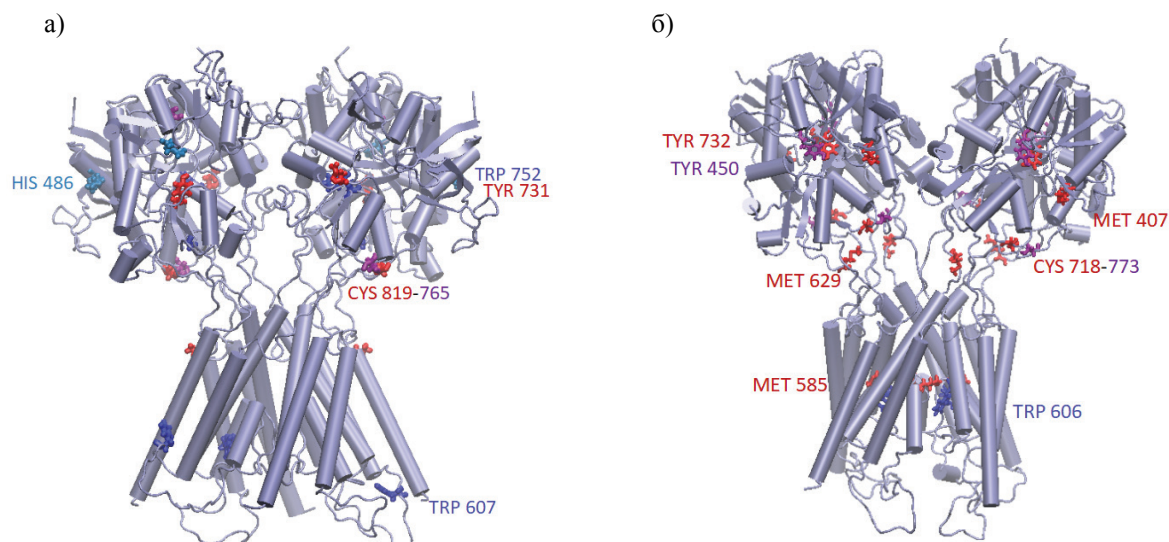


Рисунок 2. Локализация модифицированных а.о. в структурах а) 6WHT и б) 6DM1

Построение геометрии ионного канала было выполнено при помощи пакета HOLE v2.2.005 (рис. 4). Исходя из предположения, что радиус канала прямо пропорционален проводимости, были определены изменения в электрофизиологических характеристиках сети гиппокампа. Для вычисления локального потенциала нейронной популяции и спектров мощности сигнала ЭЭГ параметры кода NEURON из модели [9] были изменены соответствующим образом.

Ионный ток через единственный глутаматный рецептор (I_{NMDA} – ток через рецептор NMDA, I_{AMPA} – ток через рецептор AMPA) в модели нейронной сети [9] представлен в виде

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

$$I_{AMPA} = G_{AMPA} (V - V_e), \quad (2)$$

где G_{NMDA} – максимальная проводимость рецептора NMDA для определенного типа иона, в нашем случае токи иона Na^+ ; G_{AMPA} – максимальная проводимость рецептора AMPA; P – вероятность открытия канала в зависимости

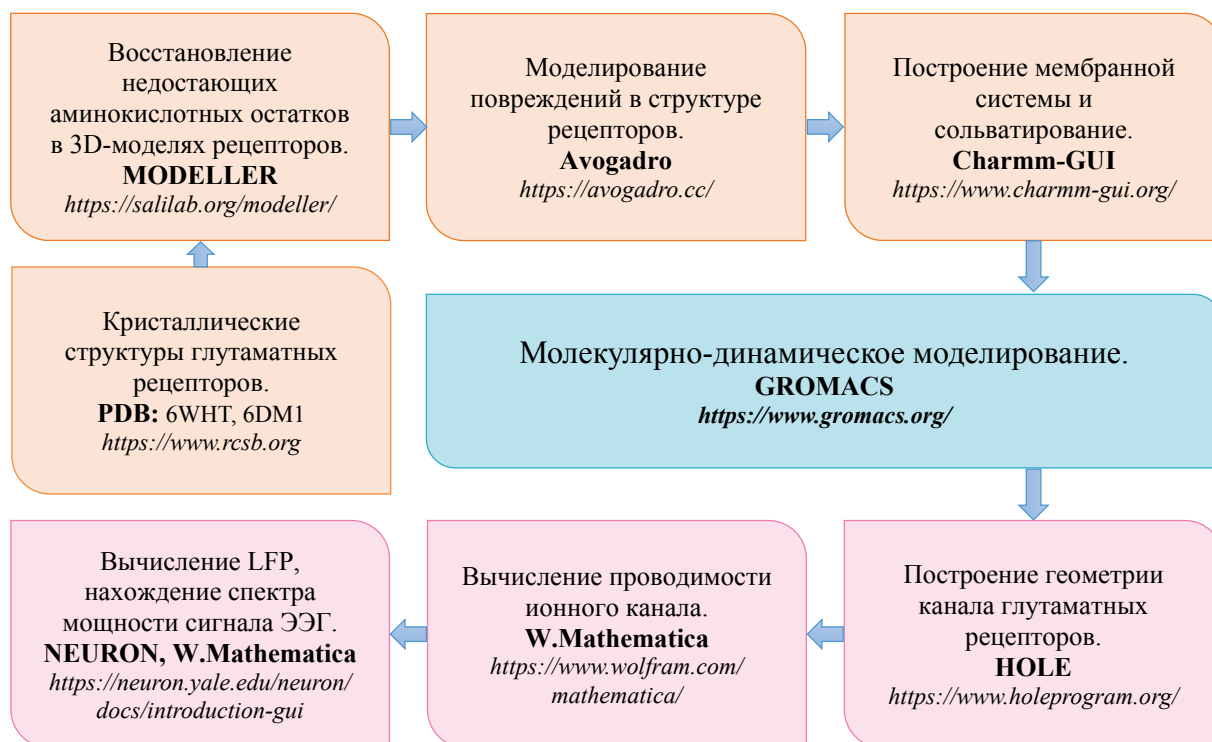


Рисунок 3. Схема этапов моделирования влияния оксидативного стресса на функционирование глутаматных рецепторов

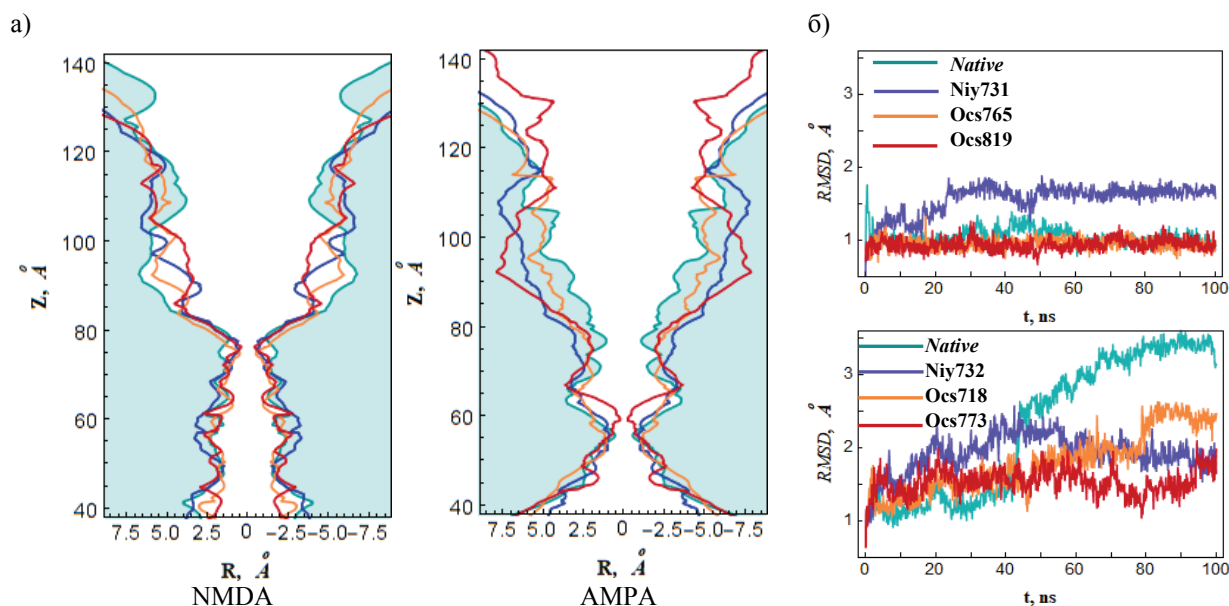


Рисунок 4. а) Изменения геометрии каналов глутаматных рецепторов в зависимости от модификации а.о. оксидантами. NMDA: зелёный – *native*, синий – Niy731, жёлтый – Ocs765, красный – Ocs819. AMPA: зелёный – *native*, синий – Niy732, жёлтый – Ocs718, красный – Ocs773. б) Среднеквадратичные отклонения остовых атомов мотива SYTANLAAF ионного канала глутаматных рецепторов, модифицированных оксидантами. Сверху – NMDA 6WHT, снизу – AMPA 6DM1

от пресинаптического потенциала V_{pre} и макроскопическая кинетика состояний рецептора; V – постсинаптический мембранный потенциал с равновесным напряжением V_e , c и q – феноменологические константы. Последние два параметра отражают связывание магния и электрохимические свойства, соответственно. Эти параметры обычно получают из экспериментальных данных.

Чтобы оценить разницу между проводимостью открытого ионного канала рецептора нативной и смоделированной форм белка, применялось следующее предположение: если радиус канала зависит от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, которая перпендикулярна мембране, то проводимость G канала можно оценить по следующей формуле:

$$\frac{1}{G} = \int_0^L \frac{dz}{\pi \sigma r^2(z)}, \quad (3)$$

где σ – ионная проводимость цитозоля; L и r – длина ионного канала и эффективный радиус поры соответственно. Таким образом, соотношение проводимости нативной G_{nat} и смоделированной форм G_{mod} оценивали по следующей формуле:

$$\frac{G_{mod}}{G_{nat}} = \int_0^L \frac{dz}{r_{nat}^2} / \int_0^L \frac{dz}{r_{mod}^2}. \quad (4)$$

Зависимости $r(z)$ в (3) и (4) были восстановлены с использованием расчетов при помощи программы HOLE для нативной формы рецепторов и каждой из смоделированных форм.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

Молекулярно-динамические расчёты показали, что проводимость ионного канала модифицированных форм рецепторов NMDA менялась незначительно, в то время как в случае AMPA-рецепторов проводимость существенно снижалась.

Таблица 2. Соотношение проводимости G поврежденного рецептора NMDA и AMPA к проводимости G_b неповрежденного рецепторного канала NMDA и AMPA

Мод.	NMDA			AMPA		
	Tyr731→Niy7	Cys765→Ocs7	Cys819→Ocs8	Tyr732→Niy7	Cys718→Ocs7	Cys773→Ocs7
	31	65	19	32	18	73
G/G_b	0,918	1,071	0,980	0,409	0,546	0,473

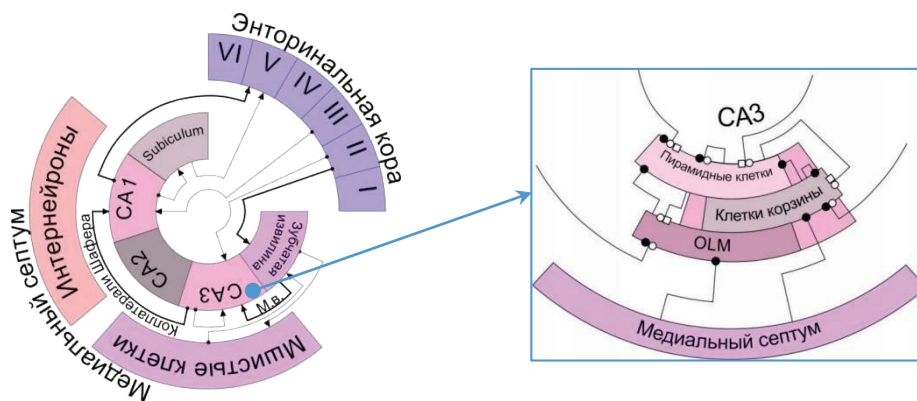


Рисунок 5. Нейронная сеть гиппокампа [11]. Справа схема модели нейронной сети из [9], области CA3 гиппокампа, состоящей из 1200 нейронов (пирамидальные клетки - 800, корзинчатые интернейроны - 200, OLM интернейроны - 200) и 152 000 синапсов. Закрашенные окружности – GABA_A рецепторы, пустые окружности – AMPA рецепторы, пустые прямоугольники – NMDA рецепторы

Влияние различных повреждений глутаматных рецепторов на динамику нейросетей гиппокампа (рис. 5) оценивалось по спектрам мощности, отражающим выраженность того или иного частотного диапазона генерируемых осцилляций. Рассмотрены два частотных диапазона: тета (4-8 Гц) и гамма (30-60 Гц).

Модель [9] воспроизводит базовые тета-модулированные гамма-колебания локального потенциала (ЛП), наблюдаемые экспериментально. Мы проанализировали изменения локального потенциала, вызванные нарушением проводимости глутаматных рецепторов (рис. 6).

Спектральный анализ сигнала производился с помощью прямого Фурье-преобразования функции, описывающей локальный потенциал. Были получены спектры мощности сигнала ЭЭГ для модели сети нейронов, содержащей поврежденные рецепторы NMDA и AMPA (рис. 7).

Оксидативный стресс приводит к формированию модифицированных а.о. в структуре глутаматных рецепторов, изменяя их свойства рецепторов и поведение в нейронной сети. В данной работе проведено молекулярно-динамическое моделирование рецепторов AMPA и NMDA, имеющих в своей структуре модифицированные а. о. В ходе анализа сетевой активности нейронов были выявлены изменения проводимости ионного канала глутаматных рецепторов и локального потенциала в зависимости от типа повреждения. В случае

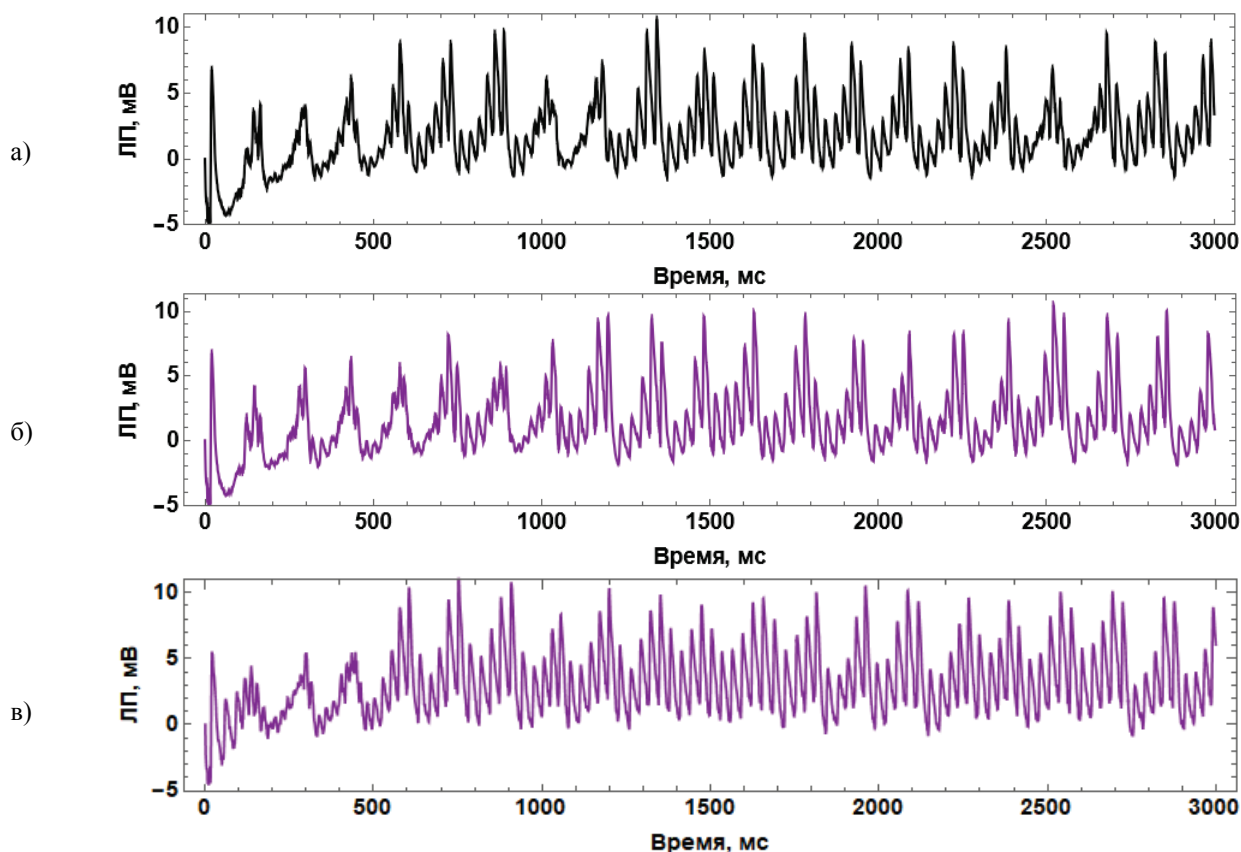


Рисунок 6. Локальный потенциал нейронной популяции модели сети из [9], содержащей поврежденные рецепторы NMDA и AMPA: а) – native, б) Niy731, в) Ocs819Ocs773

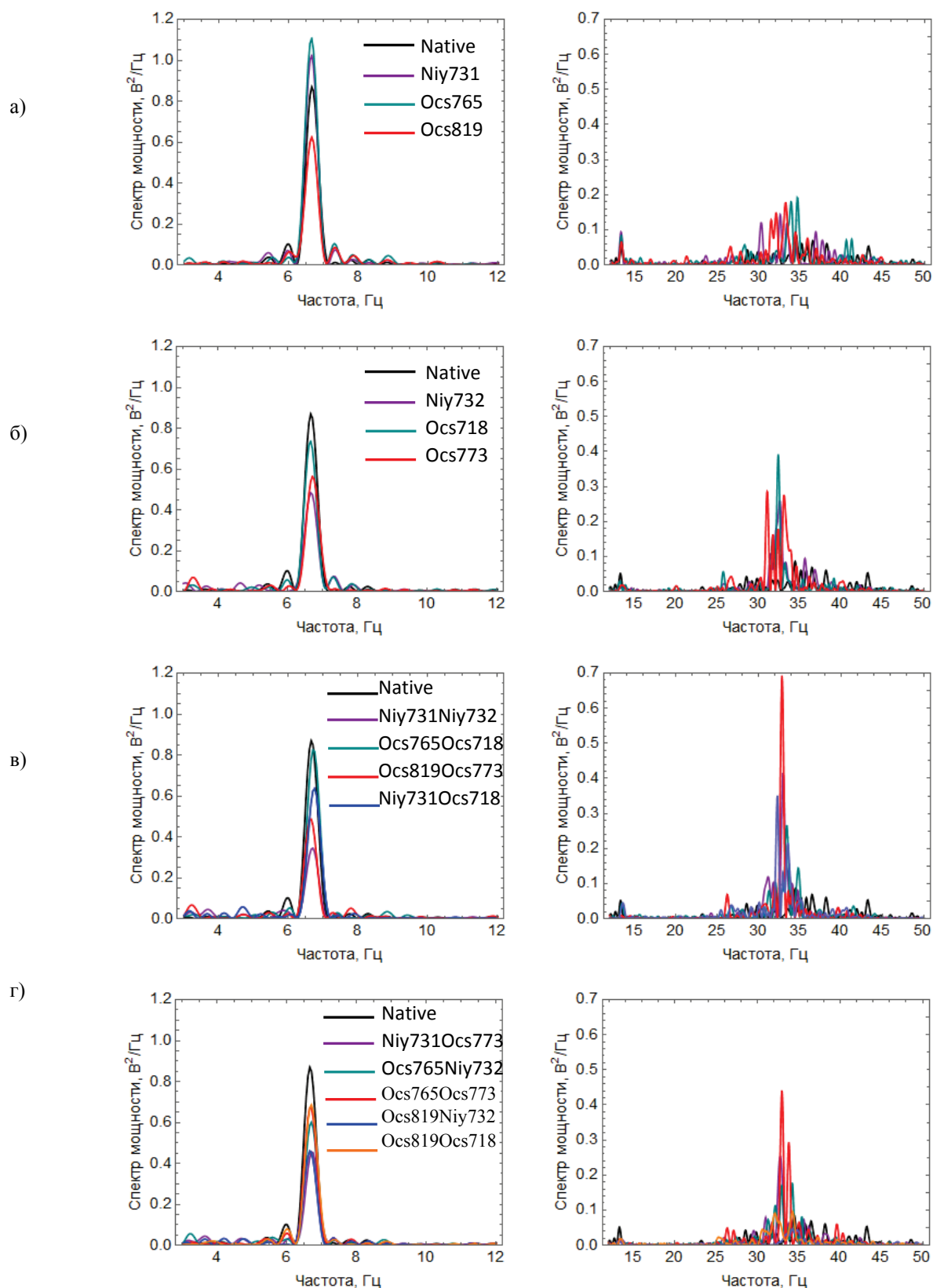


Рисунок 7. Частотный спектр осцилляций θ и γ -ритмов для модели нейронной сети Neumotín et al., содержащей поврежденные рецепторы а) NMDA (черный – *native*, фиолетовый – Niy731, зеленый – Ocs765, красный – Ocs819); б) AMPA (черный – *native*, фиолетовый – Niy732, зеленый – Ocs718, красный – Ocs773); в) NMDA и AMPA (черный – *native*, фиолетовый – Niy731Niy732, зеленый – Ocs765Ocs718, красный – Ocs819Ocs773, Niy731Ocs718); г) NMDA и AMPA (фиолетовый – Niy731Ocs773, зеленый – Ocs765Niy732, красный – Ocs765Ocs773, синий – Ocs819Niy732, жёлтый – Ocs819Ocs718)

повреждения Tyr731 и Cys765 NMDA-рецептора в модели нейронной сети [9] наблюдается возрастание амплитуды тета- и гамма-частотных диапазонов. При модификации Cys819 рецепторов NMDA в поведении нейронной сети имеет место снижение тета-частоты и увеличение частоты гамма-диапазона. Изменения ритмов модели сети гиппокампа, содержащей поврежденные рецепторы AMPA, были связаны со снижением амплитуды тета- и возрастанием гамма-частотных диапазонов по сравнению с сетью, содержащей нативные формы рецепторов.

Согласно результатам моделирования, повреждения в структуре рецепторов способны привести к изменению фазового соотношения возбуждения клеток. Более низкая активность OLM-клеток модели [9] приводит к снижению амплитуды тета-ритма и затормаживает пирамидные клетки, что приводит к увеличению активности корзинчатых клеток и росту гамма-мощности. Аномалии колебаний ритмов гиппокампа проявляются при различных патологиях. Высокая мощность гамма-ритма коррелирует со снижением передачи информации от синаптических входов к пирамидальным нейронам, что может нарушить передачу информации через гиппокамп в кору головного мозга или из нее [12].

Список литературы / References:

1. Sosa M., Gillespie A.K., Loren M., Frank L.M. Neural Activity Patterns Underlying Spatial Coding in the Hippocampus. *Curr Top Behav Neurosci.*, 2018, vol. 37, pp. 43-100, doi: 10.1007/7854_2016_462.
2. Cravens C.J., Vargas-Pinto N., Christian K.M., Nakazawa K. CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. *EJN*, 2006, vol. 24, pp. 1771-1780, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05044.x.
3. Huang S., Chen L., Bladen Chr., Stys P.K., Zamponi G.W. Differential modulation of NMDA and AMPA receptors by cellular prion protein and copper ions. *Molecular Brain*, 2018, vol. 11, no. 62, doi: 10.1186/s13041-018-0406-3.
4. Flores-Soto M.E., Chaparro-Huerta V., Escoto-Delgado M., Vazquez-Valls E., González-Castañeda R.E., Beas-Zarate C. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología*, 2012, vol. 27, no. 5, pp. 301-310, doi: 10.1016/j.nrleng.2011.10.003.
5. Wang C.C. et al. A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function. *Neuron*, 2011, vol. 72, pp. 789-805, doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.023.
6. Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front. Neurosci.*, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.00473.
7. Blanke M.L., VanDongen A.M.J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *Biology of the NMDA Receptor*, 2009, chap. 13.
8. Sahoo N., Hoshi T., Heinemann S.H. Oxidative Modulation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Antioxid Redox Signal.*, 2014, vol. 21, no. 6, pp. 933-952, doi: 10.1089/ars.2013.5614.
9. Neymotin S.A. et al. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, pp. 11733-11743, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0501-11.2011.
10. Hines M.L., Carnevale N.T. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.*, 1997, vol. 9, pp. 1179-1209, doi: 10.1162/neco.1997.9.6.1179.
11. Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.*, 2010, vol. 11, no. 5, pp. 339-350.
12. Parnas J., Bovet P., Zahavi D. Schizophrenic autism: clinical phenomenology and pathogenetic implications. *World Psychiatry*, 2002, vol. 1, pp. 131-136.

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON THE FUNCTIONING OF GLUTAMATE RECEPTORS IN THE HIPPOCAMPUS

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

Joint Institute for Nuclear Research

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

Received 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0602

Abstract. In this work, we propose a model approach for analysis of the properties of hippocampal neural networks containing modified glutamate receptors. Molecular dynamics modeling of NMDA and AMPA receptors containing damage caused by the action of free radicals was carried out. The study of network activity of neurons with altered receptor structure was carried out in models of neural network CA3 of the hippocampus region. As a result of studying the properties of the neural network of the hippocampus with a modified structure of glutamate receptors, the electrophysiological characteristics of the known model of neural networks were obtained depending on the structure of the ion channel of the receptor. Based on the analysis of changes in the conductance of the ion channel, differences in the amplitude of the theta and gamma frequency ranges in neural networks with different model structures of AMPA and NMDA receptors were revealed. During the analysis of the network activity of neurons, changes in the conductance of the ion channel of glutamate receptors and local potential were revealed depending on the type of damage. With a significant decrease in the conductivity of the ion channel of the glutamate receptor in the neural network, a decrease in the amplitude of the theta-frequency and an increase in the gamma-frequency ranges is observed. In the case of damage to the TYR731 and CYS765 NMDA receptor in the neural network, an increase in the amplitude of the theta and gamma frequency ranges takes place.

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

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ N¹H ТАУТОМЕРА КАРНОЗИНА В ЦВИТТЕРИОННОЙ ФОРМЕ

Демухамедова С.Д., Ахвердиева Г.А.

Институт физических проблем, Бакинский государственный университет
ул. З. Халилова 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан, e-mail: svetlanabest@mail.ru
Поступила в редакцию 16.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0603

Аннотация. В представленной работе исследовано пространственное и электронное строение наиболее низкоэнергетической конформации N¹H таутомера карнозина в цвиттерийной форме, имеющего широкий спектр применения. Расчеты проводились квантовохимическим методом DFT на основе гибридного функционала B3LYP и базисного набора 6-31+G(d,p) в газе, воде и в ДМСО с использованием программ Gaussian 09 и GaussView 6.0.16. Вычислены геометрические параметры, значения электронной энергии, дипольные моменты, величины парциальных зарядов на атомах, энергии НОМО и LUMO орбиталей, дескрипторы реакционной способности молекулы и проведен NBO анализ. Визуализированы карты молекулярного электростатического потенциала (MEP) и граничные орбитали. Проанализированы структурные и электронные перестройки в молекуле и изменения различных параметров в зависимости от диэлектрической проницаемости среды. Выявлено, что влияние растворителя не играет существенной роли для данной структуры, получены очень похожие результаты для водной среды и ДМСО. Однако в газовой фазе оптимизация геометрии данного таутомера цвиттерийона карнозина привела к отщеплению атома водорода от концевой группы NH₃⁺ и присоединению его к группе COO⁻, фактически преобразовав цвиттерийную форму в нейтральную.

Ключевые слова: цвиттерийон карнозина, структура, глобальные дескрипторы реактивности, NBO анализ, ИК спектры.

Карнозин (β -alanyl-L-histidine) - известный дипептид, который синтезируется в организме человека и животных и играет важную функциональную роль. Особенно в больших концентрациях он обнаруживается в тканях мозга и скелетных мышц [1]. Карнозин обладает очень широким спектром биологической активности и терапевтического применения. Он является природным антиоксидантом, защищает клетки и ткани организма от окисления активными формами кислорода и азота [2,3], применяется при лечении воспалительных процессов, протекающих на фоне повреждения клеточных мембран [4-6]. Особенный интерес к этой небольшой молекуле возник в самые последние годы, благодаря ее противовоспалительным и антиоксидантным свойствам, когда на мир обрушилась пандемия коронавируса. Известно, что карнозин способен усиливать иммунитет и защищать организм человека от инфекций, вызываемых различными бактериями, грибами, вирусами, включая коронавирус [7]. При COVID-19 коронавирус использует рецептор ACE2, известный как основное место проникновения вируса SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки и клетки легких человека. Предполагается, что назальное введение препарата на основе карнозина направит пептид непосредственно в легкие, ускользнет от внимания сывороточной карнозины и ингибирует активность ACE2 [8]. Исследования такого рода продолжаются в последних работах [9-12]. Многие свойства карнозина основаны на его способности хелатировать токсичные металлы и нейтрализовать опасные для здоровья человека молекулы путем химического связывания. Цинковые комплексы L-карнозина (L-CAZ) используются в качестве противовоспалительного препарата «Polaprezinc», созданного японскими учеными в 1994 году. Это первое лекарственное средство для перорального применения, в котором цинк играет существенную роль [13]. L-CAZ может оставаться в желудочном соке без быстрой диссоциации и специфически прикрепляться к участку с язвенным поражением, после чего L-карнозин и цинк высвобождаются для заживления язвы, а также проявляют ингибирующее действие на *Helicobacter pylori*, предотвращая возможное перерождение тканей в злокачественные. При уже достаточном использовании этого препарата никаких побочных действий не наблюдалось. Медикаментозная терапия на базе карнозина и его производных успешно используется для лечения и облегчения течения многих тяжелых болезней, таких как ишемический инсульт [14], сердечные заболевания [15], диабет и его последствия [16-18], почечная недостаточность [19], болезни Паркинсона и Альцгеймера [20-22] и других недугов. Карнозин стали применять в терапии онкологических заболеваний таких как глиобластома головного мозга [23,24], рак желудка [25,26] и колоректальный рак человека [27,28]. Карнозин ингибирует метастазирование клеток [29-31] и уменьшает побочные эффекты от облучения при лучевой терапии [32]. Обнаружено, что карнозин обладает свойствами, замедляющими процесс старения [1,33,34], применяется для профилактики и лечения старческого слабоумия [35], снижает скорость укорочения и повреждений теломеров ДНК плода [36], уменьшает образование атеросклеротических бляшек [37]. В работе [38] исследовали терапевтический потенциал карнозина в качестве противодействия большинству молекулярных изменений возрастного прогрессирующего заболевания глаз, характеризующегося нарушением центрального зрения. Карнозин нетоксичен и препараты на его основе не имеют побочных эффектов. Это подтверждает необходимость всестороннего исследования карнозина и его аналогов с целью создания на их основе новых более совершенных лекарственных средств.

На протяжении последних 15 лет мы изучали строение и свойства нейтрального карнозина в двух таутомерных формах N^1H и N^3H и его комплексов с атомами Zn, Cu и Co полуэмпирическим методом квантовой химии PM3 с использованием программного комплекса *HyperChem*. Квантово-химическим методом теории функционала электронной плотности (DFT) нами была изучена также пространственная и электронная структура нейтральной молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H в газовой фазе и в водной среде [39]. Однако известно, что биологически активные молекулы функционируют в физиологической среде их обитания - водном растворе. Поэтому в природе карнозин чаще встречается в форме цвиттериона, тоже электронейтральной молекулы, но имеющей положительно и отрицательно заряженные функциональные группы NH_3^+ и COO^- . В нашей недавней работе [40] методом молекулярной механики были изучены конформационные профили, определены энергетические и геометрические параметры, характеризующие стабильные состояния N^1H и N^3H таутомеров карнозина в цвиттерионной форме. Было показано, что фрагмент β -аланил более подвижен, чем остальная часть этой молекулы, поэтому он способен изгибать α -аминогруппу (H_3N^+) в сторону С-концевой карбоксильной группы (COO^-) или имидазольного кольца L-гистидина. Выявлено, что пространственная структура обоих таутомеров молекулы карнозина может быть охарактеризована тремя типами конформаций (I, II, III), которые определяются различным расположением указанных функциональных групп. В конформациях I типа H_3N^+ группа, COO^- группа и имидазольное кольцо L-гистидина близко расположены в пространстве; в конформациях II типа H_3N^+ группа и COO^- группа приближены в пространстве, но имидазольное кольцо L-гистидина отвернуто; в конформациях III типа H_3N^+ группа и имидазольное кольцо L-гистидина приближены в пространстве, но группа COO^- отвернута. Каждый конформационный тип для обоих таутомеров карнозина включает две характерные конформации, которые определяются одинаковым расположением функциональных групп в пространстве, но отличаются только геометрией β -аланильного фрагмента. Установлено, что наиболее устойчивые состояния данного дипептида характеризуются близким расположением в пространстве α -аминогруппы, С-концевой карбоксильной группы и имидазольного кольца L-гистидина. Наблюдается влияние внутримолекулярной водородной связи на геометрию молекулы. В этих конформациях формируются водородные связи двух типов - между ближайшими атомами водорода и кислорода противоположно заряженных N- и С-концевых заряженных групп молекулы; между атомом водорода амидной группы основной цепи аминокислотного остатка L-His и атомами кислорода COO^- группы. Выявлены также солевые мостики между атомом азота α -аминогруппы и атомами кислорода депротонированной карбоксильной группы.

В представленной работе изучены структурные, электронные, спектральные характеристики и определена реакционная способность цвиттериона карнозина с таутомерной формой имидазольного кольца N^1H , которая встречается в большинстве комплексов карнозина [41]. Расчеты выполнялись квантовохимическим методом теории функционала плотности DFT с использованием трехпараметрического гибридного функционала B3LYP, и расширенного базисного набора 6-31+G(d,p) с учетом поляризационных функций для всех атомов и диффузных функций для неводородных атомов в газовой фазе, а также в наиболее естественной для функционирования пептидных молекул водной среде и в растворителе ДМСО. Нахождение глобального минимума подтверждается отсутствием мнимых частот при решении колебательной задачи. Все вычисления проводились с использованием программы Gaussian 09 [42] и программы визуализатора GaussView 6.0.16 [43].

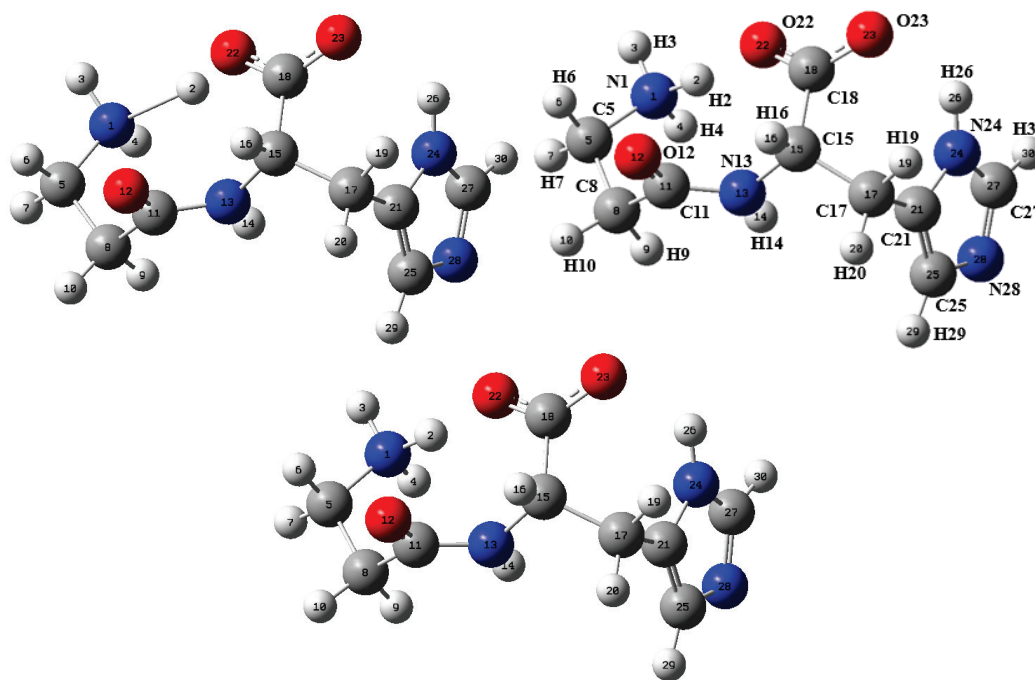


Рисунок 1. Оптимизированные модели цвиттериона карнозина N^1H в газе (слева), воде (справа) и ДМСО (снизу)

Таблица 1. Длины связей оптимизированной молекулы цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H

Связь	газ	вода	ДМСО	[44]	Связь	газ	вода	ДМСО	[44]
N1H2	1,9022	1,0801	1,0814		C15C17	1,547	1,5451	1,5451	1,539
N1H3	1,0178	1,0225	1,0225		C15C18	1,5491	1,5669	1,5669	1,535
N1H4	1,019	1,023	1,0229		C17C21	1,4979	1,4986	1,4986	1,487
N1C5	1,4805	1,5057	1,5056	1,475	C18O22	1,3321	1,2724	1,2726	1,256
C5C8	1,5393	1,5333	1,5333	1,490	C18O23	1,2182	1,2546	1,2543	1,250
C8C11	1,5209	1,5238	1,5239	1,499	C21N24	1,3843	1,3828	1,3828	1,383
C11O12	1,2278	1,2378	1,2376	1,233	C21C25	1,3801	1,3792	1,3792	1,356
C11N13	1,3695	1,3562	1,3563	1,334	N24H26	1,0132	1,0157	1,0157	
N13H14	1,0119	1,0126	1,0126		N24C27	1,3657	1,3605	1,3606	1,325
N13C15	1,4494	1,4547	1,4548	1,454	C25N28	1,3788	1,3834	1,3833	1,377
C15H16	1,0962	1,094	1,094		C27N28	1,3182	1,3237	1,3236	1,331

Таблица 2. Валентные углы молекулы цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H

	газ	вода	ДМСО	Эксп.		газ	вода	ДМСО	Эксп.
H2N1C5	121,666	113,832	113,868		C15C18O22	118,524	118,128	118,128	118,9
N1C5C8	110,672	111,709	111,680	111,0	C15C18O23	120,712	116,314	116,320	116,7
C5C8C11	107,765	109,248	109,228	113,2	O22C18O23	120,755	125,543	125,538	124,5
C8C11O12	121,609	120,867	120,860	121,4	C17C21N24	122,986	122,631	122,615	121,9
C8C11N13	115,312	115,628	115,624	115,7	C17C21C25	132,569	132,823	132,840	128,6
O12C11N133	122,788	123,310	123,318	122,9	N24C21C25	104,441	104,537	104,536	109,5
C11N13C15	122,702	122,448	122,427	123,1	C21N24C27	107,5909	108,0014	107,9971	105,0
N13C15C18	112,192	111,445	111,445	110,4	C21C25N28	111,0926	110,8345	110,8369	106,2
C17C15C18	111,201	113,080	113,056	110,6	N24C27N28	111,7747	111,4938	111,4982	112,1
N13C15C17	112,011	111,425	111,425	107,7	C25N28C27	105,1009	105,1329	105,1313	107,2
C15C17C21	114,101	115,074	115,054	114,1					

Таблица 3. Двугранные углы молекулы цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H

		ГАЗ	ВОДА	ДМСО	Эксп.
τ1	H2N1C5C8	-44,7736	-55,3283	-55,3428	
τ2	N1C5C8C11	57,912	63,0245	63,0574	-178,7
τ3	C5C8C11N13	-102,5274	-102,0695	-102,0641	130,5
ω	C8C11N13C15	163,6791	157,3024	157,2104	174,8
φ	C11N13C15C18	-99,503	-85,3141	-85,3307	
	C11N13C15C17	134,6101	147,3433	147,3582	141,4
χ1	N13C15C17C21	62,0992	67,7384	67,7895	
χ2	C15C17C21N24	76,0077	71,0974	71,1696	
ψ	N13C15C18O22	23,5181	17,4344	17,3285	

Оптимизированная структура молекулы цвиттериона карнозина с таутомерной формой N¹H имидазольного кольца для газовой (слева) и водной (справа) сред и растворителя ДМСО (снизу) представлены на рисунке 1. Данная молекула состоит из атомов β-аланильного остатка (N₁, C₅, C₈, C₁₁), пептидной группы C₁₁O₁₂-N₁₃H₁₄, карбоксильной группы C₁₈O₂₂O₂₃ и группы имидазольного кольца (N₂₄, N₂₈, C₂₁, C₂₅, C₂₇).

В таблицах 1-3 приведены оптимизированные геометрические параметры – длины связей (табл. 1) в Å, валентные (табл. 2) и двугранные углы (табл. 3) в градусах наиболее стабильной конформации N¹H таутомера карнозина в различных растворителях и для сравнения экспериментальные данные из работы [44].

Значения длин связей в основном соответствуют стандартным значениям. В газовой фазе в процессе оптимизации данного конформера дипептида за счет взаимодействия протона H₂ α-аминогруппы с кислородом O₂₂ карбоксильной группы удлиняется связь N₁H₂ (1,90Å), она разрывается и образуется новая связь C₁₈O₂₂, модель становится нейтральной и уже отсутствует взаимодействие между этими группами, связи N₁C₅ и C₁₅C₁₈ в газовой фазе по сравнению с их значениями в водной среде и ДМСО укорачиваются на ~ 0.03 и 0.02Å, а связь C₁₁N₁₃ удлиняется на 0.01Å. Эти изменения в структуре отражаются также на валентные углы H₂N₁C₅, C₅C₈C₁₁, C₈C₁₁O₁₂, C₁₇C₁₅C₁₈, C₁₅C₁₈O₂₃ и O₂₂C₁₈O₂₃ (табл. 2), двугранные углы (табл. 3) и на нековалентные взаимодействия (табл. 4).

