

Ученые записки Казанского университета.

Серия Естественные науки
рецензируемый научный журнал

2025
Т. 167, кн. 2

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ОСНОВАНЫ В 1834 ГОДУ

Редакционная коллегия

Главный редактор

Д.А. Таюрский – д-р физ.-мат. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Члены редколлегии

Г.К. Зиятдинова (зам. гл. ред.) – д-р хим. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.Д. Калмыкова (секретарь) – Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Н.И. Акберова – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

И.С. Антипин – д-р хим. наук, проф., чл.-корр. РАН, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.С. Борисов – д-р геол.-минер. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Г.К. Будников – д-р хим. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.С. Бяков – д-р геол.-минер. наук, доц., Северо-Восточный комплексный научно-исследовательский институт им. Н.А. Шило ДВО РАН, г. Магадан, Россия

А.А. Варнек – канд. наук, д-р теоретической химии, проф., Страсбургский университет, г. Страсбург, Франция

О.П. Ермолаев – д-р геогр. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Р.И. Жданов – д-р хим. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

И.Б. Ившина – д-р биол. наук, акад. РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

С.В. Костров – д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН, Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва, Россия

Я. Лабуда – д-р наук, проф., Словацкий технологический университет в Братиславе, г. Братислава, Словацкая Республика

М. Либонати – д-р мед. наук, почетный проф., Университет Вероны, г. Верона, Италия

В.В. Малахов – д-р биол. наук, акад. РАН, Московский государственный университет, г. Москва, Россия

А.И. Мелентьев – д-р биол. наук, проф., Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

Д.К. Нургалеев – д-р геол.-минер. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.А. Паутов – д-р биол. наук, проф., Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

Ю.П. Переведенцев – д-р геогр. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Р.М. Сабиров – канд. биол. наук, доц., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

С.Ю. Селивановская – д-р биол. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

В.В. Силантьев – д-р геол.-минер. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

О.Г. Синяшин – д-р хим. наук, акад. РАН, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

Н.Ю. Степанова – д-р биол. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Р.Н. Хазитов – д-р мед. наук, Средиземноморский институт нейробиологии, г. Марсель, Франция; Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Ф. Хеллер – д-р наук, почетный проф., Швейцарская высшая техническая школа Цюриха, г. Цюрих, Швейцария

Редактор английского текста *А.О. Кармазина*

Учредитель и издатель: ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство о регистрации ПИИ № ФС77-41874 от 27 августа 2010 г.

Журнал реферируется/индексируется в Scopus, DOAJ, EBSCO, eLIBRARY.RU, Emerging Sources Citation Index, Google Scholar, CAB Abstracts and Global Health, CAS Source Index, GeoRef, Sherpa Romeo, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat, КиберЛенинка

Подписной индекс 19422. Цена свободная

Адрес издателя и редакции «Ученые записки Казанского университета»:

420008, Российская Федерация, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Телефон: (843) 233-73-01; e-mail: uz.ku@kpfu.ru; сайт: <https://uzakuesc.elpub.ru>

Дата выхода в свет 10.06.2025. Формат 60×84/8.

Бумага офсетная. Усл. печ. л. 21,27.

Уч.-изд. л. 13,63. Тираж 300 экз. Заказ 90/5

Отпечатано в типографии Издательства Казанского университета

420008, Российская Федерация, Республика Татарстан,

г. Казань, ул. проф. Нужина, д. 1/37

Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta.

Seriya Estestvennyye Nauki

Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series

Peer-Reviewed Scientific Journal

2025
Vol. 167, No. 2

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA FOUNDED IN 1834

Editorial Board

Editor-in-Chief

Dmitrii A. Tayurskii – Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Members of Editorial Board

Guzel K. Ziyatdinova (Deputy Editor-in-Chief) – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Alena D. Kalmykova (Secretary) – Kazan Federal University, Kazan, Russia

Natalya I. Akberova – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Igor S. Antipin – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Aleksander S. Biakov – Dr. Sci. (Geology and Mineralogy), Associate Professor, North-East Interdisciplinary Scientific Research Institute n. a. N.A. Shilo, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

Anatolij S. Borisov – Dr. Sci. (Geology and Mineralogy), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Herman C. Budnikov – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Oleg P. Ermolaev – Dr. Sci. (Geography), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Friedrich Heller – Dr. sc. nat., Professor Emeritus, Swiss Federal Institute of Technology in Zürich, Zürich, Switzerland

Irina B. Ivshina – Dr. Sci. (Biology), Member of Russian Academy of Sciences, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Roustem N. Khazipov – Dr. Sci. (Medicine), Mediterranean Institute of Neurobiology, Marseille, France; Kazan Federal University, Kazan, Russia

Sergey V. Kostrov – Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Jan Labuda – DrSc. (Chemical Sciences), Professor, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic

Massimo Libonati – Doctor of Medicine, Professor Emeritus, Verona University, Verona, Italy

Vladimir V. Malakhov – Dr. Sci. (Biology), Member of Russian Academy of Sciences, Moscow State University, Moscow, Russia

Aleksandr I. Melentiev – Dr. Sci. (Biology), Professor, Institute of Biology, Ufa Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Danis K. Nurgaliev – Dr. Sci. (Geology and Mineralogy), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Anatolii A. Pautov – Dr. Sci. (Biology), Professor, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Jurij P. Perevedentsev – Dr. Sci. (Geography), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Rushan M. Sabirov – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Svetlana Ju. Selivanovskaya – Dr. Sci. (Biology), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Vladimir V. Silantev – Dr. Sci. (Geology and Mineralogy), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Oleg G. Sinyashin – Dr. Sci. (Chemistry), Member of Russian Academy of Sciences, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

Nadezhda Yu. Stepanova – Dr. Sci. (Biology), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Alexandre Varnek – PhD in Physical Chemistry, Habilitation in Theoretical Chemistry, Professor, University of Strasbourg, Strasbourg, France

Renad I. Zhdanov – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

English Editor: *A.O. Karmazina*

Founder and Publisher: Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Kazan (Volga Region) Federal University”

The journal is registered with the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Media

Registration certificate PI No. FS77-41874 dated August 27, 2010

The journal is abstracted and/or indexed in Scopus, DOAJ, EBSCO, eLIBRARY.RU, Emerging Sources Citation Index, Google Scholar, CAB Abstracts and Global Health, CAS Source Index, GeoRef, Cyberleninka, Sherpa Romeo, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat

Subscription index: 19422. Free price

Contacts: Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

Phone: (843) 233-73-01; e-mail: uz.ku@kpfu.ru; website: <https://uzakuesc.elpub.ru>

Date of publication: June 10, 2025. Page size: 60×84/8.

Offset printing. Conventional printing sheet: 21.27.

Publisher's signature: 13.63. Circulation: 300 copies. Order: 90/5

Printed in KFU Publishing House

ul. Prof. Nuzhina 1/37, Kazan,

Republic of Tatarstan, 420008 Russia

СОДЕРЖАНИЕ

Новикова В.Д., Агафонова Л.Е., Леонов Г.Е., Кирсанова Л.А., Басок Ю.Б., Ковалёв А.В., Шумянцева В.В., Ярыгин К.Н., Вахрушев И.В. Электрохимический сенсор для оценки накопления внеклеточного матрикса в культивируемых хондросферах.....	185
Лепикаш Р.В., Захаров Н.С., Оськин П.В., Стом Д.И., Лаврова Д.Г., Алферов С.В. Модификация электродов для увеличения генерации электроэнергии в растительных микробных топливных элементах	201
Гарифзянов А.Р., Мирзаянов И.И., Шурыгин И.Д., Чибирев Е.О., Девятков Ф.В. Комплексообразование трехзарядных катионов лантаноидов с аминоксидом(О-алкил)метилфосфоновыми кислотами – ближайшими фосфорорганическими аналогами нитрилтриуксусной кислоты.....	223
Chouikh A., Ben Ali A., Chenguel A. Antioxidant potential and phenolic composition of <i>Cistanche tinctoria</i> : A comparative study of crude, flavonoid, and tannin extracts	242
Штырлин Н.В., Хазиев Р.М., Исламов Д.Р., Штырлин Ю.Г. Фотохимическая E/Z-изомеризация изоникотиноилгидразонов на основе производных пиридоксина	254
Исламов Д.Р., Биктимиров А.Д., Клочкова Э.А., Усачев К.С. Применение контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для улучшения пространственного разрешения рефлексов на примере кристаллов белка Era из <i>Staphylococcus aureus</i>	268
Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Ксимедон и его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой при лечении экспериментально вызванного фиброза печени крыс.....	276
Бикмуллин А.Г., Клочкова Э.А., Александрова Н.М., Усачев К.С. Бесклеточная система трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов <i>Gallus gallus</i>	297
Горбунова С.Ю., Боровков А.Б. Анализ и апробация методов отделения микроводорослей от культуральной среды, применимых для <i>Porphyridium purpureum</i>	312
Стаменов М.Н. Оценка перспектив динамики ценопопуляций <i>Quercus robur</i> L. в сообществах музея-заповедника «Куликово поле» методами популяционной биологии растений	336
Kuzina D., Gattacceca J., Gouilloux H., Mertens H., Lacube R., Demory F., Lorenz C. The effect of terrestrial weathering on the magnetic properties of meteorites from the Atacama Desert.....	353

CONTENTS

<i>Novikova V.D., Agafonova L.E., Leonov G.E., Kirsanova L.A., Basok Yu.B., Kovalev A.V., Shumyantseva V.V., Yarygin K.N., Vakhrushev I.V.</i> Electrochemical sensor for assessing the accumulation of extracellular matrix in cultured chondrospheres	185
<i>Lepikash R.V., Zakharov N.S., Oskin P.V., Stom D.I., Lavrova D.G., Alferov S.V.</i> Modification of electrodes to boost electricity generation in plant microbial fuel cells	201
<i>Garifzyanov A.R., Mirzayanov I.I., Shurygin I.D., Chibirev E.O., Devyatov F.V.</i> Complexation of trivalent lanthanide cations with amino(<i>O</i> -alkyl)methylenephosphonic acids as the closest organophosphorus analogues of nitrilotriacetic acid	223
<i>Chouikh A., Ben Ali A., Chenguel A.</i> Antioxidant potential and phenolic composition of <i>Cistanche tinctoria</i> : A comparative study of crude, flavonoid, and tannin extracts	242
<i>Shtyrlin N.V., Khaziev R.M., Islamov D.R., Shtyrlin Y.G.</i> Photochemical <i>E/Z</i> isomerization of isonicotinoyl hydrazones based on pyridoxine derivatives	254
<i>Islamov D.R., Biktimirov A.D., Klochkova E.A., Usachev K.S.</i> Controlled beam divergence on a laboratory diffractometer to improve spatial resolution of reflexes for Era protein crystals from <i>Staphylococcus aureus</i>	268
<i>Belyaev G.P., Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V.</i> Xymedon and its conjugate with <i>L</i> -ascorbic acid for treating experimentally induced liver fibrosis in rats	276
<i>Bikmullin A.G., Klochkova E.A., Alexandrova N.M., Usachev K.S.</i> Avian cell-free translation system based on the cell extract of <i>Gallus gallus</i> embryos	297
<i>Gorbunova S.Yu., Borovkov A.B.</i> Analysis and evaluation of methods used for harvesting microalgae from culture media and suitable for <i>Porphyridium purpureum</i>	312
<i>Stamenov M.N.</i> Prospects for the dynamics of <i>Quercus robur</i> L. cenopopulations in the communities of the Kulikovo Field State Museum-Reserve assessed by the methods of plant population biology	336
<i>Kuzina D., Gattacceca J., Gouilloux H., Mertens H., Lacube R., Demory F., Lorenz C.</i> The effect of terrestrial weathering on the magnetic properties of meteorites from the Atacama Desert	353

Оригинальная статья

УДК 544.6.018.2+576.54

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>**Электрохимический сенсор для оценки накопления внеклеточного матрикса в культивируемых хондросферах**

В.Д. Новикова¹, Л.Е. Агафонова¹✉, Г.Е. Леонов¹, Л.А. Кирсанова², Ю.Б. Басок²,
А.В. Ковалёв³, В.В. Шумянцева¹, К.Н. Ярыгин¹, И.В. Вахрушев¹

¹НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва, Россия

²НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени ак. В.И. Шумакова, г. Москва, Россия

³НМИЦ травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова, г. Москва, Россия

✉ agafonovaluba@mail.ru

Аннотация

Повреждения суставного хряща представляют актуальную медицинскую проблему в связи с высокой частотой проявлений этого заболевания опорно-двигательного аппарата. Сниженная естественная способность хрящевой ткани к регенерации может быть компенсирована за счет регенеративной терапии. Золотым стандартом в данной области стала внутрисуставная матрикс-ассоциированная трансплантация аутологичных хондроцитов, которая подразумевает их введение либо в составе тканеинженерных конструкций в комплексе с матриксом-носителем (скаффолдом), либо в виде тканевых сфероидов (хондросфер). Последний подход представляется наиболее физиологичным, так как в составе сфероидов клетки имеют возможность продуцировать и накапливать собственный внеклеточный матрикс. При масштабном производстве такого типа биомедицинских клеточных продуктов встает вопрос о доступных и эффективных методах контроля качества получаемых хондросфер, позволяющих оценивать их химический состав и биологические свойства. В работе предложен прототип сенсора для сравнительного электрохимического профилирования хондросфер, обеспечивающий количественную оценку накопления компонентов внеклеточного матрикса гиалинового хряща в их составе.

Ключевые слова: хондросферы, суставной хрящ, клеточные сфероиды, внеклеточный матрикс, коллаген, гликозаминогликаны, электроанализ.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России (протокол № 1/22 от 26 декабря 2022 года).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Для цитирования: Новикова В.Д., Агафонова Л.Е., Леонов Г.Е., Кирсанова Л.А., Басок Ю.Б., Ковалёв А.В., Шумянцева В.В., Ярыгин К.Н., Вахрушев И.В. Электрохимический сенсор для оценки накопления внеклеточного матрикса в культивируемых хондросферах // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 185–200. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>

Electrochemical sensor for assessing the accumulation of extracellular matrix in cultured chondrospheres

V.D. Novikova¹, L.E. Agafonova¹✉, G.E. Leonov¹, L.A. Kirsanova², Yu.B. Basok²,
A.V. Kovalev³, V.V. Shumyantseva¹, K.N. Yarygin¹, I.V. Vakhrushev¹

¹*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

²*V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
Moscow, Russia*

³*National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov,
Moscow, Russia*

✉ agafonovaluba@mail.ru

Abstract

The degeneration of cartilage in articular joints is a significant medical concern due to its high incidence rate. Damaged articular cartilage has a limited ability to regenerate naturally and thus often requires regenerative therapy. Intra-articular matrix-associated autologous chondrocyte transplantation, which involves the introduction of chondrocytes into the damaged area either as part of tissue-engineered constructs with a carrier matrix (scaffold) or in the form of tissue spheroids (chondrospheres), is generally considered the gold standard for treating such defects. This approach is probably the most biomimetic restorative articular cartilage treatment in the sense that it supports the cells in spheroids to produce and accumulate their own extracellular matrix. The growing interest in large-scale production of such biomedical cellular products raises the question of accessible and effective methods for assessing the quality of obtained chondrospheres, both in terms of their chemical composition and biological properties. Here, a sensor prototype based on comparative electrochemical profiling of chondrospheres is proposed for quantitative assessment of the accumulation of extracellular matrix components in hyaline cartilage.

Keywords: chondrospheres, articular cartilage, cell spheroids, extracellular matrix, collagen, glycosaminoglycans, electroanalysis

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov (protocol code 1/22 dated December 26, 2022).

Informed Consent Statement. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments. This study was performed as part of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a Long-Term Period (2021–2030) (no. 122022800499-5).

For citation: Novikova V.D., Agafonova L.E., Leonov G.E., Kirsanova L.A., Basok Yu.B., Kovalev A.V., Shumyantseva V.V., Yarygin K.N., Vakhrushev I.V. Electrochemical sensor for assessing the accumulation of extracellular matrix in cultured chondrospheres. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 185–200. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.185-200>. (In Russian)

Введение

Несмотря на критически важную физиологическую роль суставного хряща в обеспечении подвижности опорно-двигательного аппарата, его ткань обладает крайне низкой природной способностью к самовосстановлению. Главными причинами являются отсутствие в хряще кровеносных сосудов, а также высокая плотность внеклеточного матрикса (ВКМ). В течение жизни суставы испытывают высокую механическую нагрузку и нередко подвергаются травмам, что часто приводит к развитию хронических дегенеративных заболеваний, наиболее распространённым из которых является остеоартрит.

Золотым стандартом в регенеративной медицине хряща на сегодняшний день является трансплантация аутологичных хондроцитов в комплексе с матриксом-носителем (англ. MACI – matrix-associated autologous chondrocyte implantation) [1]. Основными функциями трехмерного матрикса (скаффолда) являются иммобилизация клеток и имитация их тканевой ниши. Его применение позволяет продлить выживаемость клеток в зоне введения и дает им возможность полнее реализовать свои регенеративные функции, что существенно повышает терапевтическую эффективность процедуры.

Для этих целей предложены различные биоразлагающиеся матриксы на основе природных и синтетических материалов, однако большинство из них не дошли до клинического применения. Первое разрешение Администрации по делам продовольствия и медикаментов США (англ. FDA – Food and Drug Administration) получил тканеинженерный препарат MACI (Vericel Corp., США) в 2021 г., представляющий собой аутологичные хондроциты, культивированные на мембране, состоящей из свиного коллагена [2].

Другим хорошо себя зарекомендовавшим подходом является трансплантация хондроцитов в виде трехмерных тканевых сфероидов, называемых хондросферами [3]. Формируясь в результате агрегации клеток в низкоадгезивных условиях, они являются, по сути, бескаффолдными тканеинженерными конструкциями [4]. При таком способе культивирования хондроциты имеют возможность образовывать межклеточные контакты и обмениваться регуляторными сигналами, а также вырабатывать и накапливать собственный ВКМ, что способствует сохранению их фенотипа и свойств [5].

Хондросферы успешно применяются в клинической практике с 2017 г. под брендом Spherex (CO.DON AG, Германия). Накопленные за этот период положительные результаты позволяют предположить, что производство хондросфер для терапевтических целей будет получать все более широкое распространение [6]. Одной из наиболее значимых проблем, сдерживающих этот процесс, является высокая вариабельность свойств первичных культур аутологичных хондроцитов, от которых напрямую зависит и терапевтическая эффективность хондросфер на их основе. По этой причине разработка способов контроля качества производимых хондросфер представляет важную практическую задачу для активно развивающейся регенеративной медицины [7].

Перспективным представляется применение для этих целей электрохимических методов. Многие важные процессы в живых клетках основаны на переносе электронов и, соответственно, могут быть зарегистрированы электрохимически. Например, окислительно-восстановительные реакции и изменения в ионном составе за счет протекания различных клеточных процессов, приводят к генерации и/или переносу электронов на внутренних и внешних мембранах клеток [8]. Кроме того, белки внешней оболочки клеточной мембраны могут быть зарегистрированы и идентифицированы на основе по реакциям электрохимического окисления некоторых аминокислот, входящих в состав белков (тирозин, триптофан,

цистеин, гистидин, цистин, метионин) [9, 10]. Следовательно, эукариотические и прокариотические клетки могут быть охарактеризованы как электрохимически динамичные системы, способные к переносу электронов, то есть к окислению и/или восстановлению клеточных компонентов, таких как белки, ДНК, РНК, простетические группы клеточных ферментов (гем, флавины, хиноны) [8]. Электроанализ клеток позволяет исследовать каталитические и электрохимические свойства их электротранспортных белков, анализировать метаболические клеточные процессы, прогнозировать антибиотикорезистентность клеток, использовать клетки для «зеленого» синтеза наночастиц металлов [11, 12]

Электрохимические методы позволяют не только зарегистрировать отдельные компоненты клеток (белковые и нуклеотидные молекулярные отпечатки, электроактивные ферменты), но и анализировать молекулярно-биологические процессы при трансфекции клеток, фрагментации ДНК после воздействия ферментов рестрикции и при апоптозе, при исследовании инактивации вирусов [13, 14]. Так, авторами работы [15] разработан подход для быстрого (3 мин) электрохимического скрининга внеклеточного матрикса дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) *in vitro* с помощью электродов, модифицированных наночастицами палладия, в зависимости от оптической плотности, времени культивирования и используемой среды роста. Скрининг проводили по электроокислению вторичных метаболитов (органогидразинов) дрожжей в диапазоне потенциалов от +0.18 до +0.35 В в условиях циклической вольтамперометрии. Такой подход позволяет зарегистрировать незначительные различия в условиях культивирования клеток, а также отличить клетки дикого типа от генетически модифицированных вариантов.

На примере двумерных культур хондроцитов и клеточных сфероидов при концентрации 2×10^6 клеток/мл с помощью дифференциально-импульсной вольтамперометрии установлено [16], что для двумерных культур характерен один пик окисления при потенциале 0.56 ± 0.01 В, который, скорее всего, соответствует электрохимическому окислению экспонированных аминокислот (тирозин, триптофан, цистеин) мембранных белков клеток. Для хондросфер как моделей 3D-клеток регистрировали также второй пик окисления при потенциале 0.86 ± 0.01 В, который может соответствовать электропревращению метаболитов и других компонентов ВКМ. Таким образом, дифференциально-импульсная вольтамперометрия позволяет достоверно и количественно различать «двумерные» и «трехмерные» клетки.

В настоящем исследовании разработан сенсор для количественной оценки накопления ВКМ в составе тканевых сфероидов на основе хондроцитов человека (хондросфер) путем сравнительного электрохимического профилирования биоконпонентов, иммобилизованных на рабочей поверхности электрода.

1. Материалы и методы

1.1. Первичные культуры хондроцитов. Фрагменты суставного хряща получали с интактной суставной поверхности мышелка бедренной кости человека. Образцы промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 1 % антибиотика/антимикотика (ПанЭко, Россия). Ткань механически измельчали на кусочки размером менее ~ 1 мм³, помещали в 0.1 % раствор коллагеназы I (Gibco, США) и инкубировали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажность) в течение 60 мин. Далее, осадив центрифугированием, измельченную и обработанную коллагеназой ткань переносили в культуральные флаконы 75 см² с питательной средой DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США).

Культивирование проводили при 37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажности со сменой питательной среды каждые 3–4 дня. По мере достижения монослоя, культуры пассировали. Сначала промывали клетки раствором Версена (ПанЭко, Россия), после чего инкубировали в смеси Версен + трипсин (1 : 1) (ПанЭко, Россия) в течение 5 мин при 37 °С. Затем клетки переводили в суспензию, центрифугировали, ресуспендировали в свежей питательной среде и пассировали в соотношении 1 : 3.

1.2. Получение хондросфер и хондрогенная дифференцировка. Сфероиды формировали с использованием 96 луночных планшетов из низкоадгезивного пластика (Corning, США). Для приготовления сфероидов клеточную суспензию, рассчитанную в количестве 250 тыс. кл./мл, вносили аликвотами по 200 мкл в лунки планшета. Планшеты с клетками помещали на 48 ч в CO₂-инкубатор в стандартные для культивирования условия (37 °С, 5 % CO₂, 80 % влажность). Спустя 48 ч, обычную ростовую среду заменяли на среду для хондрогенной дифференцировки, представлявшую собой DMEM HG (Gibco, США) с добавлением 100 ед/мл пенициллина (Gibco, США), 100 ед/мл стрептомицина (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамина (Gibco, США), 1 % пирувата натрия (Gibco, США), 10 % ITS+Premix (Corning, США), 1 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 0.25 % аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0.0001 % дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) и 10 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1) (PeproTech, США). Дальнейшее культивирование проводили в вышеуказанных условиях в течение трех недель с ежедневной сменой хондрогенной среды.

1.3. Гистологический анализ. Оценка накопления ВКМ. Хондросферы фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина (Биовитрум, Россия) в течение 24 ч, промывали в проточной воде и обезвоживали в этаноле восходящей концентрации (70, 80, 90, и 96 %), затем выдерживали в смеси 96 % этанола с хлороформом или ксилолом и заливали в парафин. Срезы образцов толщиной 4–5 мкм делали с помощью микротомы Leica RM3255 (Leica Microsystems, Германия).

Гликозаминогликаны в исследуемых образцах выявляли, окрашивая срезы 1 % раствором альцианового синего (Sigma, США) в течение 30–45 минут. Затем срезы ополаскивали дистиллированной водой и докрашивали гематоксилином Майера 2 мин, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в карбол-ксилоле, ксилоле и заключали в бальзам. Окрашивание образцов на общий коллаген проводили по методу Массона. Депарафинированные, регидратированные срезы окрашивали железным гематоксилином Вейгерта (Биовитрум, Россия) в течение 2 мин, затем 15 мин промывали водопроводной водой и окрашивали кислым фуксином 2 мин. После чего срезы быстро ополаскивали дистиллированной водой и помещали в 1 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты на 10 мин. Раствор кислоты сливали, не ополаскивая срезы в воде, и помещали стекла в раствор анилинового синего на 1–2 мин, срезы ополаскивали водопроводной водой и дифференцировали в 1 % уксусной кислоте в течение 10 мин. Проводили обезвоживание в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам.

1.4. Подготовка образцов для электрохимического анализа. Образцы хондросфер после культивирования трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ПанЭко, Россия) от хондрогенной среды и лизировали тремя циклами замораживания-размораживания с последующей ультразвуковой дезинтеграцией для равномерного нанесения на рабочий электрод.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора Quant-IT® PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Хондросферы до и после культивирования с TGF- β 1 дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, разбавляли до 300 мкл и разрушали с помощью ультразвука до получения гомогената. В полученный лизат добавляли реагент PicoGreen™ согласно рекомендациям производителя и измеряли флуоресценцию ($\lambda_{\text{возб}} = 480$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 560$ нм) на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Швейцария).

1.5. Электрохимический анализ. Электрохимические измерения проводили на потенциостате PalmSens (PalmSens BV, Нидерланды) с программным обеспечением PSTrace (версия 5.8) и трехконтактными электродами, изготовленными методом трафаретной печати (КолорЭлектроникс, Россия). Электродная система состояла из графитовых рабочего и вспомогательного электродов (ПГЭ) и хлоридсеребряного электрода сравнения. Диаметр рабочего электрода равен 0.2 см (площадь 0.0314 см²).