Таблица 4. Нековалентные взаимодействия молекулы цвиттериона карнозина N¹H

DH ... A	среда	DH	H...A	D...A	∠DNA
O22H2 ... N1	Газ	0,99688	1,90224	2,83850	155,27936
N1H2 ... O22	Вода	1,08010	1,58506	2,65637	170,515861
	DMSO	1,08140	1,57936	2,65177	170,41005
N24H26 ... O23	Газ	1,01325	2,27447	2,97728	125,31226
	Вода	1,01571	2,18854	2,94609	130,00643
	DMSO	1,01574	2,18701	2,94462	130,00388
O22H2 ... N13	Газ	0,99683	2,34337	3,77153	118,95433
N1H2 ... N13	Вода	1,08010	2,69011	3,28472	114,24279
	DMSO	1,08140	2,68858	3,28376	114,21697
C15H16 ... O12	Газ	1,09617	2,35768	2,83079	104,03050
	Вода	1,09401	2,43732	2,84414	100,28006
	DMSO	1,09400	2,43691	2,84410	100,30245

Таблица 5. Выбранные энергии возмущения второго порядка матрицы Фока и заселенности молекулы карнозина N¹H в цвиттерионной форме в воде, в газе средах и в DMSO

среда	Donor (i)	Type	ED (i)	Acceptor (j)	Type	ED (j)	E (2)	E(j)-E(i)	F(i,j)
Газ	N1	n (1)	1,91218	H2-O22	σ*	0,06789	22,67	0,77	0,119
вода	O22	n(2)	1,85656	N1-H2	σ*	0,09945	41,03	0,76	0,159
ДМСО			1,85555		σ*	0,10093	42,05	0,76	0,161
Газ	O22	n(2)	1,78298	C18-O23	π*	0,22576	47,53	0,35	0,115
вода			1,63595		π*	0,34645	89,24	0,29	0,144
ДМСО			1,63680		π*	0,34571	89,00	0,29	0,144
газ	O 23	n(1)	1,97512	N24-H26	σ*	0,02235	1,17	1,15	0,033
вода			1,97345		σ*	0,02661	1,57	1,15	0,038
ДМСО			1,97341		σ*	0,02666	1,58	1,15	0,038
Газ	N 13	n(1)	1,70651	C11-O12	σ*	0,04895	3,19	0,78	0,048
вода			1,66714		π*	0,31309	65,60	0,27	0,120
ДМСО			1,66751		π*	0,31280	65,64	0,27	0,120
Газ	N13	n(1)	1,70651	H2-O22	σ*	0,06789	1,31	0,69	0,029
Газ	N13	n(1)	1,70651	C17-H19	σ*	0,01384	0,51	0,71	0,018
Газ	O12	n (2)	1,86355	C11-N13	σ*	0,07810	25,71	0,71	0,122
Вода			1,87805		σ*	0,07249	23,84	0,74	0,120
ДМСО			1,87779		σ*	0,07261	23,88	0,74	0,120
газ	O12	n (2)	1,86355	C15-H16	σ*	0,02011	1,00	0,69	0,024
вода		n (2)	1,87805		σ*	0,01773	0,67	0,71	0,020
ДМСО		n(2)	1,87779		σ*	0,01772	0,68	0,71	0,020
газ	O12	n (2)	1,86355	C8-C11	σ*	0,06086	19,63	0,62	0,100
вода			1,87805		σ*	0,05869	18,40	0,62	0,097
ДМСО			1,87779		σ*	0,05881	18,44	0,62	0,097
Газ	N24	n(1)	1,56603	C27-N28	π*	0,37292	47,40	0,27	0,103
Вода			1,55125		π*	0,39644	52,71	0,26	0,106
ДМСО			1,55128		π*	0,39623	52,67	0,26	0,106
Газ		n(1)	1,56603	C21-C25	π*	0,32503	34,19	0,29	0,092
Вода			1,55125		π*	0,31653	34,73	0,29	0,093
ДМСО			1,55128		π*	0,31670	34,74	0,29	0,093
газ	C27-N28	π*	0,37292	C21-C25	π*	0,32503	80,28	0,02	0,060
Вода		π*	0,39644	C21-C25	π*	0,31653	49,81	0,03	0,058
ДМСО		π*	0,39623	C21C25	π*	0,31670	50,06	0,03	0,058

E(2) – энергия гиперсопряженных взаимодействий (энергия стабилизации в ккал/моль)

ED (i) – заселенности орбиталей электронами (в ед.электрона)

E(j)-E(i) – разность энергий (а.у.) донорной (i) и акцепторной (j) NBO-орбиталей

F(i,j) – матричные элементы Фока (а.е.) между i и j NBO орбиталами

Стабилизации молекул способствуют нековалентные внутримолекулярные взаимодействия несвязанных атомов водорода с кислородами и азотами. Как видно из результатов, представленных в таблице 4 в воде и в ДМСО наблюдается формирование солевых мостиков между атомом азота α-аминогруппы и атомом кислорода депротонированной карбоксильной группы длиной 2,66 и 2,65 Å, соответственно. Данный процесс

Таблица 6. Заряды Малликена и НБО на атомах цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H

атом	Заряд Малликена			Заряд НБО		
	Газ	Вода	ДМСО	Газ	Вода	ДМСО
N1	-0,754538	-0,675004	-0,676693	-0,95811	-0,84729	-0,84775
H2	0,453757	0,491546	0,492695	0,53497	0,49920	0,49934
H3	0,319449	0,401805	0,401361	0,42364	0,48585	0,48549
H4	0,314858	0,407900	0,407159	0,41040	0,47835	0,47772
C5	-0,251143	-0,178703	-0,178222	-0,28265	-0,27892	-0,27901
H6	0,181439	0,208454	0,208678	0,25912	0,27594	0,27610
H7	0,142058	0,200840	0,200248	0,22915	0,27879	0,27834
C8	-0,181927	-0,162050	-0,162394	-0,55340	-0,56617	-0,56609
H9	0,137544	0,178742	0,178085	0,23958	0,26787	0,26736
H10	0,178979	0,199258	0,199253	0,28003	0,29470	0,29470
C11	0,428049	0,288421	0,287738	0,68343	0,68040	0,68017
O12	-0,459413	-0,562867	-0,560965	-0,63582	-0,69424	-0,69302
N13	-0,364307	-0,247671	-0,249020	-0,68554	-0,65609	-0,65634
H14	0,318431	0,329210	0,328642	0,43947	0,44692	0,44645
C15	-0,303623	-0,372088	-0,371021	-0,18281	-0,17993	-0,17998
H16	0,216989	0,192542	0,192800	0,30928	0,29164	0,29185
C17	-0,506716	-0,434429	-0,434878	-0,50055	-0,50441	-0,50443
C18	0,399709	0,428931	0,427798	0,81413	0,80098	0,80129
H19	0,184678	0,181811	0,182010	0,28348	0,28198	0,28213
H20	0,163055	0,168252	0,168046	0,27392	0,27569	0,27553
C21	0,159798	0,105547	0,106347	0,06755	0,08406	0,08396
O22	-0,435365	-0,646935	-0,646261	-0,72620	-0,80463	-0,80456
O23	-0,461823	-0,626190	-0,624107	-0,63324	-0,78252	-0,78117
N24	-0,325195	-0,297035	-0,297280	-0,57890	-0,57322	-0,57334
C25	-0,093644	-0,046639	-0,047193	-0,11365	-0,12215	-0,12226
H26	0,336363	0,351540	0,351604	0,47121	0,47899	0,47903
C27	0,230325	0,236029	0,235754	0,16073	0,16018	0,16011
N28	-0,290588	-0,419511	-0,417839	-0,50104	-0,56066	-0,55995
H29	0,126201	0,140674	0,140359	0,23881	0,24519	0,24502
H30	0,136600	0,157618	0,157295	0,23301	0,24350	0,24333

сопровождается также образованием водородной связи N₁H₂ ... O₂₂ длиной 1,59 и 1,58 Å в указанных средах, соответственно. Отметим, что в газовой среде в результате оптимизации происходит отщепление атома водорода от концевой группы NH₃⁺ и присоединение его к группе COO⁻, что приводит к образованию ковалентной связи (0,997 Å) между атомами H₂ и O₂₂. По этой причине атом азота α-амино группы депротонируется, что говорит об отсутствии солевого мостика между вышеупомянутыми атомами азота и кислорода в газовой фазе. При этом наблюдается заметная деформация углов исследуемой молекулы τ₁ (на 10°), ω (на 7°), φ (на 15°), ψ (на 7°) в газовой среде (табл. 3).

Для получения подробной информации о внутримолекулярных взаимодействиях и переносе заряда был проведен анализ орбиталей натуральных связей НВО [46], который подтверждает образование ковалентной связи O₂₂H₂ в газовой фазе (таблица 5, первая строчка). Атом водорода H₂ образует две водородные связи, первая в газе O₂₂H₂...N₁, а в воде и ДМСО O₂₂ N₁H₂ ... O₂₂ и вторая с атомом азота пептидной группы N₁₃, в газовой фазе O₂₂H₂ ... N₁₃ с переносом заряда с неподеленной пары атома N₁₃ на разрыхляющую орбиталь связи H₂O₂₂ n(1)_{N13}→σ*_{H2-O22} с энергией 1,31 ккал/моль, в воде и ДМСО водородная связь N₁H₂...N₁₃ соответствует переносу заряда n(1)_{N13}→σ*_{N1-H2} с энергией 0,10 ккал/моль. В воде и в ДМСО образуется шестичленный цикл N₁₃O₁₁C₈C₅N₁H₂, в котором происходит делокализация электронной плотности n_{N13}→π*_{C11-O12} с энергией делокализации 65,6 ккал/моль, в газовой фазе образуется семичленный цикл N₁₃O₁₁C₈C₅N₁H₂O₂₂ и соответствующая энергия 3,19 ккал/моль. Образование водородных связей C₁₅H₁₆ ... O₁₂ и N₂₄H₂₆ ... O₂₃ подтверждено НБО анализом: n(2)_{O12} → σ*_{C15H16} с энергией стабилизации в газе, воде и ДМСО 1,00, 0,67 и 0,68 ккал/моль и n(1)_{O23}→σ*_{N24H26} с энергией 1,17, 1,57 и 1,58 соответственно. Сильное взаимодействие с переносом заряда наблюдается с неподеленной пары O₁₂ на разрыхляющую σ* орбиталь связи C₁₁N₁₃ n_{O12}→σ*_{C11-N13} с энергией 25,71 в газе и 23,84 и 23,88 ккал/моль в воде и ДМСО. Внутри имидазольного кольца наблюдаются сильные делокализации с переносом заряда с π и π* на σ* и π* орбитали связей внутри кольца.

Таблица 7. Энергетические параметры наиболее стабильной конформации цвиттериона карнозина таутомерной формы N¹H в различных средах (DFT/B3LYP/6-31+G(d,p)) (в eV)

Параметры	Газ	Вода	ДМСО	
Электронная энергия	-21664,670558	-21665,478546	-21665,457756	
НОМО	-6,416176	-6,352501	-6,350052	
LUMO	-0,748041	-0,397559	-0,406810	
Энергетическая щель ΔE	5,668134	5,954942	5,943242	
Потенциал ионизации (I)	$I = -E_{\text{НОМО}}$	6,416176	6,352501	6,350052
Сродство к электрону (A)	$A = -E_{\text{LUMO}}$	0,748041	0,397558	0,406810
Электроотрицательность (χ)	$\chi = (I+A)/2$	3,582109	3,375030	3,378431
Химический потенциал (μ)	$\mu = -(I+A)/2$	-3,582109	-3,3750298	-3,378431
Твердость (η)	$\eta = (I-A)/2$	2,834067	2,977471	2,971621
Мягкость (S)	$S = 1/2\eta$	130,635614	124,343807	124,588615
Индекс электрофильности (ω)	$\omega = \mu^2/2\eta$	2,263798	1,912825	1,920472
Нуклеофильность (ν)	$\nu = 1/\omega$	327,087846	387,109525	385,562639
Максимальный перенос заряда (ΔN)	$\Delta N = -\mu/\eta$	34,393739	30,844719	30,936585
Поляризуемость (α)		3887,469931	5180,596701	5157,310111
Дипольный момент (Debye)		4,878727	14,166919	14,076730

В таблице 6 даны полученные в процессе расчета заряды Маллика, удобные для качественной оценки и заряды НБО, отражающие более разумное распределение зарядов на атомах цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H в рассмотренных средах. Естественные заряды дают более отрицательные значения на атомах азотов, кислородов и углеродов с отрицательным зарядом, исключение составляет заряд на C₁₅. Положительный заряд наблюдается на атомах углерода карбоксильной группы C₁₈ и имидазольного кольца C₂₁ и C₂₇.

В таблице 7 приведены энергетические и электронные характеристики цвиттериона карнозина с N¹H формой имидазольного кольца, полученные в результате расчета. Это значения энергий, дипольного момента, поляризуемости. Отрицательный знак энергии LUMO орбитали во всех средах говорит о электрофильном характере дипептида. В водной среде и ДМСО электронная энергия цвиттериона карнозина понижается на 0,808 и 0,786 eV соответственно, а значения энергетической щели на 0,287 и 0,275 eV увеличивается. Следовательно, в водной среде и ДМСО данный конформер цвиттериона карнозина более стабилен. На основе энергий пограничных орбиталей – НОМО (высшая занятая молекулярная орбиталь) и LUMO (низшая вакантная молекулярная орбиталь) вычислены глобальные дескрипторы, по которым можно изучить химические свойства цвиттериона карнозина. Согласно теореме Купманса [48] первая энергия ионизации равна отрицательному

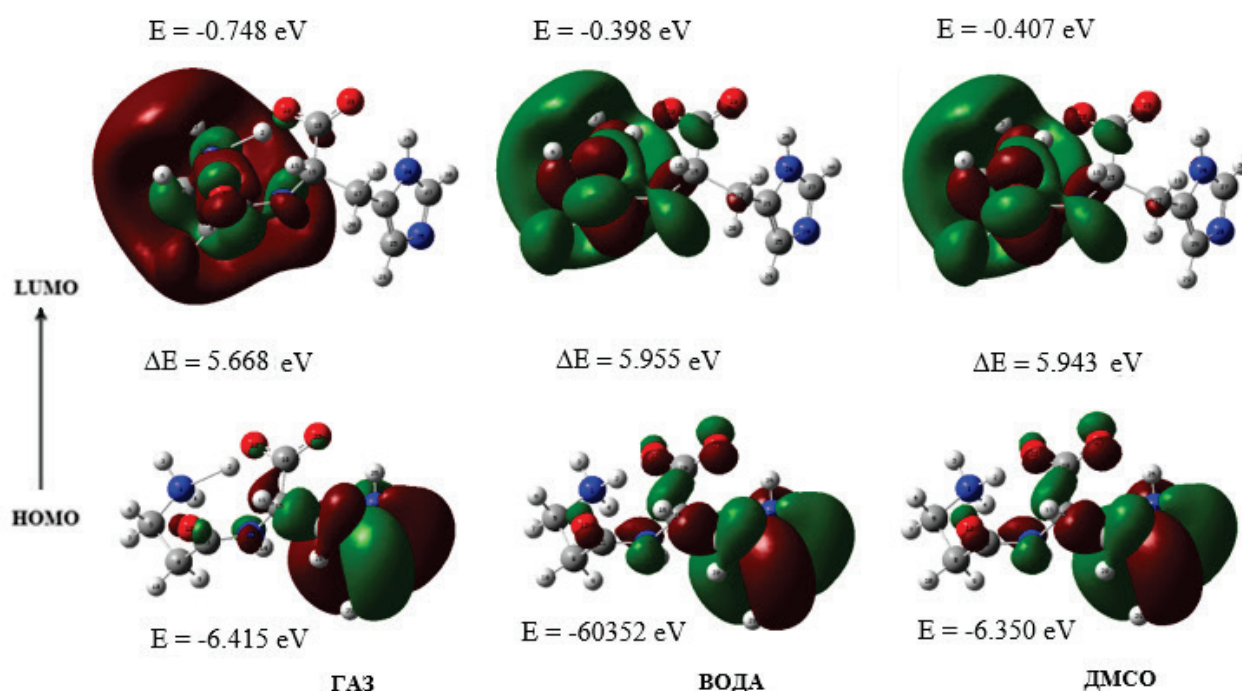


Рисунок 2. Картины и энергии НОМО – LUMO орбиталей и их разность для цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H для газовой фазы (слева), водной среды (в середине) и в растворителе ДМСО (справа)

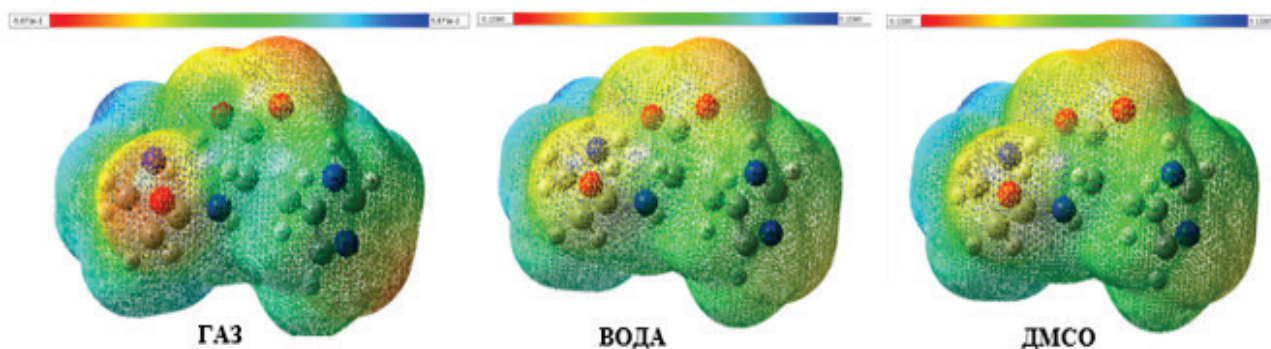


Рисунок 3. МЕР молекулы цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H для газовой фазы (слева), водной среды (в середине) и в растворителе ДМСО (справа)

значению НОМО орбитали, а отрицательное значение LUMO орбитали соответствует средству к электрону. Потенциал ионизации и сродство к электрону в водной среде уменьшаются соответственно на 0,064 и 0,350 eV, а в ДМСО еще на 0,002 и 0,009 eV. В этих средах (таблица 7) уменьшаются также мягкость (на 6,292 и 6,047 eV), электрофильность (на 0,35 и 0,34 eV) и максимальный перенос заряда (на 3,55 и 3,46 eV). Поляризуемость в растворителе, особенно в воде увеличивается (на 1293,127 и 1269,84 eV), что говорит о увеличении химической активности. Дипольный момент также значительно увеличивается в воде на 9,288 и в ДМСО на 9,198 eV, цвиттерион в растворителях обладает большей реакционной способностью.

На рисунке 2 показаны визуализированные пограничные НОМО и LUMO орбитали, их энергии и значения энергетической щели цвиттериона карнозина в таутомерной форме N¹H для газовой и водной сред и растворителя ДМСО, рассчитанные на том же уровне теории. Рассмотрим области молекулярных орбиталей, где между ними

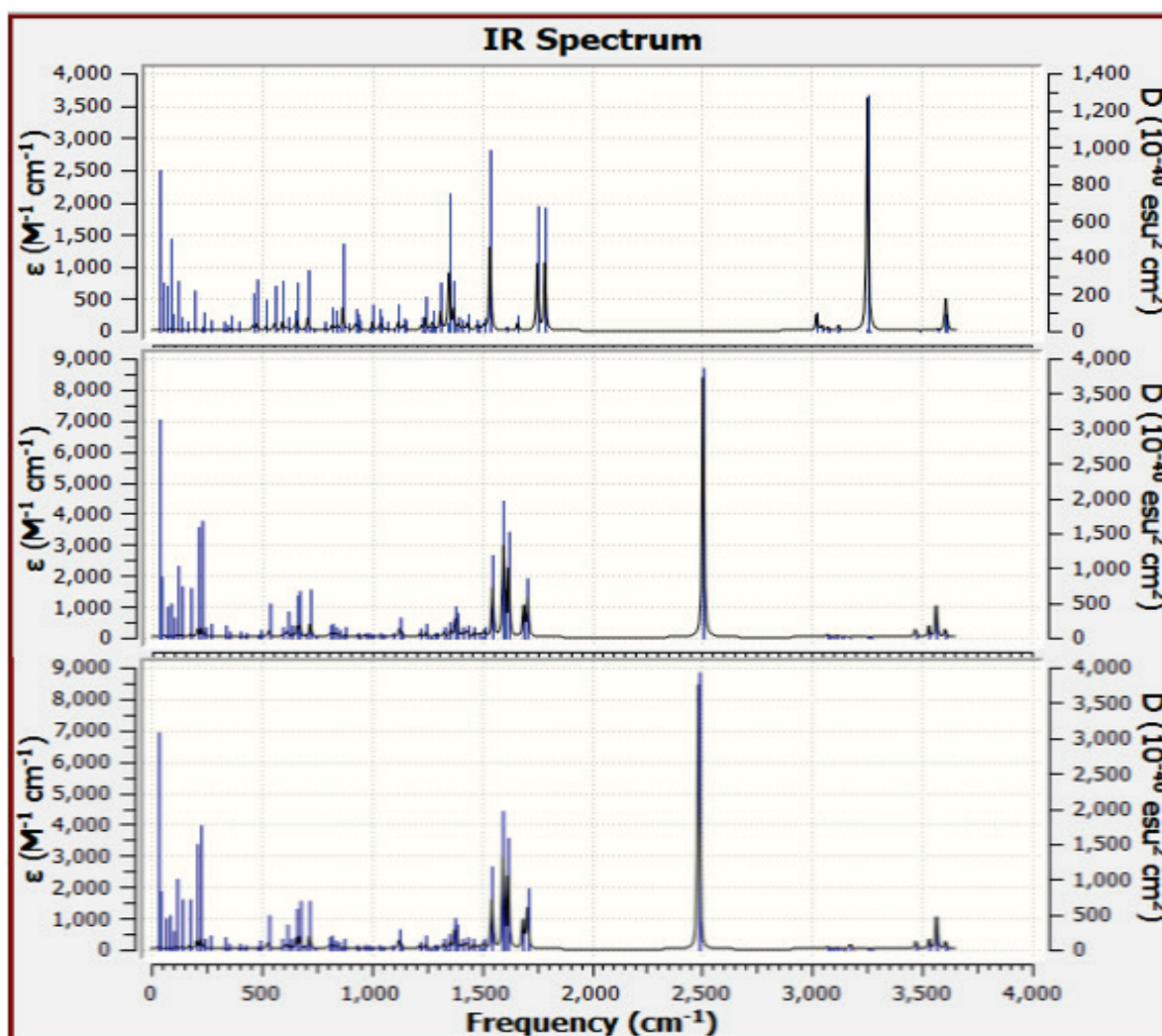


Рисунок 4. Теоретические ИК- спектры цвиттерионной молекулы карнозина в таутомерной форме N¹H для газовой (сверху), водной (в середине) и ДМСО (снизу) сред, полученные методом DFT/6-31+G(d,p)

произошли электронные переходы. Красный цвет на рисунке указывает на присутствие электронов (отрицательный заряд), а зеленый - на отсутствие электронов (положительный заряд).

Во всех средах на НОМО орбиталях данного конформера цвиттериона карнозина загруженным оказывается гистидиновый остаток, причем в основном оккупированными оказываются имидазольное кольцо и примыкающая к нему CH_2 группа, а также небольшая электронная плотность располагается на атомах пептидной группы и над связью $\text{C}_{15}\text{C}_{18}$. В водной среде и в ДМСО загруженность наблюдается и на атомах кислорода карбоксильной группы. При переходе с НОМО на LUMO орбиталь полностью освобождается имидазольное кольцо гистидина и ближайшая к нему CH_2 группа, а электронная плотность переходит на β -аланиновый остаток карнозина: полностью загруженными оказываются атомы N_1 , N_3 и N_4 со стороны N конца дипептида, следующие две группы CH_2 и атомы пептидной группы. В растворителях загруженность пептидной группы LUMO орбитали увеличивается. Как видим, переходы электронной плотности носят схожий характер для НОМО и LUMO орбиталей в разных средах. Однако имеется существенное различие в окраске этих орбиталей в газовой фазе и в растворителях: расположенные в одних и тех же областях молекулы НОМО и LUMO орбитали при переходе от газа к растворителям меняют красный цвет на зеленый и наоборот. В обоих растворителях картинка орбиталей имеют одинаковый вид.

На рисунке 3 представлены карты молекулярного электростатического потенциала (МЕР) цвиттериона карнозина в таутомерной форме N^1H , рассчитанные методом DFT/B3LYP/6-31+G(d,p) в газе, воде и ДМСО. Они имеют аналогичный вид, активными центрами реактивности цвиттериона карнозина во всех средах являются атомы кислорода пептидной и карбоксильной групп, а также атом азота N-конца дипептида. Однако в газовой среде, ввиду отщепления в процессе оптимизации атома водорода от концевой группы NH_3^+ и присоединения его к группе COO^- , цвет между атомами O_{22} и H_2 становится зеленым, реактивность этого участка в газовой фазе исчезает, что подтверждает образование ковалентной связи.

На рисунке 4 приведены рассчитанные на том же уровне теории теоретические ИК спектры для газовой (сверху), водной (в середине) и ДМСО (снизу) сред цвиттериона карнозина в таутомерной форме N^1H . Видим, что в воде и ДМСО спектры имеют очень похожий вид, а спектр в газовой фазе значительно отличается. Наиболее интенсивной полосой в растворителях является полоса в области 2500 см^{-1} , а в газовой среде наиболее интенсивна полоса 3254 см^{-1} . Анимация этих полос показывает, что обе частоты соответствуют колебаниям атома водорода H_2 N-конца дипептида. В газовой фазе в колебании частотой 3254 см^{-1} принимает также участие атом кислорода O_{22} карбоксильной группы.

Полученные результаты могут оказаться полезными в процессе поиска новых нетоксичных лекарственных препаратов.

Список литературы / References:

1. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.*, 2013, vol. 93, pp. 1803-1845, doi: 10.1152/physrev.00039.2012.
2. Болдырев А.А. Проблемы и перспективы исследования биологической роли карнозина. *Биохимия*, 2000, т. 65, № 7, с. 884-890 [Boldyrev A.A. Problems and prospects of research of the biological role of carnosine. *Biokhimiya*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 884-890 (In Russ.)].
3. Hipkiss A.R. Chapter 3: Carnosine and Its Possible Roles in Nutrition and Health. *Advances in Food and Nutrition Research.*, 2009, vol. 57, pp. 87-154, doi: 10.1016 / S1043-4526 (09) 57003-9.
4. Gallant S., Kukley M., Stvolinsky S., Bulygina E., Boldyrev A. Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, pp. 85-99, doi: 10.1620/tjem.191.85.
5. Prokopieva V.D., Yarygina E.G., Bokhan N.A., Ivanova S.A. Use of carnosine for oxidative stress reduction in different pathologies. *Oxid Med Cell Longev.*, 2016, no. 29390872016, doi: 10.1155/2016/2939087.
6. Caruso G., Fresta C.G. et al. Carnosine prevents $\text{A}\beta$ -induced oxidative stress and inflammation in microglial cells: A key role of $\text{TGF-}\beta 1$. *Cells*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 64-86, doi: 10.3390/cells8010064.
7. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*, 2020, vol. 52, no. 3, pp. 329-360, doi: 10.1007/s00726-020-02823-6.
8. Hipkiss A.R. COVID-19 and Senotherapeutics: Any Role for the Naturally-occurring Dipeptide Carnosine? *Aging Dis.*, 2020, vol.11, no. 4, pp. 737-741, doi: 10.14336/AD.2020.0518.
9. Saadah L.M., Deiab G.I.A., Al-Balas Q., Basheti I.A. Carnosine to Combat Novel Coronavirus (nCoV): Molecular Docking and Modeling to Cocrystallized Host Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Viral Spike Protein. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 23, pp. 5605-5619, doi: 10.3390/molecules25235605.
10. Diniz F.C., Hipkiss A.R., Ferreira G.C. The Potential Use of Carnosine in Diabetes and Other Afflictions Reported in Long COVID Patients. *Front Neurosci.*, 2022, vol. 16, p. 898735, doi: 10.3389/fnins.2022.898735.
11. Bennet S., Kaufmann M. et al. Small-molecule metabolome identifies potential therapeutic targets against COVID-19. *Sci Rep.*, 2022, vol. 12, no. 1, p. 10029, doi: 10.1038/s41598-022-14050-y.
12. Caruso G. Unveiling the Hidden Therapeutic Potential of Carnosine, a Molecule with a Multimodal Mechanism of Action: A Position Paper. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 10, p. 3303, doi: 10.3390/molecules27103303.
13. Matsukura T., Tanaka H. Applicability of Zinc Complex of L-Carnosine for Medical Use. *Biochemistry (Mosc.)*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 817-823.
14. Jain S., Kim E.S. et al. Comparative cerebroprotective potential of d- and l-carnosine following ischemic stroke in mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 9, pp. 3053-3065, doi: 10.3390/ijms21093053.

15. Zhao J., Posa D.K. et al. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids*, 2019, vol. 51, no. 1, pp. 123-138, doi: 10.1007/s00726-018-2676-6.
16. Petersmann A., Müller-Wieland D. et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 2019, vol. 127, iss. S01, pp. S1-S7, doi: 10.1055/a-1018-9078.
17. Riedl E., Pfister F. et al. Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell Physiol Biochem.*, 2011, vol. 28 no 2, pp. 279-288, doi: 10.1159/000331740.
18. Peters V., Zschocke J., Schmitt C.P. Carnosinase, diabetes mellitus and the potential relevance of carnosinase deficiency. *J Inherit Metab Dis.*, 2018, vol. 41, no. 1, pp. 39-47, doi: 10.1007/s10545-017-0099-2.
19. Kiliś-Pstrusińska K. Carnosine, carnosinase and kidney diseases. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, vol. 66, pp. 215-221.
20. Zhao J., Shi L., Zhang L.-R. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. *Exp. Ther. Med.*, 2017, vol. 14, no. 1, pp. 664-670, doi: 10.3892/etm.2017.4571.
21. Calon F., Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2007, vol. 77, no. 5-6, pp. 287-293, doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.019.
22. Bermúdez M.L., Seroogy K.B., Genter M.B. Evaluation of carnosine intervention in the Thy1-aSyn mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2019, vol. 411, pp. 270-278, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.026.
23. Gaunitz F., Hipkiss A.R. Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids*, 2012, vol. 43, no. 1, pp. 135-142, doi: 10.1007/s00726-012-1271-5.
24. Oppermann H., Faust H., Yamanishi U., Meixensberger J., Gaunitz F. Carnosine inhibits glioblastoma growth independent from PI3K/Akt/mTOR signaling. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 6, e0218972, doi: 10.1371/journal.pone.0218972.
25. Shen Y., Yang J., Li J., Shi X., Ouyang L., Tian Y., Lu J. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 8, e104632, doi: 10.1371/journal.pone.0104632.
26. Zhang Z., Miao L., Wu X., Liu G., Peng Y., Xin X., Jiao B., Kong X. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric carcinoma cells by retarding Akt/mTOR/p70S6K signaling. *J. Cancer.*, 2014, vol. 5, pp. 382-389. doi: 10.7150/jca.8024.
27. Lee J., Park J.R., Lee H., Jang S., Ryu S.M., Kim H., Kim D., Jang A., Yang S.R. L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- κ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 2018, vol. 54, pp. 505-512, doi: 10.1007/s11626-018-0264-4.
28. Hsieh S.-L., Li J.-H., Dong C.-D., Chen C.-W., Wu C.-C. Carnosine suppresses human colorectal cancer cell proliferation by inducing necroptosis and autophagy and reducing angiogenesis. *Oncol Lett.*, 2022, vol. 23 no. 2, p. 44, doi: 10.3892/ol.2021.13162.
29. Chuang C.-H., Hu M.-L. L-Carnosine Inhibits Metastasis of SK-Hep-1 Cells by Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Induction of an Antimetastatic Gene, nm23-H1. *Nutr Cancer*, 2008, vol. 60, no. 4, pp. 526-533, doi: 10.1080/01635580801911787.
30. Hsieh S.-L., Hsieh S., Lai P.-Y., Wang J.-J., Li C.-C., Wu C.-C. Carnosine suppresses human colorectal cell migration and intravasation by regulating EMT and MMP expression. *Am J Chin Med*, 2019, vol. 47, no. 2, pp. 477-494, doi: 10.1142/s0192415x19500241.
31. Wu C.-C., Lai P.-Y., Hsieh S., Cheng C.-C., Hsieh S.-L. Suppression of carnosine on adhesion and extravasation of human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.*, 2019, vol. 39, no. 11, pp. 6135-6144, doi: 10.21873/anticancer.13821.
32. Rybakova Y. S., Boldyrev A. A., Effect of Carnosine and Related Compounds on Proliferation of Cultured Rat Pheochromocytoma PC-12 Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, vol. 154, no. 1, pp. 136-140, doi: 10.1007/s10517-012-1894-2.
33. Hipkiss A.R., Baye E., de Courten B. Carnosine and the processes of ageing. *Maturitas*, 2016, vol. 93, pp. 28-33, doi: 10.1016/j.maturitas.2016.06.002.
34. Cararo J.H., Streck E.L., Schuck P.F., da C. Ferreira G. Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders. *Aging and Disease*, 2015, vol. 6, no. 5, pp. 369-379, doi: 10.14336/AD.2015.0616.
35. Kawahara M., Tanaka K.-I., Kato-Negishi M. Zinc, Carnosine, and Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 147-167, doi: 10.3390/nu10020147.
36. Shao L., Li Q., Tan Z. L-Carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, vol. 324, no. 2, pp. 931-936, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.136.
37. Rashid I., van Reyk D.M., Davies M.J. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro. *FEBS Lett.*, 2007, vol. 581 no. 5, pp. 1067-1070, doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.082.
38. Caruso G., Fresta C.G. et al. Carnosine Counteracts the Molecular Alterations A β Oligomers-Induced in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Molecules*, 2023, vo. 28, pp. 3324-3338, doi: 10.3390/molecules28083324.
39. Демухамедова С.Д. Теоретическое квантово-химическое моделирование структуры и свойств дипептида карнозина методом DFT. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 2, с. 241-250, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0509 [Demukhamedova S.D. Theoretical quantum-chemical simulation of the structure and

properties of carnosine dipeptide by the DFT method. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2022, vol. 7, no 2, pp. 241-250 (In Russ.)].

40. Akverdieva G.A., Alieva I.N., Hajiyevev Z.I., Demukhamedova S.D. Spatial structure of N¹H and N³H tautomers of carnosine in zwitterion form. *AJP Fizika*, 2021, vol. XXVII, no. 2, section: En, 2021, pp. 29-37.

41. Baran E.J. Metal complexes of carnosine. *Biochemistry*, 2000, vol. 65, no.7, pp. 789-797.

42. Frisch M.J. et al. Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

43. Dennington R., Keith T., Millam J. Gauss View, Version 6.0.16. Shawnee, Kansas: Semichem Inc., Shawnee Mission, 2016.

44. Itoh H., Yamane T., Ashida T. Carnosine (β -Alanyl-L-histidine). *Acta Cryst.*, 1977, vol. B33, pp. 2959-2961, doi: 10.1107/S0567740877009972.

45. Koopmans T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*, 1934, vol. 1, no. 1-6, pp. 104-113, doi: 10.1016/s0031-8914(34)90011-2.

46. Weinhold F., Landis C.R. Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective. Cambridge University Press, 2005.

THEORETICAL STUDY OF THE CARNOSINE N¹H TAUTOMER IN THE ZWITTERIONIC FORM

Demukhamedova S.D., Akverdieva G.A.

Institute for Physical Problems, Baku State University

Z. Khalilov st.23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan, e-mail: svetlanabest@mail.ru

Received 16.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0603

Abstract. In the present work, the spatial and electronic structures of the lowest energy conformation of the carnosine N¹H tautomer in the zwitterionic form, which has a wide range of applications, have been studied. The calculations were performed by the DFT quantum-chemical method based on the B3LYP hybrid functional and the 6-31+G(d,p) basis set in gas, water, and DMSO using the Gaussian 09 and GaussView 6.0.16 programs. The geometry parameters, values of electronic energy, dipole moments, values of partial charges on atoms, HOMO and LUMO energies, descriptors of reactivity of a molecule were calculated and NBO analysis is carried out. The molecular electrostatic potential (MEP) maps and frontier orbitals were visualized. The structural and electronic rearrangements in the molecule and changes in various parameters depending on the dielectric constant of the medium were analyzed. It was found that the influence of the solvent does not play a significant role for this structure, very similar results were obtained for the aqueous medium and DMSO. However, the optimization of the geometry of this carnosine zwitterion tautomer in the gas phase, led to the elimination of the hydrogen atom from the terminal NH₃⁺ group and its addition to the COO⁻ group, actually converting the zwitterionic form into a neutral one.

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

АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ В МОДЕЛИРОВАНИИ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

Ковалёв А.И.¹, Пузановский К.В.²

¹ Самарский государственный университет им. академика Королёва
ул. Московское шоссе, 34, г. Самара 443086, РФ; e-mail: anatologykovalev22041870@gmail.com

² Кубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар 350040, РФ; e-mail: puzanovsky.kv@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0604

Аннотация. В работе рассматриваются математические модели эволюции новых биологических видов от общего предка, в зависимости от приспособляемости к окружающей среде при наличии того или иного признака в генотипе. Представлены уравнения, описывающие изменение численности особей с доминантным и рецессивным признаком с учётом их плодовитости. Также произведён расчёт времени, за которое популяция вида расходует жизненно необходимые ресурсы окружающей среды. В рамках данной модели исследован темп роста популяции в условиях нехватки пищевого источника. Представлена и описана математическая модель роста численности вида, границы применимости и методы её продолжения с использованием уравнений, описывающих фактор снижения популяции из-за резких изменений в окружающей среде. В статье приведены критерии применимости критических точек одной математической модели как начальные условия для другой. Результаты расчетов, могут быть использованы в рамках популяционной генетики, а также для экологических исследований. На их основе можно выдвигать предположения о возможности дальнейшего эволюционного развития биологического вида.

Ключевые слова: Движущие силы эволюции, математическое моделирование, появление новых видов от общего предка, эффект «Бутылочного горлышка»

На сегодняшний день известно множество проявлений, возникающих в процессе эволюции животного мира: идиоадаптация, ароморфоз, конвергентная эволюция и т.д. Благодаря труду палеонтологов и генетиков науке известны некоторые основы формирования адаптивных органов у животных различных видов [1]. А современные успехи генетики привели к тому, что для многих видов животных стали известны цепочки филогенетических преобразований органов и их функций [12].

Но, в связи с невозможностью реализации некоторых экспериментальных условий (большая продолжительность во времени, точность определения возраста окаменелостей по геохронологической шкале и т.д.), переходные процессы образования новых видов изучены не в полной мере [8,9].

Рассмотрим переходные процессы, на основе их математической модели. Для оптимизации математических расчётов применяется К-стратег с малым количеством или вовсе полным отсутствием естественных врагов (рис. 1).

Пусть α – среднее количество потомков у одной особи, m_1 и m_2 – вероятность дожить до половой зрелости, имеющей доминантный и рецессивный признак соответственно. Для математической модели были выбраны особи с кривой выживаемости 1 (рис. 1). То есть, можно считать, что вероятность для вида дожить до начала репродуктивного возраста примерно равна вероятности дожить и до его окончания.

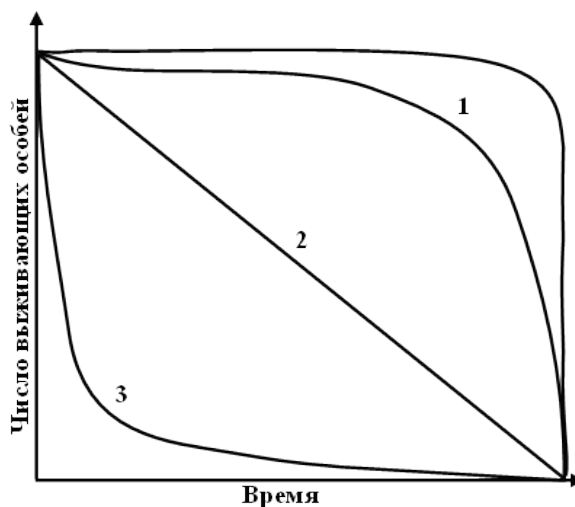


Рисунок 1. Кривые выживания; 1 – Выпуклая кривая смертность в основном происходит по естественным причинам (Человек *Homo Sapiens*), 2 – смертность постоянна на протяжении всей жизни (Гидра *Hydra Vulgaris*), 3 – Смертность высока на ранних стадиях (Устрица *Crassostrea angulata*)

При этом будем считать, что по рассматриваемому гену не наблюдается кодоминирования. В этом случае численность популяции будет выражаться следующей системой уравнений (1).

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = (\alpha m_1 - 1)n_1 \\ \frac{dn_2}{dt} = (\alpha m_2 - 1)n_2 \end{cases} \quad (1)$$

где n_1 и n_2 – численность популяции с доминантным и рецессивным признаком.

Но такая закономерность никак не выражает связь между особями, обладающими разными признаками. Чтобы учесть этот факт, введём в систему уравнений (1) положительные коэффициенты β и λ , показывающие меру взаимодействия между особями с разными признаками.

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = (\alpha m_1 - 1)n_1 + \beta n_2 \\ \frac{dn_2}{dt} = (\alpha m_2 - 1)n_2 - \lambda n_1 \end{cases} \quad (2)$$

А также введем в (2) компонент учёта взаимодействия вида с внешней средой. Для этого используем функцию F , имитирующую внешний источник энергии для вида. Если источник энергии (питания) восполняется с постоянной скоростью, то его можно представить в виде линейной функции. Тогда предположим, что изменение количества особей пропорционально оставшейся энергии [6], и система уравнений в таком случае будет представлена в следующем виде:

$$\begin{cases} F(t) = a + bt - n_1 - n_2 \\ \frac{dn_1}{dt} = (\alpha m_1 - 1)n_1 \cdot F(t) + \beta n_2 \\ \frac{dn_2}{dt} = (\alpha m_2 - 1)n_2 \cdot F(t) - \lambda n_1 \end{cases} \quad (3)$$

Если решение системы уравнений (2) будет представлять собой функции экспоненциального роста, то решение системы (3) будет представлять собой кривые, указанные на рисунке 2.

Для параметров, указанных к рис. 2 время, за которое будут исчерпаны источники энергии приблизительно $\tau = 3,95$. Так как данный параметр будет очень важен при дальнейших расчётах, то далее будем называть его «временем истощения ресурса».

При непосредственном наблюдении и контроле популяции невозможно проверить или вычислить с достаточной точностью параметры β и λ . Поэтому имеет смысл, при этих фиксированных параметрах менять значения $\alpha m_1 - 1$ и $\alpha m_2 - 1$ и получить для них время истощения ресурсов. Изобразим полученные значения на графике (рис. 3).

Для упрощения расчётов было ограничено время истощения ресурсов до величины $t = 25$. Из графика на рисунке 3 видно, что при высоком воспроизведении особей с рецессивным и доминантным признаком ресурсы исчерпываются быстро. При этом если плодовитость особей с доминантным геном очень низка, то при любой (в изображённом диапазоне) репродуктивности особей с рецессивным геном питательные ресурсы не растрачиваются полностью.

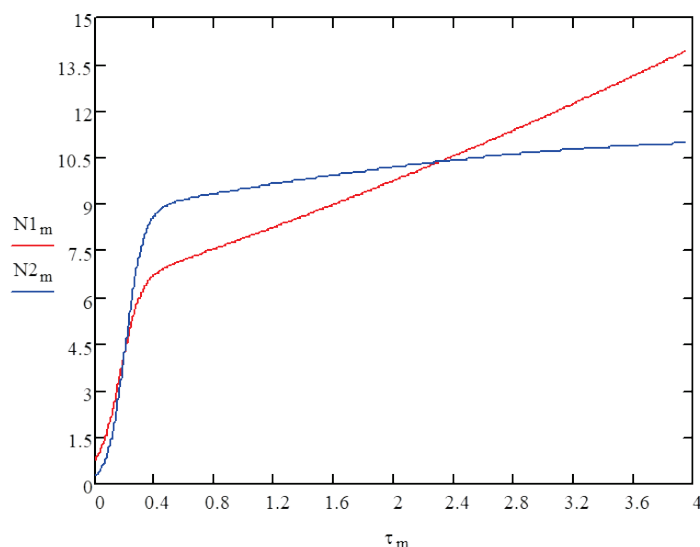


Рисунок 2. Изменение числа особей с доминантным (N_1) и рецессивным (N_2) признаками во времени (условная единица времени – 750 поколений). При $N_1(0) = 0,75$, $N_2(0) = 0,25$, $a = 15$, $b = 10$, $\alpha m_1 - 1 = 3$, $\alpha m_2 - 1 = 5$. $\beta = \lambda = 0,4$

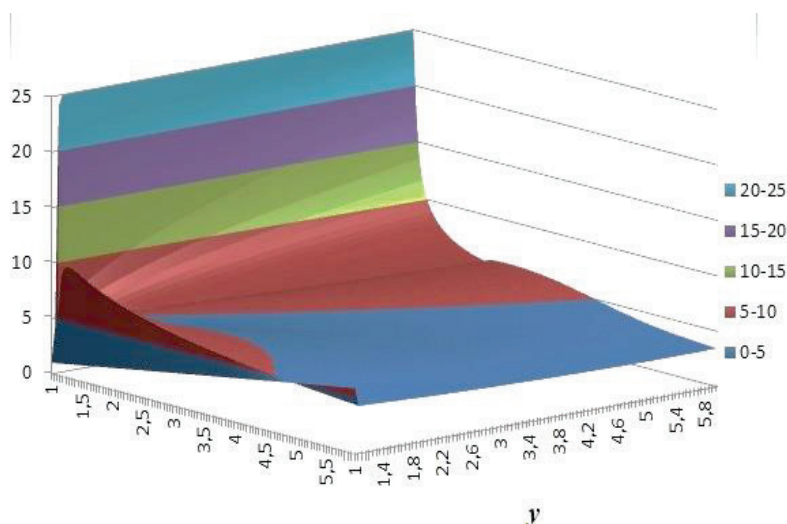


Рисунок 3. График изменения времени истощения ресурса в у.е. (1 у.е. – 750 поколений). Параметры, аналогичные с данными для (рис. 2). Зависимость от величин $(at_1 - 1)$ – неподписанная ось и $(at_2 - 1)$ – ось y

Так как в работе основной акцент делается на переходные процессы, то рассмотрим, что должно будет происходить в промежутке времени, близком к моменту полного истощения питательных ресурсов (рис. 3).

При критической нехватке ресурсов у особей с разными признаками (наличие или отсутствие которого влияет на выживание вида) есть два возможных варианта поведения [1,8]:

1) особи с разными признаками неизбежно начнут конкурировать между собой, что неизбежно по закону Гаузе [3];

2) особи с одним из «удачных» признаком найдут новые источники питания (сменят рацион, найдут другие ореолы обитания).

В любом из представленных вариантов в долгосрочной перспективе продолжение рода либо снизится до нуля, либо произойдет эволюционирование подвидов, приспособленных к изменённым условиям жизни [9].

При эмиграции особей в другую среду обитания, и как следствие потери конкурентов в лице своих сородичей, или имеющих на территории бывшего ареала обитания естественных врагов, популяции будет выгоднее сместиться ближе к r -стратегии, что при разделении вида окажет влияние на их поведенческие паттерны [5,7].

Если же ресурсы заканчиваются, но особи не мигрируют, то численность популяции сокращается или остаётся постоянной [3]. Такое равновесие сложно поддерживать в течение длительного промежутка времени, и любые сдвиги в окружающей среде могут иметь губительные последствия. Тогда при резких изменениях в окружающей среде будет наблюдаться эффект «бутылочного горлышка» [4]. В рамках математической модели (3) этот эффект не учитывается потому, что событие, влияющее на снижение роста популяции должно резко изменить условия обитания [10], а то время, за которое истощаются пищевые ресурсы происходит медленно.

Но в рамках математической модели можно точно выделить момент времени, когда ресурсы будут истощены. Это даёт возможность проанализировать скорость их сокращения и в определённом приближении считать подходящим для последующего наблюдения эффекта «бутылочного горлышка» [11].

Чтобы понять насколько это приближение будет верно, необходимо рассмотреть и проанализировать недостатки построенной математической модели. При $F(t \geq \tau)$ скорость роста функции очень велика, что лишает смысл рассматриваемого процесса. Для того чтобы иметь возможность анализировать точность предсказываемой модели применим для него анализ устойчивости. При изучении динамических систем часто используют показатель Ляпунова. В теории динамических систем он показывает насколько быстро две сколь угодно близкие траектории «удаляются» друг от друга [2]. Для системы (3) показатель Ляпунова примет вид:

$$\mu = \lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{1}{2t} \ln \left(\left(\frac{\partial n_1}{\partial t} \right)^2 + \left(\frac{\partial n_2}{\partial t} \right)^2 \right). \tag{4}$$

Как уже было сказано, для математической модели (3) после времени τ происходит быстрый рост, не соответствующий действительности. И параметр Ляпунова с точки зрения описания биологических процессов теряет свою практическую значимость. Что не даёт никакой информации для изучения роста популяции и поведения видов. В таком случае более информативным параметром будет такое число.

$$\mu = \lim_{t \rightarrow \tau-0} \frac{1}{2t} \ln \left(\left(\frac{\partial n_1}{\partial t} \Big|_{\tau-0} \right)^2 + \left(\frac{\partial n_2}{\partial t} \Big|_{\tau-0} \right)^2 \right). \tag{5}$$

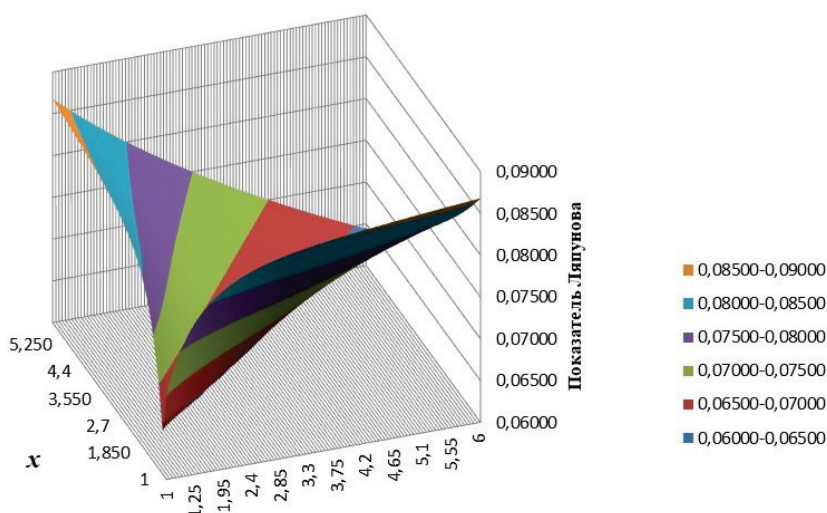


Рисунок 4. Зависимость показателя Ляпунова, рассчитанного по формуле (5) от параметров $(am_1 - 1)$ – ось x и $(am_2 - 1)$ – неподписанная ось

Теперь параметр μ в формуле (5) является показателем экспоненты роста популяции около момента времени истощения ресурса (см. рис.4).

На рисунке 4 очевидна незначительность величины показателя μ , из чего можно сделать вывод о низком росте (на уровне статистической погрешности) популяции на тот момент времени, когда поглощаемые ресурсы заканчиваются, что соответствует действительности [13].

Теперь для математической модели можно увеличить её прогнозируемую точность. Если, например, необходимо исследовать переходные процессы, то в точке $t = \tau$ можно задать начальные условия для дифференциальных уравнений, описывающих переходные процессы [5,13].

В работе неоднократно был приведен такой эффект в эволюции видов, как эффект «бутылочного горлышка». Математическая модель с её описанием будет выглядеть следующим образом:

$$\frac{dn}{dt} = rn \left(1 - \frac{n(t-\tau_0)}{\mathfrak{K}} \right) (Y - n(t - \tau_0)), \quad (6)$$

где n – общая численность особей, r – репродуктивный потенциал, τ_0 – запаздывающая регуляция, Y – порог численности, \mathfrak{K} – параметр экологической ниши [4].

При этом, учитывая граничные условия и определения некоторых параметров из (6), можно заключить, что:

$$\begin{cases} n(0) = n_1(t = \tau) + n_2(t = \tau) \\ r = \frac{am_1 n_1(t = \tau) + am_2 n_2(t = \tau)}{n_1(t = \tau) + n_2(t = \tau)} \\ Y = a + bt \end{cases} \quad (7)$$

Но для вычисления параметров τ_0 и \mathfrak{K} необходимы дополнительные сведения. Формула (6) это лишь одно из множества уравнений, описывающих данный эффект для исследования устойчивости выживания вида. Она интересна тем, что описывает бифуркацию на коротких промежутках времени [4,10,11], что вполне применительно к математической модели (3) соответствия развития нескольких видов из одного общего предка.

Подытоживая представленные выше результаты, можно заключить, что для более детального статистического и математического описания появления новых видов необходимо исследовать бифуркации в уравнениях, описывающих биологические процессы [10,11]. При расхождении теоретической модели с данными наблюдений имеет смысл задать численные параметры у критических значений как начальные условия для более точной математической модели.

Список литературы / References:

1. Любич Ю.И. Основные понятия и теоремы эволюционной генетики свободных популяций. *Успехи математических наук*, 1971, т. 26, № 5(161), с. 51-116 [Lyubich Yu.I. Basic concepts and theorems of evolutionary genetics of free populations. *Successes of Mathematical Sciences*, 1971, vol. 26, no. 5(161), pp. 51-116 (In Russ.)].
2. Atassi A.N., Khalil H.K. A separation principle for the stabilization of a class of nonlinear systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1999, vol. 44, no. 9, pp. 1672-1687.
3. Рассадина Е.В., Антонова Ж.А. *Экология популяций и сообществ*. Учебно-методическое пособие, 2015 [Rassadina E.V., Antonova Zh.A. *Ecology of populations and communities*. Teaching aid, 2015 (In Russ.)].

4. Переварюха А.Ю. Сценарии прохождения состояния «бутылочного горлышка» инвазионным видом в новой модели динамики численности популяции. *Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика*, 2018, т. 26, № 5, с. 63-80 [Perevaryukha A.Yu. Scenarios for the passage of the “bottleneck” state by an invasive species in a new model of population dynamics. *Izvestiya of higher educational institutions. Applied nonlinear dynamics*, 2018, vol. 26, no. 5, pp. 63-80 (In Russ.)].
5. Переварюха А.Ю. Сценарии осцилляций и гибели в новой непрерывной модели эруптивной фазы инвазии чужеродного вида. *Математическая физика и компьютерное моделирование*, 2019, № 1 [Perevaryukha A.Yu. Scenarios of oscillations and mortality in a new continuous model of the eruptive phase of invasion of an alien species. *Mathematical physics and computer modeling*, 2019, no. 1 (In Russ.)].
6. Трубецков Д.И. Феномен математической модели Лотки-Вольтерры и сходных с ней. *Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика*, 2011, т. 19, № 2, с. 69-88 [Trubetskov D.I. Phenomenon of the mathematical model of Lotka-Volterra and similar ones. *Izvestia of higher educational institutions. Applied nonlinear dynamics*, 2011, vol. 19, no. 2, pp. 69-88 (In Russ.)].
7. Caplat P., Coutts S., Buckley Y.M. Modeling population dynamics, landscape structure, and management decisions for controlling the spread of invasive plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, vol. 1249, no. 1, pp. 72-83.
8. Hamilton M.B. *Population genetics*. John Wiley & Sons, 2021.
9. Hartl D.L., Clark A.G., Clark A.G. *Principles of population genetics*. MA: Sinauer associates, 1997, vol. 116, 542 p.
10. Henson S.M. Nonlinear population dynamics: models, experiments and data. *J. theor. Biol.*, 1998, vol. 194, pp. 1-9.
11. Barros L.C., Bassanezi R.C., Tonelli P.A. Fuzzy modelling in population dynamics. *Ecological modelling*, 2000, vol. 128, no. 1, pp. 27-33.
12. Peach M.B., Rouse G.W. Phylogenetic trends in the abundance and distribution of pit organs of elasmobranchs. *Acta Zoologica*, 2004, vol. 85, no. 4, pp. 233-244.
13. Переварюха А.Ю. Моделирование флуктуаций агрессивных чужеродных видов в непрерывных моделях с независимой регуляцией. *Вестник Самарского университета. Естественнонаучная серия*, 2018, № 4 [Perevaryukha A.Yu. Modeling fluctuations of aggressive alien species in continuous models with independent regulation. *Bulletin of Samara University. Natural Science Series*, 2018, no. 4 (In Russ.)].

STABILITY ANALYSIS IN SIMULATION OF EVOLUTIONARY PROCESSES

Kovalev A.I.¹, Puzanovsky K.V.²

¹ Samara State University

Moscovskoje shosse str., 34, Samara, 443086, Russia, e-mail: anatologykovalev22041870@gmail.com

² Kuban State University

Stavropol'skaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia, e-mail puzanovsky.kv@yandex.ru

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0604

Abstract. The paper considers mathematical models of the evolution of new biological species from a common ancestor, depending on the adaptability to the environment in the presence of a particular trait in the genotype. Equations describing the change in the number of individuals with dominant and recessive traits, taking into account their fertility, are presented. The calculation of the time for which the population of the species consumes vital environmental resources has also been made. Within the framework of this model, the growth rate of the population in conditions of a shortage of a food source is investigated. A mathematical model of the population growth of the species, the limits of applicability and methods of its continuation using equations describing the factor of population decline due to sudden changes in the environment are presented and described. The article presents criteria for the applicability of critical points of one mathematical model as initial conditions for another. The results of the calculations can be used in the framework of population genetics, as well as for environmental studies. On their basis, it is possible to make assumptions about the possibility of further evolutionary development of a biological species.

Key words: *Driving forces of evolution, mathematical modeling, emergence of new species from a common ancestor, bottleneck effect.*

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.

НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Абрикосовский пер., 2, г. Москва, 119991, ГСП-1, РФ; e-mail: rodich_k@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0605

Аннотация. В последние годы в мире отмечен значительный рост числа заболеваний, связанных с нарушениями функционирования иммунной системы. Одной из главных причин этого можно считать загрязнение окружающей среды эндокринными дисрапторами. Наиболее распространенным на планете дисраптором является ДДТ. Отмечается повсеместное содержание его в продуктах питания, воде и почве, что делает изучение воздействия его фоновых доз на организм крайне актуальным. Системное потребление низких доз дисраптора ДДТ приводит к значительным изменениям структурных и функциональных характеристик тимуса крыс, которые проявляются усилением гибели лимфоцитов и ретикулоэпителиоцитов, в механизмах гибели которых задействован р53-зависимый путь апоптоза, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов, т.е. способно оказывать иммунотоксическое действие на организм. Эти данные показывают, что максимальные допустимые уровни содержания ДДТ в продуктах питания не являются безопасными для иммунной системы организма.

Ключевые слова: дисраптор, ДДТ, тимус, апоптоз, пролиферация, иммунная система.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в мире отмечен значительный рост числа заболеваний, связанных с нарушениями функционирования иммунной системы. Многие исследователи сходятся во мнении, что одной из главных причин этого можно считать загрязнение окружающей среды эндокринными дисрапторами [1,2]. Согласно определению, данному ВОЗ, эндокринные дисрапторы – это вещества, которые нарушают один или несколько параметров функционирования эндокринной системы и тем самым оказывают негативное влияние на организм или его потомство, либо популяцию [3]. Исследователями был проявлен большой интерес к проблеме эндокринных дисрапторов, но большинство работ посвящено эстрогеноподобным, антиандрогенным и антитиреоидным веществам. Наименее изученным вопросом является как прямое, так и опосредованное влияние дисрапторов через эндокринную систему на развитие и функционирование иммунной системы. Исследование влияния эндокринных дисрапторов на развитие органов иммунной системы приобретают важное значение для понимания механизмов нарушений иммунитета, защитных реакций и адаптации организма. Наиболее распространенным на планете дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Это связано как с его массивным использованием в прошлом, так и с длительным периодом полураспада и способности к биоаккумуляции в организмах животных и человека. Его воздействие на человека оказывается в первую очередь через потребление продуктов питания. Благодаря низкой молекулярной массе и высокой липофильности он легко проникает через плаценту и гистогематические барьеры, также экскретируется с молоком, что обеспечивает постоянное воздействие дисраптора на всех этапах развития организма [4,5]. В связи с повсеместным распространением ДДТ его содержание в продуктах питания, воде, почве, воздухе регламентировано нормативными документами [6]. Этот факт делает актуальной проблему изучения влияния разрешенных МДУ доз эндокринного дисраптора на организм человека и животных и, в частности, на иммунную систему.

Целью работы было изучение функциональных и структурных изменений тимуса крыс, вызванных воздействием системного потребления различных низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=32) с массой тела 80-100г (питомник «Столбовая»). Животных были разделены на 3 группы: 1 контрольную и 2 опытные. Доступ к воде и пище у крыс был свободным. Животные опытных групп (n=22) вместо воды получали растворы о,п-ДДТ («Sigma», США) с концентрацией 20 и 80 мкг/л. Учет потребляемой жидкости производили ежедневно. Выбор потребляемой дозы ДДТ производили с учетом нормативов содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации (СанПин 2.3.2.1078-01. – 2008). Животные контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Среднесуточное потребление ДДТ крысами составило $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг в группе, получавшей раствор ДДТ 20 мкг/л, и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг в группе, получавшей раствор 80 мкг/л. Животных выводили из эксперимента через 10 недель с помощью передозировки золетила («Virbac Sante Animale», Франция). После стандартной гистологической проводки с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jg» («Hygesc», Франция) изготавливали срезы с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Leica DM2500» и компьютерной морфометрии с помощью программы «ImageScope» («Leica Microsystems,

GMBH, Австрия). В гистологических препаратах тимуса определяли соотношение коркового и мозгового веществ, ширину субкапсулярного слоя, количество тимических телец в мм² площади среза мозгового вещества, оценивали количество ретикулярных эпителиоцитов, входящих в их состав, и стадии развития телец (1-я стадия – сближение нескольких ретикулярных эпителиоцитов с повышенной оксифилией цитоплазмы; 2-я стадия – концентрическое наложение ретикулярных эпителиоцитов и накопление в них кератина; 3-я стадия – формирование полости в центре тельца; 4-я стадия – распад тимического тельца). Проводили иммуногистохимическое исследование экспрессии белка p53 тимоцитами с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Также определяли спонтанную пролиферативную активность тимоцитов и пролиферацию в реакции бласттрансформации радиоизотопным методом с использованием 3H-тимидина. В качестве митогена использовали Конканавалин А («Sigma», США). Конечная концентрация Конканавалина А после внесения в культуру клеток составила 5 мкг/мл. Индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации (ИБ) определяли по формуле: ИБ = А/Б, где А – Конканавалин А – стимулированная пролиферация клеток, Б – пролиферация клеток в среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тимус контрольной группы крыс через 10 недель после начала эксперимента имел типичное дольчатое строение. Дольки тимуса были покрыты капсулой. Доля коркового вещества составляла 76,4±1%, мозгового – 23,6±1%. В корковом слое хорошо визуализировался субкапсулярный слой, образованный плотно лежащими лимфобластами. В мозговом веществе отмечались единичные тимические тельца.

В тимусе крыс 1 опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе 1,890±0,086 мкг/кг/сут в течение 10 недель соотношение площади коркового и мозгового вещества статистически значимо не изменилось. Однако в корковом веществе были отмечены участки опустошения, говорящие о гибели лимфоцитов. Процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. p53-позитивные клетки располагались диффузно в корковом, а также группами в мозговом веществе. Количество тимических телец в мозговом веществе также соответствовало значению контрольной группы, однако число ретикулоэпителиоцитов в их составе статистически значимо увеличилось (таблица. 1). Доля тимических телец на ранних стадиях развития также увеличилась. Было отмечено снижение спонтанной пролиферативной активности тимоцитов и повышение пролиферативного ответа на митоген (таблица 1).

В тимусе крыс 2 опытной группы, потреблявших раствор ДДТ в дозе 7,77±0,17 мкг/кг/сут в течение 10 недель, статистически значимо изменилось соотношение коркового и мозгового слоев (рис. 1). Также было отмечено уменьшение ширины субкапсулярного слоя по сравнению со значением контрольной группы (табл. 1). В корковом слое имелись участки гибели лимфоцитов. Количество тимических телец в мозговом веществе не менялось, однако среднее количество ретикулоэпителиоцитов в них увеличилось (табл. 1). И, в отличие от контрольной группы, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец. Экспрессия белка p53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и 1 опытной группой. p53-позитивные тимоциты обнаруживались в корковом и мозговом веществе, отмечалось усиление экспрессии в субкапсулярном слое. Показатели пролиферативной активности тимоцитов и индуцированная пролиферация при этом значительно снизились (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

После 10 недель потребления ДДТ в меньшей дозе, гибель ретикулярных эпителиоцитов в мозговом слое была более выражена, чем в контрольной группе за счет увеличения количества клеток, образующих тимические тельца. Однако, процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. В отличие от контрольной группы, где p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно, в группе, потреблявшей ДДТ в дозе 1,89±0,086 мкг/кг/сут в течение 10 недель, клетки, экспрессирующие белок p53, располагались диффузно в корковом веществе, а также группами

Таблица 1. Изменения морфометрических показателей тимуса и пролиферативной активности клеток тимуса при воздействии различных низких доз ДДТ в течение 10 недель (M±m).

	Ширина субкапсул. слоя, мкм	Кол-во тим. телец в 1мм ² мозг. вещества	Кол-во клеток в тим. тельцах	Включение ³ H-тимидина, имп/мин	Индукц. пролиферация
Контрольная группа	44,22±1,19	1,84±0,29	3,61±0,10	10557,88 ±845,12	2,27±0,11
1 опытная группа	41,61±1,79	2,42±0,47	5,34±0,21*	7163,57±67,00	13,4±0,7*
2 опытная группа	39,35±1,44*	2,42±0,23*	5,01±0,20*	4605,05 ±154,95*+	1,24±0,20*+

* – статистически значимые отличия от контрольной группы, + – 2ой опытной группы от 1ой

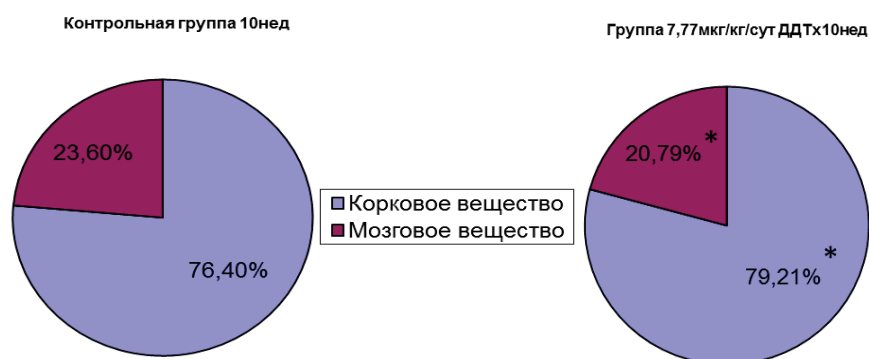


Рисунок 1. Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса крыс контрольной группы, и опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель

в мозговом веществе. Соотношение коркового и мозгового вещества не изменялось и не отличалось от значений контрольной группы. Тем не менее, отмечалось прогрессивное снижение ширины субкапсулярного слоя, в результате чего, этот показатель был ниже, чем в контрольной группе. Данный факт объясняется значительной гибелью лимфобластов на более раннем сроке исследования данной дозы ДДТ, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов в данной опытной группе, что не дало возможности восстановить численность клеток в субкапсулярном слое. Стоит также отметить, что в данной дозе исследования значительно увеличилась ответная реакция тимоцитов на введение митогена на фоне пониженной спонтанной пролиферативной активности, что не типично для клеток тимуса [7].

В тимусе крыс, потреблявших более высокую дозу ДДТ, имелись признаки усиления гибели лимфоцитов. Экспрессия белка p53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и опытной группой аналогичного срока исследования, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. p53-позитивные тимоциты обнаруживались в корковом и мозговом веществе, а также отмечалось увеличение их количества в субкапсулярном слое, что вместе со значительным снижением пролиферативной активности в данной группе, привело к снижению толщины слоя лимфобластов. Значительные изменения отмечались также и в строме тимуса. Увеличилось количество гибнущих ретикулярных эпителиоцитов за счет увеличения как числа тимических телец, так и количества клеток в них. При этом только в данной опытной группе, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец. Значительная гибель ретикулярных эпителиоцитов привела к уменьшению доли мозгового вещества в тимусе крыс данной группы и указывает на возможное нарушение секреции тимических гормонов и созревания Т-лимфоцитов. Данный факт говорит о негативном влиянии малых доз ДДТ на функционирование центрального органа иммунной системы тимуса, а, следовательно, может быть причиной нарушения реакций в первую очередь клеточного иммунитета, также как и при действии субтоксических доз ДДТ [8].

ВЫВОДЫ

Наше исследование показало, что системное потребление низких доз дисраптора ДДТ приводит к значительным изменениям структурных и функциональных характеристик тимуса крыс, которые проявляются усилением гибели лимфоцитов и ретикулоэпителиоцитов, в механизмах гибели которых задействован p53-зависимый путь апоптоза, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов, т.е. способно оказывать иммунотоксическое действие на организм. Эти данные показывают, что максимальные допустимые уровни содержания ДДТ в продуктах питания не являются безопасными для иммунной системы организма.

Список литературы / References:

1. Timokhina E.P., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Dichlorodiphenyltrichloroethane and the Adrenal Gland: From Toxicity to Endocrine Disruption. *Toxics*, 2021, vol. 9, no. 10, p. 243, doi: 10.3390/toxics9100243.
2. Gore A.C., Chappell V.A., Fenton S.E., Flaws J.A., Nadal A. et al. EDC-2, The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.*, 2015, vol. 36, pp. E1-E150, doi: 10.1210/er.2015-1010.
3. *World Health Organization*. 2006. Preventing disease through healthy environments - towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva: World Health Organization.
4. Bouwman H., Becker P.J., Cooppan R.M., Reinecke A.J. Transfer of DDT used in malaria control to infants via breast milk. *Bull. World Health Organ.*, 1992, vol. 70, pp. 241-250.
5. Salone L.R., Vann W.F., Dee D.L. Breastfeeding: an overview of oral and general health benefits. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2013, vol. 144, pp. 143-151.
6. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб: ГИОРД, 2015, 176 с. [Technical Regulations of the Customs Union TR CU 021/2011 "On food safety". St. Petersburg: GIORД, 2015, 176 p. (In Russ.)].

7. Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов. *Иммунология*, 2003, № 2, с. 117-127 [Yarilin A.A. Age-related changes in thymus and T-lymphocytes. *Immunology*, 2003, no. 2, pp. 117-127 (In Russ.)].
8. Udoji F. et al. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. *J. Immunotoxicol.*, 2010, vol. 7, no. 3, pp. 205-212.

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHANGES IN THE RAT THYMUS INDUCED BY DIFFERENT DOSES OF ENDOCRINE DISRUPTOR

Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.

Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery"

Tsyurupy str., 3, Moscow, 117418, Russia; e-mail: rodich_k@mail.ru

Received 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpc.2023.0605

Abstract. In recent years, there has been a significant increase in the number of diseases associated with impaired functioning of the immune system in the world. One of the main reasons for this can be considered environmental pollution by endocrine disruptors. The most common disruptor on the planet is DDT. Its ubiquitous content in food, water and soil is noted, which makes the study of the effect of its background doses on the body extremely relevant. Systemic consumption of low doses of the disruptor DDT leads to significant changes in the structural and functional characteristics of the rat thymus, which are manifested by increased death of lymphocytes and reticuloepitheliocytes, in the mechanisms of death of which the p53-dependent pathway of apoptosis is involved, as well as a decrease in the proliferative activity of thymocytes, i.e., it is capable of having an immunotoxic effect on the body. These data show that the maximum permissible levels of DDT in food are not safe for the body's immune system.

Key words: *disruptor, DDT, thymus, apoptosis, proliferation, immune system.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Набережных Г.А., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: naber1953@mail.ru
Поступила в редакцию 14.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0606

Аннотация. Выделены и очищены липополисахарид-связывающие белки из двух массовых видов медуз *Aurellia aurita* и *Ropelema asamushi* и изучено взаимодействие липополисахаридов (ЛПС) разных структурных типов с ЛСБ. Ингибированием взаимодействия установлено, что оба белка специфически связываются с липидным и коровым фрагментами молекулы ЛПС. В ЛСБ присутствует два типа сайтов связывания с $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$ М и $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$ М (для белка из *A. aurita*) и $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$ М и $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$ М (для белка из *R. asamushi*). Методом динамического рассеяния света показано, что связывание ЛСБ с R-ЛПС приводит к диссоциации мицелл ЛПС. Размеры агрегатов ЛПС уменьшаются с 200 нм до 25-30 нм в составе комплексов ЛПС-ЛСБ. Данные электрокинетических измерений указывают на нейтрализацию отрицательного заряда R-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ- *R. asamushi* до -4,4 мВ. Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ, что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС. Связывание ЛПС с ЛСБ может оказывать влияние на их эндотоксические свойства.

Ключевые слова: липополисахарид, липополисахарид связывающие белки, параметры связывания, дезагрегация.

ВВЕДЕНИЕ

Система врожденного иммунитета беспозвоночных включает огромную популяцию антимикробных пептидов и белков, распознающих и связывающих липополисахариды (ЛПС) (эндотоксины) грамотрицательных бактерий [1]. Липополисахарид-связывающие белки (ЛСБ) могут взаимодействовать с разными участками молекулы ЛПС: О-специфическим полисахаридом, олигосахаридом кора, содержащем остатки 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), и липидом А, который представляет собой фосфорилированный и ацилированный дисахарид D-глюкозамина и является токсическим центром молекулы. Установлено, что ЛСБ синтезируются в различных тканях беспозвоночных, но максимальный уровень их обнаруживается в клетках крови. Эти белки являются индуцибельными. Экспрессия их значительно возрастает уже через несколько часов после инфицирования животных грамотрицательными бактериями или введения ЛПС. Хотя ЛСБ широко представлены в разных видах морских беспозвоночных, в настоящее время они выделены лишь из сравнительно небольшого числа видов, в основном из ракообразных и моллюсков тропических морей.

ЛСБ беспозвоночных могут быть разделены на 4 группы в соответствии с их структурными особенностями: анти-ЛПС факторы (ALF) [2], большие дифенсины (Big-Def) [3], бактерицидные/увеличивающие проницаемость белки (BPI) [4] и ЛПС- и β -1,3-глюкан-связывающие белки (LGBP) [5]. Большинство изученных ЛСБ беспозвоночных – положительно заряженные амфифильные мономерные белки с молекулярной массой от 10 до 50 кДа, обнаружены также высокомолекулярные ЛСБ (до 170 кДа).

Природные ЛСБ могут стать прототипами лекарственных препаратов для терапии сепсиса, а также новых антибиотиков широкого спектра действия, способных решить проблему резистентности к существующим антимикробным средствам. Как правило, ЛСБ проявляют значительную антимикробную и мембранотропную активности. ЛСБ, способные нейтрализовать токсические свойства эндотоксинов, представляют большой интерес как потенциальные препараты для борьбы с эндотоксемией и сепсисом. Как правило, ЛСБ проявляют значительную антимикробную и мембранотропную активности. Природные ЛСБ могут стать прототипами лекарственных препаратов для терапии сепсиса, а также новых антибиотиков широкого спектра действия, способных внести вклад в решение проблемы резистентности бактерий к антимикробным средствам.

Ранее нами был выявлен целый ряд морских беспозвоночных северных морей, принадлежащих к разным систематическим группам, которые могут быть перспективными источниками для выделения ЛПС-связывающих белков [6]. Из медузы *Aurelia aurita* выделен катионный пептид, обладающий антимикробными и мембраносвязывающими свойствами антибактериальными свойствами, который потенциально может взаимодействовать с ЛПС [7]. Нами были исследованы массовые виды медуз Японского моря *A. aurita* и *Rhopilema asamushi* на присутствие в них ЛСБ и разработан метод выделения этих белков. С помощью катионообменной хроматографии были выделены и очищены несколько белков, обладающих ЛПС-связывающей активностью [8]. ЛПС связывающая активность была обнаружена во фракциях, элюированных в области градиента с 1М NaCl, что свидетельствует о высоком положительном заряде белков этой фракции. В активной фракции из обеих медуз обнаруживаются, в основном, белки с кажущейся молекулярной массой 110 кДа.

По литературным данным при взаимодействии ЛСБ с ЛПС происходят структурные изменения высокомолекулярных агрегатов ЛПС. Встраивание ЛСБ в агрегаты ЛПС приводит к изменению надмолекулярной структуры эндотоксина. Индуцированная белком конверсия мономеллярной, кубической

или смешанной мономеллярной/кубической структуры ЛПС и липида А в мультимеллярную рассматривается как необходимое условие инактивации ЛПС [9]. В настоящей работе проведено исследование взаимодействия ЛПС различных типов (S; S, R; R) с ЛСБ из двух видов медуз, установлено влияние ЛСБ на размер агрегатов ЛПС и определены параметры связывания с ЛСБ. Сайты связывания на молекулах ЛСБ специфичны к отрицательно заряженным участкам молекулы ЛПС: липиду А и олигосахариду кора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ЛСБ. Медуз собирали в Уссурийском заливе Японского моря в летний сезон и хранили при -18°C . Лизаты мезоглеи *R. asamushi* и *A. aurita* получали в результате трех циклов замораживания-оттаивания. Нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием, надосадочную жидкость концентрировали на мембране ультрафильтрацией с пределом исключения 3 кДа (Millipore, США) и диализовали против ФСБ (0,01 М фосфат, 0,15 М NaCl, pH 7,5). Изолированный ЛСБ получали катионообменной хроматографией на колонке Source 15S с помощью хроматографической системы FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) и элюцией 1М NaCl согласно процедурам, описанным в работе [8]. Концентрацию общего белка определяли по методу Брэдфорд [10] с использованием кристаллического бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Выделение различных форм липополисахаридов. R,S-ЛПС из *Yersinia pseudotuberculosis* выделяли по методике [11]. Образцы S-ЛПС *Escherichia coli* 055 B5 и R-ЛПС *E. coli* K-12 были приобретены Флюка (Германия).

Получение меченых флуоресцеином и биотином ЛПС. Получение ЛПС, меченых флуоресцеином и биотином. Образцы 30 мг ЛПС *E. coli* 055 B5 растворяли в 1 мл воды. Для введения аминогрупп в полисахаридную часть ЛПС добавляли 20 мг бромистого циана в 50 мкл ацетонитрила. Смесь инкубировали 10 мин и добавляли этилендиамин (30 мг на 1 мл 0,02 М NaHCO_3). После 60-минутной инкубации смеси раствор диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали. В результате было получено 25 мг амино-ЛПС.

Для введения аминогрупп в молекулу 30 мг ЛПС *E. coli* 055 B5 растворяли в 1 мл воды, добавляли 20 мг бромистого циана в 50 мкл ацетонитрила. Смесь инкубировали 10 мин и добавляли этилендиамин (30 мг на 1 мл 0,02 М NaHCO_3). После 60-минутной инкубации смеси раствор диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали. В результате было получено 25 мг амино-ЛПС.

Для синтеза меченого флуоресцеином липополисахарида (Ф-ЛПС) 20 мг амино-ЛПС растворяли в 3 мл 0,02 М NaHCO_3 (pH 9,5), добавляли раствор 4 мг флуоресцеинизотиоцианата (Sigma, США) в 0,25 мл диметилсульфоксида. и смесь инкубировали в течение ночи при 37°C . Реакционную смесь подвергали диализу в течение 48 ч против воды и затем лиофилизировали. Для синтеза меченого флуоресцеином липополисахарида (Ф-ЛПС) 20 мг амино-ЛПС растворяли в 3 мл 0,02 М NaHCO_3 (pH 9,5) и добавляли 4 мг флуоресцеинизотиоцианата (Sigma, США) в 0,25 мл диметилсульфоксида. Смесь инкубировали в течение ночи при 37°C , диализовали в течение 48 ч против воды и затем лиофилизировали.

Для введения биотина к 6 мг амино-ЛПС в 1 мл 0,1 М NaHCO_3 (pH 8,3) добавляли 1 мг N-гидроксисукцинимидного эфира биотин амидогексановой кислоты (Sigma, США), растворенного в 0,1 мл диметилсульфоксида. Смесь инкубировали в течение 16 ч при 37°C . Полученный меченый биотином ЛПС (Б-ЛПС) диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали.

Лиганд-ферментный твердофазный анализ (ЛФТА). В лунки микропланшета PolySorp (Nunc, США) добавляли 200 мкл (20 мкг/мл) объединенных фракций ЛСБ после катионообменной хроматографии, инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Лунки трижды промывали ФСБ (pH 7,5) с добавлением 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и блокировали 0,1% БСА-ФСБ в течение 2 ч при 37°C . Лунки, заполненные 100 мкл ФСБ -Т с добавлением 0,1% БСА, использовали в качестве отрицательного контроля. Планшеты промывали ФСБ -Т, в лунки добавляли по 100 мкл раствора Б-ЛПС в разных концентрациях (0,08–2,0 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C . После инкубации планшеты промывали ФСБ-Т, добавляли конъюгат пероксидазы хрена (HRP) и стрептавидина Sigma Chemical (США) в разведении 1: 1000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C . Связанный конъюгат определяли по активности пероксидазы с использованием 100 мкл/лунку раствора субстрата (0,4 мг/мл о-фенилендиамина (о-ФДА) и 0,01% H_2O_2 в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере (pH 5,0)). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 0,2 М H_2SO_4 (50 мкл/лунку). Поглощение при 492 нм измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов ($\mu\text{QuantBio-TekInstrument, Inc.}$, США) и наносили на график связывания ЛПС-ЛСБ средние значения трехкратных измерений. Данные связывания анализировали с использованием модифицированного графика Скэтчарда для ELISA, как описано в работе [12]. Для описания взаимодействия между ЛСБ и ЛПС была применена модель связывания на двух независимых участках белковой молекулы:

$$\frac{r}{[S]} = \frac{n_1 K_1}{1 + K_1 [C_{\text{ЛПС}}]} + \frac{n_2 K_2}{1 + K_2 [C_{\text{ЛПС}}]} \quad (1)$$

$$r/[S] = n_1 K_1 / (1 + K_1 [C_{\text{ЛПС}}]) + n_2 K_2 / (1 + K_2 [C_{\text{ЛПС}}]), \quad (2)$$

где r – отношение количества связанного ЛПС к добавленному белку; $[C_{\text{ЛПС}}]$ – концентрация ЛПС; n – количество сайтов связывания на молекуле ЛПС, K_1 и K_2 – константы ассоциации. Рассчитывали значение $\Delta A = A_{\text{exp}} - A_0$, где A_0 и A_{exp} – оптическая плотность растворов до и после добавления ЛПС соответственно. Значения ΔA_{max} и K_b определяли по зависимости Скэтчарда в координатах $\Delta A/C_{\text{ЛПС}}$ от ΔA .

Диссоциация агрегатов ЛПС под действием ЛСБ. Использовали несколько форм липополисахаридов: S-ЛПС (*E. coli* 055), S-R-ЛПС (*Y. pseudotuberculosis*) и R-ЛПС (*E. coli* K12). В Ф-ЛПС флуоресценция ФИТЦ самогасится в мицеллах ЛПС, тогда как диссоциация мицелл приводит к увеличению флуоресценции.

Флуоресценцию Ф-ЛПС регистрировали при возбуждении 480 нм и эмиссии 520 нм. Диссоциацию мицелл ЛПС регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции, возрастающей со временем после добавления ЛСБ.

Дезагрегацию различных форм ЛПС (Rd-ЛПС из *E. coli* K12, S-R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* 598 и S-ЛПС из *E. coli* 055) при взаимодействии с ЛСБ из двух видов медуз так же изучили методом динамического светорассеивания (ДРС) на приборе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенный He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 4 мВт), при угле 173° . Время накопления данных составляло 15–30 мин. Расчет Z-average (среднего гидродинамического радиуса частиц образца) и RH (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их объемного распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS, «Malvern», Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика ЛСБ. Из лизата мезоглеи медуз из *Aurelia aurita* и *Rhopilema asamushi* с помощью катионообменной хроматографии были выделены и очищены несколько ЛСБ с кажущейся молекулярной массой 110 кДа [8]. ЛПС связывающая активность была обнаружена во фракциях, элюированных в области градиента с 1М NaCl, что свидетельствует о высоком положительном заряде белков этой фракции.

Определение параметров связывания ЛПС с ЛСБ медуз. Для изучения взаимодействия ЛПС с белками из двух видов после катионообменной хроматографии использовали лиганд-ферментный твердофазный анализ. ЛСБ медуз с одинаковой концентрации общего белка сорбировали на поверхности полистирольной пластины и титровали меченым биотином ЛПС. Для учета образующихся комплексов использовали конъюгат стрептавидин–пероксидаза хрена. Как видно из рисунка 1а, связывание белков с ЛПС имеет специфический характер, так как достигается насыщение сайтов связывания на белках лигандом.