Для приготовления 0.1 М калий-фосфатного буферного раствора, pH 7.4, содержащего 0.05 М NaCl, использовали однозамещенный фосфат калия и хлорид натрия («Реахим», Россия). В работе применяли также коммерческие реактивы: гиалуронат натрия (высокомолекулярная 1.2–1.4 МДа гиалуриновая кислота “CristalHyal”) (Soliance, Франция), одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой (OCSiAl, Россия), и коллаген I типа (Gibco, США).

Электрохимические измерения проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в условиях циклической (диапазон потенциалов от –0.3 до +1.2 В, шаг потенциала 10 мВ, скорость сканирования потенциала 50 мВ/с) и квадратно-волновой (диапазон потенциалов от 0.0 до +1.2 В, шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ и частота 10 Гц, скорость сканирования потенциала 100 мВ/с).

Рабочую поверхность ПГЭ модифицировали 2 мкл водной дисперсии (0.75 ± 0.05) мг/мл ОУНТ, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой (ПГЭ/ОУНТ). ПГЭ/ОУНТ инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем проводили их предобработку (четыре скана в рабочем диапазоне потенциалов в квадратно-волновом режиме). На ПГЭ/ОУНТ наносили 2 мкл лизата клеток, коллагена или гиалуроната натрия и инкубировали 24 ч при +4 °С. Затем на электрод наносили 60 мкл калий-фосфатного буферного раствора, pH 7.4, содержащего 0.05 М NaCl, и проводили измерения в планарном режиме.

Для измерения электрохимических характеристик применяли коррекцию базовой линии в программе PSTrace. Электрохимическими характеристиками служили численные значения максимальной амплитуды тока пика окисления (I , мкА) и площадь пика (S , мкА $\times$ В) при соответствующих потенциалах (E , В). Для количественного сравнения полученные максимальные амплитуды токов электроокисления образцов хондросфер нормировали по концентрации в них двухцепочечной ДНК (дцДНК).

1.6. Статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполняли в программе GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Сравнение двух групп проводили с помощью t -теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Получение хондросфер из первичных хондроцитов человека. Из фрагментов ткани суставного хряща выделяли первичные культуры хондроцитов человека. Полученные культуры представляли собой морфологически однородную популяцию адгезивных одноядерных клеток с характерной полигональной морфологией. Клетки обладали выраженной способностью к миграции, позволявшей им быстро покидать фрагменты тканевого эксплантата и равномерно распределяться по пластику (рис. 1).

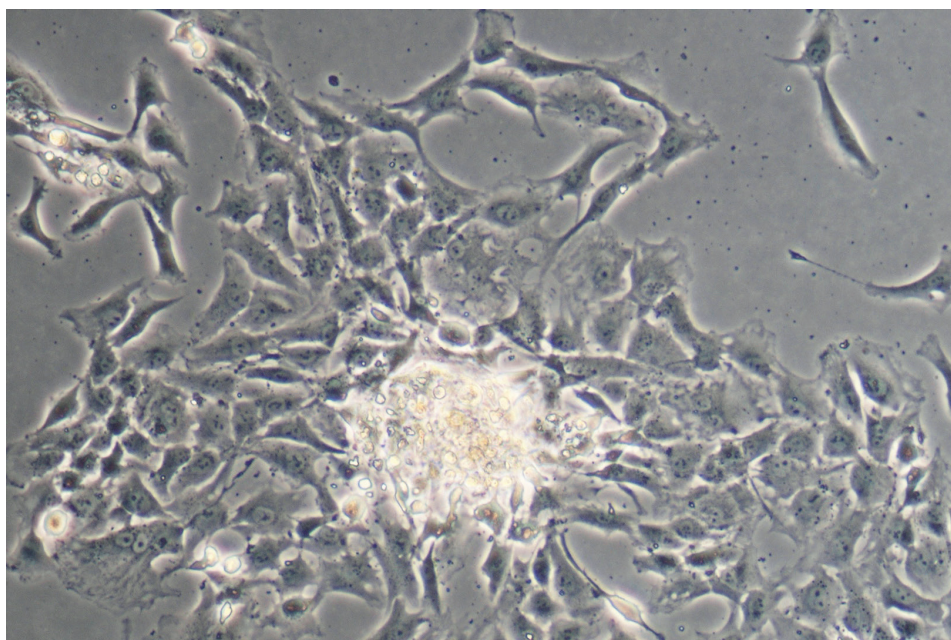


Рис. 1. Первичная культура хондроцитов человека на стадии выделения по данным фазово-контрастной микроскопии

Fig. 1. Primary culture of human chondrocytes at the stage of isolation based on phase-contrast microscopy data

Далее, по ранее отработанной методике [5, 17, 18], из двумерных культур получали трехмерные сфероиды (хондросферы) путем агрегации клеток в низкоадгезивных условиях. Как известно, в сфероидах клетки имеют возможность продуцировать и накапливать собственный экстрацеллюлярный матрикс, образуя при этом тканеподобные морфологические структуры [19]. Благодаря этим качествам, сфероиды на основе хондросферы являются эффективным терапевтическим инструментом для восстановления суставного хряща [20] и одновременно представляют собой оптимальную модель для изучения хондрогенеза *in vitro* [5]. Чтобы стимулировать продукцию ВКМ, характерного для гиалинового хряща, полученные хондросферы культивировали в течение трех недель в среде для индукции хондрогенной дифференцировки на основе TGF- β 1.

2.2. Гистологическое исследование накопления ВКМ в результате хондрогенной дифференцировки. Гистологическое исследование срезов хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1 показало, что в процессе хондрогенной дифференцировки клетки наработали значительное количество ВКМ (рис. 2).

Методы гистохимического окрашивания позволили выявить в дифференцированных хондросферах высокое содержание гликозаминогликанов и коллагена, которые являются основными молекулярными компонентами хрящевой ткани [21].

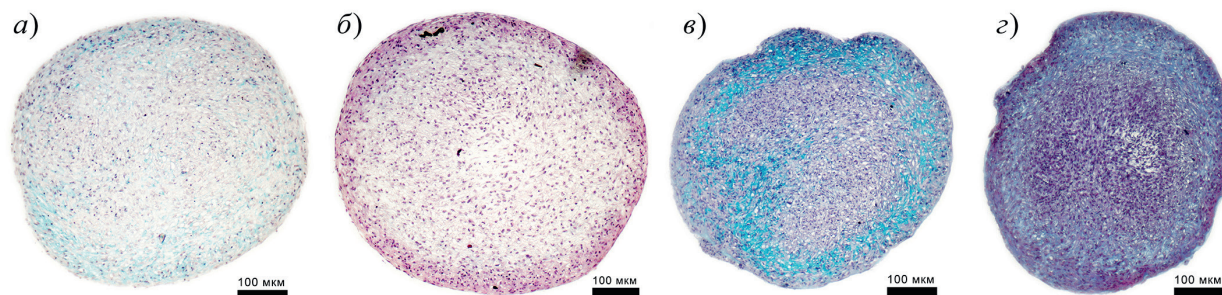


Рис. 2. Накопление внеклеточного матрикса в процессе хондрогенной дифференцировки клеток до внесения индукторов (*а* и *б*) и на 21-е сутки дифференцировки (*в* и *г*). Окрашивание альциановым синим (*а* и *в*) и по методу Массона (*б* и *г*)

Fig. 2. Accumulation of extracellular matrix during chondrogenic cell differentiation prior to the introduction of inducers (*a* and *b*) and on day 21 of differentiation (*c* and *d*). Alcian blue (*a* and *c*) and Masson's (*b* and *d*) staining

2.3. Электрохимическое профилирование хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1. Количественная оценка накопления ВКМ. Поскольку методики гистохимического и гистоиммунологического окрашивания срезов являются качественными и не позволяют количественно оценить рост и накопление внеклеточного матрикса, был разработан электрохимический подход для выявления накопления ВКМ и степени дифференцировки клеток в культивируемых хондросферах на основе электроокисления основных компонентов ВКМ.

Образцы хондросфер до и после культивирования с TGF- β 1 не показали электрохимическую активность в условиях циклической вольтамперометрии в широком диапазоне потенциалов (от -0.3 до +1.2 В), что подтверждается отсутствием редокс-пигов на вольтамперограммах (рис. 3, *а*) и может быть связано с недостаточной чувствительностью метода применительно к исследованным клеточным моделям.

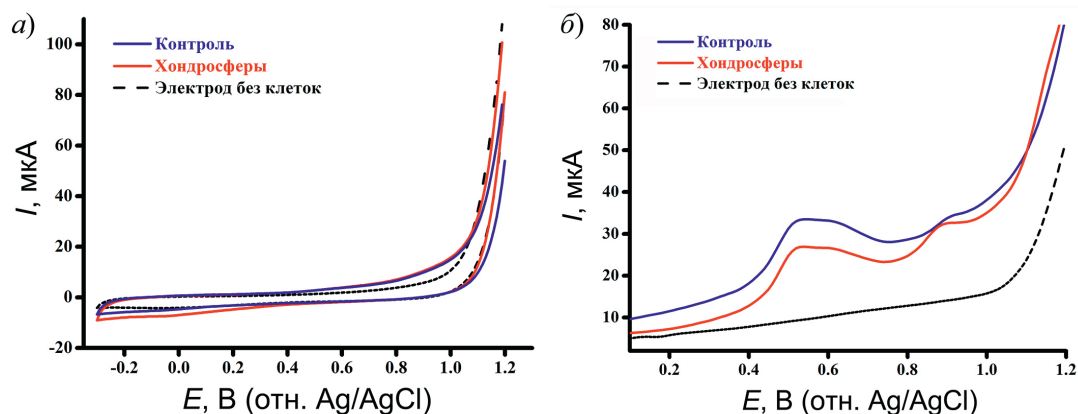


Рис. 3. Циклические (*а*) и квадратно-волновые (*б*) вольтамперограммы лизата контрольных сфероидов без добавления TGF- β 1 (синяя кривая) и дифференцированных хондросфер, культивированных в течение трех недель с добавлением TGF- β 1 (красная кривая), а также электрода без клеток (пунктирная кривая). Скорость сканирования потенциала 50 мВ/с в циклической вольтамперометрии, шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ и частота 10 Гц при скорости сканирования потенциала 100 мВ/с в квадратно-волновой вольтамперометрии

Fig. 3. Cyclic (*a*) and square wave (*b*) voltammograms of the lysates from the control spheroids without TGF- β 1 addition (blue curve) and differentiated chondrospheres cultured for three weeks with TGF- β 1 addition (red curve), as well as an electrode without cells (dashed curve). In cyclic voltammetry, potential scan rate is 50 mV/s. In square wave voltammetry, potential scan rate is 100 mV/s with potential step 10 mV, amplitude 20 mV, and frequency 10 Hz

Для увеличения чувствительности электрохимическое профилирование биообразцов проводили методом квадратно-волновой вольтамперометрии. В этом случае получены строго воспроизводимые значимые различия в свойствах контрольных и дифференцированных хондросфер (до и после культивирования с TGF- β 1, соответственно). В области потенциалов от +0.4 до +1.0 В для контрольных хондросфер регистрируется один интенсивный пик при потенциале 0.53 ± 0.01 В и «плечо» при потенциале 0.91 ± 0.01 В (рис. 3, б). Для дифференцированных хондросфер (трехнедельное культивирование с индуктором хондрогенной дифференцировки TGF- β 1) регистрируются два интенсивных пика окисления при потенциалах 0.52 ± 0.01 и 0.88 ± 0.01 В. Увеличение интенсивности максимальной амплитуды тока второго пика 2.5 ± 0.5 мкА при смещенном в область меньших значений потенциале 0.88 ± 0.01 В для дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными хондросферами, для которых ток окисления при 0.91 ± 0.01 В составляет 1.2 ± 0.1 мкА (рис. 3, б), говорит о термодинамически более выгодном процессе окисления на электроде. Разница в электрохимических профилях образцов (рис. 3, б) отражает изменение биологических характеристик хондросфер в процессе хондрогенной дифференцировки и, вероятно, связана с накоплением ВКМ в их структуре [16, 22–26].

Главными компонентами ВКМ в суставном хряще являются коллагены, эластин, адгезивные белки и основное вещество – протеогликаны, которые представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из 5–10 % белка и 90–95 % гликозаминогликанов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, кератансульфат, гепарансульфат и гепарин) [21]. Для идентификации зарегистрированных пиков окисления хондросфер электрохимически охарактеризованы основные компоненты ВКМ, характерные для хрящевой ткани, а именно коллаген и гиалуроновая кислота. На рис. 4 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы окисления коллагена, гиалуроновой кислоты (гиалуроната натрия) и дифференцированных хондросфер в области потенциалов от 0.0 до +1.2 В.

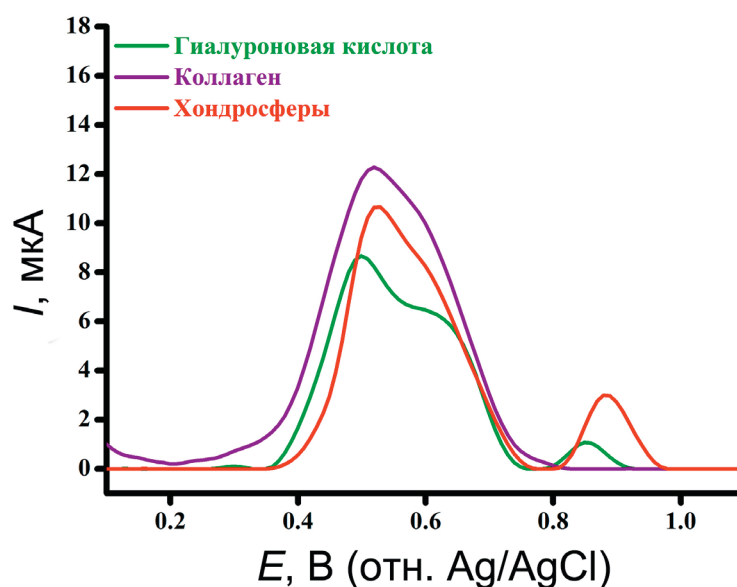


Рис. 4. Квадратно-волновые вольтамперограммы лизата дифференцированных хондросфер (красная кривая), 1 мг/мл гиалуроновой кислоты (зеленая кривая) и 0.5 мг/мл коллагена (фиолетовая кривая)

Fig. 4. Square wave voltammograms of the lysate of differentiated chondrospheres (red curve), 1 mg/mL of hyaluronic acid (green curve), and 0.5 mg/mL of collagen (purple curve)

Пик окисления дифференцированных хондросфер при потенциале 0.52 ± 0.01 В можно соотнести с окислением коллагена (рис. 4), входящего в состав внеклеточного матрикса. Пик обусловлен электроокислением аминокислотных остатков коллагена. Второй пик при потенциале 0.88 ± 0.01 В может соответствовать окислению гиалуроновой кислоты (рис. 4), являющейся одними из основных компонентов матрикса [27, 28].

Электрохимические характеристики дифференцированных хондросфер, коллагена и гиалуроната натрия приведены в табл. 1.

Табл. 1. Электрохимические характеристики дифференцированных хондросфер, коллагена и гиалуроната натрия, полученные на ПГЭ/ОУНТ в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4)

Table 1. Electrochemical characteristics of differentiated chondrospheres, collagen, and sodium hyaluronate at SPGE/SWNT in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)

Образец	$E_{ок1}$, В	$E_{ок2}$, В	$I_{ок1}$, мкА	$I_{ок2}$, мкА	S_1 , мкА×В	S_2 , мкА×В
Дифференцированные хондросферы	0.52 ± 0.01	0.88 ± 0.01	10.6 ± 0.2	2.5 ± 0.5	1.97 ± 0.04	0.20 ± 0.05
Коллаген	0.52 ± 0.01	—	11 ± 1	—	2.4 ± 0.2	—
Гиалуронат натрия	0.50 ± 0.01	0.85 ± 0.01	8.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.89 ± 0.05	0.088 ± 0.009

Для количественного сравнения дифференцированных и контрольных хондросфер полученные максимальные амплитуды токов электроокисления образцов (рис. 3, б) нормировали по концентрации в них дцДНК (табл. 2). Токи пиков электроокисления дифференцированных хондросфер увеличиваются на 13 % и 66 % для первого и второго пиков соответственно по сравнению с контрольными сфероидами (различия статистически значимы ($p \leq 0.05$ для первого пика и $p \leq 0.01$ для второго пика)), что подтверждает накопление экстрацеллюлярного матрикса при культивировании с TGF- β 1 в течение трех недель и согласуется с результатами гистохимического окрашивания (рис. 2).

Табл. 2. Электрохимические характеристики контрольных сфероидов и дифференцированных хондросфер, полученные на ПГЭ/ОУНТ в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4) и нормированные по концентрации дцДНК, выделенной из клеток

Table 2. Electrochemical characteristics of control spheroids and differentiated chondrospheres at SPGE/SWNT in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and normalized by the concentration of dsDNA isolated from the cells

Тип клеток	[ДНК], мкг/мл	$E_{ок}$, В	$I/[ДНК]$, мкА/мкг×мл ⁻¹
Контрольные сфероиды	15.675	0.53 ± 0.01	0.82 ± 0.04
		0.91 ± 0.01	0.074 ± 0.009
Дифференцированные хондросферы	11.217	0.52 ± 0.01	0.94 ± 0.02
		0.88 ± 0.03	0.22 ± 0.04

Заключение

Предложен прототип сенсора для количественной оценки накопления компонентов внеклеточного матрикса гиалинового хряща в составе хондросфер, основанный на их сравнительном электрохимическом профилировании по данным квадратно-волновой вольтамперометрии. Регистрируемый вольтамперометрический сигнал хондросфероидов идентифицирован как электроокисление коллагена и гиалуроновой кислоты – основных компонентов экстра-

целлюлярного матрикса в исследованных образцах клеток. Проведено сравнительное электрохимическое профилирование контрольных сфероидов, культивированных без добавления TGF- β 1 и дифференцированных в течение трех недель с TGF- β 1 3D-хондросфер. При индуцированной дифференцировке хондроцитов происходит накопление экстрацеллюлярного матрикса, что отражается в увеличении максимальных амплитуд токов пиков электрохимического окисления дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными сфероидными. Полученные результаты согласуются с данными гистохимического исследования.

Сравнительный электроанализ позволяет зарегистрировать различия в условиях культивирования клеток, количественно охарактеризовать трехмерные клеточные сфероиды по величинам токов пиков электрохимического окисления компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Такой подход может найти практическое применение в области контроля качества не только хондросфер, но и других тканеинженерных препаратов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Gille J., Behrens P., Schulz A.P., Oheim R., Kienast B. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A clinical follow-up at 15 years // *Cartilage*. 2016. V. 7, No 4. P. 309–315. <https://doi.org/10.1177/1947603516638901>.
2. Carey J.L., Remmers A.E., Flanigan D.C. Use of MACI (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane) in the United States: Preliminary experience // *Orthop. J. Sports Med.* 2020. V. 8, No 8. Art. 2325967120941816. <https://doi.org/10.1177/2325967120941816>.
3. Vonk L.A., Roël G., Hernigou J., Kaps C., Hernigou P. Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: A systematic review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22, No 13. Art. 7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>.
4. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation *in vitro* // *Cartilage*. 2020. V. 11, No 4. P. 521–531. <https://doi.org/10.1177/1947603518798890>.
5. Vakhrushev I.V., Basok Y.B., Baskaev K.K., Novikova V.D., Leonov G.E., Grigoriev A.M., Belova A.D., Kirsanova L.A., Lupatov A.Y., Burunova V.V., Kovalev A.V., Makarevich P.I., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Cartilage-specific gene expression and extracellular matrix deposition in the course of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in 3D spheroid culture // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25, No 11. Art. 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms25115695>.
6. Hoburg A., Löer I., Körsmeier K., Siebold R., Niemeyer P., Fickert S., Ruhnau K. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation is an effective treatment at midterm follow-up in adolescents and young adults // *Orthop. J. Sports Med.* 2019. V. 7, No 4. Art. 2325967119841077. <https://doi.org/10.1177/2325967119841077>.
7. Eschen C., Kaps C., Widuchowski W., Fickert S., Zinser W., Niemeyer Ph., Roël G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria // *Osteoarthritis Cartilage Open*. 2020. V. 2, No 1. Art. 100033. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100033>.
8. Lovley D.R. Electromicrobiology // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
9. Brabec V., Mornstein V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions // *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* 1980. V. 625, No 1. P. 43–50. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).

10. Malfoy B., Reynaud J.A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives // J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1980. V. 114, No 2. P. 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80448-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80448-7).
11. Шумянцева В.В., Шебанова А.С., Чаленко Я.М., Воейкова Т.А., Кирпичников М.П., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Электроанализ бактериальных клеток *Shewanella oneidensis* MR-1 // Доклады Академии наук. 2015. Т. 464, № 5. С. 629–632. <https://doi.org/10.7868/S0869565215290277>.
12. Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A. Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance // Biosens. Bioelectron. 2012. V. 32, No 1. P. 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.015>.
13. Agafonova L.E., Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Shishparenok A.N., Shumyantseva V.V. Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells // Heliyon. 2024. V. 10, No 3. Art. e25602. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25602>.
14. Жданов Д.Д., Ивин Ю.Ю., Шишпарёнок А.Н., Краевский С.В., Канащенко С.Л., Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Гнеденко О.В., Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ишмухаметов А.А., Арчаков А.И. Перспективы создания вакцинных препаратов нового типа на основе псевдовиральных частиц (на примере вакцины против полиомиелита) // Биомедицинская химия. 2023. Т. 69, Вып. 5. С. 253–280. <https://doi.org/10.18097/PBMC20236905253>.
15. Silina Y.E., Fink-Straube C., Koch M., Zolotukhina E.V. A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes // Bioelectrochemistry. 2023. V. 149. Art. 108283. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108283>.
16. Агафонова Л.Е., Вахрушев И.В., Новикова В.Д., Ярыгин К.Н., Шумянцева В.В. Перспективы электрохимических методов для сравнительного анализа двумерных культур хондроцитов и клеточных сфероидов // Тезисы докл. Междунар. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 25 сент. 2023 г. М.: ООО «Экспо-Биохим-Технологии», 2023. Вып. 21. С. 56–58. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2023-21-56-58>.
17. Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Вахрушев И.В., Цветкова А.В., Грядунова А.А., Ярыгин К.Н., Севастьянов В.И. Сравнительное исследование процесса хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных источников // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, Вып. 1. С. 101–112. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-101-112>.
18. Цветкова А.В., Вахрушев И.В., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Лунатов А.Ю., Севастьянов В.И., Ярыгин К.Н. Хондрогенный потенциал МСК различного происхождения в условиях сфероидного культивирования // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2020. № 4. С. 237–246. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2020-4-237-246>.
19. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // J. R. Soc. Interface. 2017. V. 14, No 127. Art. 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
20. Grevenstein D., Mamilos A., Schmitt V.H., Niedermair T., Wagner W., Kirkpatrick C.J., Brochhausen C. Excellent histological results in terms of articular cartilage regeneration after spheroid-based autologous chondrocyte implantation (ACI) // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 2021. V. 29, No 2. P. 417–421. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05976-9>.
21. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules // BioEssays. 1995. V. 17, No 12. P. 1039–1048. <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>.
22. Astashkina A., Grainger D.W. Critical analysis of 3-D organoid *in vitro* cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments // Adv. Drug Delivery Rev. 2014. V. 69–70. P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.008>.
23. Esch E.W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery // Nat. Rev. Drug Discovery. 2015. V. 14, No 4. P. 248–260. <https://doi.org/10.1038/nrd4539>.

24. Hjelm B.E., Berta A.N., Nickerson C.A., Arntzen C.J., Herbst-Kralovetz M.M. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal epithelial cell model // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82, No 3. P. 617–627. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080408>.
25. Radtke A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models // *J. Visualized Exp.* 2012. No 62. Art. e3868. <https://doi.org/10.3791/3868>.
26. Shologu N., Gurdal M., Szegezdi E., FitzGerald U., Zeugolis D.I. Macromolecular crowding in the development of a three-dimensional organotypic human breast cancer model // *Biomaterials.* 2022. V. 287. Art. 121642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121642>.
27. Neame P.J., Barry F.P. The link proteins // *Experientia.* 1993. V. 49, No 5. P. 393–402. <https://doi.org/10.1007/BF01923584>.
28. Wilusz R.E., Sanchez-Adams J., Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage // *Matrix Biol.* 2014. V. 39. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.