График Скэтчарда для данных связывания дает двухфазную кривую (рис. 1б), что позволяет предположить, что в ЛСБ присутствует более одного типа сайтов связывания для ЛСБ. Если предположить наличие двух сайтов связывания для ЛПС, то можно рассчитать константу диссоциации для одного класса рецепторов как $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$ М, а для второго класса рецепторов как $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$ М для *A. aurita* и $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$ М и $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$ М для *R. asamushi*. Если предположить наличие двух сайтов связывания для ЛПС, то можно рассчитать величины констант диссоциации. Для ЛСБ *A. aurita* $K_{d1} = 3,28 \times 10^{-6}$ М и $K_{d2} = 0,13 \times 10^{-6}$ М и для ЛСБ из *R. asamushi* $K_{d1} = 3,66 \times 10^{-6}$ М и $K_{d2} = 0,27 \times 10^{-6}$ М. Согласно литературным данным, в ELISA связывающем тесте ЛСБ из белого шримса *Litopenaeus vannamei* имел большую величину $K_d = 1,28 \times 10^{-7}$ М [13].

Ингибирование связывания ЛСБ с ЛПС. Ингибирование связывания проводили, используя изолированный R-ЛПС, свободный липид А и О-специфический полисахарид, чтобы определить фрагменты молекулы ЛПС, участвующие во взаимодействии с ЛСБ. Как R-ЛПС, так и свободный липид А ингибировали связывание ЛСБ из обоих видов медуз с ЛПС дозозависимым, насыщаемым образом для обоих видов медуз (рис. 3а, 3б). Напротив, О-специфический полисахарид (рис. 3а, 3б) слабо ингибирует связывание Б-ЛПС с ЛСБ.

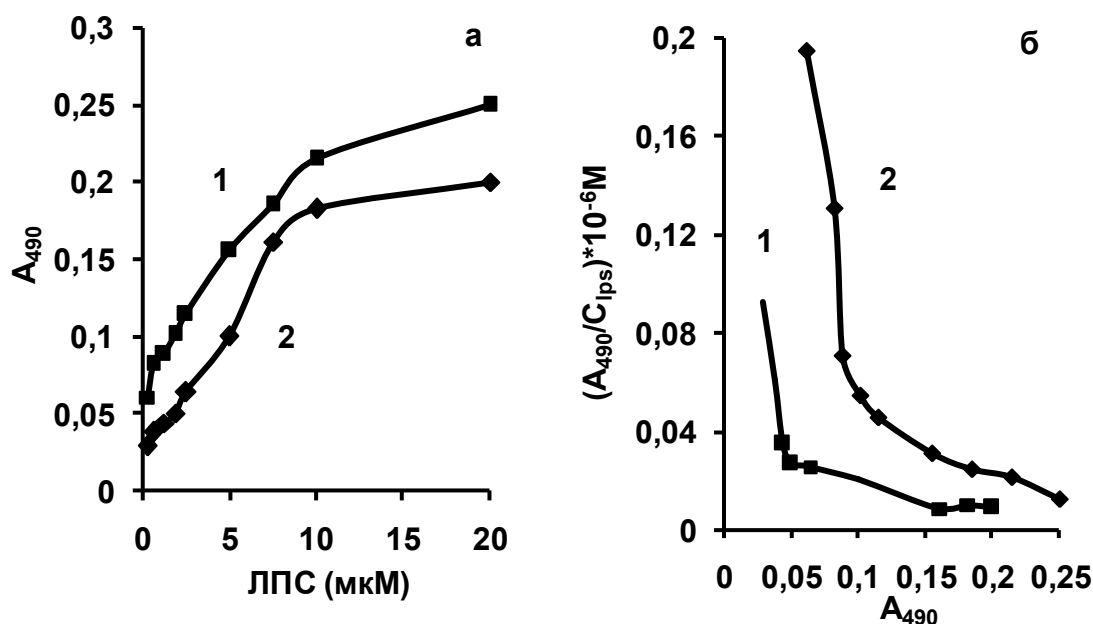


Рисунок 1. Связывание меченого биотином ЛПС с иммобилизованными ЛСБ *Aurelia aurita* (1) и *Rhopilema asamushi* (2). Связывание ЛСБ с Б-ЛПС определяли с помощью HRP-конъюгированного стрептавидина (а). Графики Скэтчарда для взаимодействия ЛСБ с Б-ЛПС (б)

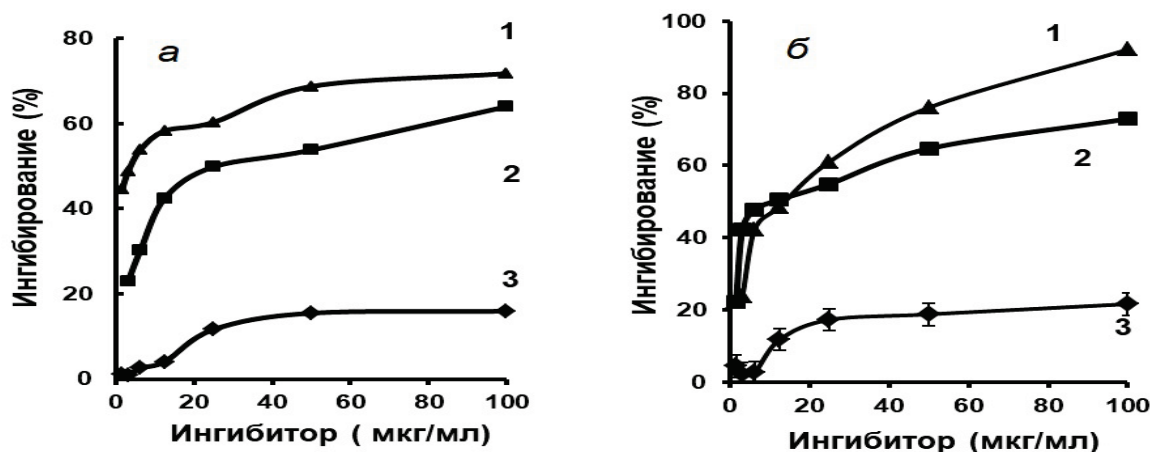


Рисунок 2. Ингибирование связывания Б-ЛПС с ЛСБ из *A. aurita* (а) и *R. asamushi* (б) с помощью Rd-ЛПС (1), свободного липида А (2) и О-PS (3). Результаты представляют средние значения из трех повторений

Это указывает на то, что ЛСБ связываются с липидом А или олигосахаридом кора, которые являются наиболее консервативными компонентами ЛПС.

Диссоциация мицелл ЛПС при взаимодействии с ЛСБ. Способность ЛСБ диссоциировать мицеллы ЛПС изучали флуорометрически с использованием Ф-ЛПС. Использовали следующие формы липополисахарида: S-ЛПС (*E. coli* 055), S,R-ЛПС (*Y. pseudotuberculosis*) и Rd-ЛПС (*E.coli* K12).

Флуоресценция ФИТЦ самогасится в мицеллах Ф-ЛПС, тогда как диссоциация мицелл приводит к увеличению флуоресценции. За диссоциацией мицелл Ф-ЛПС следили по увеличению интенсивности флуоресценции с увеличением времени их инкубации в присутствии ЛСБ. Под действием ЛСБ из медуз обоих видов достаточно эффективно разрушаются мицеллы R-ЛПС, в молекуле которого отсутствуют О-полисахаридные цепи, в то время как мицеллы S, R- и особенно R-ЛПС диссоциируют в гораздо меньшей степени. Полученные результаты, вероятно, объясняются разной доступностью сайтов связывания на молекуле ЛПС для ЛСБ.

Деагрегацию различных форм ЛПС (R_d-ЛПС из *E. coli* K12, S,R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* 598 и S-ЛПС ЛПС из *E. coli* 055) при взаимодействии с ЛСБ из двух видов медуз так же изучили методом динамического светорассеивания. Характер распределения и размер частиц (34 нм и 88,8 нм) R_d-ЛПС в комплексе с ЛСБ из *R. asamushi* указывает на деагрегацию R_d-ЛПС (рис. 4). После связывания с белком исчезают крупные частицы ЛПС с размерами в области 200 нм. Влияние ЛСБ из *A. aurita* на размеры R_d-ЛПС было менее выраженным, хотя связывание белка с ЛПС приводило к появлению частиц размером 100 нм. Данные электрокинетических

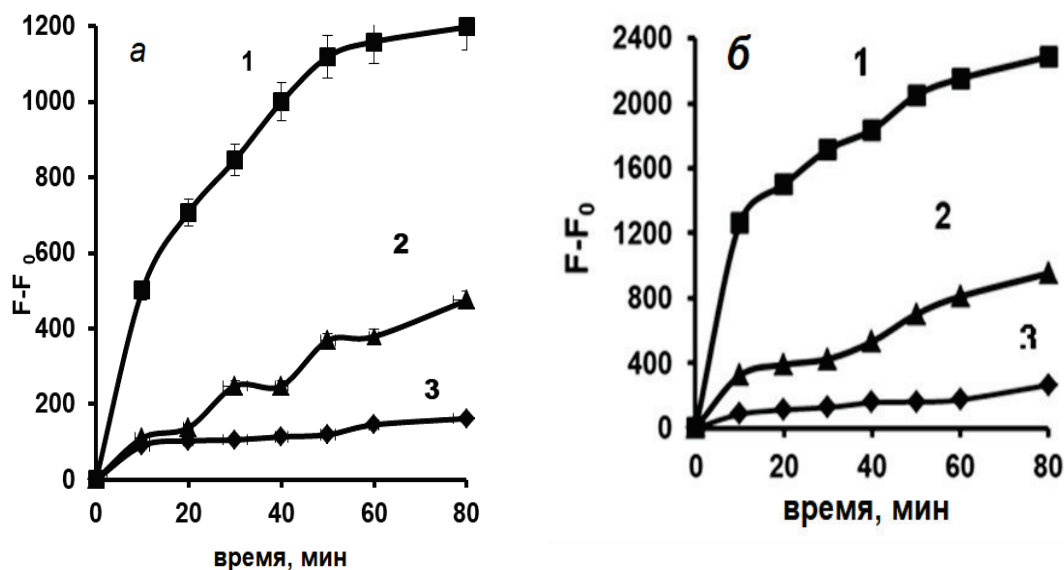


Рисунок 3. Изменение интенсивности флуоресценции конъюгатов ФИТЦ с R_d-ЛПС (1), S,R-ЛПС (2) and S-ЛПС (3) в при добавлении ЛСБ из *A. aurita* (а) и *R. asamushi* (б). Результаты представляют средние значения из трех повторений

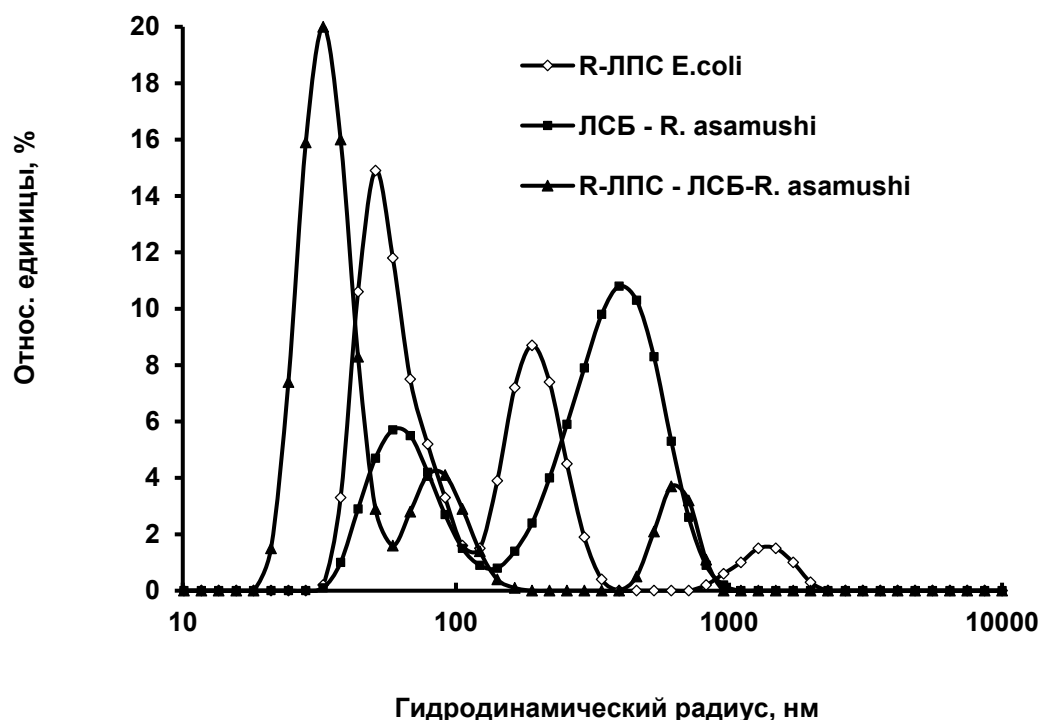


Рисунок 4. Объемное распределение по размеру частиц ЛСБ из *R. asamushi* (1), R_d-ЛПС *E.coli* K12 (2), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R_d-ЛПС (3)

измерений так же указывают на связывание ЛСБ с ЛПС. Происходит нейтрализация отрицательного заряда R_d-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ-*R. asamushi* до -4,4 мВ.

S,R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* дезагрегировал под воздействием ЛСБ из обоих видов медуз (рис. 5а, 5б). В растворе обнаруживаются частицы комплексов ЛПС-ЛСБ размером 25-30 нм и отрицательным зарядом -15-20 мВ, вместо частиц ЛПС размером 138 нм и зарядом -30 мВ. ЛСБ из *R. asamushi* более активен при взаимодействии с ЛПС, чем белок из *A. aurita*.

Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ *R. asamushi* и *A. aurita* (рис. 6а, 6б), что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС.

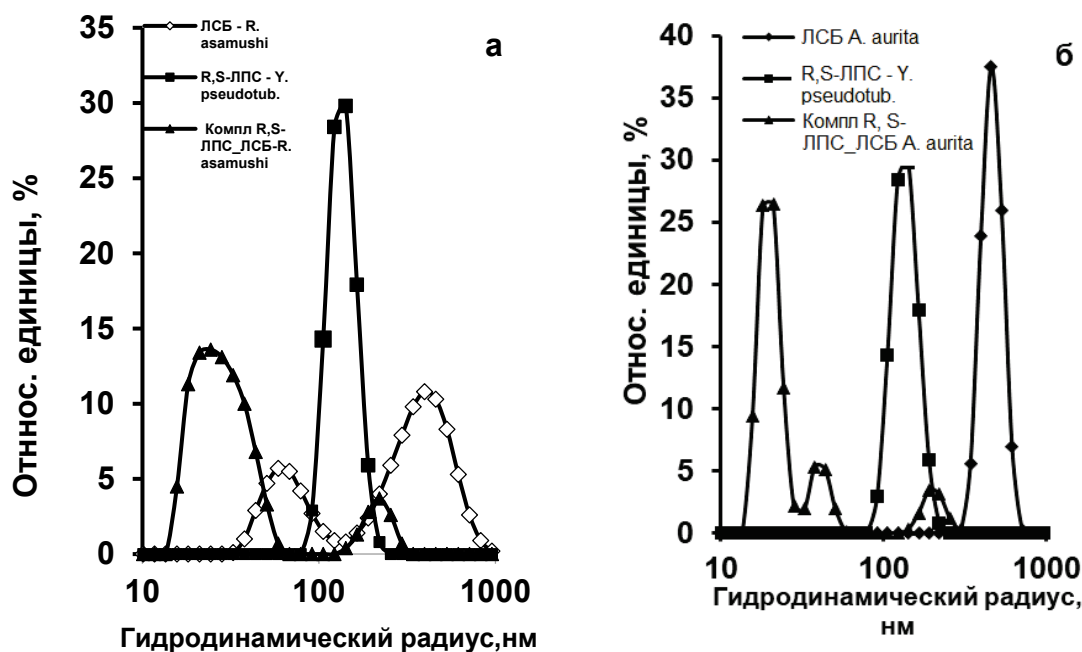


Рисунок 5. Объемное распределение по размеру частиц ЛСБ из *R. asamushi* (1а), *A. aurita* (1б), R,S-ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (2 а,б), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R,S-ЛПС (3 а), *A. aurita* с R,S-ЛПС (3 б)

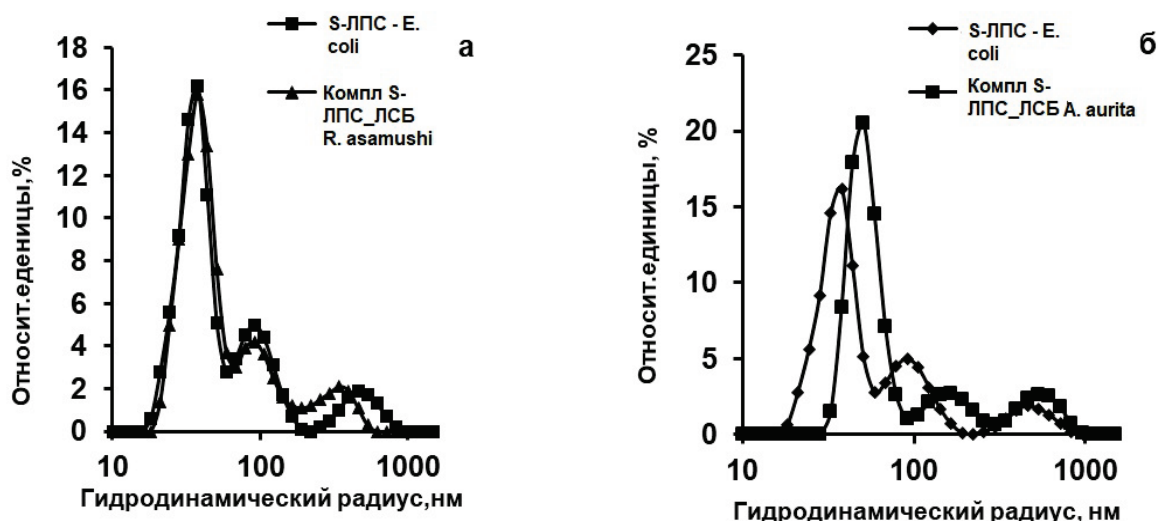


Рисунок 6. Объемное распределение по размеру частиц S-ЛПС *E. coli* K12 (а,б), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R,S-ЛПС (а), *A. aurita* с R,S-ЛПС (б)

Таким образом, изучено взаимодействие ЛПС разных структурных типов с ЛСБ из двух видов медуз *A. aurita* и *R. asamushi*. Оба белка специфически и с высокой аффинностью (K_d порядка 10^{-6} М) связываются с липидным и коровым фрагментами ЛПС. В ЛСБ присутствует два типа сайтов связывания. Связывание ЛСБ приводит к диссоциации мицелл ЛПС. Размеры ЛПС уменьшаются с 200 нм до 25-30 нм в составе комплексов R_d-ЛПС-ЛСБ. Данные электрокинетических измерений указывают на нейтрализацию отрицательного заряда R-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ-Ропилема до -4,4 мВ. Этот факт свидетельствует о том, что электростатические взаимодействия участвуют в образовании комплексов между ЛСБ и ЛПС и что катионная природа белка играет важную роль в этом процессе. Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ, что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС. Связывание ЛПС с ЛСБ может оказывать влияние на их эндотоксические свойства.

Список литературы / References:

- Iwanaga S., Lee B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biology*, 2005, vol. 38, pp. 128-150, doi: 10.5483/bmbrep.2005.38.2.128.
- Warren H.S., Glennon M.L. et al. Binding and Neutralization of Endotoxin by Limulus Antilipopolysaccharide Factor. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 2506-2513, doi: 10.1128/iai.60.6.2506-2513.1992.
- Saito T., Kawabata S.I., Shigenaga T., Takayenoki Y., Cho J., Nakajima H., Hirata M., Iwanaga S. A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes: Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity. *J. Biochem.*, 1995, vol. 117, pp. 131-1137.
- Tobias P.S., Mathison J.C., Ulevitch R.J. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to Gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, pp. 13479-13481.
- Amparyup P., Sutthangkul J., Charoensapsri W., Tassanakajon A. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *J Biol Chem.*, 2016, vol. 291, no. 20, p. 10949, doi: 10.1074/jbc.A111.294744.
- Бахолдина С.И., Набережных Г.А., Горбач В.И., Исаева М.П., Соловьева Т.Ф. Морские беспозвоночные Охотского моря как новые источники липополисахарид связывающих белков. *Биология моря*, 2014, т. 40, № 1, с. 63-69, doi: 10.1134/S106307400906008X [Bakholdina S.I., Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Isaev, M.P., Solov'eva T.F. Marine Invertebrates of the Sea of Okhotsk as a New Source of Lipopolysaccharide Binding Proteins. *Russian J. Mar. Biol.*, 2014, vol. 40, pp. 59-65 (In Russ.)].
- Ovchinnikova T.V., Balandin S.V., Aleshina G.M., Tagaev A.A., Leonova Y.F., Krasnodembsky E.D., Men'shenin A.V., Kokryakov V.N. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, 2006, vol. 348, pp. 514-523, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.078.
- Naberezhnykh G.A. New Lipopolysaccharide Binding Proteins from the Jellyfishes *Aurelia aurita* and *Rhopilema asamushi* of Sea of Japan. *J Marine Biol Aquacult.*, 2017, vol. 3, no. 2, pp. 1-5.
- Andra J., Howe J., Garidel P., Rossle M., Richter W., Leiva-Leon J., Moriyon I., Bartels R., Gutschmann T., Brandenburg K. Mechanism of interaction of optimized Limulus-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.*, 2007, vol. 406, pp. 297-307, doi: 10.1042/BJ2007027936.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quatitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-534, doi: 10.1006/abio.1976.9999.

11. Galanos O. Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, pp. 245-249, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
12. Hogg P.J, Johnston S. Calculation of equilibrium constants for antigen-antibody interactions by solid-phase in immunoassay: the binding of paraquat to its elicited mouse monoclonal antibody. *Mol. Immunol.*, 1987, vol. 24, pp. 797-801, doi: 10.1016/0161-5890(87)90064-2.
13. Chen Y.-Y., Chen J.-C., Kuo Y.-H., Lin Y.-C., Chang Y.-H., Gong H.-Y., Huang C.-L. Lipopolysaccharide and b-1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.*, 2016, vol. 55, pp. 144-151, doi: 10.1016/j.dci.2015.10.023.

INTERACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEINS WITH VARIOUS FORMS OF LIPOPOLYSACCHARIDES.

Naberezhnykh G.A., Davydova V.N., Soloveva T.F.

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

Received 14.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0606

Abstract Lipopolysaccharide-binding proteins from two common jellyfish species *Aurellia aurita* and *Ropilema asamushi* were isolated and purified, and the interaction of lipopolysaccharides (LPS) of various structural types with LBP was studied. By inhibiting the interaction, it was found that both proteins specifically bind to the lipid and core fragments of the LPS molecule. There are two types of binding sites in LBP with $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$ M and $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$ M (for the protein from *A. aurita*) and $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$ M and $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$ M (for protein from *R. asamushi*). It has been shown by dynamic light scattering that the binding of LBP to R-LPS leads to the dissociation of LPS micelles. The sizes of LPS aggregates decrease from 200 nm to 25–30 nm in the composition of LPS–LSB complexes. The data of electrokinetic measurements indicate the neutralization of the negative charge of R_d-LPS (-42,2 mV) in the LPS-LSB-R. *asamushi* complex up to -4,4 mV. S-LPS micelles from *E. coli* do not disaggregate upon binding to LBP, which is apparently due to the shielding of lipid A by O-specific chains in the S-LPS molecule. The binding of LPS to LBP may affect their endotoxic properties.

Key words: lipopolysaccharide, lipopolysaccharide binding proteins, binding parameters, disaggregation.

ОКСИД АЗОТА – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЛОВУШКА АФК. ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Титов В.Ю.^{1,2,3}, Осипов А.Н.¹, Ананкина А.А.¹, Кочич И.И.²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
ул. Островитянова, 1с7, г. Москва, 117513, РФ; e-mail: vtitov43@yandex.ru

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина
ул. Академика Скрябина, 23, г. Москва, РФ

³ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН
ул. Птицеградская, 10, г. Сергиев Посад, Московская область, РФ
Поступила в редакцию 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0607

Аннотация. Показано, что в норме нитрит присутствует в большинстве тканей в концентрации, не превышающей 50 нМ. Но ткани содержат десятки микромоляр соединений – доноров NO. Следовательно, в тканях есть механизмы, предотвращающие окисление NO до нитрита. Соединения-доноры NO спонтанно не распадаются с высвобождением NO. Трансформация NO, включенного в состав соединений доноров, до нитрита и нетиолатных нитрозосоединений ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) происходит под действием активных форм кислорода (АФК) и, прежде всего, супероксида (O_2^-). Последний продуцируется активированными фагоцитами. Таким образом, содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ – очень чувствительный показатель активации фагоцитов – процесса, сопровождающего любое воспаление. В данной работе рассмотрена возможность использования показателя содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ для ранней диагностики заболеваний, носящих воспалительный характер. Показано, что этот показатель обладает большей чувствительностью и специфичностью, чем все известные клинические и биохимические показатели. Это делает его особенно ценным для контроля состояния больных в стационаре, контроля состояния сельскохозяйственных животных. Фактором, ограничивающим использование показателя $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в диагностике является проницаемость тканевых барьеров для этих соединений. Это особенно актуально для контроля состояния плода, а также состояния центральной нервной системы.

Ключевые слова: оксид азота (NO), нитрит и нетиолатные нитрозосоединения ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$), фагоциты, воспаление.

ВВЕДЕНИЕ

Показано, что супероксид (O_2^-) эффективно взаимодействует с оксидом азота (NO), находящимся как в свободной форме, так и в составе соединений – доноров NO: нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [1-3]. Константа скорости – не менее $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [1]. Регистрация продуктов метаболизма NO в живых тканях затруднена тем, что используемые в настоящее время методы имеют либо относительно низкую чувствительность (фотометрические, ЭПР), либо высокую чувствительность, но низкую специфичность (хемилюминесцентный). Кроме того, все эти методы требуют очистку и подготовку образца. В частности, взаимодействия со специфическим реагентом, что требует кислой среды, в которой соединения-доноры NO распадаются и могут быть определены как нитрит [4,5]. Нами разработан ферментный сенсор, основанный на обратимом ингибировании фермента каталазы нитритом и нитрозосоединениями и утрате ими способности ингибировать под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы этих соединений. Мы предполагаем, что непосредственным ингибитором является группа NO^+ , которую эти соединения либо имеют исходно, либо приобретают при взаимодействии с апоферментом [6,7]. Ингибирующий эффект усиливается на два порядка в присутствии хлорида в плазменной концентрации, а также бромида и тиоцианата. Способность ингибировать утрачивается в присутствии ловушки NO (гемоглобина) и ряда соединений, специфичных для каждой группы нитрозосоединений [6,7]. Сенсор позволяет оперативно, без какой-либо подготовки объекта, определить концентрации RSNO, ДНКЖ, а также нитрита (NO_2^-), нетиолатных нитрозосоединений (RNO), высокомолекулярных нитрозосоединений, способных трансформироваться в ДНКЖ (RNO_2) с точностью до 50 нМ [6,7]. При помощи него установлено, что конечные продукты взаимодействия супероксида и соединений – доноров NO (RSNO, ДНКЖ) в физиологических условиях представлены нитритом (NO_2^-) и нетиолатными нитрозосоединениями (RNO). В отсутствие активных форм кислорода (АФК) соединения – доноры NO не продуцируют NO_2^- и RNO, поскольку спонтанно не распадаются с высвобождением NO, который мог бы быть окислен кислородом до нитрита [8]. Нитрит и RNO появляются в крови под действием активатора фагоцитов зимозана. СОД предотвращала их появление. В связи со сравнительно высокой концентрацией доноров NO в тканях, равной десяткам микромоляр, и высокой константе скорости их взаимодействия с O_2^- , у доноров NO в тканях нет эффективных конкурентов за супероксид [5].

В норме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ присутствуют в большинстве тканей в суммарной концентрации, не превышающей 50 нМ [2]. Но во всех случаях клинически идентифицированного воспаления наблюдается появление в плазме $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [9]. Более того, они появлялись задолго до наступления клинических признаков и изменения биохимических показателей, что делает показатель содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ одним из наиболее чувствительных

для ранней диагностики воспаления. И одним из наиболее специфичных: если концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме выше 150 нМ, то однозначно имеет место активация фагоцитов как обязательное звено процесса воспаления. Неактивированные фагоциты не продуцируют супероксид, и содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в связи с этим минимально.

В связи с этим возникают следующие вопросы: можно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о тяжести процесса, и, возможно ли по содержанию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ диагностировать воспаление, носящее локальный характер и не приводящее к генерализованной активации фагоцитов. Это особенно касается контроля за состоянием плода.

В данной статье проведено исследование возможностей использования показателя концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ для диагностики воспалительных заболеваний, в том числе и носящих локальный характер.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовался однозамещенный фосфат калия, цитрат калия, хлорид натрия, трилон Б, пероксид водорода "Лаверна" (Россия), каталаза, нитрит калия, глутатион, L-аргинин, L-нитроаргинин (НА), гемоглобин "Sigma" (США).

Для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ у больных отбиралась кровь в количестве 2 мл. Для предотвращения свертывания крови использован раствор гепарина – 0,1 мл 1% раствора на 10 мл крови. Плазму получали путём центрифугирования образцов на центрифуге ЦУМ-1 при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отделяли от эритроцитов и использовали для определения содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [3,6,9].

Для определения содержания нитро- и нитрозосоединений использовался ферментный сенсор. Он основан на уникальной способности нитрита и других нитрозосоединений, имеющих в составе NO^+ - группу или приобретающую ее под воздействием ряда реагентов, ингибировать каталазу в присутствии галоид – ионов с примерно равной эффективностью, одинаково зависящей от pH среды. Другие известные ингибиторы каталазы не обладают такими особенностями и в норме не встречаются в биообъектах в концентрациях, способных привести артефакты [6,7].

Определение активности каталазы осуществлялось калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение пероксида водорода. Использовалась установка на основе прибора "Dithermanal" (Венгрия). Активность каталазы определялась по величине наклона начального прямолинейного участка кинетики. Концентрация нитрозосоединений определялась по степени ингибирования каталазы, согласно калибровочной кривой, полученной с использованием нитрита в различных концентрациях. [6,7].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) теряют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа (ЭДТА) и ловушку NO (гемоглобин). Именно по этому свойству судили о их наличии и концентрации. Ингибирование каталазы в присутствии хлорида говорит о наличии NO^+ - группы. Эффект хелаторов железа – о связи нитрозо – группы с железом [6,7]. Известно, что S-нитрозотиолы (RSNO) трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа [10]. Нами показано, что S-нитрозотиолы не теряют способности ингибировать каталазу в системе гемоглобин – хелатор железа, но теряют их в такой системе, если предварительно было добавлено закисное железо, так как трансформируются в ДНКЖ и приобретают их свойства [6,7]. S-нитрозотиолы определялись как соединения, трансформирующиеся в ДНКЖ под воздействием закисного железа и тиолов и приобретающие их свойства. Нитрит (NO_2^-) и нитрозоамины ($\text{R}_1\text{R}_2\text{NNO}$), практически, не продуцируют ДНКЖ в нейтральной среде и сохраняют ингибирующие способности при последовательном добавлении гемоглобина, закисного железа, глутатиона и ЭДТА. Их совокупное определение основано на этих свойствах [6,7]. Нитрозильные комплексы железа, не содержащие лиганды, кроме NO, либо содержащие таковые, но с очень низкой константой связывания ($\text{Fe}(\text{NO})_n$), определялись как соединения, исходно лишённые свойства ингибировать каталазу, но приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ после добавления глутатиона в реакционную среду [6,7]. Высокомолекулярные нитрозосоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO_2), определялись как соединения, приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ под воздействием закисного железа и глутатиона [6,7]. Для определения общего пула нитрозосоединений использовалась их способность восстанавливаться треххлористым ванадием до нитрозо – состояния, в котором они приобретают способность ингибировать каталазу. Метод не нуждается в какой-либо предварительной подготовке образца, поскольку не основан на фотометрии.

Чувствительность метода – 50нМ [6,7].

Концентрация гемоглобина также определялась спектрофотометрически, используя $\epsilon_{540} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [7].

В экспериментах использовались образцы крови и цереброспинальной жидкости, полученная от больных на кафедрах хирургии, неврологии, акушерства и гинекологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова. Диагностика преждевременного разрыва плодных оболочек (ППРО) осуществлялась с помощью теста на подтекание околоплодных вод – AmniSure ROM Test, основанного на выявлении во влажностном содержимом плацентарного альфа-1-микроглобулина, присутствующего в норме только в околоплодных водах [11]. Для контроля воспалительных процессов определяли С-реактивный белок, используя иммуноферментный метод для количественного определения *in vitro* С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека. Использован также показатель числа лейкоцитов.

Диагноз ишемический инсульт (ИИ), локализация и объем поражения устанавливались на основании клинической картины и подтверждались результатами КТ или МРТ головного мозга. В контрольную группу входили больные, у которых диагноз ИИ не подтвердился.

Гомогенаты эмбрионов на 14 сутки получали путем обработки содержимого яйца без скорлупы в измельчителе тканей «Oster» (Мексика).

Реакционная среда во всех случаях содержала 40 мМ фосфатный буфер, 158 мМ NaCl, 9,0 нМ каталазы, рН 6,0. Реакция запускалась путем добавления в среду 10 мМ пероксида водорода. Концентрация всех исследуемых соединений в реакционной среде – 0,25 мкМ; добавляемых реагентов: глутатиона (GSH), ЭДТА – 0,5 мМ; гемоглобина (HbO₂) – 100 мкМ; FeSO₄ – 100 мкМ. К 5,0 мкМ раствору исследуемого вещества в 40 мМ фосфатном буфере, рН 6,0 добавлялись реагенты с интервалом в 1 мин. После 5 мин. инкубации раствор переносили в реакционную среду. При этом исследуемое вещество разбавлялось в 20 раз.

Оплодотворенные куриные яйца породы мини-мясная и кросса Хайсекс белый, а также взрослые куры кросса Хайсекс белый получали в ООО «Генофонд». Для разведения вводимых в яйца препаратов использовался стерильный физиологический раствор. Растворы препаратов вводились в яйца за 1 ч. до закладки на инкубацию через воздушную камеру в объеме 0,3 мл. Развитие эмбриона контролировалось путем овоскопии на 5 и 7 дни инкубации. Яйца, в которых не было развития эмбриона или имели место дефекты развития: отставание в развитии, кровь-кольцо, отбраковывались. Для инкубации использовался инкубатор ИПХ-10 (Россия). Температура в инкубационный период – 37,6 С.

В экспериментах на взрослых курах забор крови осуществлялся в состоянии натошак после 16-часового голодания из подкрыльцовой вены в количестве 2-3 мл. В качестве антикоагулянта использовали 3,8%-ный раствор цитрата натрия. Препараты вводились также в подкрыльцовую вену.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT. Данные представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные о содержании нитро- и нитрозосоединений в различных тканях человека и животных. Во всех случаях концентрация нитрита и нитрилатных нитрозосоединений (NO₂⁻ + RNO) ниже детектируемой. Концентрация доноров NO (RSNO, ДНКЖ, Fe(NO)_n, RNO₂) достигает десятков и сотен мкМ. Но даже в объектах с очень высокой концентрацией соединений-доноров NO, таких как амниотическая жидкость курицы и коровы, кровь куриного эмбриона, концентрация NO₂⁻ + RNO ниже 0,05 мкМ. Внутривенное введение аргинина – субстрата синтеза NO, способствовало увеличению концентрации доноров NO в крови курицы в 6 раз в течении 5 минут. Но это не приводило к увеличению концентрации NO₂⁻ + RNO. Применение нитро-аргинина – блокатора NO-синтазы наоборот снижало концентрацию соединений-доноров NO. Но это опять-таки не сказывается на их соотношении и на концентрации NO₂⁻ + RNO (табл. 1).

Эти соединения появляются под действием активатора фагоцитов зимозана при наличии последних. Причем, появление NO₂⁻ + RNO сопряжено с пропорциональным снижением концентрации соединений – доноров NO (табл. 2).

Супероксиддисмутаза (СОД) предотвращает появление NO₂⁻ + RNO. Следовательно, причиной появления этих соединений является супероксид, продуцируемый активированными фагоцитами. Супероксид взаимодействует с соединениями – донорами NO, что приводит к образованию NO₂⁻ + RNO [1,2].

Таблица 1. Концентрация нитро- и нитрозосоединений (мкМ), в тканях человека и животных (n=5)

ткань	RSNO	ДНКЖ	Fe-(NO) _n	RNO ₂	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ + RNO
Кровь человека	<0,05	18,7±6,9	<0,05	<0,05	69,4±28,2	<0,05
Спинномозговая жидкость человека	<0,05	14,1±6,1	<0,05	<0,05	61,1±22,3	<0,05
Амниотическая жидкость куриного эмбриона кросса Хайсекс белый	31,3±4,1	<0,05	550±33	5150±450	<0,05	<0,05
Амниотическая жидкость коровы	25,1±0,8	<0,05	183,5±39,6	2600±450	<0,05	<0,05
Кровь 18 суточного куриного эмбриона	89,7±17,5	<0,05	980±19	14200±1500	450,4±21,6	<0,05
Кровь курицы	<0,05	<0,05	12,4±0,8	<0,05	141,5±11,3	<0,05
Кровь курицы через 5 минут после внутривенного ввода аргинина (14,0 мг/кг)	<0,05	<0,05	71,2±2,4	<0,05	159,3±12,4	<0,05
Кровь курицы через 5 минут после внутривенного ввода нитроаргинина (2,0 мг/кг)	<0,05	<0,05	5,8±0,5	<0,05	118,3±10,9	<0,05

Таблица 2. Изменение концентрации метаболитов NO (мкМ) в плазме крови под действием зимозана. Влияние СОД

Объект	ДНКЖ	Fe-(NO) _n	NO ₂ ⁻ + RNO
Плазма человека	14,7±1,9	<0,05	<0,05
+зимозан (0,2 мг/мл)	4,3±0,4	<0,05	10,8±0,9
+зимозан (0,2 мг/мл)+40 мкМ СОД	15,3±1,8	<0,05	<0,05
Плазма курицы	<0,05	16,2±0,8	<0,05
+зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	1,9±0,2	13,9±0,9
+зимозан (0,2 мг/мл)+40 мкМ СОД	<0,05	15,9±0,8	<0,05
Плазма курицы, отцентрифугированная до 500 клеток/мм ³ +зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	10,1±0,4	5,7±0,6
Плазма курицы, отцентрифугированная до 200 клеток/мм ³ +зимозан (0,2 мг/мл)	<0,05	16,3±0,8	<0,05

В случаях воспалительных заболеваний в крови человека и животных появляются NO₂⁻ + RNO (табл. 3). Эти соединения образуются также в инкубируемом курином яйце, у которого 75% поверхности закрыто скотчем. То есть эмбрион испытывает гипоксию. Вначале это привело к некоторому увеличению концентрации соединений-доноров NO, что, по-видимому, связано с интенсификацией синтеза NO. Затем, через три часа, имело место появление NO₂⁻ + RNO, но общая концентрация нитро- и нитрозосоединений не возросла. Следовательно, появление NO₂⁻ + RNO обусловлено не интенсификацией синтеза NO, а, по-видимому, активацией оксидаз, продуцирующих супероксид.

Таким образом, мы имеем основание предположить, что появление NO₂⁻ + RNO в живых тканях есть следствие продукции супероксида. Но зафиксировать NO₂⁻ + RNO в тканях значительно легче, чем O₂⁻, хотя бы потому, что они относительно долгоживущие. В таблице 4 представлены данные о содержании NO₂⁻ + RNO в плазме крови здоровых беременных и с диагностированным преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО). В контрольной группе повышенное содержание NO₂⁻ + RNO имело место у 9 из 39 пациенток. Во всех

Таблица 3. Концентрация доноров NO, нитрита и нетиолатных нитрозосоединений (NO₂⁻ + RNO) человека и животных при воспалительных заболеваниях (мкМ)

Объект	Доноры NO (RSNO+ДНКЖ+Fe(NO) _n +RNO ₂)	NO ₂ ⁻ + RNO
Плазма здорового человека (n=4)	8,7±1,7	<0,05
Плазма человека, больного аппендицитом (n=4)	1,2±0,2	4,1±0,4
Плазма человека, больного ОРЗ (n=15)	9,3±1,8	0,9±0,3
Молоко здоровой коровы (n=4)	8,8±1,6	<0,05
Молоко коровы, больной маститом (n=4)	1,1±0,4	5,8±0,4
Гомогенат 12 суточного куриного эмбриона (n=4)	360,9±18,8	<0,05
Гомогенат 12 суточного куриного эмбриона через 1 ч. после закрытия 75% поверхности яйца (n=4)*	413,7±22,3	<0,05
То же через 3,5 часа после закрытия 75% поверхности яйца (n=4)	418,1±23,1	14,6±1,9

* Поверхность яйца закрывалась скотчем.

Таблица 4. Частота встречаемости значений концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$, содержания СРБ, и числа лейкоцитов в венозной крови беременных в норме и при ПРПО

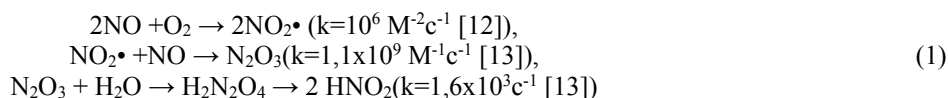
Показатели	Нормальная беременность	ПРПО
($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) мкМ		
<0,15	30 (77%)	0
>0,15	9 (23%)	60 (100%)
СРБ, мг/л (норма до 6,0)		
<6,0	36	54
>6,0	3	4
Лейкоциты, тыс /мм ³ (норма: 4-9)		
<9,0	17	19
>9,0	22	41

случаях ПРПО имело место значительная, от сотен нМ до нескольких мкМ, концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме. Антибактериальная терапия способствовала нормализации этого показателя (табл. 5). Следовательно, появления $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ связано с процессом инфекционного характера. Но это повышение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ не сопровождалось какими-либо клиническими признаками воспалительного процесса. Концентрация С реактивного белка лишь в 10% случаев была выше нормы. В таком же проценте случаев этот показатель был выше нормы в группе здоровых. Причем в эту группу отбирались пациентки без каких-либо диагностированных воспалительных заболеваний. Содержание лейкоцитов также не являлось информативным показателем, поскольку в случае ПРПО у 41 из 60 пациенток было повышенное их содержание, а в контрольной группе у 22 из 39.