References

1. Gille J., Behrens P., Schulz A.P., Oheim R., Kienast B. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A clinical follow-up at 15 years. *Cartilage*, 2016, vol. 7, no. 4, pp. 309–315. <https://doi.org/10.1177/1947603516638901>.
2. Carey J.L., Remmers A.E., Flanigan D.C. Use of MACI (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane) in the United States: Preliminary experience. *Orthop. J. Sports Med.*, 2020, vol. 8, no. 8, art. 2325967120941816. <https://doi.org/10.1177/2325967120941816>.
3. Vonk L.A., Roël G., Hernigou J., Kaps C., Hernigou P. Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 13, art. 7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>.
4. Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanov E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation *in vitro*. *Cartilage*, 2020, vol. 11, no. 4, pp. 521–531. <https://doi.org/10.1177/1947603518798890>.
5. Vakhrushev I.V., Basok Y.B., Baskaev K.K., Novikova V.D., Leonov G.E., Grigoriev A.M., Belova A.D., Kirsanova L.A., Lupatov A.Y., Burunova V.V., Kovalev A.V., Makarevich P.I., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Cartilage-specific gene expression and extracellular matrix deposition in the course of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in 3D spheroid culture. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, no. 11, art. 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms25115695>.
6. Hoburg A., Löer I., Körsmeier K., Siebold R., Niemeyer P., Fickert S., Ruhnau K. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation is an effective treatment at midterm follow-up in adolescents and young adults. *Orthop. J. Sports Med.*, 2019, vol. 7, no. 4, art. 2325967119841077. <https://doi.org/10.1177/2325967119841077>.
7. Eschen C., Kaps C., Widuchowski W., Fickert S., Zinser W., Niemeyer Ph., Roël G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria. *Osteoarthritis Cartilage Open*, 2020, vol. 2, no. 1, art. 100033. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100033>.
8. Lovley D.R. Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2012, vol. 66, pp. 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
9. Brabec V., Mornstein V. Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.*, 1980, vol. 625, no. 1, pp. 43–50. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).
10. Malfoy B., Reynaud J.A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and deriv-

- atives. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1980, vol. 114, no. 2, pp. 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80448-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80448-7).
11. Shumyantseva V.V., Shebanova A.S., Chalenko Ya.M., Voeikova T.A., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V., Debabov V.G. Electroanalysis of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2015, vol. 464, no. 1, pp. 325–328. <https://doi.org/10.1134/S1607672915050154>.
 12. Chalenko Y., Shumyantseva V., Ermolaeva S., Archakov A. Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 32, no. 1, pp. 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.015>.
 13. Agafonova L.E., Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Shishparenok A.N., Shumyantseva V.V. Electrochemical approach for the analysis of DNA degradation in native DNA and apoptotic cells. *Heliyon*, 2024, vol. 10, no. 3, art. e25602. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25602>.
 14. Zhdanov D.D., Ivin Yu.Yu., Shishparenok A.N., Kraevskiy S.V., Kanashenko S.L., Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Gnedenko O.V., Pinyaeva A.N., Kovpak A.A., Ishmukhametov A.A., Archakov A.I. Perspectives for the creation of a new type of vaccine preparations based on pseudovirus particles using polio vaccine as an example. *Biomed. Khim.*, 2023, vol. 69, no. 5, pp. 253–280. <https://doi.org/10.18097/PBMC20236905253>.
 15. Silina Y.E., Fink-Straube C., Koch M., Zolotukhina E.V. A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes. *Bioelectrochemistry*, 2023, vol. 149, art. 108283. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108283>.
 16. Agafonova L.E., Vakhrushev I.V., Novikova V.D., Yarygin K.N., Shumyantseva V.V. Prospects of electrochemical methods for the comparative analysis of two-dimensional cultures of chondrocytes and cell spheroids. *Tezisy dokl. Mezhdunar. kong. "Biotehnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya"*, Moskva, 25 sent. 2023 g. [Proc. Int. Congr. "Biotechnology: State of the Art and Perspectives", Moscow, September 25, 2023]. Issue 21. Moscow, OOO "Ekspo-Biokhim-Tekhnologii", 2023, pp. 56–58. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2023-21-56-58>. (In Russian)
 17. Basok Yu.B., Grigoriev A.M., Kirsanova L.A., Vakhrushev I.V., Tsvetkova A.V., Gryadunova A.A., Yarygin K.N., Sevastianov V.I. The comparative study of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells allocated from different sources. *Vestn. Transplantologii Iskusstv. Organov*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 101–112. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-101-112>. (In Russian)
 18. Tsvetkova A.V., Vakhrushev I.V., Basok Yu.B., Grigor'ev A.M., Kirsanova L.A., Lupatov A.Yu., Sevastianov V.I., Yarygin K.N. Chondrogenic potential of the MSC of different origin in spheroid culture. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, vol. 170, no. 4, pp. 528–536. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05101-x>.
 19. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface*, 2017, vol. 14, no. 127, art. 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
 20. Grevenstein D., Mamilos A., Schmitt V.H., Niedermair T., Wagner W., Kirkpatrick C.J., Brochhausen C. Excellent histological results in terms of articular cartilage regeneration after spheroid-based autologous chondrocyte implantation (ACI). *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 417–421. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05976-9>.
 21. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*, 1995, vol. 17, no. 12, pp. 1039–1048. <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>.
 22. Astashkina A., Grainger D.W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, vol. 69–70, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.008>.
 23. Esch E.W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 248–260. <https://doi.org/10.1038/nrd4539>.
 24. Hjelm B.E., Berta A.N., Nickerson C.A., Arntzen C.J., Herbst-Kralovetz M.M. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal epithelial cell model. *Biol. Reprod.*, 2010, vol. 82, no. 3, pp. 617–627. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080408>.

25. Radtke A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J. Visualized Exp.*, 2012, no. 62, art. e3868. <https://doi.org/10.3791/3868>.
26. Shologu N., Gurdal M., Szegezdi E., FitzGerald U., Zeugolis D.I. Macromolecular crowding in the development of a three-dimensional organotypic human breast cancer model. *Biomaterials*, 2022, vol. 287, art. 121642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121642>.
27. Neame P.J., Barry F.P. The link proteins. *Experientia*, 1993, vol. 49, no. 5, pp. 393–402. <https://doi.org/10.1007/BF01923584>.
28. Wilusz R.E., Sanchez-Adams J., Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.*, 2014, vol. 39, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>.

Информация об авторах

Виктория Дмитриевна Новикова, младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: vnlvikova@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4502-6898>

Любовь Евгеньевна Агафонова, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3874-6556>

Георгий Евгеньевич Леонов, младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: golerus@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5632-7040>

Людмила Анфилофьевна Кирсанова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биомедицинских материалов и тканевой инженерии, НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова

E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-611X>

Юлия Борисовна Басок, доктор биологических наук, заведующий отделом биомедицинских материалов и тканевой инженерии, НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова

E-mail: bjb2005@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Алексей Вячеславович Ковалев, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий и медицинской генетики, НМИЦ травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова

E-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1277-5228>

Виктория Васильевна Шумянцева, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоэлектрохимии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1509-7218>

Константин Никитич Ярыгин, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: kyarygin@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2261-851X>

Игорь Викторович Вахрушев, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии, НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

E-mail: vakhrunya@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-6656>

Author Information

Victoria D. Novikova, Junior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: vnlvikova@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4502-6898>

Lyubov E. Agafonova, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3874-6556>

Georgy E. Leonov, Junior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: golerus@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5632-7040>

Lyudmila A. Kirsanova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biomedical Materials and Tissue Engineering, V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

E-mail: lyudochkakirsanova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-611X>

Yulia B. Basok, Dr. Sci. (Biology), Head of Department of Biomedical Materials and Tissue Engineering, V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

E-mail: bjb2005@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Alexey V. Kovalev, Cand. Sci. (Medicine), Head of Laboratory of Cell Technologies and Medicinal Genetics, National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov

E-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1277-5228>

Victoria V. Shumyantseva, Dr. Sci. (Biology), Full Professor, Chief Researcher, Head of Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1509-7218>

Konstantin N. Yarygin, Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: kyarygin@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2261-851X>

Igor V. Vakhrushev, Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry

E-mail: vakhrunya@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-6656>

Поступила в редакцию 13.12.2024

Принята к публикации 20.01.2025

Received December 13, 2024

Accepted January 20, 2025

Оригинальная статья

УДК 620.95

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.201-222>**Модификация электродов для увеличения генерации
электроэнергии в растительных микробных топливных элементах****Р.В. Лепикаш¹✉, Н.С. Захаров¹, П.В. Оськин¹, Д.И. Стом^{2,3,4}, Д.Г. Лаврова¹, С.В. Алферов¹**¹Тульский государственный университет, г. Тула, Россия²Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия³Байкальский музей Сибирского отделения РАН, п. Листвянка, Россия⁴Иркутский национальный исследовательский технический университет, г. Иркутск, Россия✉mr.romalep@yandex.ru**Аннотация**

Растительные микробные топливные элементы (РМТЭ) представляют собой альтернативу традиционным источникам электроэнергии, однако их применение ограничено невысокими электрохимическими характеристиками. Для повышения производительности РМТЭ используют различные модификации электродов. Проведено электрохимическое осаждение MnO_2 на поверхность углеродного войлока с последующим использованием в качестве бифункционального материала для анода и катода в системах РМТЭ. Сравнение образцов углеродного войлока проводили по значениям электроактивной площади поверхности и количеству дефектов, установленных с помощью циклической вольтамперометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния соответственно. Мощность систем РМТЭ составила 15, 2 и 33 мВт/м² для контрольной системы РМТЭ, РМТЭ-анод- MnO_2 и РМТЭ-катод- MnO_2 соответственно. Применение MnO_2 на катоде в составе РМТЭ обеспечивает двукратное увеличение генерации энергии.

Ключевые слова: углеродный войлок, биоэлектрохимические системы, растительные микробные топливные элементы, возобновляемая электроэнергия.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2024-0003 «Биокаталитические системы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами».

Для цитирования: Лепикаш Р.В., Захаров Н.С., Оськин П.В., Стом Д.И., Лаврова Д.Г., Алферов С.В. Модификация электродов для увеличения генерации электроэнергии в растительных микробных топливных элементах // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 201–222. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.201-222>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.201-222>

Modification of electrodes to boost electricity generation in plant microbial fuel cells

R.V. Lepikash¹✉, N.S. Zakharov¹, P.V. Oskin¹, D.I. Stom^{2, 3, 4}, D.G. Lavrova¹, S.V. Alferov¹

¹Tula State University, Tula, Russia

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³Baikal Museum, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Listvyanka, Russia

⁴Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russia

✉mr.romalep@yandex.ru

Abstract

Plant microbial fuel cells (PMFC) offer a promising alternative to traditional electricity sources. However, their practical application is limited due to poor electrochemical performance, which is enhanced using various electrode modifications. In this study, MnO_2 was electrochemically deposited on the surface of carbon felt and then used as a bifunctional material for the anode and cathode configurations in PMFC systems. The modified carbon felt samples were characterized in terms of electrochemically active surface area and the number of defects determined using cyclic voltammetry and Raman spectroscopy. The resulting density power was 15, 2, and 33 mW/m^2 for the control system, PMFC-anode- MnO_2 , and PMFC-cathode- MnO_2 , respectively. Thus, the deposition of MnO_2 on the cathode in PMFC systems results in a twofold increase of electrical energy generation.

Keywords: carbon felt, bioelectrochemical systems, plant microbial fuel cells, renewable energy

Acknowledgments. This study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of state assignment no. FEWG-2024-0003 “Biocatalytic systems based on microbial cells, subcellular structures, and enzymes in combination with nanomaterials”.

For citation: Lepikash R.V., Zakharov N.S., Oskin P.V., Stom D.I., Lavrova D.G., Alferov S.V. Modification of electrodes to boost electricity generation in plant microbial fuel cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 201–222. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.201-222>. (In Russian)

Введение

Растущее загрязнение окружающей среды и выбросы углекислого газа оказывают негативное влияние на здоровье человека и состояние экосистемы, что требует постепенного перехода к устойчивым источникам энергии, включая солнечные, ветряные и гидроэлектростанции [1]. Возможной альтернативой традиционным источникам электроэнергии рассматриваются топливные элементы, которые работают как эффективные устройства преобразования энергии химических связей в электричество, обеспечивающие работу различных маломощных устройств [2].

Примером топливных элементов являются электрохимические ячейки, созданные на основе биологических объектов, которые могут преобразовать энергию химических связей субстратов в электричество под действием ферментативных систем микроорганизмов [3]. Технология биологических топливных элементов возникла на стыке микробиологии, химии и физики [4]. К подобным системам относят растительный микробный топливный элемент (РМТЭ), принцип работы которого основан на окислении корневых экссудатов растений и вносимых субстратов микроорганизмами, обитающими в анодной области, с последующей генерацией электроэнергии. Тем не менее, широкое внедрение РМТЭ ограничено из-за низких значений вырабатываемой энергии, причиной чего могут служить в том числе и используемые материалы электродной системы. Как правило, при создании анодов и катодов используются углеродные материалы [5, 6], отличающиеся высоким удельным сопротивлением по сравнению с металлами, что негативно сказывается на мощности биоэлектрохимических систем. Однако металлические электроды склонны к коррозии [7], характеризуются высокой стоимостью, что ограничивает их использование в биоэлектрохимических системах. Кроме того, ионы металлов способны оказывать ингибирующее воздействие на микроорганизмы, что также негативно сказывается на вырабатываемой мощности биотопливного элемента [5]. Углеродные материалы обладают высокой коррозионной стойкостью, низкой стоимостью, большей площадью поверхности электродов и практически не оказывают негативного влияния на микроорганизмы. Поэтому углеродные материалы являются перспективными для применения в биоэлектрохимических системах [8, 9].

Для улучшения характеристик углеродных материалов (снижения сопротивления, увеличения электроактивной площади поверхности) используют различные подходы, основанные на адсорбции наноматериалов [10, 11] и нанесении пористых и проводящих полимерных покрытий [12, 13] на поверхность электродов. В работе [14] показано, что мощность микробного топливного элемента с использованием электрода из углеродного войлока с адсорбированным на его поверхности оксидом графена составляет 132 мВт/м² относительно 55.8 мВт/м² для контрольной системы вследствие увеличения удельной поверхности модифицированного электрода и скорости переноса электронов, а также адсорбции микроорганизмов [15]. Установлено, что присутствие наночастиц магнетита (Fe₃O₄) на поверхности электрода увеличивает мощность микробного топливного элемента практически в 1.5 раза (с 255 до 391 мВт/м²) [16]. Однако в ряде случаев процесс модификации является трудоемким [17] или предполагает применение токсичных соединений [18] (рис. 1).

Одними из недорогих и быстрых подходов к улучшению характеристик анода из углеродных материалов для использования в микробных топливных элементах являются электрохимические способы модификации [19–21]. Так, в работе [22] анод из углеродной сетки окисляли электрохимически в растворе HNO₃. При использовании модифицированного материала в составе микробного топливного элемента наблюдалось увеличение потенциала с 510 мВ до 540 мВ, что обусловлено снижением потенциала анода за счет улучшения адгезии микроорганизмов. Продемонстрирована возможность использования электрохимических способов модификации анода микробных топливных элементов, обеспечивающих увеличение параметров генерации электроэнергии в системе [21, 22].

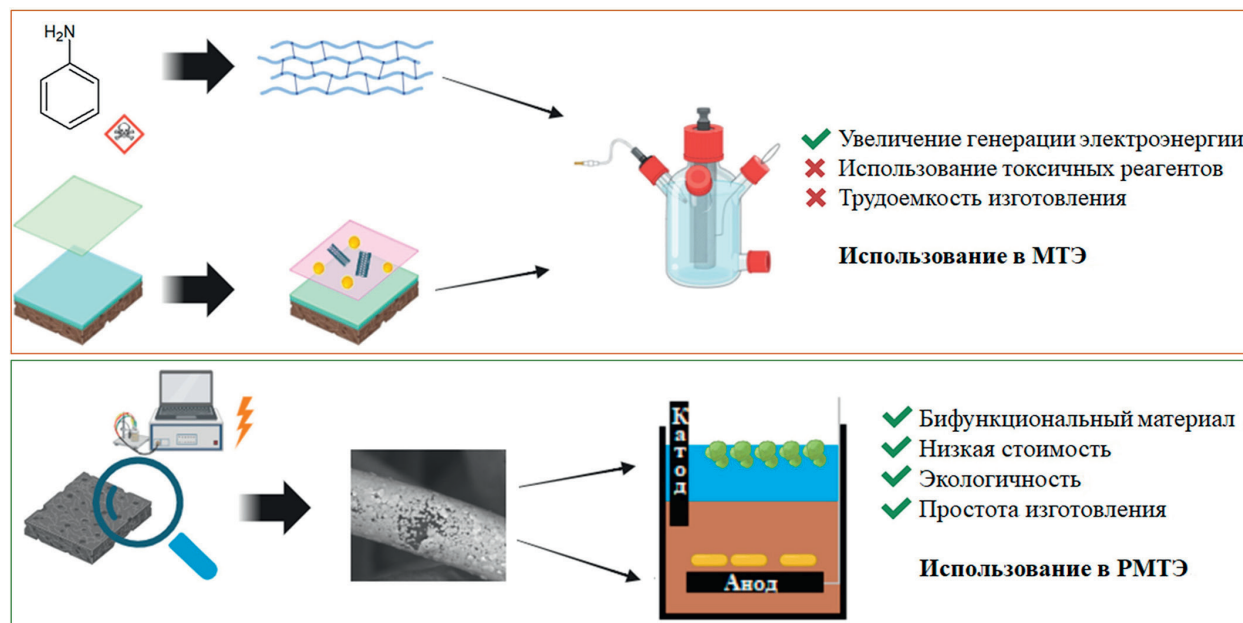


Рис. 1. Подходы к модификации углеродных материалов

Fig. 1. Strategies to the modify carbon materials

Наибольший интерес в качестве модифицирующего агента для электродов в микробных топливных элементах представляет диоксид марганца (MnO_2) [23–26]. Он проявляет высокую каталитическую активность в реакции восстановления кислорода и используется в качестве замены более дорогостоящей платины [27]. Кроме того, MnO_2 применяют в составе материала анода [28–30]. Так, анод из углеродного войлока с нанесенным MnO_2 демонстрирует увеличение удельной мощности микробного топливного элемента в 6.21 раз (до 2754 мВт/м²) по сравнению с немодифицированным углеродным войлоком [28]. Простое электроосаждение MnO_2 на поверхность углеродного войлока также приводит к росту мощности микробного топливного элемента на 24 % [29]. Показано, что использование MnO_2 -модифицированного анода обеспечивает улучшение характеристик электронного переноса от микроорганизмов к электроду [31, 32]. Таким образом, электроосаждение MnO_2 можно рассматривать как эффективный, доступный и простой способ улучшения операционных параметров в биоэлектрохимических системах (рис. 1) с перспективами последующего масштабирования.

Исходя из вышеизложенного, представляет практический интерес использование углеродного войлока с электроосажденным MnO_2 в качестве электродов в РМТЭ. Цель настоящей работы состоит в оценке влияния электрохимической модификации электродов из углеродных материалов на электрохимические характеристики РМТЭ. Для демонстрации возможностей масштабирования выбранного метода электроосаждения MnO_2 проводили на электродах с большой геометрической площадью (25 см² для катода и 50 см² для анода). Модифицированные электроды охарактеризованы с помощью циклической вольтамперометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния, которая позволила выявить влияние способа модификации на характеристики структуры материала электрода. Для подтверждения электроосаждения MnO_2 на поверхность электродного материала и оценки биообрастания поверхности анода РМТЭ использована сканирующая электронная микроскопия.

1. Материалы и методы

1.1. Культивирование растений и микроорганизмов. Растительным компонентом являлась ряска малая (*Lemna minor* L.). Биомассу ряски выращивали согласно ГОСТ 32426-2013 [33] при температуре 22–25 °С при постоянном освещении 10000 лк.

Штамм *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-2188D (*Ps. chlororaphis*) из лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» любезно предоставлен И.Ф. Пунтус. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Бактерии *Ps. chlororaphis* культивировали на среде LB [34]. Состав жидкой среды: пептон – 10 г/дм³, дрожжевой экстракт – 5 г/дм³, хлорид натрия – 10 г/дм³. Среду для культивирования стерилизовали автоклавированием при давлении 1 атм в течение 45 мин. Бактерии выращивали аэробно в течении 20–24 ч в колбах Эрленмейера объемом 750 см³ при температуре 29 °С. Полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре при 10000 об/мин в течение 10 мин и двукратно отмывали от культуральной среды 20 мМ фосфатным буферным раствором рН 6.8. Определяли массу осевших клеток, проводили разбавление и затем наносили на анод РМТЭ.

1.2. Модификация углеродного войлока и их характеристики. Электроосаждение MnO₂ на углеродный войлок проводили в потенциостатическом режиме в течение 4 ч при потенциале 1.0 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода из раствора MnCl₂ с концентрацией 280 мкг/см³ по иону Mn²⁺ в среде 0.05 моль/дм³ NH₄Cl в качестве фоновой электролита согласно методике [35]. В качестве вспомогательного электрода выступал графитовый стержень. Полученный материал обозначали как ЭОс-MnO₂.

Для подтверждения модификации электродов использовали сканирующую электронную микроскопию в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM4000 Plus (Hitachi, Япония) с приставкой Bruker EDS (Bruker, Германия) при ускоряющем напряжением 15 кВ и времени накопления 5 мин. Изображения поверхности углеродного войлока до и после электроосаждения MnO₂ получали на оптическом инвертированном микроскопе Axiovert 40 MAT (Carl Zeiss, Германия).

Спектры комбинационного рассеяния регистрировали на приборе DXR Raman Microscope (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при длине волны лазерного излучения 532 нм. Обработку полученных спектров проводили с использованием программного обеспечения OMNIC for Dispersive Raman (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

1.3. Электрохимические измерения. Для определения электроактивной площади поверхности использовали циклическую вольтамперометрию. Измерения проводили на потенциостате CS1350 (CorrTest, KHP) в трехэлектродной ячейке, состоящей из рабочего электрода (образцы модифицированного углеродного войлока), вспомогательного электрода (платиновая фольга 1 × 1 × 0.1 см) и электрода сравнения (насыщенный хлоридсеребряный электрод). В качестве электролита использовали 0.1 М KCl с добавлением 2.5 мМ K₃[Fe(CN)₆]. Сканирование потенциала проводили в диапазоне от –0.2 В до 0.7 В при ско-

рости развертки от 5 до 175 мВ/с. Электроактивную площадь поверхности рассчитывали по уравнению Рэндлса–Шевчика для необратимых систем (при $n\Delta E \geq 212$ мВ) (уравнение 1):

$$I_p = 0.496n\sqrt{1-\alpha}FAc\sqrt{\frac{Dn'Fv}{RT}}, \quad (1)$$

где I_p – ток анодного пика, А; n – число электронов, участвующих в редокс-реакции; n' – число электронов, переносимых в лимитирующей стадии (предполагая, что $n = n'$); F – постоянная Фарадея, 96485 Кл/моль; A – электроактивная площадь поверхности, см²; c – концентрация гексацианоферрат(III) ионов, моль/см³, D – коэффициент диффузии гексацианоферрат(III) ионов, 6×10⁻⁶ см²/с; v – скорость развертки потенциала, В/с; R – универсальная газовая постоянная, 8.314 Дж/(К×моль); T – температура, 293 К; $1-\alpha$ – коэффициент переноса электрона для анодного процесса (0.5).

Измерения электрохимического импеданса проводили в трехэлектродной ячейке при амплитуде переменного тока 5 мВ и частоте от 100 кГц до 0.01 Гц с добавлением 2.5 мМ K₃[Fe(CN)₆]. Потенциал поляризации соответствовал потенциалу полуволны $E_{1/2}$ по данным циклической вольтамперометрии.

1.4. Конструкция РМТЭ. Для изготовления электродов углеродный войлок (ПАН, Китай) нарезали на кусочки с площадью 25 см² для катода и 50 см² для анода, помещали в 4 моль/дм³ соляную кислоту на 4 дня, а затем промывали дистиллированной водой до pH 7 [36]. Электроосаждение MnO₂ на полученный углеродный войлок проводили согласно п. 1.2.

Для создания РМТЭ, песок с диаметром частиц 0.2–0.4 мм прокаливали в печи в течение 40 мин при 160 °С. Затем 100 см³ прокаленного песка помещали в контейнеры объемом 1 л, на дно горизонтально размещали анод со вставленной в него титановой проволокой толщиной 0.8 мм с термоусадкой, обеспечивающей изоляцию проволоки от контакта с водой. На анод равномерно наносили 2.5 см³ суспензии микроорганизмов (250 мг) с питательной средой и досыпали 400 см³ песка. Катод закрепляли вертикально сбоку. Растения *Lemna minor* L. вносили в количестве 8.64 г на каждый РМТЭ (рис. 2). Модифицированные MnO₂ электроды использовали в качестве анода или катода. Рассматривали биоэлектрохимические системы РМТЭ-контроль, РМТЭ-анод-MnO₂ и РМТЭ-катод-MnO₂.

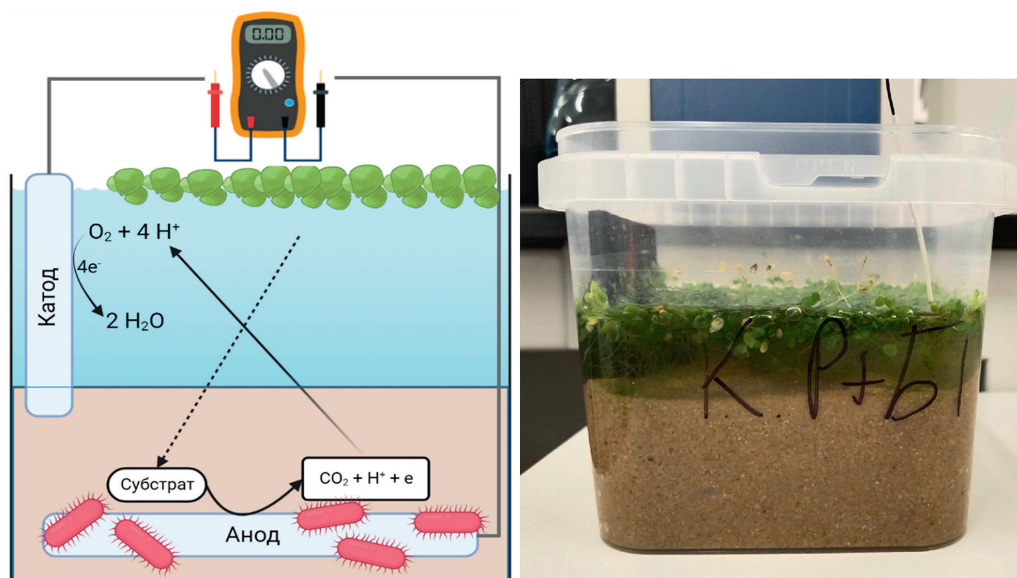


Рис. 2. Схема функционирования и лабораторная модель исследуемых РМТЭ

Fig. 2. Functional schematic and laboratory model of the studied PMFC

Для определения мощности исследуемых систем измеряли напряжение и ток с подключением внешнего сопротивления в диапазоне от 10 кОм до 50 Ом. Расчет мощности и плотности мощности проводили по уравнениям 2 и 3 соответственно:

$$P = U \times I, \quad (2)$$

$$P_d = \frac{P}{S_a}, \quad (3)$$

где U – напряжение, В; I – сила тока, А; P – мощность, Вт; P_d – плотность мощности, Вт/м²; S_a – геометрическая площадь анода, м².

Внутреннее сопротивление системы определяли по графику зависимости $U = f(I)$, где $\operatorname{tg} \alpha = R_{\text{int}}$ согласно закону Ома.