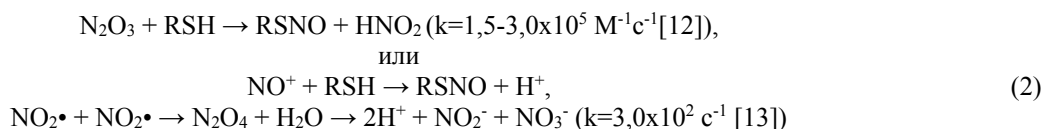
Таким образом содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ – самый чувствительный показатель ранней стадии воспаления, так как по сути является индикатором активации фагоцитов. И в тоже время самый специфичный, поскольку продуцироваться $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в тканях могут под действием супероксида, а последний продуцируется активированными фагоцитами. Но если речь идет о диагностическом показателе, то всякий ли воспалительный процесс возможно контролировать по содержанию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$? Обязательно ли любое воспаление отразится на содержании $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме крови? В таблице 6 представлены данные о содержании $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и плазме крови больных с диагностированным ишемическим инсультом (ИИ). Во всех случаях диагностированного инсульта ЦСЖ содержало $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в концентрации 0,2-1,0 мкМ. Но плазма крови таких больных содержала $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ только в 22% случаев. То есть возможна ситуация, когда $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ присутствуют в ЦСЖ, но не присутствуют в плазме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что если синтезированный из аргинина NO будет находиться в свободном состоянии длительное время, то он либо будет окислен, преимущественно, до нитрита кислородом, либо свяжется с тиоловой группой. Это следует из величин констант процессов, имеющих место в системе оксид азота - кислород:



Либо вступит во взаимодействие с любой SH-группой:



Считается, что соединения – доноры NO (RSNO, ДНКЖ) продлевают время жизни NO, предохраняя от окисления кислородом [10,14,15]. Но если эти соединения будут спонтанно распадаться с высвобождением NO, то никакого предохранения NO от окисления и обеспечения специфичности его воздействия не будет. В наших работах показано, что соединения – доноры NO: RSNO, ДНКЖ, Fe(NO)_n, практически, не продуцируют NO спонтанно. Это следует из того, что они могут часами инкубироваться в среде, содержащей ловушку NO: гемоглобин, сульфониловую кислоту, но не теряя специфический галоид-зависимый ингибирующий эффект,

Таблица 5. Влияние антибактериальной терапии на концентрацию $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в плазме крови пациенток с ПРПО

№ пациентки	$\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (мкМ) до начала антибактериальной терапии	применяемый препарат	$\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (мкМ) после 7 суток проведения антибактериальной терапии
1.	1,4±0,2	7 сут., цефазолин,	<0,05
2.	4,4±0,4	11 сут, цефтриаксон	0,2±0,1
3.	0,9±0,2	7 сут. амоксилав	<0,05
4.	1,8±0,3	8 сут, цефтриаксон	1,3±0,2
5.	2,5±0,3	7 сут., фортум, клофабрин	0,6±0,2
6.	2,3±0,4	6 сут, цефтриаксон	<0,05
7.	4,8±0,4	7 сут, цефтриаксон	<0,05
8.	1,7±0,3	8 сут. амоксилав	<0,05

связанный с наличием группы NO^+ . При этом они могут претерпевать изменения в спектральных и ЭПР характеристиках, но не теряя способности галоид-зависимо ингибировать каталазу [7]. Так ДНКЖ под действием видимого света сначала приобретают свойства $\text{Fe}(\text{NO})_n$, затем свойства RNO_2 . При инкубации в темноте эти процессы шли медленнее. ЭПР-свойства утрачивались с утратой ингибирующих свойств, присущих ДНКЖ [16]. Но это не означало потери комплексом группы NO .

GSNO под действием света трансформировался в соединение со свойствами RNO_2 [16].

В системе пероксидаза – H_2O_2 ДНКЖ трансформировался в соединение со свойствами $\text{Fe}(\text{NO})_n$, а GSNO – до соединения со свойствами RNO_2 . Нитрит в такой системе окислялся до нитрата [17]. То есть и здесь отсутствует высвобождение NO в окружающую среду из соединений – доноров.

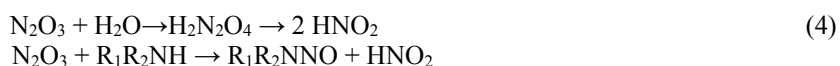
Несмотря на то, что растворы ДНКЖ, $\text{Fe}(\text{NO})_n$ и RSNO продуцируют окрашенный продукт при инкубации с реактивом Грисса, их воздействие на каталазу говорит о том, что они не содержат нитрит в количестве равном порогу чувствительности метода. Реакция с реактивом Грисса, по-видимому, обусловлена распадом соединений-доноров в кислой среде [3,7].

Утрата ингибирующих свойств ДНКЖ/SH имела место в системе, содержащей ловушку NO (гемоглобин, сульфониловую кислоту) и хелатор железа, разрушающий комплекс [7]. Предполагается, что роль такого хелатора могут играть части апофермента физиологической мишени NO . Это дает возможность NO перейти на мишень с минимальным пребыванием в свободном состоянии. Так может достигаться и специфичность воздействия предохранения от окисления [8].

В то же время инкубация соединений - доноров NO с активированными лейкоцитами приводит к трансформации ДНКЖ, $\text{Fe}(\text{NO})_n$ и RSNO в соединения с ингибирующими свойствами, характерными для нитрита и нитрозоаминов. СОД предотвращала этот процесс. Достаточно 500 активированных фагоцитов на микролитр крови, чтобы обеспечить трансформацию 30% содержащихся в плазме доноров NO до $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (таблица 2). Можно предположить, что в данном случае супероксид взаимодействует непосредственно с группой $\text{NO}(\text{NO}^+)$. Присутствие в системе ДНКЖ/SH – лейкоциты – зимозан тирозина приводило к тому, что вместо $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ образовывался продукт с ингибирующими свойствами RNO_2 . По-видимому, нитротирозин [7]. По-видимому, сначала образуется пероксинитрит, который затем может распасться до $\text{NO}_2^\bullet + \text{OH}^\bullet$:



Поскольку плазма содержит относительно мало SH-групп, по сравнению с внутриклеточной средой, где концентрация только глутатиона достигает нескольких миллимоль, N_2O_3 либо подвергается гидролизу с образованием нитрита, либо образуют нетиолатные нитрозосоединения (RNO), прежде всего нитрозоамины. Сравнивая данные теста Грисса и ферментного сенсора, мы пришли к выводу, что в большинстве тканей нетиолатные нитрозосоединения составляют не менее половины конечных продуктов взаимодействия супероксида с донорами NO [9]:



То есть появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в большинстве тканей может быть результатом продукции супероксида. Он может продуцироваться при активации НАДФН-оксидазы фагоцитов, а также некоторых других оксидаз [9]. Как

Таблица 6. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в ЦСЖ и плазме крови больных с диагностированным ИИ

Группы	ЦСЖ, мкМ*	Кровь, мкМ*	Число больных (%)
К	<0,15	<0,15	6 (100)
		>0,15	0
	>0,15	<0,15	0
		>0,15	
ИИ	<0,15	<0,15	0
		>0,15	
	>0,1(0,3-1,8)	<0,15	18 (78)
		>0,1 (0,2-1,0)	5 (22)

*В скобках дан диапазон значений концентрации (мкМ), имеющий место у пациентов.

следует из наших данных, всякое заболевание, сопровождаемое воспалительным процессом, приводит к появлению $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [9]. Воспалительный процесс сопровождается активацией фагоцитов, а, следовательно, активацией НАДФН-оксидазы [18]. А активация фагоцитов – одна из начальных стадий любого воспалительного процесса. Нами измерены пробы плазмы от нескольких сот больных. В наших исследованиях не было ни одного случая, чтобы при наличии клинических признаков воспаления концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ была ниже 0,1 мкМ. Наоборот, $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ появлялись до проявления клинических и биохимических признаков воспаления [3,9].

Как следует из данных, приведенных в таблице 4, во всех случаях клинически диагностированного ПРПО имело место появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в крови матери. Антибактериальная терапия приводила к нормализации этого показателя (табл. 5). Это означает, что появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ связано с бактериальным инфицированием. Но показатели содержания С-реактивного белка и числа лейкоцитов не были информативными (табл. 4). Никаких клинических признаков воспалительного процесса у пациенток не наблюдалось. Показатель $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$, таким образом, является очень чувствительным и специфичным критерием ранней диагностики воспаления. Если концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в крови выше 0,15 мкМ, то однозначно можно констатировать наличие воспалительного процесса [9].

Но есть два вопроса касательно возможности использования этого показателя в диагностике. Во-первых, можно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о тяжести процесса? И второй – возможно ли по концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ судить о локальных воспалительных процессах? Прежде всего, $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в большинстве тканей – результат трансформации соединений – доноров NO. Поэтому концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ лимитируется с одной стороны исходной концентрацией соединений – доноров NO, а с другой стороны – интенсивностью продукции супероксида, которая, в свою очередь, зависит от концентрации лейкоцитов. Поэтому самым ценным показателем является само появление $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в концентрации выше 0,15 мкМ [9].

В случае диагностированного ишемического инсульта $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ во всех случаях появляется в спинномозговой жидкости, но не во всех – в крови (табл. 6). Также показано, что в содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в материнской крови и в крови из пуповины не всегда одинаково [19]. Следовательно, существуют тканевые барьеры, которые непроницаемы для $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$.

Таким образом, онцентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ является одним из наиболее чувствительных индикаторов активации лейкоцитов, а, следовательно, ранних стадий воспаления. Высокая чувствительность обусловлена тем, что продуцироваться $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ в тканях могут только под действием активных форм кислорода и, прежде всего, супероксида. А последний в плазму крови продуцируется активированными лейкоцитами. Доноры NO является высокоэффективными ловушками супероксида. Учитывая их концентрацию в живых тканях – десятки, а иногда сотни мкМ, и константу скорости взаимодействия с супероксидом, у доноров NO не должно быть значимых конкурентов за супероксид. Аскорбат в концентрации 100 мкМ незначительно снижал интенсивность образования $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [7, 9]. $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ являются относительно стабильными продуктами, образовавшимися в результате воздействия короткоживущего соединения. Их зафиксировать легче, чем непосредственно O_2^- . Но не все тканевые барьеры проницаемы для $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$. В частности, амниотический пузырь не проницаем для всех нитро- и нитрозосоединений, включая $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ [8]. Проницаем ли для них плацентарный барьер, пока неясно.

Отдельного внимания заслуживает гипоксия. Ее моделирование на инкубируемом яйце, обмотанным скотчем, также приводило к появлению $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ (табл. 3). По-видимому, здесь совокупный эффект активации оксидаз и реакции иммунной системы на пораженные ткани.

Список литературы / References:

1. Shumaev K., Gubkin A., Gubkina S., Gudkov L., Sviriaeva I., Timoshin A., Topunov A., Vanin A., Ruuge E. Interaction between dinitrosyl iron complexes and intermediate products of oxidative stress. *Biofizika*, 2006, vol. 51, pp. 472-477.

2. Shumaev K., Gubkin, A., Serezhenkov V., Lobysheva I., Kosmachevskaya O., Ruuge E., Lankin V., Topunov A., Vanin A. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, pp. 37-46, doi: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
3. Titov V., Osipov A., Vanin A. The Ability of Blood Plasma to Inhibit Catalase in the Presence of Chloride is a Highly Sensitive Indicator of Deposited Nitric Oxide and Leukocyte Activation. *Current Enzyme Inhibition*, 2020, vol. 16, no. 2, pp. 172-180, doi: 10.2174/1573408016999200429123919.
4. Tarpey M., Wink D., Grisham M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. R431-R444, doi: 10.1152/ajpregu.00361.2003.
5. Емченко С.В., Цыганенко О.И. *Аналитические обзоры*. Новосибирск, 1993, вып. 27, с. 95-115 [Yemchenko S.V., Tsyganenko O.I. *Analytical review*. Novosibirsk, 1993, vol. 27, pp. 95-115 (In Russ.)].
6. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. *Способ определения нитрозосоединений и нитрита в биообъектах*. Патент РФ, №2395096, рег. 20 июля 2010. [Titov V.Yu., Petrenko Yu.M., Vanin A.F. *Method of determination of nitroso compounds and nitrite in biological objects*. Patent of the Russian Federation, no. 2395096, reg. July 20, 2010 (In Russ.)].
7. Titov V., Petrenko Yu., Vanin A., Stepuro I. Detection of nitrite and nitrosocompounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method. *Biophysics*, 2010, vol. 55, no. 1, pp. 77-86.
8. Titov V., Dolgorukova A., Osipov A., Kochish I. Putative Role of Ligands of DNIC in the Physiological Action of the Complex. *Bull Exp Biol Med.*, 2021, vol. 171, no. 5, pp. 606-610, doi: 10.1007/s10517-021-05278-1.
9. Titov V., Osipov A., Kreinina M., Vanin A. Features of Metabolism of Nitric Oxide in Normal State and Inflammation. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 676-688.
10. Vanin A., Poltorakov A., Mikoyan V., Kubrina L., Burbaev D. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 136-49, doi: 10.1016/j.niox.2010.05.285.
11. Lee S., Lee J., Seong H., Lee S., Park J., Romero R. et al. The clinical significance of a positive Amnisure test in women with term labor with intact membranes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 2009, vol. 22, no. 4, pp. 305-310, doi: 10.1080/14767050902801694.
12. Kharitonov V., Sundquist A., Sharma V. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, no. 47, pp. 28158-29164, doi: 10.1074/jbc.270.47.28158.
13. Licht W., Tannenbaum S., Deen W. Use of ascorbic acid to inhibit nitrosation: kinetic and mass transfer considerations for an in vitro system. *Carcinogenesis*, 1988, vol. 9, pp. 365-372.
14. Rassaf T., Preik M., Kleinbongard P., Lauer T., Hei Ch., Strauer B-E., Feelisch M., Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 109, no. 9, pp. 1241-1248.
15. Severina I., Bussygina O., Pyatakova N., Malenkova I., Vanin A. Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors - S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2003, vol. 8, no. 3, pp. 155-163.
16. Titov V., Osipov A., Ibragimova L., Petrov V., Dolgorukova A., Oleshkevich A. Hypothetical mechanism of light action on nitric oxide physiological effects. *Lasers in Medical Science*, 2021, vol. 36, no. 7, pp. 1389-1395, doi: 10.1007/s10103-020-03169-x.
17. Titov V.Y., Kosenko O.V., Starkova E.S., Kondratov G.V., Borkhunova E.N., Petrov V.A., Osipov A.N. Enzymatic Sensor Detects Some Forms of Nitric Oxide Donors Undetectable by Other Methods in Living Tissues. *Bull Exp Biol Med.*, 2016, vol. 162, no. 1, pp. 107-110, doi: 10.1007/s10517-016-3557-1.
18. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2003, vol. 54, no. 4, pp. 469-87.
19. Титов В.Ю., Ананкина А.А., Осипов А.Н., Шалина Р.И., Иванова Е.А., Попова М.В. Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме материнской крови. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2022, т. 67, № 11, с. 633-639, doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-633-639 [Titov V.Yu., Osipov A.N., Shalina R.I., Anankina A.A., Ivanova E.A., Popova M.V. The possibility of diagnosing intrauterine infection by the content of nitrite and non-thiolate nitroso compounds in maternal blood plasma. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, vol. 67, no. 11, pp. 633-639 (In Russ.)].

NITRIC OXIDE IS A HIGHLY EFFICIENT ROS TRAP. POSSIBILITY OF CLINICAL USE FOR DIAGNOSTICS**Titov V.Yu.^{1,2,3}, Osipov A.N.¹, Anankina A.A.¹, Kochish I.I.²**¹ Russian National Research N.I. Pirogov Medical University*Ostrovityanova str., 1c7, Moscow, 117513, Russia; e-mail: vtitov43@yandex.ru*² Moscow State K.I. Skryabin Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology*Akademika Skryabin str., 23, Moscow, Russia*³ Russian National Research and Technological Poultry Farming Institute, RAS*Ptitsegradskaya str., 10, Sergiev Posad, Moscow region, Russia*

Received 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpc.2023.0607

Abstract. It has been shown that nitrite is normally present in most tissues at a concentration not exceeding 50 nM. But the tissues contain NO donor compounds in concentration dozens of micromoles. Consequently, there are mechanisms in the tissues that prevent the oxidation of NO to nitrite. The NO donor compounds do not spontaneously dissociate with the release of NO. The transformation of NO included in the composition of donor compounds to nitrite and non-thiolate nitroso compounds ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$) occurs under the action of active oxygen species (ROS) and, above all, superoxide that is produced by activated phagocytes. Thus, the content of $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ is a very sensitive indicator of phagocyte activation, a process that accompanies any inflammation. In this paper, the possibility of using the $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ content as indicator for the early diagnosis of inflammatory diseases is considered. It has been shown that this indicator has greater sensitivity and specificity than all known clinical and biochemical indicators. This makes it especially valuable for monitoring the state of patients in the hospital, monitoring the farm animals. The factor limiting the use of the $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ indicator in diagnostics is the permeability of tissue barriers to these compounds. This is especially important for monitoring the condition of the fetus, as well as the state of the central nervous system.

Key words: nitric oxide (NO), nitrite and non-thiolate nitroso compounds ($\text{NO}_2^- + \text{RNO}$), phagocytes, inflammation.

ВОЛНОВОДНО ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ МЕТОД И УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ И ОБЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Полников И.Г., Казаринов К.Д.

ФирЭ им. В.А. Котельникова РАН

пл. Введенского, 1, г. Фрязино Московской обл., 141190, РФ; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0608

Аннотация. Предложена методика изучения поглощения микроволнового излучения биологических объектов в тонком диэлектрическом капилляре. Представлены результаты экспериментальных исследований и предложен механизм обнаруженных эффектов биологического действия микроволнового излучения. Было установлено, что при определенном соотношении между размерами волновода, диаметром и толщиной стенок капилляра, диэлектрическими параметрами биологического материала, заполняющего капилляр и длиной волны микроволнового излучения в тракте возможно значительное увеличение поглощенной мощности в довольно узкой полосе частот (волноводно - диэлектрический резонанс). Это явление, необходимо учитывать в биотехнологических экспериментах по облучению суспензий. В результате выполненной работы по изучению поглощения микроволнового излучения углеводородными смесями и моделями биологических объектов в водных средах созданы новые конструкции измерительных устройств и разработана методика акваметрии углеводородов. Созданная продукция защищена авторами данной работы патентом на изобретение.

Ключевые слова: волноводно-диэлектрический резонанс, микроволновое излучение, КВЧ спектроскопия, волновод прямоугольного сечения, диэлектрический капилляр, липосомы.

В данной работе показан пример использования современных физических методов микроволновой электроники для разработки новых датчиков определения диэлектрических характеристик биологических сред. Поглощение микроволнового излучения в водных растворах связано с механизмом ориентационной поляризации молекул. Электрическое поле вызывает поворот молекул воды таким образом, чтобы их дипольные моменты ориентировались по направлению этого поля. Этому препятствует тепловое движение и взаимодействие соседних молекул. В результате появляется сдвиг фазы поляризации среды относительно поля, что и определяет диэлектрические потери [1]. В микроволновом диапазоне диэлектрические характеристики воды (\mathcal{U} -дисперсия) удовлетворительно описывают уравнения Дебая [2]. Экспериментально установленные значения коэффициента поглощения электромагнитного излучения для воды в области КВЧ составляют 20-30 дБ/мм. Диэлектрические свойства растворов солей физиологических концентраций в КВЧ диапазоне длин волн тождественны свойствам воды с точностью до небольшой поправки на величину ионной проводимости. Только при концентрации растворенного вещества выше 0,5 М наблюдается изменение коэффициента поглощения раствора по сравнению с чистой водой. На измерении этой разницы основано использование КВЧ спектроскопии для исследования гидратации различных веществ, а также межмолекулярных взаимодействий [3]. В таких исследованиях обычно используются устройства, основанные на принципе традиционных резонансных методов, которые состоят в сравнении резонансной частоты и добротности резонатора, измеренных сначала без исследуемого образца, а затем с образцом, помещенным в полость резонатора [4]. Основным ограничением, которым приходится руководствоваться при выборе конструкции и размеров резонатора, а также способа введения диэлектрического образца в резонатор, является условие квазистационарности. При нарушении условий квазистационарности размеры системы могут оказаться сравнимыми с длиной волны электромагнитного излучения и учет "полезного" сигнала на фоне "паразитных" параметров может оказаться невозможным.

Для решения поставленной задачи обычно пользуются методом малых возмущений [5], который дает возможность установить связь между мощностью, поглощаемой внутри полости резонатора и энергией, поступающей в эту полость в единицу времени. В отличие от рассмотренных выше и широко применяемых в измерительной технике полых резонаторов с поглощающим образцом, для которых измерения основаны на эффекте малого возмущения поля в резонаторе образцом, в данном случае исходная измерительная система с пустым капилляром не обладает резонансными свойствами, а резонанс возникает только в присутствии исследуемого образца. Эта особенность рассматриваемого волноводного резонатора и определяет высокую чувствительность параметров регистрируемого резонанса к диэлектрическим свойствам образца.

Предложенная конструкция резонансной измерительной камеры [6] отличалась возможностью перестройки и подбора оптимальной связи резонатора с волноводным трактом. Широкие стенки волновода раздвигают два цилиндрических поршня, через осевые отверстия которых проходит капиллярная трубка, изготовленная из радиопрозрачного диэлектрика. Поршни регулируются по высоте в резонаторной камере с помощью винтового механизма перемещения. Настройка резонанса на максимальную добротность для измеряемой жидкости осуществляется последовательно верхним и нижним поршнем, которые отличаются по диаметру. Чувствительность настроенного таким образом резонатора к изменению диэлектрических параметров жидкости достаточно высока, что позволяет его использовать в простых микроволновых схемах регистрации прошедшего

сигнала. На первом этапе нашей работы мы проводили измерения на водно-спиртовых растворах различных концентраций. Измерение диэлектрических характеристик жидкостей с помощью данного устройства выполняется следующим образом. В радиопрозрачный капилляр, пронизывающий широкую стенку металлического прямоугольного волновода, наливается исследуемая жидкость. Затем с помощью подвижных поршней добиваются максимального значения добротности резонаторной измерительной системы, что регистрируется по величине амплитуды резонансной кривой на экране. Разность амплитуд резонансной кривой при последовательных измерениях показывает изменение концентрации вещества в бинарной или же многокомпонентной исследуемой жидкости, связанной с изменением величины диэлектрической проницаемости. Более высокая чувствительность измерений наблюдается при измерениях уровня сигнала на склоне резонансной кривой. В этом случае оценивается смещение пика резонансной кривой по шкале частот, что повышает чувствительность измеряемого параметра жидкости, связанного также с изменением величины диэлектрической проницаемости. Доработка измерительного устройства коснулась конструкции дроссельных поршней, и их привода, введения пружин для фиксации положения поршней, а также предусматривалась возможность калибровки положения дроссельных поршней в резонаторе.

В процессе нашей экспериментальной работы нам пришлось столкнуться с неожиданным обстоятельством. Оно заключалось в том, что даже при минимальном уровне мощности генератора СВЧ сигнала 0,1 мВт, обеспечивающего устойчивую работу устройства, мы наблюдали существенное изменение амплитуды резонанса, в зависимости от продолжительности облучения, свидетельствующее о микроволновом нагреве исследуемого экспериментального образца водного раствора. Изменение амплитуды резонанса при микроволновом облучении образца в течение нескольких минут достигало в некоторых случаях 9 дБ, что свидетельствовало о недопустимой погрешности измерений.

Такая ситуация указывает на необходимость надежного термостатирования измерительной резонаторной кюветы в процессе измерений. Обеспечить условия термостатирования в данных условиях довольно сложно, из-за того, что СВЧ облучаемая часть диэлектрической трубки, в которой находится исследуемый раствор, расположена внутри полого волновода. В случае «проточной» измерительной кюветы, такого нагрева не наблюдается, так как движущаяся жидкость в диэлектрической трубке не успевает нагреться в зоне СВЧ облучения. Однако, для дорогостоящих биологических препаратов такой «проточный» режим работы измерительной ячейки неприемлем из-за непомерно высоких материальных затрат на проведение эксперимента.

Удачное решение данной проблемы мы подцепнули из опыта специалистов нефтяной компании «British Petroleum Co LTD», которые предложили определять диэлектрические характеристики углеводородных смесей с водой следующим способом [7]. Учитывая высокий уровень поглощения водой СВЧ излучения, авторы данной работы предлагают в анализируемой водной многокомпонентной смеси измерять повышение температуры контролируемого объекта при его СВЧ облучении, которое оказывается пропорциональным концентрации воды в объекте (например, в сырой нефти).

Температурная зависимость диэлектрических свойств воды и водных смесей хорошо изучена в диапазоне от низких частот до ММ волн [8]. Следует отметить недостаток метода, связанный с необходимостью экранировки термодатчика при СВЧ облучении, а также влияние самих термодатчиков на температуру объекта в капиллярной трубке, что не может не сказаться на точности измерений. Мы же решили заменить в данном способе сложную процедуру измерения температуры анализируемого образца на регистрацию изменения его коэффициента поглощения СВЧ излучения при нагревании за фиксированный промежуток времени [9]. Предложенный таким образом новый способ измерения диэлектрических характеристик водных растворов, хотя и несколько уступает по чувствительности прежнему способу измерений с помощью волноводной резонаторной камеры, но зато свободен от необходимости термостатировать измерительную ячейку, что не всегда представляется возможным. По сравнению же со способом, предложенным «British Petroleum Co LTD», наш подход отличается простотой измерительной установки, процедуры измерений и отсутствием влияния датчиков измерителя температуры на контролируемый объект. В связи с тем, что расчетные количественные соотношения между параметрами резонанса и диэлектрическими параметрами образца установлены с большим приближением, то для определения последних удобно пользоваться методом сравнения, калибруя измерительную систему по эталонным растворам.

В наших экспериментах по изучению первичных механизмов биологического действия микроволнового излучения мы исследовали простые биологические системы (на клеточном, мембранном и молекулярном уровнях) [10]. При подготовке таких экспериментов с суспензиями клеток или липосом (моделями биологических клеточных мембран), а также растворами приходилось принимать сложное решение о способе микроволнового облучения биообъектов. Высокое содержание воды в наших объектах, сильно поглощающей микроволновое излучение, приводило к тому, что основная мощность излучения поглощалась в толщине образца, не превосходящей 0,3 мм. Это обстоятельство диктовало необходимость использовать в наших опытах или очень тонкие кюветы, или же обычные, но снабженные механической мешалкой. Понятно, что в последнем случае снимался вопрос о неравномерности микроволнового облучения объекта, появлялась возможность надежного термостатирования и контроля состояния объекта непосредственно в процессе облучения, например, контролировать кислотность среды (рН), температуру, светорассеяние и т.д. Следует заметить, однако, что эффективность облучения в такой ситуации оказывается достаточно невысокой. По этой причине приходилось искать такой способ микроволнового облучения, при котором весь объект находился бы в поле излучения и в то же время можно было бы контролировать его состояние.

Известно успешное использование прямоугольной волноводной секции с пронизывающим ее широкую стенку диэлектрическим капилляром для исследований растворов, суспензий и гидродинамических свойств воды при поглощении микроволнового излучения [11,12]. В работе [13] выполнен расчет параметров распространения H_{10} волны с диэлектрической неоднородностью, которая представляла собой волноводно-капиллярный резонатор в виде отрезка прямоугольного волновода с заполненным водой капилляром квадратного поперечного сечения, пропущенным через центр волновода перпендикулярно его широким стенкам. Задача была решена методом создания зеркальных изображений капилляра и последующего рассмотрения дифракции бриллюэновских компонент H_{10} волны в волноводе на периодической «решетке капилляров». Размеры прямоугольного капилляра выбирались в данной работе в соответствии с размерами капилляра круглого сечения так, чтобы площадь круглого и квадратного сечений капилляров, как по внешнему периметру, так и по внутреннему, были равны [13]. Выполняя нашу задачу исследований, мы пришли к необходимости воспользоваться тонким полиэтиленовым капилляром, заполненным суспензией липосом. Следует отметить, что подобный способ облучения в капилляре, пропущенном сквозь широкую стенку волновода, обеспечивает хорошее согласование биологического объекта с волноводным измерительным трактом. Однако, при определенном соотношении между размерами волновода, диаметром и толщиной стенок капилляра, диэлектрическими параметрами биологического материала, заполняющего капилляр и длиной волны микроволнового излучения в тракте возможно значительное увеличение поглощенной мощности в довольно узкой полосе частот (волноводно - диэлектрический резонанс). Это явление, приходилось учитывать в наших биотехнологических экспериментах по облучению суспензий.

В экспериментах с липосомами из ДПЛ (дипальмитоиллецитин) наблюдался отчетливый излом кривой поглощения при мощности 40-50 мВт. Пропускание микроволнового сигнала измерялось в двух точках кинетической кривой: P_0 – исходной, т.е. непосредственно после включения мощности в волноводном тракте и $P_{ст}$ – стационарной, после завершения переходного процесса и установления стационарного значения проходящего КВЧ сигнала через диэлектрический капилляр в волноводном тракте. В случае липосом из яичного лецитина, которые претерпевают фазовый структурный переход при более высоких температурах, резких изменений зависимости поглощения от мощности сигнала мы не наблюдали. Эти эксперименты были выполнены на длине волны 8,5 мм.

Можно предположить, что после включения микроволновой мощности суспензия липосом нагревается, а излом на зависимости поглощения сигнала от мощности в случае капилляров с ДПЛ связан с термотропным структурным переходом гель-жидкий кристалл, т.е. с плавлением мембран при температуре фазового перехода 42 °С. Контрольные опыты по обдуванию капилляра горячим воздухом (50-60 °С) подтвердили, что поглощение микроволнового сигнала в нашей измерительной ячейке растёт при повышении температуры объекта независимо от способа его нагревания.

Ранее нами были получены аналогичные результаты в экспериментах с суспензиями липидов в плоских кюветах [14]. Гистерезис, обнаруживаемый по светорассеянию при переходе гель-жидкий кристалл и обратно, оказывается при КВЧ нагреве примерно в два раза более узким, чем при обычном ИК нагреве. Полученный в работе результат легко объяснялся исходя из предположения, что теплообмен между мембранами липосом и водой при плавлении происходит достаточно медленно. В случае ИК нагрева энергия поглощалась в основном стенкой кюветы, а липосомы нагревались в результате теплопередачи из внешней водной среды. Средняя температура липосом должна была при этом отставать от температуры в кювете. При микроволновом облучении липосомы, попадая в область поглощения излучения, нагреваются изнутри также, как водная среда в этой области, и в этом случае передача тепла для плавления мембран идет эффективнее.

Экспериментальная проверка, проведенная в указанной выше работе, подтвердила это объяснение. В кювете быстро смешивались две порции липосом: одна с температурой, выше температуры плавления, т.е. в жидкокристаллическом состоянии, другая – охлажденная до такой температуры, чтобы смесь двух порций была чуть ниже температуры фазового перехода. Оказалось, что температура в кювете устанавливается за 2-3 сек, а переход гель-жидкий кристалл, судя по светорассеянию, происходил в течение 6-8 сек. Этот результат, по-видимому, означает, что теплопередача из раствора в мембраны ограничивает скорость структурного перехода в липосомах.

Известно, что кооперативные перестройки легче всего проявляются при изменении температуры среды. Как оказалось, это свойство биологических мембран в физиологическом интервале температур – универсальная способность поддерживать жизнедеятельность клеток. Пороговый характер ответа на физический стимул представляется целесообразным для живой системы, так как ее помехоустойчивость по отношению к внешним сигналам возрастает и создаются условия для адекватного ответа при незначительном изменении интенсивности физического воздействия, превышающего некоторый порог [15].

Температура окружающей среды, при которой происходит микроволновое облучение биологического объекта, может быть близка к температуре фазового перехода углеводородных цепей фосфолипидов, из которых состоят биологические мембраны. Тогда, повышение температуры даже на 0,2 °С в процессе облучения может привести к новому фазовому состоянию фрагмента мембраны, например, белок-липидного комплекса, и отклик системы обнаруживает новое качество с явно выраженным пороговым эффектом. Таким образом, при воздействии микроволновым излучением на биологические структуры, находящиеся вблизи точки фазового перехода, достигается эффект дистанционного управления функциональной активности клетки. Следует также отметить, что незначительное изменение температуры биообъекта, при котором наблюдается фазовый переход в

рассматриваемом случае, не всегда может быть надежно зафиксировано измерительным прибором и эффект микроволнового излучения будет ложно истолкован, как «нетепловой».

Итак, полученные экспериментальные результаты позволяют судить о фазовых переходах в биологических мембранах при воздействии микроволнового облучения как о возможном механизме восприимчивости биообъектов к данному виду излучения. Кроме того, была обнаружена возможность регистрации структурных фазовых переходов в липосомах – моделях биологических мембран по изменению величины поглощения микроволнового сигнала в капиллярной диэлектрической трубке, что должно представлять значительный интерес для исследователей механизмов биологического действия микроволнового излучения, а также специалистов по микроволновой спектроскопии.

В процессе экспериментальной работы проведена конструктивная доработка резонансной измерительной камеры, которая позволяет обеспечить максимальную добротность резонатора для каждой концентрации вещества в исследуемой жидкости и способствует повышению чувствительности измерений диэлектрических параметров контролируемой жидкости. Кроме того, (в случае безпоршневого устройства) упрощается конструкция узла за счет исключения настроечных поршней с дифференциальными винтами, фторопластовыми шайбами, зубчатыми колесами и спиральными пружинами, уменьшаются габариты устройства и его вес в несколько раз и, следовательно, должна снижаться себестоимость измерительного устройства. Предложенная методика определения диэлектрических характеристик водных растворов и суспензий, основанная на температурной зависимости коэффициента поглощения водных растворов с помощью одной из модификаций волноводно-диэлектрического резонансного метода, позволяет расширить возможности данного метода для некоторых его применений.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 075-01110-23-01 ИПЭ им. В.А. Котельникова РАН на 2023 год.

Список литературы / References:

1. Pathig R. *Dielectric and electronic properties of biological materials*. Chichester: John Wiley & Sons, 1979, 279 p.
2. Аксенов С.И. *Вода и ее роль в регуляции биологических процессов*. М.: Наука, 1990, 117 с. [Aksenov S.I. *Water and its role in the regulation of biological processes*. М.: Nauka, 1990, 117 p. (In Russ.)].
3. Девятков Н.Д. Взаимодействие миллиметрового излучения с биологически активными соединениями и полярными жидкостями. *Радиотехника и электроника*, 1978, т. 23, № 9, с. 1882-1890 [Devyatkov N.D. Interaction of millimeter radiation with biologically active compounds and polar liquids. *Radio engineering and electronics*, 1978, vol. 23, no. 9, pp. 1882-1890 (In Russ.)].
4. Брандт А.А. Исследования диэлектриков на сверхвысоких частотах. М.: Физматгиз, 1963, 403 с. [Brandt A.A. *Studies of dielectrics at ultrahigh frequencies*. Moscow: Fizmatgiz, 1963, 403 p. (In Russ.)].
5. Гвоздочев С.Д. *Теория электронных приборов сверхвысоких частот*. М.: Гостехиздат, 1956, 527 с. [Gvozdochev S.D. *Theory of electronic devices of microwave frequencies*. Moscow: Gostekhizdat, 1956, 527 p. (In Russ.)].
6. Казаринов К.Д., Полников И.Г. *Перестраиваемая волноводно-диэлектрическая камера для контроля жидкостей*. Патент на изобретение № 2614047. Дата гос. регистрации в Гос. Реестре изобретений РФ 22 марта 2017, бюл. № 9 [Kazarinov K.D., Polnikov I.G. *Tunable waveguide-dielectric chamber for the control of liquids*. Patent for invention no. 2614047. State date. registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation March 22, 2017, bull. no. 9 (In Russ.)].
7. BP (British Petroleum). Measurement of water content of liquids using microwave. *Claim*, vol. 24, no. 03, 1980.
8. Chamberlain J.E. et al. Submillimetre absorption and dispersion of liquid water. *Nature*, 1966, vol. 210, no. 5038, p. 1003.
9. Казаринов К.Д., Полников И.Г. *Способ измерения концентрации водных растворов*. Патент на изобретение № 2631340. Дата гос. регистрации в Гос. Реестре изобретений РФ 21.09. 2017, бюл. № 27 [Kazarinov K.D., Polnikov I.G. *Method for measuring the concentration of aqueous solutions*. Patent for invention no. 2631340. State date. registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation 21.09. 2017, bul. no. 27 (In Russ.)].
10. Казаринов К.Д. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. *Электронная техника. сер. 1. СВЧ - техника*, 2018, вып. 2, с. 62-75 [Kazarinov K.D. Study of the membranotropic activity of EMR in a wide range of wavelengths. *Electronic equipment. ser. 1. Microwave technology*, 2018, no. 2, pp. 62-75 (In Russ.)].
11. Bigu del Blanco, Romero-Siera C., Tanner J.A., Bigu M. Luisa. Effects of MW fields on the rate of flow and mass flux of liquids along tubes of small diameter. IEEE. *International electromagnetic compability symposium record*, 1973, p. 56.
12. Бецкий О.В., Казаринов К.Д., Путвинский А.В., Шаров В.С. *Способ измерения мощности СВЧ излучения*. Авторское свидетельство №1101750. Бюлл. ОИ, 1984, № 25, с. 120 [Betsky O.V., Kazarinov K.D., Putvinsky A.V., Sharov V.S. Method for measuring the power of microwave radiation. Copyright certificate no. 1101750. Bull. OI, 1984, no. 25, p. 120 (In Russ.)].
13. Блудов Ю.В. Распространение H₁₀-волны в прямоугольном волноводе с диэлектрической неоднородностью. *ЖТФ*, 2005, т. 75, вып. 8, с. 99-105 [Bludov Yu.V. Propagation of the H₁₀-wave in a rectangular waveguide with a dielectric inhomogeneity. *ZhTF*, 2005, vol. 75, no. 8, pp. 99-105 (In Russ.)].

14. Борисенко Г.Г., Полников И.Г., Казаринов К.Д. Биологические мембраны - первичные мишени рецепции электромагнитных полей в медико-биологическом эксперименте. *Электронная техника. Сер.1. СВЧ-техника*, 2007, № 4, с. 25-372 [Borisenko G.G., Polnikov I.G., Kazarinov K.D. Biological membranes are the primary targets for the reception of electromagnetic fields in a biomedical experiment. *Electronic equipment. Ser.1. Microwave technology*, 2007, no. 4, pp. 25-372 (In Russ.)].

15. Конев С.В. *Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы*. Минск: Наука и техника, 1987, 240 с. [Konev S.V. *Structural lability of biological membranes and regulatory processes*. Minsk: Science and technology, 1987, 240 p. (In Russ.)].

WAVEGUIDE DIELECTRIC METHOD AND DEVICES FOR MEASURING THE CONCENTRATION OF AQUEOUS SOLUTIONS AND IRRADIATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

Polnikov I.G., Kazarinov K.D.

Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics (*Fryasino branch*)

Fryazino, Moscowregion, Vvedensky sq., 1, 141190, Russia, e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

Received 17.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0608

Abstract. A technique for studying the absorption of microwave radiation of biological objects in a thin dielectric capillary is proposed. The results of experimental studies are presented and the mechanism of the detected effects of the biological action of microwave radiation is proposed. It was found that at a certain ratio between the dimensions of the waveguide, the diameter and thickness of the walls of the capillary, the dielectric parameters of the biological material that fills the capillary and the wavelength of microwave radiation in the waveguide, a significant increase in the absorbed power in a rather narrow frequency band (waveguide-dielectric resonance) is possible. This phenomenon must be taken into account in biotechnological experiments on the irradiation of suspensions. As a result of the work done on the study of the absorption of microwave radiation by hydrocarbon mixtures and models of biological objects in aquatic environments, new designs of measuring devices were created and a technique for hydrocarbon aquametry was developed. The created products are protected by the authors of this work by a patent for an invention.

Key words: *waveguide-dielectric resonance, microwave radiation, EHF spectroscopy, rectangular waveguide, dielectric capillary, liposomes.*

ХРОНОФИЗИОТЕРАПИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКЕ

Зарубин В.Н.

ООО «Международный центр «Рубин»

ул. Иванова, 30А, г. Новосибирск, 630117, РФ; e-mail: mcrubin@bk.ru

Поступила в редакцию 17.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0609

Аннотация. Исследование направлено на решение вопросов повышения эффективности и безопасности лечения широкого спектра заболеваний на базе разработанного хронобиологического подхода к управлению функциональным состоянием организма. Подход базируется на следующих хронобиологических закономерностях: 1. принципе ритмичности биологических процессов в живых организмах; 2. принципе сопряжённости биопроцессов и их биоритмов; 3. принципе хроноуправления живыми организмами путём регуляции их биоритмов; 4. явлении усвоения внешних ритмов живыми организмами. Согласно принципу ритмичности, все биопроцессы в организме имеют свои биоритмы. Это означает, что биопроцессы и их биоритмы взаимозависимы и подчиняются принципу сопряжения. Поэтому при заболевании нарушение биопроцессов в организме сопровождается отклонением их биоритмов от нормы – десинхронозами. Из этого следует, что, лечить болезни можно не только методами фармакотерапии путём восстановления нарушенных биопроцессов, но и методами хронотерапии путём коррекции их биоритмов и устранения десинхронозов. В этом и заключается принцип хроноуправления живыми организмами. Однако в настоящее время на рынке терапии отсутствуют аппаратные методы лечения десинхронии. Для реализации этого принципа, на основе явления усвоения внешних ритмов и принципа сопряжённости биопроцессов и их биоритмов разработана технология хронофизиотерапии. Хронотехнология включает метод ресинхронизирующей физиотерапии биоритмов больного организма и аппарат хронофизиотерапии. В качестве внешнего синхронизатора используется частотная составляющая ЭМП. Аппарат одновременно реализует две функции лечения: хронотерапию и магнитотерапию. Функция хронотерапии реализует разработанный метод лечения, лечебным фактором которой является частота ЭМП из соответствующего диапазона биоритмов здорового организма. А функция магнитотерапии реализует вспомогательный метод, лечебным фактором которого является магнитная составляющая ЭМП. Аппарат не оказывает побочного действия на организм и в результате комплексной хрономагнитотерапии эффективность лечения на нём достигает 95%.

Ключевые слова: биопроцесс, биоритм, хронопатология, десинхроноз, технология хронофизиотерапии, метод ресинхронизации биоритмов, аппарат хрономагнитотерапии.