1.5. Исследование структуры биоанодов РМТЭ методом сканирующей электронной микроскопии. Для изучения структуры биоанодов РМТЭ проводили фиксацию биоматериала в парах глутарового альдегида ($\omega = 50 \%$) и тетраоксида осмия с последующим высушиванием при 35 °С в течение суток. Образцы наносили на графитовый скотч, закрепляли на металлическом диске – объектодержателе. На поверхность образцов напыляли золото в течении 10 мин в вакуумно-напылительной установке FINE COAT JFC-1100 (JEOL, Япония). Анализ образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV (JEOL, Япония) в условиях низкого вакуума (30 Па) в режиме регистрации вторичных электронов.

1.6. Статистическая обработка результатов. Все измерения проводили в трех повторностях, для РМТЭ – в двух. Результаты представляли как среднее значение и доверительный интервал (если не указано иное). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corp., США).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Исследование модифицированных углеродных материалов методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Углеродный войлок до (контрольный образец) и после электроосаждения MnO_2 (ЭОс-MnO_2) охарактеризован с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (рис. 3, а), оптической микроскопии (рис. 3, б–г) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (рис. 4).

В спектре исходного углеродного войлока присутствуют полосы комбинационного рассеяния, характерные для углеродных материалов: полоса G ($\sim 1550 \text{ см}^{-1}$), возникающая вследствие колебаний связей между sp^2 -гибридными атомами углерода [37], и связанная с наличием дефектов в кристаллической решетке полоса D ($\sim 1350 \text{ см}^{-1}$), интенсивность которой прямо пропорциональна их числу в образце [37]. При электрохимической модификации поверхности войлока снижается интенсивность полос углеродных материалов и возникает полоса, соответствующая диоксиду марганца. Это связано с постепенным покрытием поверхности волокон углеродного войлока слоем MnO_2 , что подтверждается данными оптической микроскопии (рис. 3, б–г) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, данные которой свидетельствуют о присутствии марганца на поверхности углеродного материала (рис. 4). Форма и положение ($550\text{--}650 \text{ см}^{-1}$) новой полосы комбинационного рассеяния позволяют считать, что MnO_2 представлен главным образом α -формой [42], которая проявляет наивысшую электрокаталитическую активность по отношению к реакции восстановления кислорода [43].

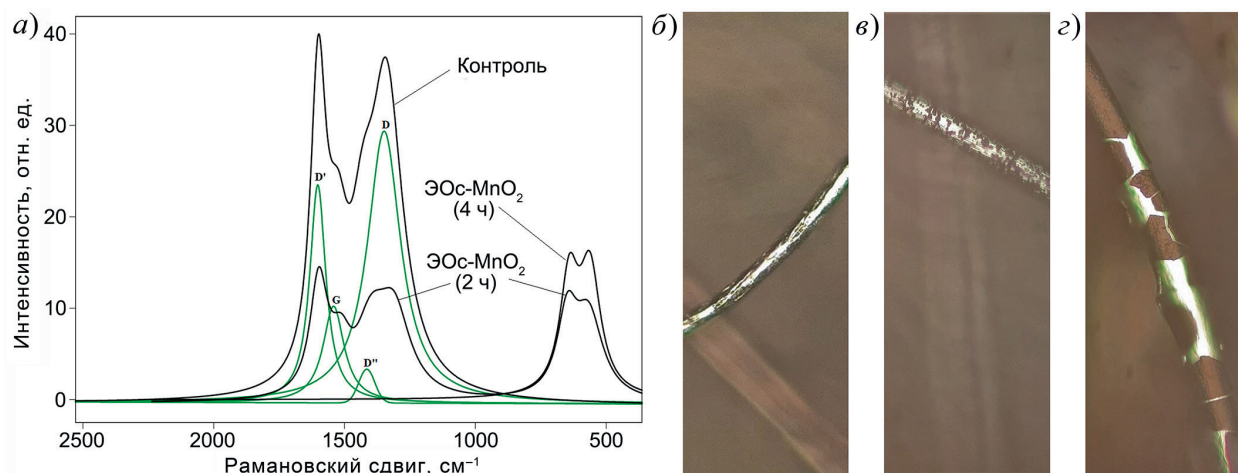


Рис. 3. Спектры комбинационного рассеяния углеродного войлока до (контроль) и после электроосаждения MnO_2 (ЭОс- MnO_2) (а). Поверхность углеродного войлока до (б) и после электроосаждения MnO_2 в течение 2 ч (в) и 4 ч (г) по данным оптической микроскопии (увеличение 500 $\times$)

Fig. 3. Raman spectra of carbon felt before (control) and after MnO_2 electrodeposition (ED- MnO_2) (a). Surface of carbon felt before (b) and after MnO_2 electrodeposition for 2 h (c) and 4 h (d) based on optical microscopy data (magnification 500 $\times$)

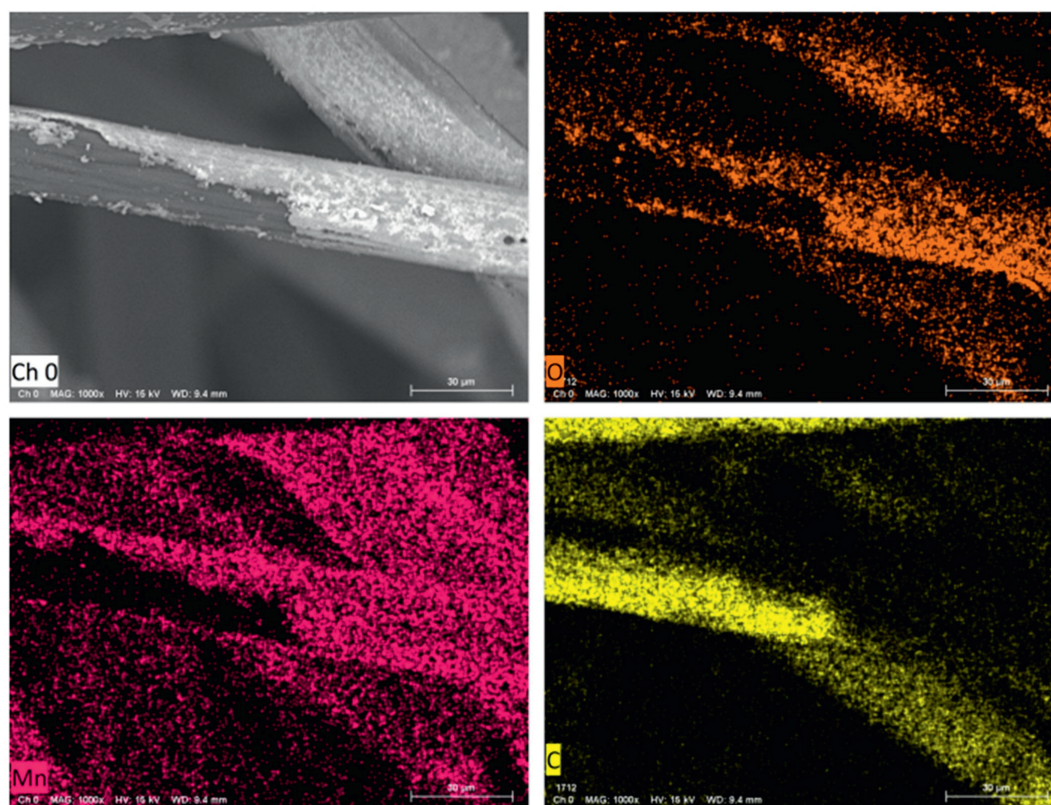


Рис. 4. Элементный состав поверхности углеродного войлока, модифицированного электроосажденным MnO_2

Fig. 4. Elemental composition of the surface of carbon felt modified with electrodeposited MnO_2

Для интерпретации спектров проведен деконволюционный анализ полос комбинационного рассеяния согласно известному алгоритму [38]. Это позволило выделить дополнительные полосы D' (связана с типом дефектов [39, 40]) и D'' (связана с содержанием

аморфной фазы [41]) в образцах углеродного войлока. Сопоставление интенсивностей полос поглощения проводили после их нормирования на интенсивность полосы G, так как в процессе модификации поверхности углеродного войлока общее содержание связей между sp^2 -гибридными атомами углерода меняется незначительно. Результаты представлены в таблице 1.

Табл. 1. Типы и количественные характеристики дефектов структуры рассматриваемых электродов
Table 1. Types and quantitative characteristics of structural defects in the studied electrodes

Анод	I_D/I_G	$I_{D'}/I_G$	$I_D/I_{D'}$	Тип дефекта
Контроль	1.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	sp^3
ЭОс- MnO_2 2 ч	1.7 ± 0.2	0.81 ± 0.04	1.0 ± 0.1	sp^3
ЭОс- MnO_2 4 ч	—	—	—	—

Электроосаждение MnO_2 не привело к изменению соотношений интенсивностей полос комбинационного рассеяния. Это свидетельствует о том, что в процессе модификации электрода в углеродном материале количество дефектов I_D/I_G , аморфной фазы $I_{D'}/I_G$, а также дефектов $I_D/I_{D'}$ не меняется. По величине соотношения $I_D/I_{D'}$ можно сделать вывод, что основной тип дефектов в структуре углеродного войлока представлен sp^3 -гибридными атомами углерода.

2.2. Электрохимические измерения. Электроактивную площадь поверхности и сопротивление переносу заряда в системе ферро-/феррицианид-ионы для исходного и модифицированного войлока определяли методами циклической вольтамперометрии и электрохимической импедансной спектроскопии (рис. 5).

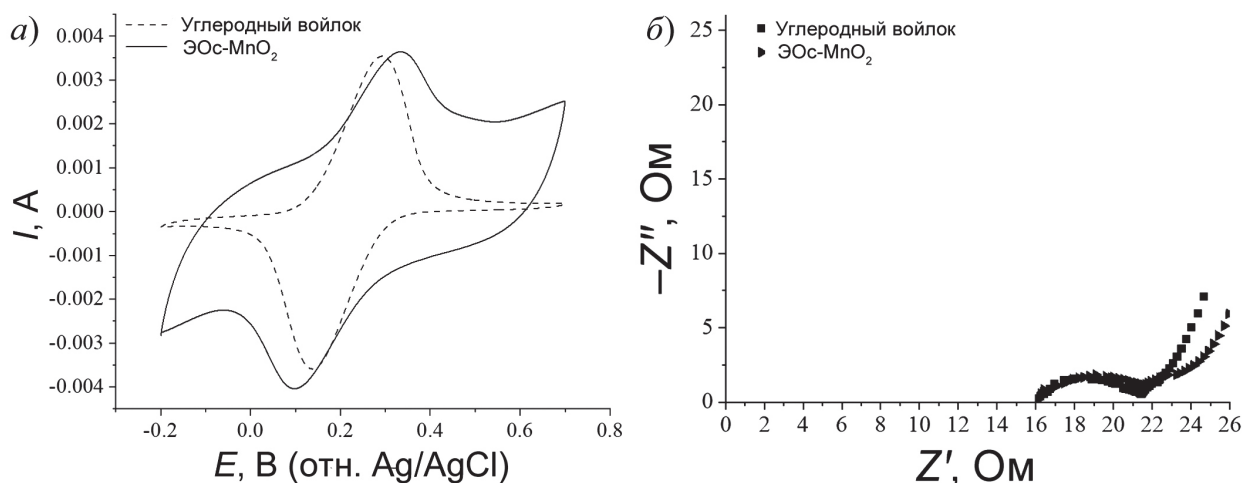


Рис. 5. Электрохимические испытания исходного углеродного войлока и образца с осажденным MnO_2 : вольтамперограммы образцов углеродного войлока в присутствии 2.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ в 0.1 М KCl, $\nu = 10$ мВ/с (а); диаграммы Найквиста для образцов углеродного войлока в присутствии 2.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ в 0.1 М KCl (б)

Fig. 5. Electrochemical tests for the control carbon felt and the sample with deposited MnO_2 : voltammograms of the carbon felt samples in the presence of 2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M KCl, $\nu = 10$ mV/s (a); Nyquist plots for the carbon felt samples in the presence of 2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M KCl (b)

Рассчитанные параметры электродов представлены в табл. 2. Модификация электрода приводит к 1.5-кратному увеличению его электроактивной площади по сравнению с исходным углеродным войлоком, что, вероятно, обусловлено псевдоемкостными характе-

ристиками MnO_2 [44]. После модификации разность потенциалов редокс-пигов (ΔE) увеличивается на 80 мВ, что косвенно может указывать на уменьшение скорости электрохимической реакции [45]. Тем не менее, сопротивление переносу заряда (R_{ct}) не изменяется. При этом в работах [45–49] отмечается снижение сопротивления переносу заряда (R_{ct}) при использовании композитных материалов, содержащих в составе MnO_2 , что говорит о возможности использования MnO_2 в качестве анодного катализатора.

Табл. 2. Электрохимические параметры модифицированных электродов

Table 2. Electrochemical parameters of the modified electrodes

Электрод	S , $\text{m}^2/\text{г}$	ΔE , мВ	R_{ct} , Ом	R_s , Ом
Исходный углеродный войлок	0.05 ± 0.01	140 ± 20	6 ± 1	13 ± 2
ЭОс- MnO_2	0.08 ± 0.02	220 ± 20	6 ± 2	14 ± 3

2.3. Влияние модификации электродов на электрогенерацию в РМТЭ. По экспериментальным данным РМТЭ построены зависимости потенциала разомкнутой цепи от времени функционирования и поляризационные кривые, по тангенсу угла наклона которых установлено внутреннее сопротивление (R_{int}) РМТЭ.