Работа относится к области хрономедицины/хронофизиотерапии и медицинской биофизики. Она выполнена на основе многолетних исследований автора и анализа уже имеющихся результатов, ранее полученных в этом направлении. В статье рассматриваются вопросы повышения эффективности и безопасности лечения широкого спектра заболеваний на базе разработанного хронобиологического подхода к управлению функциональным состоянием организма (ФСО) путём регуляции его биоритмов определённой частотой ЭМП. ФСО это интегральная характеристика состояния здоровья, которая отражает иммунные возможности организма и оценивается по данным изменений его функций и структур в текущий момент времени. С позиции современной медицины критерием ФСО является отсутствие или наличие патологических процессов в организме, что соответственно означает состояние его здоровья (норма) или состояние болезни (отклонение от нормы).

Актуальность разработки хронобиологического подхода вызвана следующими фактами. 1) созданием при РАМН проблемной комиссии "Хронобиология и хрономедицина" для решения вопросов, связанных с возникновением и лечением десинхронозов; 2) добавлением в номенклатуру наук ЮНЕСКО в науку Биофизика раздела «Биофизика периодических процессов (биоритмология и внешние факторы синхро и десинхронизации биоритмов)».

Хронобиологический подход, базируется на следующих хронобиологических закономерностях:

1. Свойстве ритмичности живой материи. Проявлением этого свойства в живых организмах является принцип ритмичности биопроцессов, согласно которому все биопроцессы в организме имеют свои биоритмы [1,2]. Частоты биоритмов не являются постоянными величинами, они изменяются в определённых диапазонах, границы которых поддерживаются существующими в биосистемах обратными связями. Изучением биоритмов занимаются такие науки как Хронобиология, Биоритмология, Биоритмика. В общем случае под биоритмами понимаются автоколебания каких-либо процессов, явлений и состояний организма в определённых диапазонах частот (ритмы клетки, сердца, мозга, частота дыхания и т.д.). В настоящее время биоритмы признаны важнейшим механизмом регуляции функций организма, обеспечивающим гомеостаз, динамическое равновесие и процессы адаптации в биологических системах. В зависимости от источника происхождения выделяют эндогенные и экзогенные биоритмы. Экзогенные ритмы – это колебания, вызванные периодическими воздействиями из вне. Они являются пассивными реакциями организма на колебания факторов окружающей среды. Эндогенные ритмы

– автономные (спонтанные, самоподдерживающиеся, самовозбуждающиеся) колебания, обусловленные активными процессами в самом организме. В их основе лежат ритмические процессы в клетках и осцилляторы клеточных мембран. В данной работе рассматриваются эндогенные биоритмы, вся совокупность которых в организме объединяется одним понятием «хроном». Хроном это комплексная многоуровневая иерархическая мульти частотная синхронизированная автоколебательная система в структуре организма, которая синхронизована с внешними ритмами. Из этого следует, что организм человека, как единое целое, может существовать только при определенном соотношении разных колебательных процессов в клетках, тканях, органах, функциональных системах и их синхронизации с условиями окружающей среды. Ключевым словом в определении является «синхронизация», возникновение десинхронии на любом уровне, между ними или внешней средой сопровождается десинхронозами и функциональными нарушениями в организме. Таким образом, с позиции хрономедицины критерием ФСО является отсутствие или наличие десинхронии в хрономе.

2. Согласно принципу ритмичности, биопроцессы и их биоритмы взаимозависимы и подчиняются принципу сопряженности, который означает, что изменение одного из сопряженных процессов сопровождается изменением другого. Принцип сопряженности биопроцессов и их биоритмов является отражением фундаментального принципа «сопряжения» структурной и функциональной организации биологической формы развития материи в живых организмах. Поэтому при заболевании нарушение биопроцессов в организме (патофизиология) сопровождается отклонением их биоритмов от нормы – десинхронозом (хронопатологией) [3], и наоборот, возникновение хронопатологии (десинхроноза) вызванной, например, в результате электромагнитного воздействия на организм, сопровождается нарушением их биопроцессов (патофизиологией). В общем случае под десинхронозом понимается нарушение параметров отдельных биоритмов, рассогласование фазовых взаимоотношений между различными биоритмами внутри организма и между ритмами организма и циклическими факторами внешней среды.

3. Из принципа сопряженности биопроцессов и их биоритмов следует, что все заболевания в организме сопровождаются десинхронозами, а сами заболевания представляют собой комбинацию двух взаимозависимых (сопряженных) патологических процессов – хронопатофизиологию. Таким образом, лечить болезни можно не только методами фармакотерапии путём восстановления нарушенных биопроцессов, но и методами хронотерапии путём коррекции биоритмов больного организма и устранения десинхронозов. В первом случае в результате медикаментозной терапии путём ускорения (катализа) или замедления (ингибирования) происходит восстановление нарушенных биохимических процессов. Согласно принципу сопряжения, это сопровождается нормализацией их биоритмов, устранением десинхроноза и выздоровлением организма, что и наблюдается в медицинской практике. Однако из-за побочного действия на организм, методы фармакотерапии не обеспечивают достаточную эффективность и безопасность лечения.

Во втором случае в результате коррекции биоритмов больного организма методами хронотерапии произойдёт устранение десинхроноза и, согласно принципу сопряженности, восстановление нарушенных биохимических процессов. Это открывает новые возможности в области хрономедицины: управление биопроцессами в организме путём воздействия на их биоритмы физическими факторами. Общеизвестно, что ЭМП так же может вызывать как ускорение, так и замедление биохимических реакций [4]. В результате электромагнитного воздействия изменяется амплитуда и период колебаний биохимических реакций в клетке и, следовательно, во всём организме. В этом заключается принцип хроноуправления живыми организмами путём регуляции их биоритмов. В широком смысле этот принцип означает, что управлять функциональным состоянием организма можно путём десинхронизации (рассогласования) или ресинхронизации (восстановления) его биоритмов (хронома) и тем самым создания или устранения в живых организмах патологических процессов. Проблема в этом случае заключается в отсутствии в арсенале хрономедицины методов и аппаратов лечения десинхронии путём прямого физического воздействия на биоритмы организма.

4. Явление усвоения внешних ритмов живыми организмами характеризует способность клеток, тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы под воздействием внешних ритмов и сохранять эти изменения после окончания воздействия [5]. Это явление можно наблюдать в организме на следующих примерах. После перелёта на самолёте нескольких часовых поясов в организме происходит нарушение циркадного (суточного) биоритма, и в результате его смещения по фазе на несколько часов, возникает недомогание, слабость, сонливость и т. д. Согласно существующей классификации, такое отклонение от нормы биоритмов функциональных систем называется острым десинхронозом (джетлаг). Считается, что нормализация нарушенных процессов происходит в результате приспособления (адаптации) организма к функционированию в новых географических условиях. Однако сам механизм такого приспособления научного объяснения не получил. В действительности же лечение десинхроноза осуществляется суточными ритмами в данной географической точке земли, куда человек прилетел. В течение нескольких суток, в результате «геофизической хронотерапии», происходит усвоение ритма, и организм перестраивается на новый суточный ритм. Сначала перестраиваются биоритмы центральной нервной системы, затем гормональной, пищеварительной и в последнюю очередь мочеполовой. Таким образом, происходит устранение десинхроноза и связанных с ним дисфункций.

Второй пример связан с лечением диссинхронии сердца. В здоровом сердце сокращения предсердий и желудочков происходят последовательно и синхронно. На фоне различных заболеваний эта синхронизация нарушается и возникает сердечная недостаточность. Одним из наиболее эффективных методов лечения этой диссинхронии является электрокардиостимуляция сердца. Суть методики заключается в использовании внешнего синхронизатора. В организм имплантируется кардиостимулятор, который через прикреплённые

электроды контролирует работу сердца и, в случае возникновения десинхроноза, помогает его камерам сокращаться синхронно. Этот метод носит название «сердечная ресинхронизирующая терапия» (СРТ). При этом вопрос о механизме влияния СРТ на диссинхронию сердца до сих пор объяснения не получил, и решение сводится к подбору оптимальных параметров стимулятора. На самом деле ответ лежит на поверхности: благодаря усвоению заданного базального ритма, оптимизируется работа сердца и восстанавливается его насосная функция. Из этого следует, что для коррекции биоритмов больного организма, и тем самым управления биопроцессами, в качестве внешнего синхронизатора можно, в частности, использовать частотную составляющую ЭМП.

В рамках хронобиологического подхода разработана технология хронофизиотерапии, которая реализует принцип хроноуправления живыми организмами. Хронотехнология включает метод ресинхронизирующей физиотерапии (РФТ) и аппарат хронофизиотерапии, который представляет собой хронокорректор биоритмов организма. Разработка метода базируется на принципе сопряжённости биопроцессов и их биоритмов, и явлении усвоения внешних ритмов живыми организмами. В качестве источника внешних ритмов в методе используется ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, в которой возник патологический процесс. Принцип лечения заключается в следующем. Если на больную ткань воздействовать ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, то, в результате явления усвоения ритма, биоритмы больной ткани перестроятся на частоту биоритмов здоровой ткани, и произойдёт устранение десинхроноза. А это, согласно принципу сопряжённости биопроцессов и их биоритмов, приведёт к восстановлению нарушенных биопроцессов и выздоровлению. Использование частотной составляющей ЭМП из диапазона биоритмов здоровой ткани, в которой возникла патология, является необходимым и достаточным условием для возникновения явления усвоения ритма только в больной ткани. В результате прямого частотного воздействия на биоритмы больной ткани отсутствуют побочные эффекты, и метод относится к биомедицине нового поколения: таргетной хронофизиотерапии. Новизна метода и отсутствие конкурентов подтверждаются экспертными заключениями ИЦ Сколково, НП ТП «Медицина будущего» и патентом РФ на изобретение метода лечения.

На основе метода и для его внедрения в медицинскую практику разработан аппаратно-программный комплекс (АПК) хронофизиотерапии. Аппарат одновременно реализует две функции лечения: хронотерапию и магнитотерапию. Функция хронотерапии реализует основной метод лечения (РФТ): аппарат генерирует заданную частоту из соответствующего диапазона биоритмов здорового организма, которая и является лечебным фактором. Функция магнитотерапии, которая имеет место на любой частоте, реализует вспомогательный метод лечения локальной магнитотерапии, лечебным фактором которой является магнитная составляющая ЭМП. Функция хронотерапии запускает процесс ресинхронизации биоритмов в больном организме и восстановления нарушенных биопроцессов, а функция магнитотерапии стимулирует процесс выздоровления за счёт реологического эффекта. Аппарат охватывает лечением все ткани и органы, биоритмы которых попадают в диапазон его рабочих частот, и в результате отсутствия побочного действия на организм и комплексной хрономагнитотерапии эффективность лечения достигает 95%. На аппарат получен патент РФ на полезную модель и Регистрационное удостоверение Росздравнадзора.

На основании вышеизложенного можно утверждать, что разработанная технология хронофизиотерапии открывает новое направление в области медицинской биофизики: лечение заболеваний путём ресинхронизации биоритмов больного организма терапевтической частотой из соответствующего диапазона биоритмов здорового организма.

Список литературы / References:

1. Загускин С.Л. *Ритмы клетки и здоровье человека*. Монография. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2010, 292 с. [Zaguskin S.L. *Cell rhythms and human health*. Monograph. Rostov-on-Don: Publishing House of Southern Federal University, 2010, 292 p. (In Russ.)].
2. Прохорова Э.М. Биологические ритмы и здоровье. *Сервис plus, Фундаментальная медицина*, 2010, № 3, с. 20-26 [Prokhorova E.M. Biological rhythms and health. *Service Plus, Fundamental Medicine*, 2010, no. 3, pp. 20-26 (In Russ.)].
3. Зарипов А.А., Янович К.В., Потапов Р.В., Корнилова А.А. *Современные представления о десинхронозе. Современные проблемы науки и образования*, 2015, № 3 [Zaripov A.A., Yanovich K.V., Potapov R.V., Kornilova A.A. *Modern ideas about desynchronization. Modern problems of science and education*, 2015, no. 3 (In Russ.)].
4. Темурьянц Н.А., Владимирский Б.М., Тишкин О.Г. *Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире*. Киев: Наук. думка, 1992, 188 с. [Temuryants N.A., Vladimirsky B.M., Tishkin O.G. *Superlow frequency electromagnetic signals in the biological world*. Kyiv: Science dumka, 1992, 188 p. (In Russ.)].
5. Ухтомский А.А. *Усвоение ритма в свете учения о парабiosis*. Избранные труды. Под редакцией Е.М. Крепса. Серия «Классики науки». Ленинград: Издательство «Наука», 1978, 360 с. [Ukhtomsky A.A. *Assimilation of rhythm in the light of the doctrine of parabiosis*. Selected works. Edited by E.M. Kreps. Series "Classics of Science". Leningrad: Nauka Publishing House, 1978, 360 p. (In Russ.)].

CHRONOPHYSIOTHERAPY – A NEW DIRECTION IN MEDICAL BIOPHYSICS

Zarubin V.N.

Rubin International Center LLC

Ivanov str., 30A, Novosibirsk, 630117, Russia; e-mail: mcrubin@bk.ru

Received 17.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0609

Abstract. The study is aimed at solving the issues of increasing the efficiency and safety of treatment for a wide range of diseases based on the developed chronobiological approach to managing the functional state of the body. The approach is based on the following chronobiological patterns: 1. the principle of the rhythm of biological processes in living organisms; 2. the principle of conjugation of bioprocesses and their biorhythms; 3. the principle of chrono-management of living organisms by regulating their biorhythms; 4. the phenomenon of assimilation of external rhythms by living organisms. According to the principle of rhythm, all biological processes in the body have their own biorhythms. This means that bioprocesses and their biorhythms are interdependent and obey the conjugation principle. Therefore, in case of a disease, a violation of bioprocesses in the body is accompanied by a deviation of their biorhythms from the norm – desynchronosis. From this it follows that it is possible to treat diseases not only by pharmacotherapy methods by restoring disturbed bioprocesses, but also by chronophysiotherapy methods by correcting their biorhythms and eliminating desynchronosis. This is the principle of chrono-management of living organisms. However, at present, there is no hardware methods for the treatment of desynchrony on the therapy market. To implement this principle, based on the phenomenon of mastering external rhythms and the principle of conjugation of bioprocesses and their biorhythms, a technology of chronophysiotherapy has been developed. Chronotechnology includes a method of resynchronizing physiotherapy of biorhythms of a sick organism and a chronophysiotherapy apparatus. The frequency component of the EMF is used as an external synchronizer. The apparatus simultaneously implements two treatment functions: chronotherapy and magnetotherapy. The function of chronotherapy implements the developed method of treatment, the therapeutic factor of which is the frequency of EMF from the corresponding range of biorhythms of a healthy organism. And the function of magnetotherapy implements an auxiliary method, the therapeutic factor of which is the magnetic component of the EMF. The device has no side effects on the body and as a result of complex chronomagnetic therapy, the effectiveness of treatment on it reaches 95%.

Key words: *bioprocess, biorhythm, chronopathology, desynchronosis, chronophysiotherapy technology, biorhythm resynchronization method, chronomagnetic therapy apparatus.*

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМИНА И Zn^{II} -КОМПЛЕКСА ТЕТРА(4-ПИРИДИЛ) ПОРФИРИНА С ГЕКСАМОЛИБДЕНОНИКЕЛАТ-ПОЛИАНИОНОМ В ВОДНЫХ СРЕДАХ

Клименко И.В.¹, Китушина Е.В.^{1,2}, Лобанов А.В.^{1,2,3}

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

² ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»
ул. Малая Пироговская, 1/1, г. Москва, 119991, РФ

³ ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0610

Аннотация. С целью создания высокоупорядоченных супрамолекулярных комплексов на основе порфиринов с возможностью использования их в медицине в данной работе представлен способ получения новых гибридных супрамолекулярных органо-неорганических систем на основе тетрапиррольных соединений (природные и искусственно синтезированные порфирины) и гексамолибденоникелат-аниона. В частности рассматривается взаимодействие природного порфирина гемина и Zn^{II} -комплекса тетра(4-пиридил)порфирина с гетерополисоединением – кристаллогидратом гексамолибденоникелата натрия $Na_4[Ni(OH)_6Mo_6O_{18}] \cdot 8H_2O$ в водной среде. Благодаря своим физико-химическим и биологическим свойствам данное гетерополисоединение может входить в состав фотохромных материалов и фармакологических препаратов. Методом электронной абсорбционной спектроскопии исследованы зависимости оптического поглощения полученных гибридных супрамолекулярных органо-неорганических систем. В электронных спектрах поглощения наблюдается как трансформация полос, характерных для порфиринов, так и появление новых полос, свидетельствующих об образовании гибридных супрамолекулярных органо-неорганических комплексов. В работе прослежена роль структурных особенностей порфиринов в процессе их взаимодействия с гетерополианионами. Показано, что различия в спектральном поведении двух металлопорфиринов при взаимодействии с гетерополисоединением связаны, прежде всего, с отличиями в их структуре. Полученные данные будут полезны при разработке новых материалов для использования их в качестве антибактериальных компонентов гибридных систем.

Ключевые слова: гетерополисоединения, порфирины, электронные спектры поглощения, водно-органическая среда, агрегация.

Порфирины и их производные являются важнейшими соединениями, участвующими во многих природных биохимических и биофизических процессах, в том числе в фотосинтезе, переносе кислорода, транспорте электронов. Порфирины – это производные макроцикла порфина, в состав которого входят четыре пиррольных кольца, связанных между собой с помощью метиновых ($-CH=$) мостиков, образующих единую стабильную систему сопряжения π -электронов по всему 16-членному кольцу. Особенностью порфиринов является их структурное многообразие. Они отличаются природой координационного центра и мостиковых групп, а также заместителями в макроцикле. Порфириновые комплексы широко распространены в природе, например в виде хлорофилла (магнийсодержащий комплекс замещенного протопорфирина) или гемоглобина (железосодержащий белок или порфириновый комплекс железа). Этот класс тетрапиррольных соединений вызывает огромный интерес у исследователей благодаря многообразным физико-химическим и биологическим свойствам, особенностям электронной и атомной структуры порфиринов, а также их возможному применению в качестве активных компонентов современных электронных и оптоэлектронных устройств, низкоразмерных проводников и люминесцентных материалов, транзисторов и фотовольтаических ячеек, химических сенсоров и красителей.

Особое значение также приобретает возможность выявления новых стратегий создания и разработки высокоупорядоченных супрамолекулярных комплексов на основе порфиринов, используемых в медицине, в том числе при ранней диагностике и лечении различных заболеваний. Создание данных гибридных соединений открывает новые области исследования и синтеза многофункциональных материалов, свойства которых являлись бы симбиозом магнитных, электрических и оптических параметров твердых тел.

Интересным представляется исследование гибридных систем на основе порфиринов или их комплексов с металлами и различных гетерополисоединений (ГПС) на предмет их сольватационного поведения и склонности к ассоциации в водных средах, моделирующих биологическое окружение в живом организме, а также анализа фотофизических свойств и антибактериальной активности полученных систем. Создание таких гибридных супрамолекулярных систем позволит солубилизировать порфирины в водной среде. Кроме того, в таких комплексах порфирин оказывается в составе наноразмерных частиц, что делает возможным доставку его в клетки организма. К тому же, в данном случае имеется возможность совмещения биологической активности индивидуальных ГПС и порфирина, а также проявления вновь возникающих в гибридной системе физико-химических и биологических свойств.

ГПС – класс координационных соединений, относящихся к полилигандным полиоксосоединениям, содержащих десятки атомов кислорода, а также атомы переходных металлов. В состав ГПС входят гетерополианионы, состоящие из металло-кислородных октаэдров MeO_6 и являющихся основной структурной единицей ГПС. В качестве MeO_6 обычно выступают оксосоединения, например, вольфрама, ниобия, молибдена, ванадия, в качестве центральных атомов – около 50 различных металлов и неметаллов. Формулу ГПС можно представить как $Kat [X_x M_m O_y] \cdot nH_2O$, где Kat – катионы неорганической или органической природы, X – никель, марганец или медь, M – вольфрам, молибден, реже ванадий, ниобий, тантал или смесь этих элементов в высшей степени окисления [1]. Высокая симметрия изолированных многоатомных гетерополианионов и атомы переходных металлов, образующие различные наноразмерные многозарядные частицы, определяют специфические физико-химические свойства ГПС. Благодаря своим свойствам ГПС могут входить в состав фотохромных материалов, протонных проводников и фармакологических препаратов. В твердом состоянии ГПС обычно представляют собой кристаллогидраты переменного состава, полностью или частично зависящего от параметров окружающей среды, прежде всего, температуры и влажности.

Однако, без решения вопросов, связанных с молекулярным, электронным и пространственным строением ГПС, невозможно полное понимание их роли во многих процессах, а также при синтезе новых гибридных супрамолекулярных систем с заранее заданными свойствами на основе ГПС. Перспективным является изучение физико-химических свойств данных гибридных материалов, получаемых в результате сборки органических и неорганических молекул.

Известно, что важнейшей характеристикой порфиринов являются их электронные спектры поглощения. Форма, положение и интенсивность полос позволяют получать информацию о структуре молекулы, а также судить о влиянии таких факторов, как природа растворителя и взаимодействие с компонентами гибридных систем. Благодаря наличию у порфириновых макрогетероциклов интенсивных полос поглощения в видимом диапазоне и полос флуоресценции, характерных для d^0 - и d^{10} -металлокомплексов, методы электронной абсорбционной спектроскопии и спектрофлуориметрии успешно применяются для выявления межмолекулярных взаимодействий [2,3].

В данной работе проводилось исследование взаимодействия комплекса железа (III) с протопорфирином IX (природного порфирина, гемина) и Zn^{II} -комплекса тетра(4-пиридил) порфирина (Zn ТПП, Sigma-Aldrich) с кристаллогидратом гексамолибденоникелата натрия $Na_4[Ni(OH)_6Mo_6O_{18}] \cdot 8H_2O$ (гетерополисоединение, ГМНН) в водных средах. Гемин – один из наиболее известных представителей порфиринов. Он содержит ион трехвалентного железа (Fe^{3+}) и координирующий хлорид ион (Cl^-) и широко применяется в фармакологии для создания препаратов, корректирующих дефицит гемоглобина в организме. Кроме того, молекулы гемина являются катализаторами образования активных форм кислорода в воде (синглетного кислорода 1O_2 и других активных форм O_2^- , OH^\cdot и H_2O_2), обеспечивающего бактерицидный эффект [4], тогда как цинковые комплексы порфирина представляют интерес с точки зрения фотобиологии и фотомедицины [5]. Порфирин-полимерные системы, в состав которых входит гемин и полигидроксипропан, ранее были рекомендованы нами в качестве антисептического материала при обработке ран, так как они подавляют рост грамотрицательных и грамположительных бактерий – *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [6].

Образование гибридных органо-неорганических структур в данной работе наблюдали с помощью метода электронной абсорбционной спектроскопии. ГМНН получили согласно методике [7], гемин (содержащий ион Fe^{3+} и координирующий экстралиганд Cl^-) был выделен согласно [8] из сгустков свиной крови, подвергнутой кавитационной обработке.

Гибридные системы получали последовательным добавлением к 2 мл исходного водного раствора ГМНН с концентрацией 10^{-5} моль/л 0,1 ÷ 2 мл растворов гемина или Zn ТПП в среде *N,N*-диметилформамид (ДМФА) до итоговой концентрации порфирина 10^{-5} моль/л. Контролем служили эксперименты, в которых, в аналогичных объемных соотношениях, смешивали компоненты, где вместо одного из растворов брали чистый растворитель.

Регистрацию электронных спектров поглощения в диапазоне длин волн 200-900 нм проводили с помощью UV-VIS спектрофотометра TU-1901 фирмы "Beijing Purkinje General Instrument Co, Ltd". Все измерения проводили при 20 °С в стандартных кварцевых кюветах К10 с длиной оптического пути 1 см.

Полученные данные представлены на рисунках 1 и 2. В результате исследования было обнаружено, что в спектре поглощения ГМНН не содержится полос в видимой области спектра. Поглощение ГМНН наблюдается в ближнем УФ-диапазоне (рис. 1) как в дистиллированной воде, так и в воде с добавкой ДМФА. В тоже время, в растворе ДМФА гемин имеет полосу поглощения при 323 нм и характерный пик (В-полосу или полосу Core) при 395 нм. Для смеси ГМНН и гемина в бинарной системе растворителей вода - ДМФА сохраняется поглощение гемина при 323 и 397 нм, однако наблюдаемый спектр не является суперпозицией индивидуальных спектров ГМНН и гемина.

Данная особенность поведения гемина в водной среде может указывать на его стабилизацию благодаря взаимодействию электронных систем неорганического и органического компонентов гибридной супрамолекулярной системы. В отсутствие ГМНН в спектре гемина в бинарной системе вода - ДМФА наблюдается существенно уширенная полоса поглощения в диапазоне длин волн 300-500 нм, что свидетельствует об агрегации гемина в этих условиях.

Электронные спектры поглощения Zn ТПП в отсутствие и в присутствии ГМНН представлены на рисунке 2. В спектре Zn ТПП в чистом ДМФА наблюдается полоса Core с максимумом при 424 нм, а также Q-полосы малой

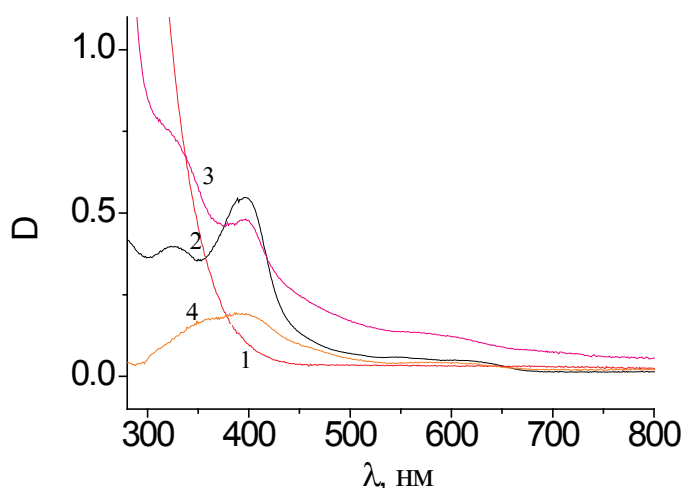


Рисунок 1. Электронные спектры оптического поглощения ГМНН и гемина: ГМНН (10^{-5} моль/л) в воде (1), гемин (10^{-5} моль/л) в ДМФА (2), ГМНН (10^{-5} моль/л) и гемин (10^{-5} моль/л) в системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 (3), гемин (10^{-5} моль/л) в системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 (4)

интенсивности в области 550-650 нм и дополнительная полоса при 459 нм, относящаяся, по-видимому, к молекулярным агрегатам (димерам) порфирина. При переходе от воды к бинарной системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 полосы поглощения в электронном спектре ZnТПП практически исчезают, что говорит о значительной агрегации порфирина в этой среде. В течение суток в этой системе происходит выпадение порфирина в осадок. Иным образом обстоит дело в случае, когда в водной среде присутствуют анионы ГМНН. В такой гибридной системе ZnТПП имеет электронный спектр, характерный для преимущественно существующей в этих условиях мономолекулярной формы порфирина, вероятно, стабилизированной взаимодействием с ГМНН, с максимумом полосы Soret при 425 нм. Положение Q-полос при этом претерпевает небольшой гипсохромный сдвиг. Кроме того, в спектре присутствует новый пик при 440 нм.

Таким образом, как в случае гемина, так и в случае цинкового порфирина, есть указания на их взаимодействие с неорганическим ГПС, что проявляется в стабилизации порфириновых молекул и изменении их спектральных характеристик. Различия в спектральном поведении двух металлопорфиринов при взаимодействии с ГПС связаны прежде всего с отличием в их структуре.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН (№ гос. регистрации 01201253304) и проекта "Исследование проблем утилизации отходов природного происхождения в целях практического использования полученных продуктов" (122122600056-9).

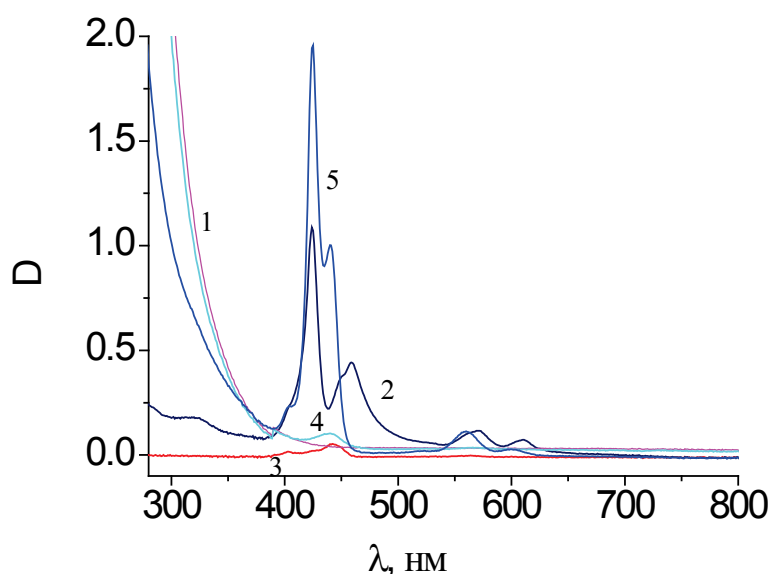


Рисунок 2. Электронные спектры поглощения ГМНН (10^{-5} моль/л) в воде (1), ZnТПП (10^{-5} моль/л) в ДМФА (2), ZnТПП (10^{-5} моль/л) в системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 (3), ГМНН (10^{-5} моль/л) и ZnТПП (10^{-6} моль/л) в системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 (4), ГМНН (10^{-5} моль/л) и ZnТПП (10^{-5} моль/л) в системе вода - ДМФА в соотношении 1:1 (5)

Список литературы / References:

1. Yoshida S., Niiyama H., Echigoya E. Reduction of heteropoly compounds with hydrogen. Roles of counteranions. *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, vol. 86, no. 16, pp. 3150-3154.
2. Lukyanets E.A., Nemykin V.N. The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs. *Journal Porphyrins Phthalocyanines*, 2010, vol. 14, pp. 1-40, doi: 10.1142/S1088424610001799.
3. Клименко И.В., Астахова Т.Ю., Тимохина Е.Н., Лобанов А.В. Димеризация фталоцианина алюминия в органической и водно-органической средах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 2, с. 230-234, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0507 [Klimenko I.V., Astakhova T.Yu., Timokhina E.N., Lobanov A.V. Dimerization of aluminum phthalocyanine in organic and water-organic media. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 2, pp. 230-234 (In Russ.)].
4. Tyubaeva P., Varyan I., Lobanov A., Olkhov A., Popov A. Effect of the Hemin Molecular Complexes on the Structure and Properties of the Composite Electrospun Materials Based on Poly(3-hydroxybutyrate). *Polymers*, 2021, vol. 13, no. 22, no. 4024, doi: 10.3390/polym13224024.
5. Nunes S.M.T., Sguilla F.S., Tedesco A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2004, vol. 37, no. 2, pp. 273-284, doi: 10.1590/S0100-879x2004000200016.
6. Китушина Е.В., Клименко И.В., Грузнов Д.В., Грузнова О.А., Попов Н.И., Алиева З.Е., Степанова С.П., Степанова А.Ф., Казиев Г.З., Лобанов А.В. Антисептические свойства гемина в составе полимерных материалов. *Сборник тезисов докладов Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»*, М.: Перо, 2023, 288 с. [Kitushina E.V., Klimenko I.V., Gruznov D.V., Gruznova O.A., Popov N.I., Alieva Z.E., Stepanova S.P., Stepanova A.F., Kaziev G.Z., Lobanov A.V. Antiseptic properties of hemin in the composition of polymeric materials. *Collection of abstracts of the Eighth Interdisciplinary Conference "Molecular and Biological Aspects of Chemistry, Pharmaceutics and Pharmacology"*, M.: Pero, 2023, 288 p. (In Russ.)].
7. Орешкина А.В., Казиев Г.З., Глазунова Т.Ю. Синтез и исследование кислых гексамolibденометаллатов (III) с никель-аммиачным катионом. *Журнал неорганической химии*, 2008, т. 53, № 10, с. 1662-1666 [Oreshkina A.V., Kaziev G.Z., Glazunova T.Yu. Synthesis and study of acid hexamolybdenum metallates (III) with nickel-ammonia cation. *Journal inorganic Chemistry*, 2008, vol. 53, no. 10, pp. 1662-1666 (In Russ.)].
8. Фигурнов В.А. Патент РФ «Способ получения гемина» № 2045267, 1995 [Figurnov V.A. RF patent "Method for obtaining hemin" no. 2045267, 1995 (In Russ.)].

PECULIARITIES OF HEMINE AND Zn^{II}-COMPLEX TETRA(4-PYRIDYL) PORPHYRIN INTERACTION WITH HEXAMOLIBDENICELATE-POLYANION IN AQUEOUS MEDIA

Klimenko I.V.¹, Kitushina E.V.^{1,2}, Lobanov A.V.^{1,2,3}

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

²Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia

³Moscow Pedagogical State University, Institute of Biology and Chemistry
Malaya Pirogovskaya str. 1/1, Moscow, 119991, Russia

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0610

Abstract. This work presents a method for producing new hybrid supramolecular organic-inorganic systems based on tetrapyrrole compounds (natural and artificially synthesized porphyrins) and hexamolibdenonicate anion to create highly ordered supramolecular complexes based on porphyrins with the possibility of using them in medicine. In particular, the reaction of natural porphyrin (hemin) and the Zn^{II}-complex of tetra(4-pyridyl)porphyrin with the heteropoly compound sodium hexamolibdenonicate crystalline hydrate Na₄[Ni(OH)₆Mo₆O₁₈]·8H₂O in an aqueous medium is considered. This heteropoly compound due to its physicochemical and biological properties can be considered as a part of photochromic materials and pharmacological agent. The optical absorption spectra of the obtained hybrid supramolecular organic-inorganic systems were investigated with the help of electronic absorption spectroscopy. Both the transformation of the bands which are the characteristics of porphyrins and the appearance of new bands indicating the formation of hybrid supramolecular organic-inorganic complexes are observed in the electron absorption spectra. The work traces the role of structural features of porphyrins in the process of their interaction with the heteropolyanions. Differences in the spectral behavior of the two metalloporphyrins when interacting them with the heteropoly compound have been shown and explained by variability in their structure. The data obtained will be useful when developing new hybrid materials as antibacterial components for medical use.

Key words: heteropoly compounds, porphyrins, electron absorption spectra, aqueous-organic medium, aggregation.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ НА ОБОНЯТЕЛЬНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Безгачева Е.А.¹, Бигдай Е.В.²

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева 6, г. Санкт-Петербург, 94044, РФ

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

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

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0611

Аннотация. Данная статья посвящена изучению влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность крысы и человека. Влияние кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность человека исследовали посредством выявления порогов обнаружения *n*-бутанола. Было показано, что при уменьшении содержания кислорода во вдыхаемой газовой смеси обонятельная чувствительность снижалась. Как известно, пороги обнаружения одорантов характеризуют функциональное состояние рецепторных клеток. Можно предположить, ослабление их чувствительности может обуславливаться недостатком энергоснабжения процесса обонятельного восприятия в условиях гипоксии. Для проверки этого предположения методом прижизненной люминесцентной микроскопии исследовалось клеточное дыхание обонятельных сенсорных нейронов крыс при стимуляции *n*-бутанолом на модели ротеноновой тканевой гипоксии. Реакцию клеточного дыхания обонятельных сенсорных нейронов оценивали по изменению интенсивности собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) по методу Б. Чанса. Анализ полученных результатов показал, что в условиях нормоксии стимуляция обонятельных нейронов пахучим раздражителем вызывала повышение интенсивности флуоресценции НАДН, что свидетельствует о накоплении восстановленной формы пиридиннуклеотидов в митохондриях, а, следовательно, об активации клеточного дыхания под действием одорантов. При гипоксии, вызванной ротеноном, повышения интенсивности флуоресценции НАДН под действием *n*-бутанола либо не регистрировалось, либо амплитуда реакции снижалась вдвое. Это означает, что восстановления НАДН под действием одоранта либо совсем не происходило, либо эта реакция на запах была значительно ниже, чем в контроле, что указывает на ослабление клеточного дыхания при гипоксии. Это приводит к уменьшению синтеза АТФ, влияющего на эффективность процесса обонятельной трансдукции и чувствительность обонятельных сенсорных нейронов. Следовательно, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что ослабление обонятельной чувствительности у млекопитающих и человека при гипоксии может быть обусловлено ослаблением клеточного дыхания в обонятельных сенсорных нейронах.

Ключевые слова: обонятельная чувствительность, обонятельный эпителий, кратковременная гипоксия, одоранты, обонятельные сенсорные нейроны.

Обоняние играет важную роль в жизни человека и животных. Оно информирует о присутствии в окружающей среде полезных и вредных химических соединений, выполняет пищевую, охранительную, ориентировочную функции. В экстремальных условиях обоняние может предупредить об опасностях, поэтому сохранение обонятельной функции необходимо для безопасности и выживания. Обоняние страдает при различных заболеваниях, которые сопровождаются развитием долговременной гипоксии головного мозга [1-7]. Однако исследований влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность недостаточно.

Известно, что обонятельная чувствительность определяется порогом обнаружения одорантов. Повышение ольфакторных порогов свидетельствует об ослаблении остроты обоняния и характеризует ухудшение функции периферического отдела обонятельного анализатора [8].

Поэтому одной из целей настоящей работы являлось исследование влияния кратковременной гипоксии на остроту обоняния у человека.

Исследования проводились в хорошо проветриваемом помещении под контролем врача на 20 добровольцах мужского пола в возрасте 18-20 лет без ЛОР-заболеваний, не устойчивых к гипоксии. Всем участникам испытания запрещалось использовать парфюмерные средства, за 45 минут до начала исследования принимать пищу, курить и пить любую ароматизированную жидкость.

Оценку обонятельного порога проводили с использованием *n*-бутанола [9-11]. Его разбавляли в дистиллированной воде, начиная с концентрации 1 М с каждым последующим трехкратным разведением. Пороговой концентрацией считался одорант с минимальной концентрацией, которую смог обнаружить испытуемый в трех предъявлениях.

Затем исследования повторяли при дыхании гипоксической газовой смесью с концентрацией O_2 10,5%, которую создавали с помощью дыхательного тренажера «Эверест-2» (ООО «фирма КЛИМБИ», Россия). Время, в течение которого подавался воздух с пониженным содержанием O_2 до предъявления пробирки, определялось

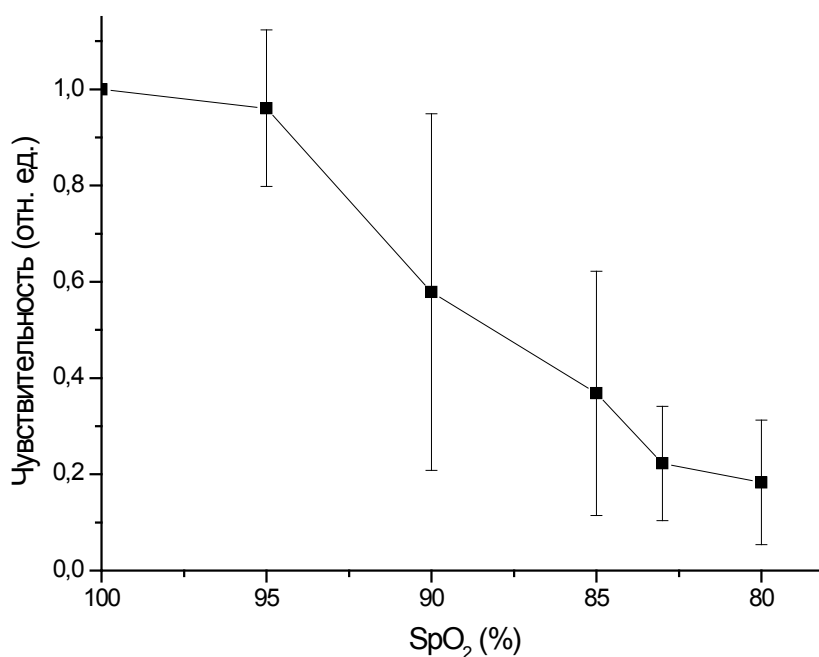


Рисунок 1. Зависимость чувствительности обонятельного анализатора к н-бутанолу от уровня сатурации у добровольцев (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n=17$)

уровнем кислородного насыщения гемоглобина (SpO_2), для чего использовали цифровой портативный пульсоксиметр 9843 Nonin (США). Если время падения уровня сатурации до 90% не превышало 5 минут, испытуемого относили к группе не устойчивых к гипоксии, в противном случае участник был отнесен к группе с высокой устойчивостью к гипоксии и не участвовал в исследовании. Состояние гипоксии у испытуемых наступало при $SpO_2=90\%$. С этого момента начинали этап определения порогов обнаружения обонятельного стимула. Испытание продолжали не более 15 минут.

Как показал анализ полученных результатов, пороги обнаружения обонятельного стимула без индуцирования острой гипоксии отличались у разных испытуемых. Эти различия, вероятно, можно объяснить индивидуальными особенностями восприятия запахов у добровольцев. Поэтому при обработке данных чувствительность при 100% насыщении гемоглобина кислородом (т.е. при $SpO_2 = 100\%$) для всех испытуемых приравнивалась к единице. Нормированные и усредненные результаты изменения обонятельной чувствительности в зависимости от уровня сатурации представлены на рисунке 1.

При дыхании гипоксической газовой смесью обонятельный порог возрастал у 85% испытуемых. При этом в 40% случаях он выявлялся при увеличении пороговой концентрации н-бутанола в 3 раза, ($n=8$), в 40% случаев – в 9 раз ($n=8$) и в 5% ($n=1$) – примерно на 2 порядка. Это свидетельствует о том, что при индуцировании кратковременной гипоксии обонятельная чувствительность снижается, а, следовательно, ухудшается функциональное состояние рецепторного аппарата обонятельного анализатора человека ($p \leq 0,01$).

Перед нами встал вопрос - какой механизм лежит в основе снижения обонятельной чувствительности при уменьшении кислорода во вдыхаемом воздухе.

Можно предположить, что именно рецепторные, а не центральные нейроны в первую очередь будут реагировать на гипоксию, поскольку они подвергаются непосредственному влиянию окружающей среды, минуя кровообращение. Кислород поступает к обонятельным клеткам выстилки, а затем и в митохондриях из обонятельной слизи [12]. Энергообеспечение механизмов обонятельной трансдукции, связанных с обонятельным восприятием, сопряжено с окислительным фосфорилированием, происходящим в митохондриях. Поэтому недостаточное снабжение кислородом, поступающим из обонятельной слизи в условиях гипоксии, возможно, обуславливает ослабление функционального состояния митохондрий обонятельных клеток и снижение клеточного дыхания. Мы предположили, что при острой гипоксии ослабевает синтез макроэргов, что обуславливает нарушение механизмов обонятельной трансдукции, ухудшение функционального состояния обонятельных клеток, чем, вероятно, можно объяснить ослабление обонятельной чувствительности. Поэтому целью нашего исследования стала проверка данной гипотезы на ротеноновой модели гипоксии, где в качестве объекта использовалась обонятельная выстилка крысы.

Исследование проводили на 17 крысах-самцах линии Вистар массой 200-250 г без ЛОР-заболеваний, так как при этом погибает большинство обонятельных клеток. Эксперименты вели в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) по уходу и использованию лабораторных животных. Применение наркоза для проведения исследований на обонятельном эпителии не рекомендуется, поскольку он нарушает функциональное состояние рецепторных обонятельных нейронов. Поэтому животных декапетировали после цервикальной дислокации. Затем готовили препарат обонятельного эпителия. Для этого снимали с головы кожу, удаляли нижнюю челюсть, и отсекали верхние резцы. Далее производили сагиттальный разрез головы строго по

срединной линии, и аккуратно извлекали обонятельную выстилку животного. Готовый препарат закрепляли в специально сконструированном фиксирующем устройстве. Это устройство располагали под объективом микроскопа. Чтобы избежать высыхания препарата, его орошали раствором Рингера для теплокровных следующего состава (в мМ): NaCl – 125,0, KCl – 2,5, MgCl₂ – 1,0, CaCl₂ – 2,5, NaH₂PO₄ – 1,3, HEPES – 20,0, D-глюкоза – 15,0 (pH 7,4) при комнатной температуре. Для стимуляции использовали воздушную подачу увлажненных паров n-бутанола в течение 5 секунд. Пахучий стимул направляли в область обонятельного эпителия, в которой регистрировали митохондриальное дыхание.

Для изучения изменений митохондриального дыхания рецепторных клеток обонятельного нейроэпителия в наших экспериментах регистрировали интенсивность собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) по методу Б. Чанса [13] в модификации В.Н. Карнаухова [14]. Данный метод основан на том, что собственная флуоресценция живых клеток в диапазоне 455-480 нм, возбужденная ультрафиолетовым излучением ($\lambda = 365$ нм), определяется главным образом свечением восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН). При окислении они теряют способность флуоресцировать. Поскольку в нервной ткани вклад митохондриального пула НАДН в суммарную флуоресценцию в 50 раз больше цитоплазматического [15], а обонятельные клетки являются нейронами, то вероятно можно утверждать, что регистрируемое синее свечение обеспечивается в основном митохондриальным НАДН. Интенсивность собственной флуоресценции НАДН в обонятельных клетках измеряли на установке для флуориметрического анализа, изготовленной на основе люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-38. Если в ответ на стимуляцию одорантом собственная люминесценция НАДН повышалась, это свидетельствовало об активации клеточного дыхания. Пониженная скорость дыхания указывает на снижение способности синтеза АТФ [16].

Так как создать контролируемые условия гипоксии в камере на поверхности препарата при микроскопическом исследовании методически очень сложно (из-за таких факторов, как метаболическая активность клеток, проницаемость для O₂ как омывающей среды, так и полимерных составляющих системы и т.п.), для создания гипоксии в рецепторных клетках обонятельной выстилки мы использовали ротенон (с = 5 мкМ). Он ингибирует клеточное дыхание на начальном этапе переноса электронов по дыхательной цепи, поэтому относится к классу веществ, имитирующих гипоксию в различных тканях [17].

Флуоресценцию НАДН в данной области препарата сначала регистрировали во время стимуляции n-бутанолом. Затем подвергали рецепторный орган обоняния 5-минутному воздействию ротенона, после чего его стимулировали одорантом в той же области препарата. Таким образом, мы сравнивали реакцию периферических обонятельных нейронов на пахучий стимул в условиях нормо- и гипоксии в одной и той же зоне эпителия.

Для оценки достоверности различий параметров реакции НАДН до и после стимуляции применяли парный или независимый двухвыборочный t-тест ($p = 0,05$). Амплитуду реакций уровня флуоресценции НАДН на одорант оценивали по отношению изменения флуоресценции в ответ на подачу стимула (ΔR) к уровню флуоресценции до воздействия одоранта (R_0). А для оценки реакции митохондриального дыхания обонятельных клеток на одорант при гипоксии, мы регистрировали изменение интенсивности собственной флуоресценции НАДН в ответ на действие n-бутанола без гипоксии и при ней.

Следует отметить, что из 217 тестируемых областей эпителия только в 99 была получена реакция на стимуляцию n-бутанолом. Такая избирательная чувствительность к одоранту объясняется, вероятно, тем, что в зонах, не реагирующих на раздражитель, не оказалось рецепторных клеток, обонятельные жгутики которых экспрессируют рецепторы на n-бутанол и может свидетельствовать о том, что из всего состава клеток, содержащихся в обонятельном нейроэпителии, реакция на стимул присуща именно рецепторным клеткам.

Результаты эксперимента показали, что в реагирующих на стимул эпителиальных зонах интенсивность флуоресценции НАДН под действием одоранта достоверно увеличивалась (рис. 2а, в), что подтверждалось при нескольких последовательных стимуляциях в одной и той же области. В среднем амплитуда флуоресценции НАДН составляла $3,1 \pm 0,6\%$ (за 100% был выбран первоначальный уровень флуоресценции). Усиление синего свечения связано с увеличением содержания восстановленных форм пиридиннуклеотидов. Накопление НАДН в митохондриях свидетельствует об активации митохондриального дыхания в обонятельных клетках, инициируемое пахучим стимулом. Эти наблюдения согласуются с исследованиями, проведенными на лягушках [18].

Таким образом, в условиях нормоксии стимуляция обонятельных нейронов пахучим раздражителем вызывала накопление восстановленной формы пиридиннуклеотидов в митохондриях, свидетельствуя об активации клеточного дыхания в активированных нейронах.

Однако необходимо отметить, что обонятельные нейроны нуждаются в достаточном энергоснабжении даже в условиях «покоя», когда на них не оказывается воздействия одорантами. Это связано с тем, что в отсутствие обонятельного раздражителя в обонятельных жгутиках, обеспечивающих процесс ольфакторного восприятия, открыты циклонуклеотид-зависимые каналы, для чего необходимо присутствие в цитозоле цАМФ, синтезируемого из АТФ. Показано, что в условиях «покоя» концентрация цАМФ достигает 300 мкМ, что требует высокого спроса на энергию [19].

Стимуляция запахом вызывает еще более высокие энергетические потребности в обонятельных рецепторных нейронах, которые удовлетворяются посредством активации митохондриального дыхания, инициируемой пахучим стимулом, показанной в наших опытах. Таким образом, действие одоранта инициирует активацию клеточного дыхания, а, следовательно, синтез АТФ, необходимый для обеспечения механизмов обонятельной трансдукции и механической функции обонятельных жгутиков.

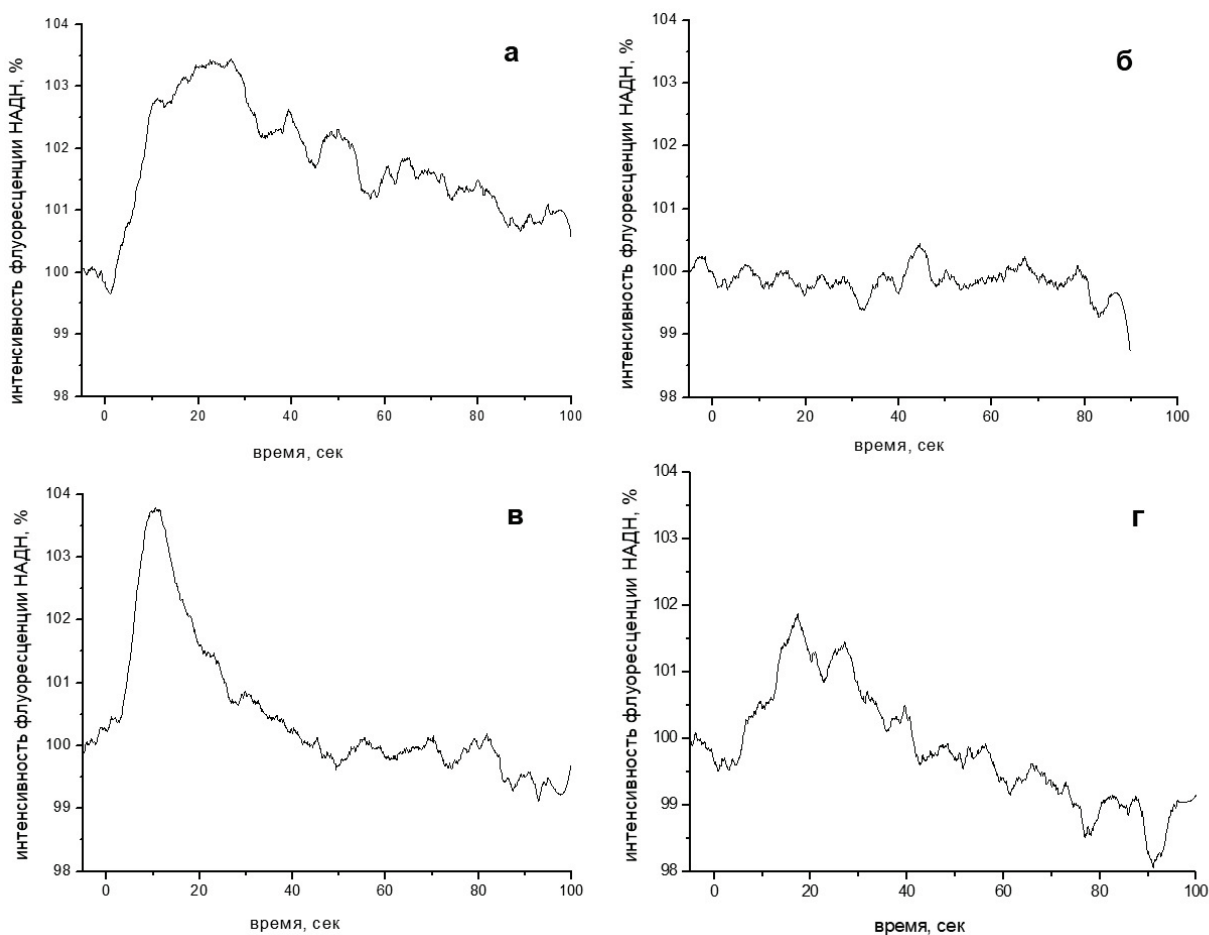


Рисунок 2. Изменение интенсивности собственной флуоресценции НАДН в обонятельных нейронах крысы в двух разных зонах при стимуляции н-бутанолом до (а, в) и после (б, г) воздействия ротеноном (5мкМ), а, б – в одной зоне; в, г – в другой

В экспериментах с использованием ротенона, т.е. при моделировании гипоксии в нейронах обонятельной выстилки, было обнаружено, что в 10 экспериментах из 13 интенсивность собственной флуоресценции НАДН либо достоверно не изменялась в ответ на одорант (рис. 2 а, в), либо (в 3 оставшихся экспериментах) величина реакции снижалась в два раза по сравнению с результатами обонятельной реакции до ингибирования в растворе ротенона (рис. 2 б, г). Это свидетельствует о том, что в условиях гипоксии, вызванной ротеноном, содержание НАДН либо двукратно сокращалось, либо его концентрация не увеличивалась, указывая на ослабление клеточного дыхания при гипоксии. Поэтому, вероятно, ослабление клеточного дыхания при гипоксии, может обуславливать либо значительное снижение обонятельной чувствительности, либо полную потерю восприятия запаха в обонятельных сенсорных нейронах, чувствительных к гипоксии, поскольку чувствительность обонятельных нейронов регулируется внутриклеточными сигнальными системами, потребляющими АТФ, концентрация которого зависит от активности митохондриального дыхания и падает при гипоксии.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что ослабление обонятельной чувствительности, обнаруженное у человека при кратковременной гипоксии, обусловлено снижением клеточного дыхания в клетках обонятельного эпителия.

Список литературы / References:

1. Son G. et al. Olfactory neuropathology in Alzheimer's disease: A sign of ongoing neurodegeneration. *BMB reports*, 2021, vol. 54, no. 6, p. 295, doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.6.055.
2. Hawkes C. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Taste and Smell*, 2006, vol. 63, pp. 133-151.
3. Hawkes C.H., Shephard B.C. Selective anosmia in Parkinson's disease? *The Lancet*, 1993, vol. 341, no. 8842, pp. 435-436.
4. Peers C., Pearson H.A., Boyle J.P. Hypoxia and Alzheimer's disease. *Essays in biochemistry*, 2007, vol. 43, pp. 153-164.
5. Chen G.J. et al. Transient hypoxia causes Alzheimer-type molecular and biochemical abnormalities in cortical neurons: potential strategies for neuroprotection. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2003, vol. 5, no. 3, pp. 209-228.
6. Zhang X., Le W. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 2010, vol. 223, no. 2, pp. 299-303.

7. Saramago I., Franceschi A.M. Olfactory dysfunction in neurodegenerative disease. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 2021, vol. 30, no. 3, pp. 167-172, doi: 10.1097/RMR.0000000000000271.
8. Turetsky B.I., Moberg P.J. An odor-specific threshold deficit implicates abnormal intracellular cyclic AMP signaling in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 2009, vol. 166, no. 2, pp. 226-233.
9. Ruffini R. et al. Adaptation of olfactory threshold at high altitude. *Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function*, Springer, Cham, 2014, pp. 19-22.
10. Hummel T. et al. "Sniffin' sticks": olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chemical senses*, 1997, vol. 22, no. 1, pp. 39-52.
11. Cain W.S., Rabin M.D. Comparability of two tests of olfactory functioning. *Chemical Senses*, 1989, vol. 14, no. 4, pp. 479-485.
12. Бигдай Е.В. и др. Изменение напряжения кислорода в обонятельном эпителии крысы при воздействии одорантов. *Биофизика*, 2019, № 4, с. 772-777 [Bigdai E.V. et al. The change in oxygen tension in the olfactory epithelium of the rat when exposed to odorants. *Biophysics*, 2019, no. 4, pp. 772-777 (In Russ.)].
13. Chance B., Connelly C.M. A method for the estimation of the increase in concentration of adenosine diphosphate in muscle sarcosomes following a contraction. *Nature*, 1957, vol. 179, no. 4572, pp. 1235-1237.
14. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Наука, 1978 [Karnaukhov V.N. *Luminescent spectral analysis of a cell*. Science, 1978 (In Russ.)].
15. Doane M.J. *J. Gen. Physiol.*, 1967, vol. 50, 2603 p.
16. Divakaruni A.S. et al. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods in enzymology*, Academic Press, 2014, vol. 547, pp. 309-354.
17. Archer S., Michelakis E. The mechanism (s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *Physiology*, 2002, vol. 17, no. 4, pp. 131-137.
18. Бигдай Е.В. и др. Влияние одорантов на митохондриальное дыхание обонятельных клеток. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*, 2004, т. 11, № 1, с. 29 [Bigdai E.V. et al. The effect of odorants on mitochondrial respiration of olfactory cells. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2004, vol. 11, no. 1, p. 29 (In Russ.)].
19. Yu C.R. et al. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 2004, vol. 42, no. 4, pp. 553-566.

POSSIBLE MECHANISM OF INFLUENCE OF SHORT-TERM HYPOXIA ON OLFACTORY SENSITIVITY

Bezgacheva E.A.¹, Bigdaj E.V.²

¹ The Kirov Military Medical Academy. S.M. Kirov
Akademika Lebedeva str. 6, St. Petersburg, 94044, Russia

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University
Litovskaya St., 2, Saint-Petersburg, 194100, Russia

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0611

Abstract. The article is focused on the effect of short-term hypoxia on the olfactory sensitivity. The effect of short-term hypoxia on the olfactory sensitivity in human and rats were studied by determination thresholds for n-butanol. We have shown that reduced oxygen partial pressure leads to reduction of olfactory sensitivity. As known, odorant detection thresholds characterize the functional state of receptor cells. It can be assumed that the weakening of their sensitivity may be caused by a lack of energy supply to the olfactory perception process in hypoxia. To test this hypothesis, we stimulated rat olfactory sensory neurons with n-butanol in rotenone model. The reaction of cellular respiration of olfactory sensory neurons was evaluated by changing the intensity of intrinsic fluorescence of reduced pyridine nucleotides (NADH) according to the B. Chance method. Analysis of the results showed that under normoxia, stimulation of olfactory neurons by odorant caused an increase in the intensity of NADH fluorescence, which indicates the accumulation of the reduced form of pyridine nucleotides in mitochondria, and, consequently, the activation of cellular respiration due to exposure to odorant. In hypoxia caused by rotenone, an increase in the induced change of fluorescence of NADH was either not registered or the amplitude of the reaction was halved. This means that the recovery of NADH due to the odorant either did not occur at all, or this reaction to the smell was significantly lower than with normoxia, which indicates a weakening of cellular respiration during hypoxia. This is the reason for the decrease in ATP synthesis, which affects the efficiency of the olfactory transduction process and the sensitivity of olfactory sensory neurons. Therefore, based on our results, it can be concluded that the weakening of olfactory sensitivity in rats and humans with hypoxia may be due to a weakening of cellular respiration in olfactory sensory neurons.

Key words: olfactory sensitivity, olfactory epithelium, short-term hypoxia, odorants, olfactory sensory neuron.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Гисич А.В., Ястребова Е.С.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0612

Аннотация. В данной работе производится исследование возможности измерения гликированного гемоглобина в одиночных эритроцитах методом сканирующей проточной цитометрии. В работе были проведены расчеты зависимости интенсивности рассеянного излучения от эритроцита в широком угловом диапазоне (индикатрис светорассеяния) для длин волн, находящихся в максимуме полосы поглощения гликированного гемоглобина. Максимальная чувствительность по концентрации гликированного гемоглобина была установлена для длины волны 415 нм. Было показано, что на имеющейся практической реализации сканирующего проточного цитометра, которая включает в себя лазеры: 405 нм (30 мВт, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) и 660 нм (LM-660-20-S, 40 мВт) удастся достоверно разделять концентрации гликированного гемоглобина у донора и пациента с диагностированным диабетом при различии в концентрациях HbA1c более 5%. Для длины волны 415 нм теоретически было показано, что заметная разница в значении интенсивности рассеяния (более 10%) наблюдается только в случае разности концентраций гликированного гемоглобина не менее 3%. Таким образом, если на имеющейся практической реализации прибора установить лазер с длиной волны 415 нм, то определение гликированного гемоглобина станет возможным с точностью не более 3%.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, гликированный гемоглобин, сканирующая проточная цитометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Типы гемоглобина. Гемоглобин (Hb) (от греч. haemo – кровь и лат. globus – шар), красный железосодержащий пигмент крови человека, позвоночных и некоторых беспозвоночных животных, выполняющий транспортно-дыхательную и буферную функции в организме. Относится к сложным белкам – хромопротеинам.

В крови гемоглобин существует по крайней мере в четырех формах: дезоксигемоглобин, оксигемоглобин, карбгемоглобин и метгемоглобин. Дезоксигемоглобин – гемоглобин, отдавший кислород тканям. Оксигемоглобин – соединение гемоглобина с кислородом – образуется, преимущественно, в артериальной крови и придает ей алый цвет. Обе эти формы (дезоксигенированный и оксигенированный) являются двумя производными нормального Hb и легко переходят друг в друга. К функциональным формам гемоглобина относится также карбгемоглобин – соединение гемоглобина с углекислым газом, которое образуется, преимущественно, в венозной крови, которая вследствие этого приобретает темно-вишневый цвет. Выделяют еще несколько форм гемоглобина, такие как фетальный гемоглобин, метгемоглобин и другие, отличающиеся от нормального гемоглобина по строению и свойствам. Мы сфокусировали свое внимание на гликированном гемоглобине – форме гемоглобина, которая образуется в результате присоединения к белку гемоглобина (глобину) глюкозы. Рост уровня гликированного гемоглобина происходит при переизбытке глюкозы в крови, возникающем при сахарном диабете. Поэтому анализ на гликированный гемоглобин – самый эффективный и необходимый метод в диагностике сахарного диабета.

Гликированный гемоглобин (кратко обозначается: гемоглобин HbA1c) – это биохимический показатель крови, отражающий среднее содержание сахара в крови за длительный период (от трёх до четырёх месяцев), в отличие от измерения глюкозы крови, которое дает представление об уровне глюкозы крови только на момент

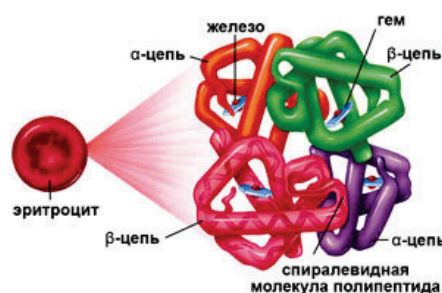


Рисунок 1. Модель третичной структуры гемоглобина

Таблица 1. Интерпретация результатов анализа на гликированный гемоглобин

Показатель гликированного гемоглобина	Значение	Определение
4-6,2 %	Отсутствие диабета	Донор
5,7-6,4 %	Преддиабет	Донор
6,5 % и больше	Наличие диабета	Пациент

исследования. Время жизни красных кровяных телец (эритроцитов), которые содержат гемоглобин, составляет в среднем 120 дней. Именно поэтому уровень гликированного гемоглобина отражает средний уровень гликемии на протяжении примерно трёх-четырёх месяцев.

Гемоглобин (Hb) состоит из 4 полипептидных цепей, каждая из которых связана с гемом (рис. 1). Более 90% Hb здорового взрослого человека представлена обычно аллельной формой A₀, имеющей 2 α и 2 β полипептидные цепи [1].

Формы гемоглобина, образованные гликированием, то есть присоединением какого-либо моносахарида к NH₂ группе концевой валина β -цепи, составляют в совокупности HbA₁ (HbA_{1a} + HbA_{1b} + HbA_{1c}), где HbA_{1a} имеет в составе фруктозу-1,6-дифосфат, HbA_{1b} содержит глюкозу-6-фосфат и HbA_{1c} содержит глюкозу [2]. Процесс гликирования необратим, и его скорость пропорциональна уровню гликемии.

В данной работе использовалась кровь условно здоровых доноров и пациентов с диагностированным сахарным диабетом.

Обзор существующих методов. Различают более 30 методов для определения гликированного гемоглобина (HbA_{1c}). Они включают в себя как лабораторные системы с низкой точностью определения концентраций и ручные микроколоночные методы, так и высокоточные автоматизированные системы. Существующие способы определения HbA_{1c} могут быть разделены на три группы. Первая группа включает методы, основанные на различии электрического заряда молекул гликированного и негликированного гемоглобина. Например, ионообменная хроматография и хроматография под высоким давлением, электрофорез в агарозном геле. Вторая группа включает приемы, основанные на структурном различии между гликированными и негликированными компонентами. Например, аффинная хроматография и иммунологический способ. Третья группа включает методы, которые основаны на химической реактивности HbA_{1c}. Это фотокolorиметрические методы [2].

Таблица 2. Достоинства и недостатки методов измерения гликированного гемоглобина

Название метода	Достоинства	Недостатки
Ионообменная хроматография	Высокая селективность определения ионов, возможность одновременного определения органических и неорганических ионов. Необходим обычный фотометр. Относительно недорогой метод.	Результат чрезвычайно зависит от температурных условий выполнения теста. Требуется больше времени, чем разделение другими хроматографическими методами. Нет надежного и недорогого прибора, который бы позволил сделать данный метод стандартным
Аффинная хроматография	На окончательный результат в значительно меньшей степени влияют температурные условия. Высокая точность метода.	Требуется достаточно большого количества мануальных операций и времени на анализ.
Высокоэффективная жидкостная хроматография	Возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам. Высокая точность. Высокая скорость анализа.	Требуется специальная аппаратура. Высокая стоимость оборудования для выполнения метода.
Электрофорез	Одномоментно может быть проанализирована целая серия проб. Относительно низкая стоимость метода.	Для выполнения метода требуется специальная аппаратура. Для разделения требуется порядка 20-40 минут.
Колориметрический	Не требуется специального дорогостоящего оборудования. Возможность определения очень малых концентраций веществ, которые другими методами химического анализа вычислить сложно.	Метод имеет недостаточно высокую точность, довольно трудоемок, требует длительного кипячения проб.
Иммунохимический	Возможность автоматизации анализа, высокая скорость получения результата, высокая точность.	Более дорогой, чем миниколоночные методы.

Хроматографические методы основаны на распределении компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. В ионообменной хроматографии используются мини колонки с катионообменной смолой, которые поставляются фирмами производителями вместе с реактивами для элюирования. В зависимости от технологии, предложенной изготовителем, определяется количество HbA1 (HbA1a + HbA1b + HbA1c) или HbA1c. В Аффинной хроматографии метод основан на способности иммобилизованной на сорбенте 3-аминофенилборной кислоты специфично связывать цис-диольную углеводную часть гликированного гемоглобина. Негликированные гемоглобины элюируются первыми, затем из колонки вытесняется гликированный гемоглобин с помощью буфера, содержащего сорбитол, который конкурирует за места связывания с борной кислотой [3]. В высоко-эффективной жидкостной хроматографии обеспечивается хорошее отделение HbA1c от A1a, A1b, A0, A2 и F форм, а также от редко встречающихся, но мешающих во многих других методах определения форм S и C с точностью 2% [4].

Метод электрофореза основан на разделении гликированных и негликированных форм Hb имеют разные электрофоретические подвижности. Свободные N-концы негликированного Hb взаимодействуют с сульфатными группами, что изменяет заряд молекул. Гемоглобины A1 не могут взаимодействовать с сульфатными группами, их заряд остается неизменным. Электрофорез проводится на таких поддерживающих средах как агар и агароза в течении 20-40 минут.

Сканирующая проточная цитометрия выгодно отличается от других методов измерения, позволяя исследовать свойства одиночных клеток. Данный метод позволяет проводить многопараметрические измерения частиц в потоке на высокой скорости. Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять интенсивность рассеянного света от одиночной частицы в широких угловых диапазонах (индикатриса светорассеяния), а также рассеяние вперед и в бок под 90°, которое используется в качестве триггерного сигнала, сообщающего системе о пролете исследуемой частицы и запускающего запись её индикатрисы светорассеяния. Метод позволяет идентифицировать эритроциты и, благодаря информации, заключённой в индикатрисе светорассеяния, характеризовать их по размеру и показателю преломления, из которого в свою очередь представляется возможным выразить концентрацию гликированного гемоглобина.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Теоретический расчет индикатрис при изменении HbA1c. С учетом различия оптических свойств гликированного гемоглобина и его нормальной формы, имеют место формулы:

$$n_r = n_{0r} + \alpha_{r(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{r(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{r(HbA1c)}HbA1c \quad (1)$$

$$n_b = n_{0b} + \alpha_{b(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{b(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{b(HbA1c)}HbA1c, \quad (2)$$

где $n_r, n_b; n_{0b}, n_{0r}$, – показатели преломления эритроцита и среды на красной 660 нм (r) и синей 405 нм (b) длинах волн соответственно; $HbA1c, Hb_{oxy}, Hb_{deoxy}$ – концентрации гликированного, оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина соответственно; $\alpha_{b(Hb)}, \alpha_{r(Hb)}, \alpha_{b(HbA1c)}, \alpha_{r(HbA1c)}, \alpha_{b(oxyHb)}, \alpha_{r(oxyHb)}, \alpha_{b(deoxyHb)}, \alpha_{r(deoxyHb)}$ оптические константы на определенной длине волны и для соответствующего типа гемоглобина.

С помощью преобразований получим:

$$\frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}} = \frac{\alpha_{r(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{r(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{r(HbA1c)} \frac{HbA1c}{Hb}}{\alpha_{b(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{b(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{b(HbA1c)} \frac{HbA1c}{Hb}} \quad (3)$$

и, обозначив $Hb\% \equiv \frac{HbA1c}{Hb}$, можно выразить долю гликированного гемоглобина через измеряемые с помощью цитометра показатели преломления и оптические константы – которые неизменны для всех доноров:

$$Hb\% = \frac{\alpha_{r(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{r(oxyHb)}Hb_{oxy} - (\alpha_{b(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{b(oxyHb)}Hb_{oxy}) \frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}}}{(\alpha_{b(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{b(oxyHb)}Hb_{oxy}) \frac{n_r - n_{0r}}{n_b - n_{0b}} - \alpha_{r(HbA1c)}} \quad (4)$$

Линии максимального поглощения HbA1c находятся на длинах волн 415 нм и 540 нм (рис. 2), следовательно, для этих значений необходимо рассчитать индикатрисы светорассеяния. Обнаруженные оптические особенности гемоглобина позволяют теоретически найти различие в регистрируемых сигналах на СПЦ для эритроцитов с варьируемой концентрацией HbA1c.

Обоснование выбора оптических констант. Значения коэффициентов экстинкции e_λ оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина известны. Для гликированного гемоглобина существуют различия значений коэффициента экстинкции в разных источниках, но, зная значение $e_{\lambda(HbA1c)}$ для 540 нм $101342,13 \pm 15316,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6] и график абсорбции (рис. 2), можно рассчитать значения экстинкции для других длин волн.

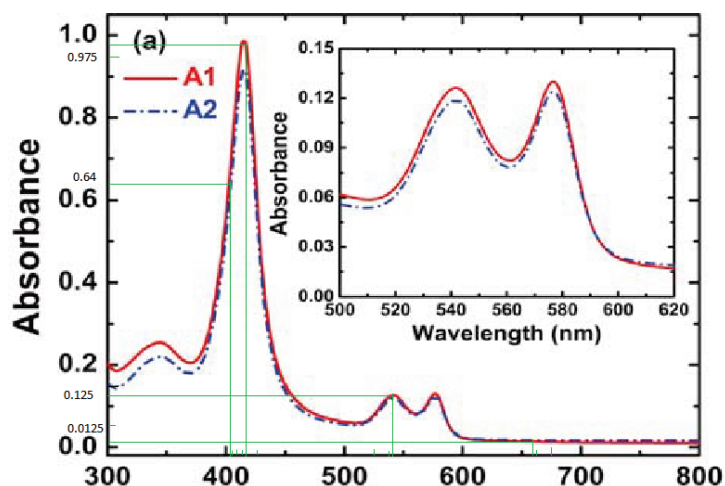


Рисунок 2. Спектр поглощения гликированного гемоглобина. Кривые A1 и A2 соответствуют образцам с 7,9% и 6% HbA1c, соответственно (измерено методом иммунотурбидиметрии в Национальном совете по аккредитации испытательных и калибровочных лабораторий, Бангалор, Индия) [5]

Для обоснования корректности использования единого значения удельной рефракции гемоглобина $\alpha = 0,18$ мл/г [7], для расчета показателя преломления было проведено следующее исследование. При фиксированной концентрации гликированного гемоглобина (5%), варьировались концентрации оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина для расчета общего показателя преломления клеток. После чего происходило моделирование индикатрис светорассеяния, на основе которых показано, что при варьировании дезоксигенированного гемоглобина в диапазонах от 20% до 40% относительная разница в интенсивности индикатрис составляет порядка 5%, в диапазонах от 20% до 75% порядка 10%, в диапазонах от 20% до 25% менее 1%. В таблице 3 приведены соответствующие коэффициенты для разных длин волн.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема установки. Сканирующий проточный цитометр имеет оптическую систему (рис. 3), в которой свет, рассеянный одиночной частицей, сканируется по апертуре фотоприемника во время ее движения в потоке внутри капилляра измерительной кюветы. Таким образом можно измерять угловую зависимость (индикатрису) светорассеяния от одиночной частицы в полярных углах, в частности в нашей работе от 5° до 70° , с интегрированием по азимутальному углу от 0° до 360° . В данной работе основное излучение (La2 на рис. 3), которое распространяется вдоль оси канала с движущимися частицами и используется для измерения индикатрисы светорассеяния. Помимо индикатрисы светорассеяния СПЦ позволяет так же измерять и стандартное для проточных цитометров рассеяние вбок, создаваемое с помощью лазера La1 (488 нм, JDSU FCD488, 20 мВт) и регистрируемое на фотоприемнике (PMT1 на рис. 3). В нашей системе боковое рассеяние используется в качестве триггерного сигнала, сообщающего системе о пролете частицы и запускающего запись ее индикатрисы светорассеяния.

Измеряемые индикатриса светорассеяния $I^{LSP}(\theta)$ и сигнал рассеяния вбок $I^{SSC}(\theta)$ могут быть представлены следующим образом [8]:

$$I^{LSP}(\theta) = k_1 \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)] d\varphi \tag{5}$$

$$I^{SSC}(\theta) = k_2 \iint_{\Omega} d\theta d\varphi \sin\theta [S_{11}(\theta, \varphi) - S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi) - S_{13}(\theta, \varphi) \sin(2\varphi)], \tag{6}$$

где S_{ij} – элементы матрицы Мюллера [9], θ и φ – полярные и азимутальные углы рассеяния соответственно,

Таблица 3. Оптические константы и коэффициенты экстинкции для гемоглобина и гликированного гемоглобина

	Оху Hb		Деoxy Hb		Gly Hb	
	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$	$e_\lambda, M^{-1}cm^{-1}$	$\alpha_\lambda, мл/г$
660 нм	319,6	0,22577	3226,56	0,20973	10134,2	0,18
540 нм	53236	0,22628	46592	0,20942	101342	0,18
415 нм	524280	0,22269	342596	0,18431	790467,6	0,18
405 нм	308716	0,19604	253368	0,18229	526978,4	0,18

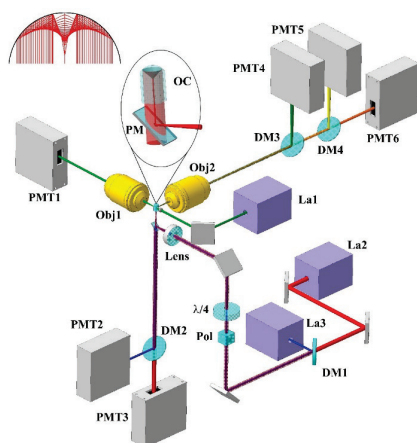


Рисунок 3. Оптическая схема сканирующего проточного цитометра. LA – лазер, PMT – ФЭУ, Obj – объектив, DM- дихроичное зеркало, Pol – поляризатор, Lens – линза, OC – оптическая кювета, PM – зеркало на пластине

Ω – круговая апертура объектива, составляющая $90 \pm 17,5^\circ$. Причем для сферически симметричных частиц $S_{14} = S_{13} = 0$. Коэффициенты k_1 и k_2 определяются в результате процесса инициализации прибора по полистирольным микросферам и связывают интенсивности экспериментальных сигналов с теоретически рассчитываемыми. В данной работе использовались 4 мкм (CML latex, 4%, w/v, Molecular probes, Life technologies, USA).

Подготовка пробы. Образцы крови были получены из цельной периферической крови доноров и пациентов с диагностированным диабетом. Пробы были собраны в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) в соотношении 9:1 (кровь:EDTA). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Национального центра медицинских исследований им. Е. Мешалкина. Письменное информированное согласие было получено от всех участников в соответствии с Хельсинкской декларацией. Эксперименты проводились при комнатной температуре около 22°C в течение 4 часов после забора крови. Происходило разбавление 10 мкл крови в 100 мкл физраствора NaCl 0,9 %. После чего 4 мкл раствора добавлялось в 500 мкл NH_4Cl 150 мМ для запуска изотонического гемолиза. В ходе которого образуются сферизованные эритроциты, которые мы идентифицировали и использовали для анализа в данной работе. Цель сферизации эритроцитов – упрощение анализа данных СПЦ [10]. Двойное разбавление проводилось для того, чтобы уменьшить концентрацию белковых структур и форм их агрегатов. На последнем этапе в каждую пробу были добавлены 4 мкм полистирольные микросферы для инициализации СПЦ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были измерены сферизованные эритроциты одновременно на двух длинах волн. Полученные данные были обработаны с помощью теории Ми с учетом поглощения на длине волны 405 нм, что позволило составить следующую таблицу (табл. 4):

Наблюдаемое различие в отношении показателей преломления доноров и пациентов на разных длинах волн $\frac{n_r - n_{or}}{n_b - n_{ob}}$ оказалось равным по порядку получаемым погрешностям определения параметра показателя преломления на СПЦ.

Чтобы оценить влияния различных концентраций гликированного гемоглобина на оптические характеристики клеток были рассчитаны индикатрисы светорассеяния на длинах волн 415 и 540 нм (рис. 3).

Таблица 4. Средние значения мнимых и реальных показателей преломления для экспериментов с одновременным измерением эритроцитов на 405 и 660 нм

	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{blue}}$	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{red}}$	$\langle n - n_0 \rangle_{\text{blue}} / \langle n - n_0 \rangle_{\text{red}}$	$\langle (n - n_0)_{\text{blue}} / (n - n_0)_{\text{red}} \rangle$
Донор 21.09.18	$0,0375 \pm 0,0003$	$0,0449 \pm 0,0005$	$0,84 \pm 0,02$	$0,853 \pm 0,008$
Пациент 14.11.18	$0,0385 \pm 0,0004$	$0,0443 \pm 0,0005$	$0,87 \pm 0,02$	$0,868 \pm 0,004$
Донор 28.03.17	$0,0320 \pm 0,0001$	$0,0456 \pm 0,0002$	$0,701 \pm 0,005$	$0,698 \pm 0,005$
Пациент 28.08.18	$0,0405 \pm 0,0002$	$0,0361 \pm 0,0002$	$0,891 \pm 0,009$	$0,893 \pm 0,009$

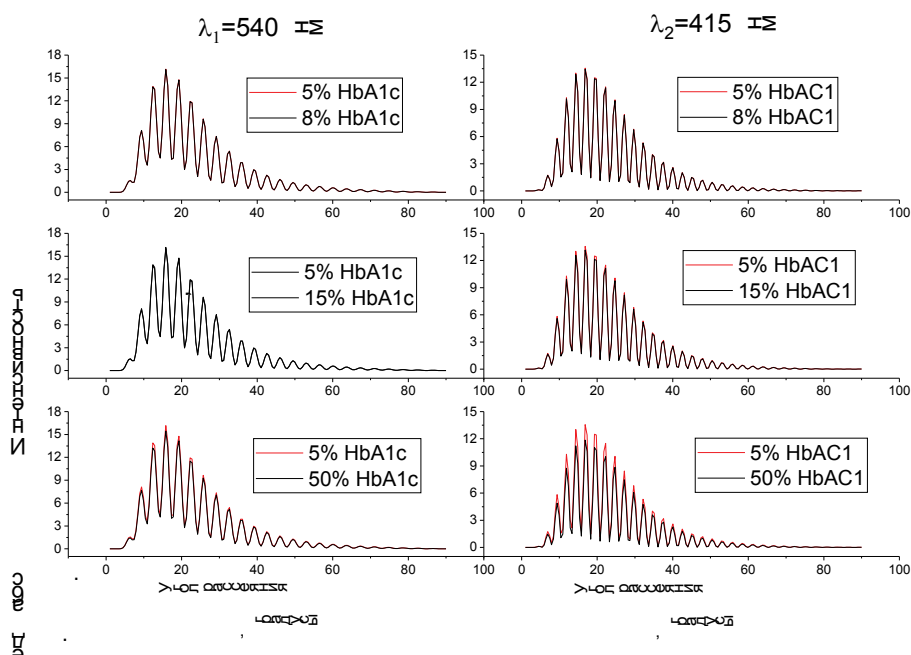


Рисунок 4. Индикатрисы светорассеяния для длины волны 540 нм (левая колонка) и для 415 нм (правая колонка). Наглядно представлены различия профиля рассеяния для различных концентраций гликированного гемоглобина (5/8 % HbA1c, 5/15 % HbA1c, 5/50 % HbA1c)

Мнимый показатель преломления эритроцита варьировался в диапазоне от 0% до 50% с шагом 1% по HbA1c. Расчитанные значения показателей преломления были получены с использованием формул:

$$Re[n_\lambda] = n_{0(\lambda)} + \alpha_{\lambda(deoxyHb)}Hb_{deoxy} + \alpha_{\lambda(oxyHb)}Hb_{oxy} + \alpha_{\lambda(HbA1c)}HbA1c \tag{7}$$

$$Im[n_\lambda] = \frac{m_{10}}{4\pi m} \lambda [e_{\lambda(deoxy)}Hb_{deoxy} + e_{\lambda(oxy)}Hb_{oxy} + e_{\lambda(HbA1c)}HbA1c], \tag{8}$$

где $Re[n_\lambda]$, $Im[n_\lambda]$ реальный и мнимый показатели преломления, $\alpha_{\lambda(HbA1c)}$, $\alpha_{\lambda(deoxyHb)}$, $\alpha_{\lambda(oxyHb)}$ [л/г] – удельная рефракция для гликированного, дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина соответственно, e_λ , $e_{\lambda(HbA1c)}$, $e_{\lambda(deoxy)}$, $e_{\lambda(oxy)}$ [M⁻¹cm⁻¹] – коэффициенты экстинкции для гликированного, дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина соответственно.

Более выраженное отличие проявляется на длине волны 415 нм (рис. 4), но заметная разница в значение интенсивности рассеяния (более 10%) имеется только в случае разности концентраций гликированного гемоглобина не менее 3%. Данные приведены в таблице 5.

Это говорит о том, что в данной реализации прибора точность определения HbA1c в одиночном эритроците будет ниже метода жидкостной хроматографии, где, однако, определение концентрации идет по всей лизированной смеси эритроцитов, а не по индивидуальным клеткам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы было решено три задачи: проверена чувствительность текущей конфигурации прибора к содержанию гликированного гемоглобина в эритроцитах доноров и пациентов; проведен теоретический расчет точности измерения концентраций HbA1c на оптимальных длинах волн; рассчитана оценка погрешностей,

Таблица 5. Теоретически рассчитанные различия между индикатрисами с различными концентрациями HbA1C на длине волны 415 нм и на длине волны 540 нм

		(5-8) % HbA1C	(5-10) % HbA1C	(5-15) % HbA1C	(5-50) % HbA1C
415 нм	<Rel MSE>, %	1,55 ± 0,08	2,55 ± 0,13	4,9 ± 0,2	18 ± 0,8
540 нм	<Rel MSE>, %	0,60 ± 0,02	1 ± 0,04	2 ± 0,08	8,5 ± 0,3

где $\langle \text{Rel MSE} \rangle = \frac{\sqrt{(I_{i(x\%HbA1c)} - I_{i(y\%HbA1c)})^2}}{\max(I_{i(x\%HbA1c)}, I_{i(y\%HbA1c)})} \times 100$ это усреднённое значение относительной разницы между двумя индикатрисами.

вносимых предположением, что для всех доноров и пациентов в каждом эритроците 25% и 75% дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина, соответственно.

Было показано, что на имеющейся практической реализации сканирующего проточного цитометра, которая включает в себя лазеры: 405 нм (30 mW, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) и 660 нм (LM-660-20-S, 40 мВт) удастся достоверно разделять концентрации гликированного гемоглобина у донора и пациента при различии в концентрациях HbA1c более 5%. Теоретически показано, что на длине волны 415 нм можно достичь точности определения гликированного гемоглобина равной не более 3%.

Список литературы / References:

1. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Система красной крови: Сравнительная физиология. Монография. Белгород: Изд-во БелГУ, 2004, 216 с. [Lipunova E.A., Skorkina M.U. *The Red Blood System: Comparative Physiology*. Monograph. Belgorod: Publishing House of BelSU, 2004, 216 p. (In Russ.)].
2. Эммануэль В.Л., Карягина И.Ю., Эммануэль Ю.В. Сравнение методов определения гликозилированного гемоглобина. *Лабораторная медицина*, 2002, т. 5, с. 99-104 [Emmanuel V.L., Karyagina I.U., Emmanuel U.V. Comparison of methods for determining glycosylated hemoglobin. *Laboratory medicine*, 2002, vol. 5, pp. 99-104 (In Russ.)].
3. Kaplan L.A., Pesce A.J. *Clinical Chemistry*. 2nd edition. St. Louis: CRC Press, 1989, 63 p.
4. Bodor G.S. et al. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. *Clin. Chem.*, 1992, vol. 38, no. 12, pp. 2414-2418.
5. Sridevi S. et al. Optical detection of glucose and glycated hemoglobin using etched fiber Bragg gratings coated with functionalized reduced graphene oxide. *J. Biophotonics*, 2016, vol. 9, no. 7, pp. 760-769.
6. Mandal S., Manasreh M.O. An In-Vitro Optical Sensor Designed to Estimate Glycated Hemoglobin Levels. *Sensors*, 2018, vol. 18, no. 4.
7. Park Y. et al. Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells. *Opt. Lett.*, 2009, vol. 34, no. 23, p. 3668.
8. Strokotov D.I. et al. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry: Polarized Light Scattering. *Cytometry A*, 2011, vol. 79A, no. 7, pp. 570-579.
9. Борен К.Ф., Хаффмен Д.Р. *Поглощение и рассеяние света малыми частицами*. Москва: Мир, 1986, 660 p. [Boren K.F., Huffman D.R. *Absorption and scattering of light by small particles*. Moscow: Mir, 1986, 660 p. (In Russ.)].
10. Yastrebova E.S. et al. Erythrocyte lysis and angle-resolved light scattering measured by scanning flow cytometry result to 48 indices quantifying a gas exchange function of the human organism. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, 2023, vol. 103, no. 1, pp. 39-53.
11. Cohen R.M. et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 10, pp. 4284-4291.

INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN BY SCANNING FLOW CYTOMETRY

Gisich A.V., Yastrebova E.S.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS
Institutskaya str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpcc.2023.0612

Abstract. The article explores the possibility of measuring glycated hemoglobin in single erythrocytes using scanning flow cytometry. Calculations of the intensity of scattered radiation from an erythrocyte in a wide angular range (light scattering indicatrix) were carried out for wavelengths at the maximum of the absorption band of glycated hemoglobin. The maximum sensitivity for the concentration of glycated hemoglobin was set at a wavelength of 415 nm. As a result, it is possible to reliably separate the concentrations of glycated hemoglobin in donors and patients with diagnosed diabetes with a difference in HbA1c concentrations of more than 5% on the existing practical implementation of a scanning flow cytometer, which includes lasers: 405 nm (30 mW, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) and 660 nm (LM-660-20-S, 40 mW). A theoretical calculation for a wavelength of 415 nm showed that a noticeable difference in the value of the scattering intensity (more than 10%) is observed only in the case of a difference in the concentrations of glycated hemoglobin of at least 3%. Thus, if a laser with a wavelength of 415 nm is installed on the existing practical implementation of the device, then the determination of glycated hemoglobin will become possible with an accuracy of no more than 3%.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, glycated hemoglobin, scanning flow cytometry.

ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЗ *ARTEMISIA L.* НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Бабаева Г.Х.¹, Мусаев Н.А.²

¹ Институт ботаники

Бадамдарское шоссе, 40, г. Баку, AZ1004, Азербайджан; e-mail: gulnarababaeva112@gmail.com

² Бакинский государственный университет

ул. Захида Халилова, 23, г. Баку, AZ1073, Азербайджан

Поступила в редакцию 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0613

Аннотация. Вероятно, что биоактивные соединения растений являются модификаторами структурно-функциональных свойств плазматической мембраны клеток при контаминации ТМ. Целью настоящей работы было проверить защитное действие экстрактов из видов *Artemisia L.*, обладающих высоким адаптационным потенциалом к различным почвенным загрязнениям, на электрические свойства клеток водорослей при воздействии ТМ. Экстракты растений полыни выделяли из надземных частей *A. scoraria* и *A. szovitsiana* путем гидролиза ацетоном. С помощью микроэлектродной техники изучены закономерности изменения мембранного потенциала и мембранной резистентности плазмалеммы *Chara gymnorphylla* и *Nitella flexilis* под влиянием Cd, Cu, Zn, Pb и экстрактов из видов *Artemisia*. Выявлен статистически достоверный гиперполяризующий эффект экстрактов *A. szovitsiana* и *A. scoraria* по отношению к Zn и Pb соответственно. Устранение экстрактами определяло снижение проводимости мембраны, вызванное Cd и Zn, а также повышение проводимости Cu. Хотя замечено, что высокая способность к накоплению ТМ видов *Artemisia L.* не связана с защитным действием их экстрактов на проводимость мембран, они могут быть потенциальным источником для поиска новых химических соединений, способных индуцировать устойчивость растений к стрессовым воздействиям.

Ключевые слова: тяжелые металлы, экстракты *Artemisia L.*, плазматическая мембрана *Chara gymnorphylla* и *Nitella flexilis*, защитный эффект, аккумуляционная способность, Азербайджан.

ВВЕДЕНИЕ

Биоразнообразие флоры и фауны в настоящее время находится под значительной угрозой из-за стремительно увеличивающегося загрязнения и нерационального использования биологических ресурсов повсеместно, в том числе и в Азербайджане. Азербайджан обладает чрезвычайно богатым разнообразием природных видов ценных растений. Однако возникший экологический дисбаланс, в частности из-за загрязнения окружающей среды, является серьезным поводом для настороженности в отношении фрагментации биоценоза и требует принятия неотложных мер, в том числе соответствующей системы мониторинга, необходимых исследований и оценки биоразнообразия. Несмотря на то, что сохранению биоразнообразия природного населения здесь придается большое значение [1], до сих пор наблюдается сокращение редких и эндемичных видов растений.

Среди ключевых угроз экосистемам одно из главных мест занимает загрязнение тяжелыми металлами (ТМ). Растения отличаются друг от друга ответными реакциями на ТМ-загрязнения на разных уровнях своей организации [2,3]. Большинство из них – растения, отличающиеся своей стратегией устойчивости. Растения полыни являются одним из видов рода, демонстрирующих различные стратегии устойчивости к ТМ [4-6].

Предыдущие работы по мониторингу видов растений, произрастающих на различных загрязненных территориях Азербайджана, позволили выявить более адаптированные растения полыни *L.* на этих территориях [6]. Показано, что некоторые виды/экоотипы *Artemisia L.* проявляют отличительные стратегии устойчивости к ТМ в зависимости от места их обитания, выступая толерантными, либо исключаящими, либо индикаторными, либо растениями-аккумуляторами [4,7]. Несмотря на разработанные различные стратегии толерантности, все испытанные виды полыней обладали высоким адаптивным потенциалом к загрязнению тяжелыми металлами.

Известно, что ТМ способны вызывать в растительном организме функциональные модификации плазмалеммы, изменяя электрический потенциал и проводимость мембран клеток. Показано, что растительные экстракты обладают защитным действием, проявляя способность взаимодействовать с компонентами клеточных мембран [7,8] и изменять их потенциал и проводимость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве экспериментальных объектов использовали два вида полыней *A. scoraria* и *A. szovitsiana* и пресноводные водоросли *Chara gymnorphylla* и *Nitella flexilis*.

Водоросли выращивали в растворе искусственной прудовой воды (ИПВ), состоящей из 10⁻⁴ моль/л КН₂Р₀₄, 2,10⁻⁴ моль/л Mg(NO₃)₂, 4,10⁻⁴ моль/л СаСl₂, 10⁻³ моль/л NaHCO₃ при комнатной температуре при искусственном освещении.

Исходные растворы экстрактов с концентрацией 10 мг/л последовательно разбавляли ИПВ до концентраций, использованных в экспериментах. В одной части опыта экстракты (1 мкг/л, 10 мкг/л) добавляли в проточный раствор после 5-дневного выдерживания растений в ИПВ + экстракт в той же концентрации и установления стационарного уровня МП. Растения, подвергавшиеся воздействию одного из испытуемых ТМ (концентрация 10^{-5} – 10^{-6} моль/л) в течение 5 суток, затем использовали в другой части эксперимента и после установления стационарного уровня МП экстракты добавляли в проточный раствор.

Параметром электрогенной активности плазмалеммы клеток служило МП, а параметром интегральной проводимости – сопротивление мембраны. МП клеток *Chara* определяют по двухэлектродному методу Хогга [9]. Также использовали метод фиксации напряжения, когда разность потенциалов плазмалеммы *Nitella flexilis* фиксировали на определенном уровне и регистрировали ионный ток.

Микроэлектродными методами установлены закономерности изменения МП (E_m) и мембранного сопротивления (R_m) плазматических мембран клеток *Chara gymnorphylla* и *Nitella flexilis* под влиянием как ТМ (Cd, Cu, Zn, Pb), так и экстрактов, содержащих биологически активные вещества из побегов полыни видов *Artemisia*.

Для изучения особенностей мембранотропного действия экстрактов растений полыни их выделяли из измельченных воздушно-сухих надземных частей *A. scoraria* и *A. szovitsiana* трехкратным гидролизом в ацетоне; затем гидролизаты фильтровали и перегоняли на водяной бане [7,8]. Все анализы проводили в нескольких повторностях. Данные оценивали с помощью дисперсионного анализа с использованием MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние экстрактов полыни на электрофизиологические свойства плазматической мембраны растений. Изучение накопления, переноса и действия тяжелых металлов в растениях имеет большое значение для понимания механизмов их действия на разных уровнях организации растений. Отмечается важность электрофизиологических подходов к изучению особенностей влияния ксенобиотиков (пестицидов, тяжелых металлов и др.) и физиологически активных соединений на механизмы ионного транспорта в плазматических мембранах растений. Установлено, что ионно-транспортная система исследованных клеток *Chara gymnorphylla* находится в различных функциональных состояниях при воздействии ТМ. Об этом свидетельствует разброс значений МП – E_m и резистентности – R_m клеток в широких пределах [6].

Известно, что экстракты растений полыни содержат такие ценные биологически активные соединения, как сесквитерпеновые лактоны, кумарины, гликозиды и другие вторичные метаболиты [10,11], которые, взаимодействуя со стеролами клеточных мембран, приводят к избирательному разрушению их проницаемость. Сообщалось, что листья *A. scoraria* содержат 33 химических компонента, представляющих собой 99,83% эфирных масел, богатых монотерпенами (71,6%). Таким образом, *A. scoraria* рассматривается как важный биоресурс для получения масла, богатого монотерпеноидами [5]. Таким образом, растения полыни, произрастающие в различных напряженных условиях среды, обладают защитными механизмами, позволяющими противостоять как осмотическому, так и токсическому воздействию. В связи с этим представляет интерес изучение защитного действия экстрактов устойчивых к ТМ видов полыни на электрофизиологические характеристики растений.

Экстракты из тестируемых видов *Artemisia L.* по-разному влияли на изменение электрофизиологических свойств клеток водорослей в присутствии различных металлов (Cd, Cu, Zn, Pb). Проверка их влияния на изменение МП клеток *Chara* в присутствии ионов Cd и Cu выявила статистически достоверные различия (рис. 1). В этих условиях экстракт из *A. scoraria* оказывал более положительное влияние на изменение МП, чем экстракт из *A. szovitsiana*. Наблюдаемый положительный эффект обоих видов свидетельствует о начальном воздействии экстрактов на плазматическую мембрану, что соответственно приводит к изменению баланса потоков ионов.

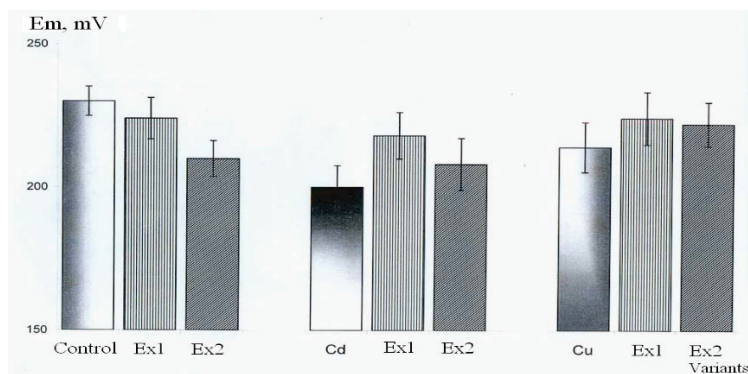


Рисунок 1. Влияние растительных экстрактов из *Artemisia scoraria* (Ex1) и *Artemisia szovitsiana* (Ex2) на величину мембранного потенциала клеток в присутствии $CdCl_2$ и $CuSO_4$. Солевые растворы использовали с концентрацией 10^{-6} моль/л; С – контроль

Таблица 1. Влияние растительных экстрактов *Artemisia scoraria* (Ex1) и *Artemisia szovitsiana* (Ex2) на мембранный потенциал (Em, мВ) клеток *Chara gymnophylla*, культивируемых в присутствии $ZnSO_4$ и $Pb(NO_3)_2$

Контроль (ИПВ)	10^{-7} моль/л $ZnSO_4$ (5-дневные)	10^{-5} мг л ⁻¹ Ex1 (в эксперименте)	10^{-5} мг л ⁻¹ Ex2 (в эксперименте)
-213 ± 17 (5)	-172 ± 9 (5)	-189 ± 10 (5)	-215 ± 8 (5)
Контроль (ИПВ)	10^{-6} моль/л $Pb(NO_3)_2$ (5-дневные)	10^{-5} мг/л Ex1 (в эксперименте)	10^{-5} мг/л Ex2 (в эксперименте)
-190 ± 9 (5)	-187 ± 6 (5)	-202 ± 12 (5)	-195 ± 11 (5)

Обнаружено разнонаправленное действие двух экстрактов на ингибирование МП Pb и Zn (табл. 1). Добавление Ex1 из *A. scoraria* снимает деполяризующий эффект, а Ex2 из *A. szovitsiana* восстанавливает МП до исходного уровня при обработке Zn.

В то же время Ex1 приводит к гиперполяризации МП при обработке растения Pb. Полученные данные отчетливо свидетельствуют о гиперполяризующем действии *A. szovitsiana* по отношению к Zn и *A. scoraria* по отношению к Pb. Следует отметить, что сами экстракты вызывали значительно меньшие мембранные эффекты, чем их совместное использование с металлами.

Сравнение аккумулирующей способности ТМ и защитного действия экстрактов полыни. Среди испытанных видов полыни наибольшей способностью к накоплению в побегах тяжелых металлов, в основном Zn, Pb, Cu, показала *A. scoraria* [10,11] и может быть отнесена к растениям-аккумуляторам. *A. szovitsiana* также отличается адаптивным потенциалом к различным типам загрязнений и широко распространена во всех загрязненных районах Азербайджана. Как и другие испытанные виды *Artemisia* (*A. scoraria*, *A. fragrans*, *A. caucasica*) [8], этот вид также в основном накапливал Zn и Cu в побегах. *A. szovitsiana*, произрастающая на участках с разным уровнем загрязнения ТМ, демонстрировала разные стратегии устойчивости [12]. На относительно слабозагрязненных участках, где концентрации Cu и Zn в почве были выявлены около 6 мг/кг и 20 мг/кг соответственно, растения с этих участков запасают в своих побегах около 20 мг/кг и Zn 100 мг. кг⁻¹ зарекомендовали себя как виды-аккумуляторы. *A. szovitsiana*, произрастающая на почвах с концентрацией Cu 60 мг/кг и Zn с концентрацией 100 мг/кг, не обладающая высокой поглотительной способностью, накапливала Cu и Zn в количествах около 15 и 70 мг/кг соответственно. Попытки сравнить данные по накоплению ТМ обоими исследованными видами *Artemisia* [13] и элиминации действия ТМ экстрактами из этих видов выявили их отличительные стратегии и по этим характеристикам (таблица 2). В то время как для *A. scoraria* характерна наибольшая способность к накоплению Zn, наибольший элиминационный эффект с наивысшим значением МП наблюдался для этого металла под влиянием экстракта *A. szovitsiana*. Но более высокий эффект элиминации Cd, Cu, Pb наблюдался в присутствии экстракта *A. scoraria*. В то же время растения *A. scoraria* накапливали в своих побегах большее количество этих металлов, чем *A. szovitsiana*. По отношению накопительной способности растений к изменению МП эта величина оказалась в несколько раз выше у *A. scoraria* для всех испытанных ТМ.

ВЫВОДЫ

Выявление защитной роли биологически активных веществ растений *Artemisia L.* в повышении устойчивости плазматической мембраны клеток водорослей к ТМ-контаминации выявило статистически достоверный гиперполяризующий эффект экстрактов *A. szovitsiana* и *A. scoraria* по отношению к влиянию Zn и Pb, соответственно. Устранение экстрактами также определяло снижение проводимости мембраны, вызванное Cd и Zn, а также повышение проводимости, вызванное Cu. Хотя замечено, что высокая аккумуляционная способность ТМ некоторых исследованных видов *Artemisia L.* не связана с защитным действием их экстрактов в отношении проводимости мембран. Но полученные данные свидетельствуют о том, что некоторые соединения в экстрактах полыни способны индуцировать толерантность к токсическому влиянию тяжелых металлов на

Таблица 2. Сравнение аккумулирующей способности видов *Artemisia L.* и элиминации действия ТМ их экстрактами в зависимости от мембранного потенциала растительных клеток

Растения / Металлы	<i>A.scoraria</i>		<i>A.szovitsiana</i>	
	Аккумулирующая способность, $\mu\text{g g}^{-1}$	Изменения М.П. mV	Аккумулирующая способность, $\mu\text{g g}^{-1}$	Изменения М.П. mV
Cd	$4,02 \pm 0,9$	18 ± 2	$0,11 \pm 0,03$	8 ± 2
Cu	$34,01 \pm 8,3$	10 ± 2	$17,5 \pm 1,5$	8 ± 2
Pb	$160,08 \pm 42,4$	15 ± 2	$1,79 \pm 0,3$	5 ± 2
Zn	$735,93 \pm 129,6$	17 ± 2	$106,5 \pm 13,1$	42 ± 2

уровне плазматической мембраны. Таким образом, полыни могут быть потенциальным источником для поиска новых веществ, способных индуцировать у растений устойчивость к стрессовым воздействиям.

Список литературы / References:

1. National Strategy and Action Plan on Conservation and Sustainable Use of Biodiversity in the Republic of Azerbaijan, Baku, 2006.
2. Валиев Р.Ш., Олышанская Л.Н. Некоторые физиологические аспекты фитоэкстракции тяжелых металлов. *Химия и химическая технология*, 2016 т. 59, вып. 1, с. 30-35 [Valiev R.Sh., Olshanskaya L.N. Some cases of application of phytoextraction of metals. *Chemistry and chemical technology*, 2016, vol. 59, iss. 1, pp. 30-35 (In Russ.)].
3. Казнина Н.М., Титов А.Ф. Влияние кадмия на физиологические процессы и продуктивность растений семейства Poaceae. *Успехи современной биологии*, 2013, т. 133, № 6, с. 588-603 [Kaznina N.M., Titov A.F. Effect of cadmium on physiological processes and productivity of plants of the Poaceae family. *Advances in modern biology*, 2013, vol. 133, no. 6, pp. 588-603 (In Russ.)].
4. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. *Тяжелые металлы и растения*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014, 196 с. [Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. *Heavy metals and plants*. Petrozavodsk: Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2014, 196 p. (In Russ.)].
5. Шергина О.В., Михайлова Т.А. Фитоэкстракция тяжелых металлов травянистыми растениями на техногенных почвах. *Химия растительного сырья*, 2022, № 4, с. 311-320 [Shergina O.V., Mikhailova T.A. Phytoextraction of heavy metals by herbaceous plants on technogenic soils. *Chemistry of plant raw materials*, 2022, no. 4, pp. 311-320 (In Russ.)].
6. Ali-zade V.M., Sokolik A.I., Musayev N.A. et al. Effect of extracts from *Artemisia scoparia* and *Artemisia szovitsiana* on membrane potential of *Chara gymnophylla* cells treated by Zn. *Proceedings of IV International Scientific Conference on "Regulation of growth, development and productivity of plants"*, Belarus, Minsk, 2005, pp. 14-15.
7. Takeda R., Yoshimura N., Matsumoto S. et al. Accumulation of heavy metals by Japanese weeds and their seasonal movement. *Contaminated Soils*, 2005, vol. 9, pp. 349-359.
8. Серкеров С.В., Алескерова А.Х. Сесквитерпеновые лактоны *Artemisia szovitsiana*. *Химия природных соединений* 3, 1981, с. 397-398. [Serkerov S.V., Aleskerova A.H., Sesquiterpene lactones of *Artemisia szovitsiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 3, 1981, pp. 397-398 (In Russ.)].
9. Hogg J., Williams E., Johnston R. A simplified method for measuring of membrane resistance of *Nitella translucens*. *Biochim Biophys Acta*, 1968, vol. 150, pp. 518-520.
10. Singh H.P., Mittal S., Kaur S. et al. Document chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. *Food Chemistry*, 2009, vol. 114, pp. 642-645.
11. Singh H.P., Kaur S., Mittal S. et al. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. *Journal of Chemical Ecology*, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 154-162.
12. Li H.Y., Tang S.R., Zheng J.M. Copper contents in two plant species of Compositae growing on copper mining spoils. *Nonhcnun Shengtai Huanjing*, 2003, vol. 19, no. 4, pp. 53-55.
13. Evseeva S.B., Sysuev B.B. Plant raw material extracts as component of cosmetic products and formulations for topical administration the products range, the production characteristics (review). *Pharmacy & Pharmacology*, 2016, no. 3, pp. 4-37.

ACTION OF EXTRACTS FROM ARTEMISIA L. ON THE PLASMATIC MEMBRANE UNDER STRESS CONDITIONS

Babayeva G.Kh.¹, Musayev N.A.²¹ Institute of Botany

Badamdar highway 40, AZ1073, Baku, Azerbaijan, e-mail: gulnarababaeva112@gmail.com

² Baku State University

Acad. Zahid Xalilov str. 23, AZ 1073, Baku, Azerbaijan

Received 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpc.2023.0613

Abstract. Plant bioactive compounds are supposed to be the modifiers of structural-functional properties of cell plasma membrane under HM contamination. To test a protective effect of extracts from *Artemisia* L. species, possessing high adaptive potential to different soil contaminations, on electrical properties of algae cells under HM treatments was the aim of the present work. Extracts from *Artemisia* plants were isolated from above-ground parts of *A.scoparia* and *A.szovitsiana* by acetone hydrolyzation. Microelectrode techniques were used to study the regularities of change of membrane potential and membrane resistance of *Chara gymnophylla* and *Nitella flexilis* plasmalemma under influence of Cd, Cu, Zn, Pb and the extracts from *Artemisia* species. Statistically reliable hyperpolarizing effect of *A.szovitsiana* and *A.scoparia* extracts in relation to Zn and Pb was revealed, respectively. Elimination by extracts a decrease of membrane conductivity caused by Cd and Zn and also an increase of conductivity by Cu was determined. Though a high HM accumulation capacity of *Artemisia* L. species is noticed to not connect with protective effect of their extracts on membrane conductivity, they can be a potential source for the searching new chemical compounds which are capable to induce the plant tolerance to stress impacts.

Key words: Heavy metals, extracts from *Artemisia* L., plasma membrane of *Chara gymnophylla* and *Nitella flexilis*, protective effect, accumulation capacity, Azerbaijan.

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРОВ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА РАЗНЫХ СОСТАВОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ОГУРЦА

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

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»

ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ

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

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

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0614

Аннотация. Разработан способ получения чистого пероксида водорода без примеси NO_x путем замены азотной среды, стабилизирующей факельный СВЧ разряд, водяным паром, когда дистиллированная вода и ее пар при атмосферном давлении обрабатываются чистой плазмой инертного аргона. Исследована динамика прорастания семян и развития проростков огурца в чистых растворах пероксида водорода, в растворах медицинского 3% пероксида водорода, стабилизированного бензоатом натрия, и в дистиллированной воде в контроле. Использовались концентрации растворов пероксида водорода в диапазоне от 0,1 мг/л до 10 мг/л. В качестве тест-объекта выбраны семена огурца «Конкурент» с пониженной всхожестью (результат длительного хранения). Семена по 30 штук раскладывали в чашки Петри на фильтры, однократно увлажненные в опыте исследуемыми растворами, а в контроле – дистиллированной водой. Показано, что всхожесть семян и развитие проростков в чистых растворах пероксида водорода достигает 95% при концентрации пероксида водорода 1,7 мг/л, в то время как при использовании медицинского пероксида аналогичный показатель составил 75% при концентрации 0,1 мг/л. Более высокие концентрации медицинского пероксида дали худший результат, в частности, концентрации 3,3 мг/л и 10 мг/л привели к угнетению процесса прорастания семян и показали худший результат.

Ключевые слова: плазма, стимуляция, азот, пероксид водорода, семена.

ВВЕДЕНИЕ

Было показано, что вода, обработанная струей аргоновой СВЧ-плазмы в воздухе или атмосфере азота, оказывала стимулирующее действие на прорастание семян и рост растений, что по эффективности превосходило влияние растворов промышленного пероксида водорода со стабилизирующими добавками. Особенность воды, получаемой [1,2] плазменной активацией (ПАВ), состояла в том, что кроме пероксида водорода в ней содержались оксиды азота (NO_x). Эти компоненты могли оказывать свое специфическое влияние на активацию семян и проростков. Представляется важным разделить влияние H_2O_2 и NO_x на прорастание семян и активацию проростков.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Для изучения влияния только растворов H_2O_2 на прорастание семян и активацию проростков было необходимо из состава ПАВ исключить оксиды азота NO_x . В связи с этим в ИОФ РАН была решена задача получения ПАВ чистого состава H_2O_2 без примеси NO_x путем замены азотной среды, стабилизирующей факельный СВЧ разряд, водяным паром [3], когда дистиллированная вода и ее пар при атмосферном давлении обрабатываются чистой плазмой инертного аргона.

Ранее проводилось сравнение влияния растворов ПАВ, содержащих H_2O_2 и NO_x , и растворов 3% медицинского пероксида водорода (H_2O_2), стабилизированного бензоатом натрия, на прорастание семян растений, что было первым опытом изучения ПАВ. Однако более корректно сравнивать влияние на прорастание семян чистых растворов H_2O_2 , получаемых при обработке водяного пара СВЧ-плазмой, с медицинским пероксидом водорода, что позволит выявить роль стабилизатора на активность аптечного пероксида водорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмотрон и установка по обработке воды СВЧ-плазмой. В качестве источника СВЧ-колебаний непрерывной генерации для получения ПАВ был использован «Магнетрон Вд-3ф» (АгроЭкоТех) мощностью 1200 Вт с частотой колебаний 2,45 ГГц. Магнетрон, через прямоугольный волновод питает коаксиальный плазмотрон, центральная трубка которого \varnothing 6 мм заканчивается коническим соплом с отверстием \varnothing 1,5 мм. Из сопла в изолированную от воздуха камеру реактора вытекает струя аргона атмосферного давления, в которой зажигается плазменный факел. Для поддержания стабильного горения плазменного факела в пространство между центральной и наружной трубками коаксиального плазмотрона, отделенными кварцевой трубкой-изолятором, подается пар от внешнего парогенератора. Корпус коаксиального плазмотрона через крышку сверху входит в изолированную от воздуха камеру реактора с охлаждаемыми стенками из нержавеющей стали объемом 3,5 л. При зажигании разряда в струе аргона формируется плазменный факел, окруженный паровой завесой. Давление

аргона и пара в камере реактора поддерживали немного выше атмосферного. Расходы аргона варьировали в пределах 4–5 л/мин. Расход перегретого пара в режиме обработки воды поддерживали на уровне 11 л/мин. Отработавший аргон и часть водяного пара вытесняются из объема камеры через патрубок в кожухо-трубный холодильник, из которого конденсат активированного пара возвращается в камеру, а аргон – в атмосферу.

Камеру реактора наполняли дистиллированной водой двойной перегонки объемом 2,3 л. ПАВ после окончания обработки сливали через дренажный патрубок. Через кварцевое смотровое окно в камере вели наблюдение и проводили спектральные измерения оптической эмиссии факела спектрометрами AvaSpec-2048 и AvaSpec-3648. После обработки плазмой воду сливали в пластиковые емкости и хранили до использования в холодильнике. Концентрацию раствора H_2O_2 измеряли колориметрическим методом цифровым тестером-фотометром Water-i.d. PoolLab 1.0 в диапазоне 0,0 - 2,9 мг/л с таблетками стандартного реагента PoolLab Peroxide LR. При концентрациях $[H_2O_2]$ выше предела измерения, раствор кратно разводили.

В качестве тест-объекта выбраны семена огурца «Конкурент» с пониженной всхожестью (результат длительного хранения). Семена по 30 штук раскладывали в чашки Петри на фильтры, однократно увлажненные в опыте исследуемыми растворами, в контроле дистиллированной водой.

Исследовали влияние чистых растворов СВЧ-ПАВ без примеси NO_x (растворы H_2O_2 , получаемые при обработке водяного пара СВЧ-плазмой), медицинского 3%-пероксида водорода (МПВ) и дистиллированной воды (ДВ) в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МПВ разводили дистиллированной водой до концентрации, близкой к разведениям СВЧ-ПАВ. Чашки Петри выставляли в термостат с температурой $+20^\circ C$ для изучения эффективности действия растворов на прорастание семян.

Прорастание семян проходит пять последовательных стадий, которые имеют свою продолжительность, биохимические и морфологические изменения семени (рис. 1):

(1) водопоглощение; (2) набухание, заканчивающееся наклеиванием; (3) рост первичного корешка; (4) развитие ростка; (5) формирование проростка. Для удобства наблюдения активации семян мы свели стадии к трем визуально наблюдаемым состояниям, когда:

на 2-е сутки у семян фиксируется корень ≤ 3 мм

на 3-е сутки у семян лопнула семенная оболочка

на 4-е сутки у проростков фиксируются свободные семядольные листья.

Результаты подсчета семян в перечисленных состояниях n по отношению к начальному числу $n_0 = 30$ штук в % приведены на рисунках 2 и 3 для СВЧ-ПАВ и МПВ в зависимости от порядкового номера суток, концентрация пероксида водорода является параметром зависимостей. Также представлены результаты по стадиям прорастания семян в дистиллированной воде – контроль.



Рисунок 1. Стадии прорастания семян огурца

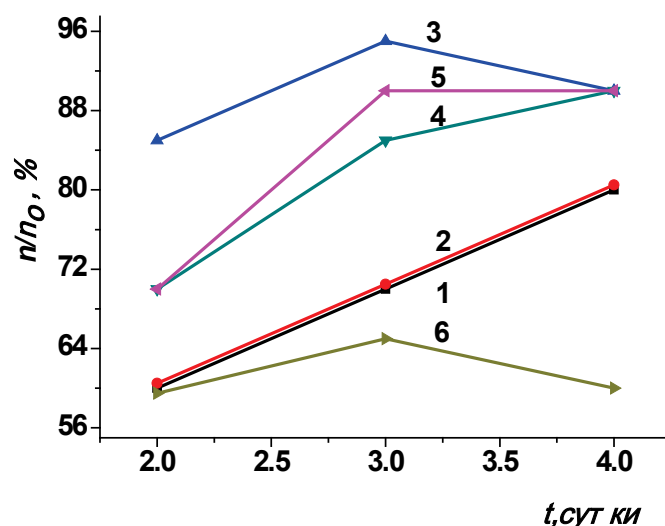


Рисунок 2. Динамика прорастания семян в растворах СВЧ-ПАВ с чистым пероксидом водорода разных разведений. На графике кривые соответствуют следующим концентрациям H₂O₂: 1 – 10 мг/л; 2 – 3,3 мг/л; 3 – 1,7 мг/л; 4 – 0,33 мг/л; 5 – 0,1 мг/л; 6 – контроль (дистиллированная вода)

Ранее [4] было показано, что между эндогенными регуляторами роста и развития растений H₂O₂ и NO_x существует тесное взаимодействие.

Пероксид водорода принадлежит к активным формам кислорода (АФК), он выполняет многофункциональную роль клеточного метаболита, участвующего в физиологических процессах развития растений. Активация семян, развитие корневой системы, процесс апоптоза. Показана существенная роль пероксида в процессах фотосинтеза [5], а также его свойство менять состав внутриклеточной воды, повышая количество связанной воды, выполнять роль антистрессового агента [6], повышая устойчивость растений к засухе, холоду, засолению почв [7].

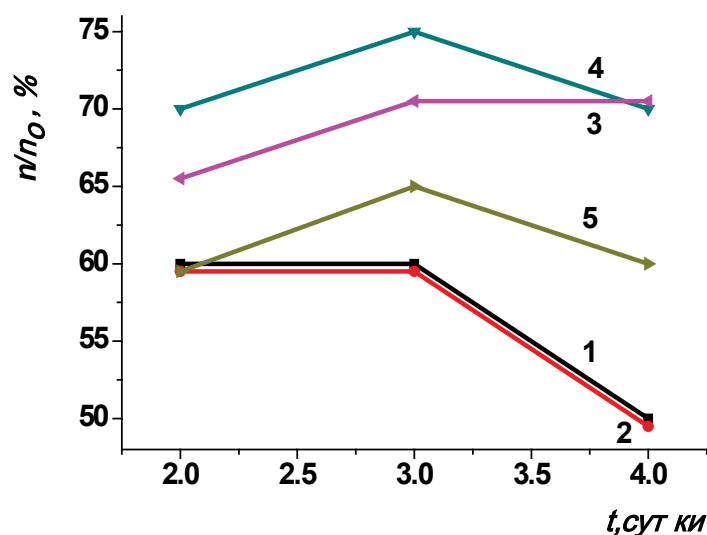


Рисунок 3. Динамика прорастания семян в растворах МПВ со стабилизатором разных разведений. На графике кривые соответствуют следующим концентрациям H₂O₂: 1 – 10 мг/л; 2 – 3,3 мг/л; 3 – 0,33 мг/л; 4 – 0,1 мг/л; 5 – контроль (дистиллированная вода)

Существуют свидетельства в пользу того, что оксид азота NO_x , также как H_2O_2 , участвует в регуляции процессов роста и развития растений: прорастание семян, цветение, развитие корней, созревание, проявляет себя регулятором передачи сигналов, повышает устойчивость растений к болезням и к различным абиотическим стрессам. NO_x , как и H_2O_2 , влияет на клеточный метаболизм [4].

Между H_2O_2 и NO_x имеет место перекрестные взаимодействия в передаче сигналов [4], которые являются комплексным фактором регулирования развития растений. Пероксид может действовать как кофактор, способствующий эндогенному синтезу NO_x , а с другой стороны, NO_x может способствовать образованию пероксида в растениях и ингибировать его эндогенную генерацию. Пероксид и оксид азота, взаимодействуя, влияют на жизнедеятельность растений.

Нами показано, что общим свойством прорастания семян огурца пониженной всхожести в растворах СВЧ-ПАВ, МПВ и дистиллированной воде (контроль) является положительная динамика развития между первой и второй стадиями (2-ми и 3-ми сутками) за исключением задержки освобождения семян от оболочки в более концентрированных растворах МПВ (рис. 3, кривые 1,2), что происходит с заметным отставанием от семян в контроле с водой (кривая 5).

Наблюдается общая тенденция к замедлению развития проростков между 3-ми и 4-ми сутками, что может объясняться физиологическими причинами, увеличением объема проростков из-за деления клеток и естественного истощения пероксида.

Что касается растворов МПВ (рис. 3), то очевидно, что более высокие его концентрации (рис. 3, кривая 1 и 2) дают худший результат по сравнению с контролем (рис. 3, кривая 5). При снижении начальной концентрации пероксида водорода в растворах МПВ до значений близких к концентрации СВЧ-ПАВ получен похожий результат по увеличению числа проросших семян и тенденции их развития. Результаты по семенам пониженной всхожести огурца «Конкурент» оказываются ниже (до 20%) по сравнению с всхожестью семян в растворах СВЧ-ПАВ эквивалентных концентраций.

Показано, что всхожесть семян и развитие проростков в растворах СВЧ-ПАВ достигает 95%. Низкие показатели прорастания семян и развития проростков в растворах МПВ видимо связаны с присутствием стабилизатора (бензоата натрия) в его составе, который по своему назначению блокирует катализаторы распада пероксида.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования убедительно показывают на примере прорастания семян огурца высокую эффективность применения экологически чистого водного раствора пероксида водорода как стимулятора роста и развития растений. Представляется целесообразным дальнейшее развитие данного направления в интересах растениеводства на примере других сельскохозяйственных культур.

Список литературы / References:

1. Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Апашева Л.М., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В. Вода, активированная струей аргоновой СВЧ-плазмы, как фактор, стимулирующий прорастание семян растений. *Химическая физика*, 2022, т. 41, № 1, с. 60-65 [Sergeychev K.F., Lukina N.A., Apasheva L.M., Ovcharenko E.N., Lobanov A.V. [Sergeychev K.F., Lukina N.A., Apasheva L.M., Ovcharenko E.N., Lobanov A.V. Voda, aktivirovannaya struyoy argonovoy SVCH-plazmy, kak faktor, stimulyacii prorastanie semyan rasteniy. *Khimicheskaya fizika*, 2022, vol. 41, no. 1, pp. 60-65 (In Russ.)].
2. Сергейчев К.Ф., Апашева Л.М., Лукина Н.А., Будник М.И., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В. Вода, активированная СВЧ-плазмой, как регулятор роста хвойных. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 3, с. 369-373 [Sergeychev K.F., Apasheva L.M., Lukina N.A., Budnik M.I., Ovcharenko E.N., Lobanov A.V. Voda, aktivirovannaya SVCH-plazmoy, kak regulyator rosta khvoynykh. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i khimii*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 369-373, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0528 (In Russ.)].
3. Сергейчев К.Ф., Хаваев В.Б., Лукина Н.А. Способ СВЧ-плазменной активации воды для синтеза пероксида водорода и устройство для его осуществления. Патент РФ № 2761437, 2022 [Sergeychev K.F., Navaev V.B., Lukina N.A. *Sposob SVCH-plazmennoy aktivatzii vody dlya sinteza peroksida vodoroda i ustroystvo dlya ego osushchestvleniya*. Patent RF № RU 2761437, 2022 (In Russ.)].
4. Niu L., Liao W. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Physiology*, 2016, vol. 7, doi: 10.3389/fpls.2016.00230.
5. Комиссаров Г.Г. *Фотосинтез: физико-химический подход*. М.: Эдиториал УРСС, 2003, 224 с. [Komissarov G.G. *Photosyntezy: fiziko-hemicheskij podhod*. М.: Editorial URSS, 2003, 224 p. (In Russ.)].
6. Апашева Л.М., Лобанов А.В., Комиссаров Г.Г. Изменение структуры внутриклеточной воды под действием пероксида водорода. *Материалы V съезда биофизиков России*, 2015, т. 2, с. 73 [Apasheva L.M., Lobanov A.V., Komissarov G.G. *Izmenenie struktury vnutrikletochnoy vody pod deystviem peroksida vodoroda*. *Materialy V Sezda biophysikov Rossii*, 2015, vol. 2, pp. 73 (In Russ.)].
7. Апашева Л.М., Комиссаров Г.Г., Сахаров А.М., Сахаров П.А. Способ повышения солеустойчивости растений (варианты). Патент РФ № 2445759, 2010 [Apasheva L.M., Komissarov G.G., Saharov A.M., Saharov P.A. *Sposob povysheniya soleustoychivosti rasteniy (versii)*. Patent RF № 2445759, 2010. (In Russ.)]

INFLUENCE OF SOLUTIONS OF HYDROGEN PEROXIDE OF DIFFERENT COMPOSITIONS ON THE SEEDS GERMINATION**Sergeychev K.F.¹, Lukina N.A.¹, Apasheva L.M.², Budnik M.I.², Ovcharenko E.N.²**¹A.M. Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences
*Vavilova str., 38, Moscow, 119991, Russia*²N.N. Semenov Federal Research Centre for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences
Kosygina str., 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ziraf@mail.ru

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0614

Abstract. A method has been developed for producing pure hydrogen peroxide without admixture of NO_x by replacing the nitrogen medium stabilizing the flare microwave discharge with water vapor when distilled water and its vapor at atmospheric pressure are treated with pure inert argon plasma. The dynamics of seed germination and development of cucumber seedlings in pure solutions of hydrogen peroxide, in solutions of medical 3% hydrogen peroxide stabilized with sodium benzoate, and in distilled water in the control were studied. The concentrations of hydrogen peroxide solutions in the range from 0,1 mg/l to 10 mg/l were used. Cucumber seeds «Competitor» with reduced germination (the result of long-term storage) were selected as a test object. Seeds of 30 pieces were placed in Petri dishes on filters, moistened once in the experiment with the studied solutions, and in the control with distilled water. It is shown that the germination of seeds and the development of seedlings in pure solutions of hydrogen peroxide reaches 95% at a concentration of hydrogen peroxide of 1,7 mg/l, while when using medical peroxide, the same indicator was 75% at a concentration of 0,1 mg/l. Higher concentrations of medical peroxide gave the worst result, in particular, concentrations of 3,3 mg/l and 10 mg/l led to inhibition of the seed germination process and showed the worst result.

Key words: *plasma, stimulation, nitrogen, hydrogen peroxide, seeds.*