Динамика электрогенерации РМТЭ с модифицированными электродами на основе бактерий *Ps. chlororaphis* представлена на рис. 6. В качестве контрольной системы использовали аноды, смоченные в 4 М растворе HCl .

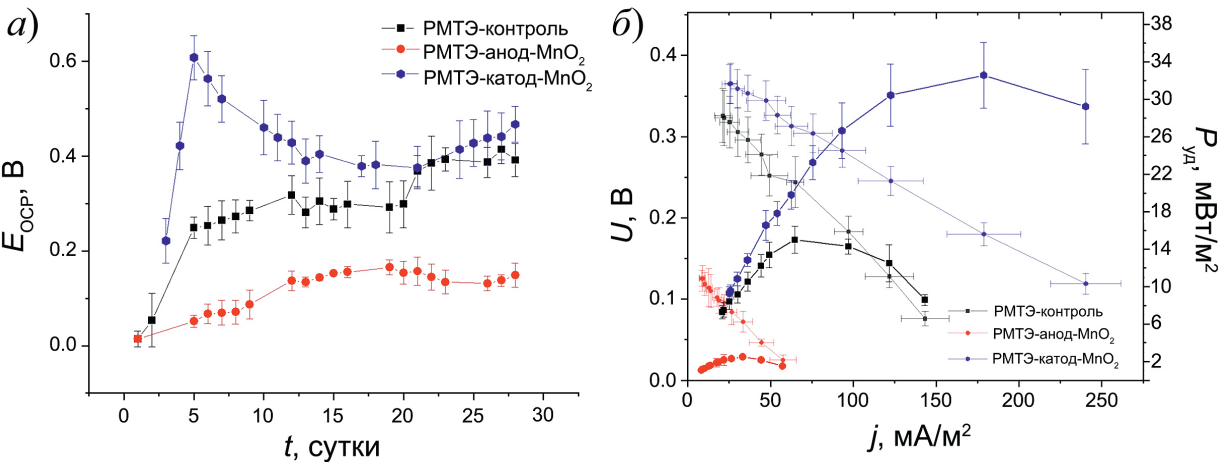


Рис. 6. Динамики генерации РМТЭ: изменение потенциала разомкнутой цепи (E_{OCP}) во времени (а), поляризационные кривые для расчета сопротивления и кривая мощности исследуемых систем (б)

Fig. 6. Generation dynamics of PMFC: changes in open circuit potential (E_{OCP}) over time (a), polarization curves for resistance calculation and power curve of the studied systems (b)

В первый день функционирования РМТЭ наблюдаются низкие значения силы тока ($I_{кз}$) и потенциала (E_{OCP}), которые возрастают в течение 10 дней. Этот промежуток времени можно обозначить как период адаптации микроорганизмов к условиям РМТЭ [50]. С 10-го по 28-й день E_{OCP} и $I_{кз}$ выходят на стационарные (постоянные) значения. Период адаптации характерен для РМТЭ и может составлять до 30 сут [51, 52]. Так, в работе [53] РМТЭ на основе растения *Cyperus papyrus* эксплуатировали в лабораторных условиях в течение девяти сот дней, при этом выход на постоянные значения напряжения (при нагрузке 1 кОм) наблюдали на 30-й день эксперимента. Авторы указывают на потерю мощности при длительных сроках эксплуатации РМТЭ, что может быть обусловлено накоплением биомассы или уменьше-

ем экссудации растений, зависящей от стадии роста. Как видно из рис. 6, наибольшим значением $I_{\text{кз}}$ на протяжении всего времени функционирования обладает РМТЭ-катод- MnO_2 .

В табл. 3 представлены электрохимические характеристики разработанных РМТЭ и описанных в литературе микробных топливных элементов на основе биоанодов.

Табл. 3. Электрохимические характеристики ячеек РМТЭ

Table 3. Electrochemical characteristics of the PMFC cells

Биоэлектрохимическая система	$E_{\text{оср}}$, В	$I_{\text{кз}}$, мА	R , Ом	$P_{\text{уд}}$, мВт/м ²	Литература
РМТЭ-Контроль	0.45 ± 0.04	1.06 ± 0.09	450 ± 30	15 ± 3	Эта работа
РМТЭ-катод- MnO_2	0.62 ± 0.04	3.6 ± 0.4	240 ± 20	33 ± 3	
РМТЭ-анод- MnO_2	0.17 ± 0.02	0.39 ± 0.08	430 ± 30	2 ± 1	
МТЭ-полипиррол/ MnO_2	0.64	—	—	440	[30]
МТЭ-полианилин/ MnO_2	0.77	—	155.6	248	[54]
МТЭ- MnO_2 /восстановленный оксид графена	0.595	—	—	1.59 Вт/м ³	[55]

Наименьшими электрохимическими характеристиками (сила тока, напряжение, мощность) по сравнению с контрольной системой обладает РМТЭ с модифицированным анодом (РМТЭ-анод- MnO_2). Электроосаждение MnO_2 на анод системы РМТЭ привело к 7-кратному снижению ее мощности. Измеренные потенциалы анода на 28-й день эксперимента также указывают на низкую активность микроорганизмов на аноде и составляют 40 мВ для РМТЭ- MnO_2 и –240 мВ для РМТЭ-контроль, что, вероятно, связано с восстановлением MnO_2 до Mn(II) бактериями *Pseudomonas* sp. с помощью соединений феназинового ряда [56–58]. В работе [59] отмечено, что MnO_2 способствует прямому переносу электронов от микроорганизмов к поверхности анода. Данный подход, по-видимому, не может быть реализован в случае используемых бактерий *Ps. chlororaphis* вследствие преобладания медиаторного переноса за счет соединений феназинового ряда (рис. 7).

Внутреннее сопротивление исследуемых РМТЭ-контроль и РМТЭ-анод- MnO_2 с учетом доверительных интервалов изменяется незначительно, поэтому вклад модифицированного анода в R_{int} оценить затруднительно. Однако для РМТЭ-катод- MnO_2 наблюдается снижение R_{int} , что может быть обусловлено уменьшением перенапряжения реакции восстановления кислорода на катоде. В целом, учитывая линейный характер поляризационных кривых, в системах РМТЭ преобладают омические потери, связанные с переносом заряда через электролит.

Тем не менее мощность исследуемых РМТЭ ниже по сравнению с другими микробными топливными элементами [30, 54] (табл. 3), что обусловлено различными условиями эксперимента. Например, в работе [30] использовали анод из нержавеющей стали с электрохимически осажденным полипирролом и MnO_2 , обеспечивающий двукратное увеличение мощности по сравнению с анодом из нержавеющей стали. Более высокая мощность микробных топливных элементов [30, 54] относительно разработанных РМТЭ может быть обусловлена использованием дополнительных источников субстрата, анаэробными условиями в анодной зоне, аэрацией катодной камеры [30, 54] и использованием активного ила [54]. Таким образом, адекватное сопоставление характеристик биоэлектрохимических систем является затруднительным.

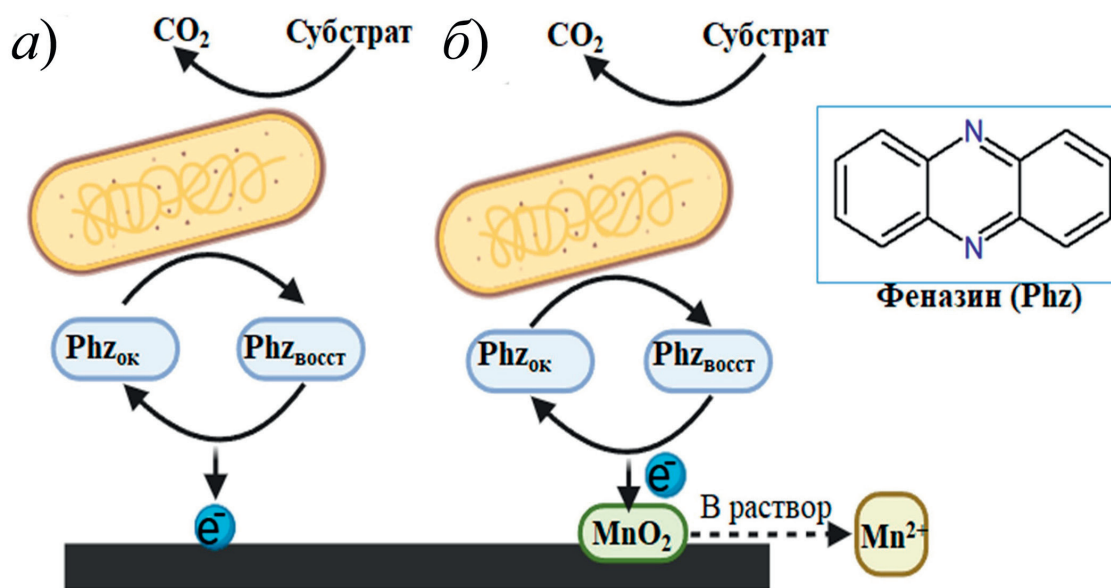


Рис. 7. Предполагаемая схема функционирования микроорганизмов на аноде в РМТЭ-контроль (а) и РМТЭ-анод-MnO₂ (б)

Fig. 7. Proposed scheme for microorganism functioning at the anode in PMFC-control (a) and PMFC-anode-MnO₂ (b)

2.4. Сканирующая электронная микроскопия углеродных биоанодов. После эксплуатации РМТЭ в течение 28 дней проводили оценку поверхности анодов методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 8) с целью выявления формирования биопленки на поверхности электродов. На анодах наблюдаются покрытия из полимероподобной субстанции в РМТЭ-контроль и РМТЭ-анод-MnO₂, (рис. 8, б и в соответственно). Однако значение потенциала анода в РМТЭ-MnO₂ является минимальным по сравнению с контрольным РМТЭ, что может быть обусловлено восстановлением MnO₂ до Mn(II) соединениями феназинового ряда [56–58] без накопления электронов на поверхности анода (рис. 7, б).

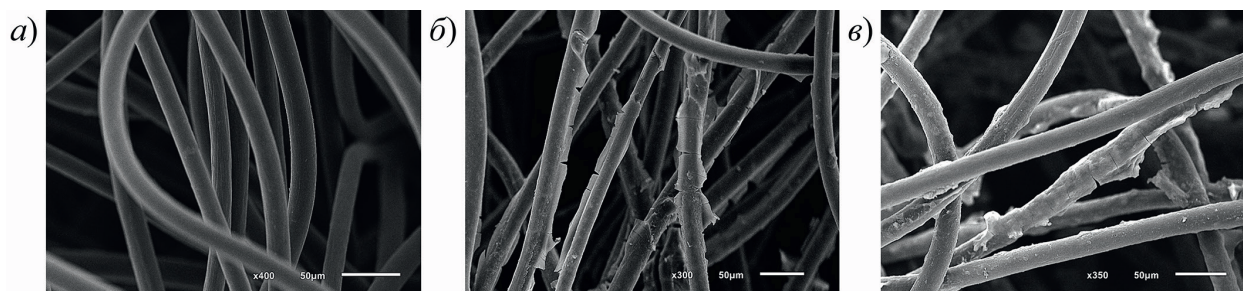


Рис. 8. Поверхность анодов из углеродного войлока (а), РМТЭ-контроль (б) и РМТЭ-анод-MnO₂ (в) по данным сканирующей электронной микроскопии. Увеличение 400× (а), 300× (б) и 350× (в)

Fig. 8. Surface of carbon felt anodes (a), PMFC-control (b), and PMFC-anode-MnO₂ (c) based on scanning electron microscopy data. Magnification 400× (a), 300× (b), and 350× (c)

Закключение

Продемонстрирована возможность использования модифицированного углеродного войлока с большой геометрической площадью в РМТЭ. Установлено, что система РМТЭ-анод-MnO₂ характеризуется меньшей мощностью ($P_{y\partial} = 2$ мВт/м²) по сравнению с контрольной системой, что обусловлено восстановлением MnO₂ на поверхности анода. Ис-

пользование MnO_2 на катоде показало двукратное увеличение мощности и снижение внутреннего сопротивления с 450 до 240 Ом, что подтверждает возможность использования электроосажденного MnO_2 в качестве недорогого и эффективного катодного катализатора реакции восстановления кислорода в РМТЭ с возможностью его масштабирования на электродах с большой площадью.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Machol B., Rizk S. Economic value of U.S. fossil fuel electricity health impacts // *Environ. Int.* 2013. V. 52. P. 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.03.003>.
2. Abdelkareem M.A., Elsaid K., Wilberforce T., Kamil M., Sayed E.T., Olabi A. Environmental aspects of fuel cells: A review // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 752. Art. 141803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141803>.
3. Sonawane A.V., Rikame S., Sonawane S.H., Gaikwad M., Bhanvase B., Sonawane S.S., Mungray A.K., Gaikwad R. A review of microbial fuel cell and its diversification in the development of green energy technology // *Chemosphere.* 2024. V. 350. Art. 141127. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141127>.
4. Rabaey K., Verstraete W. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23, No 6. P. 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>.
5. Pamintuan K.R.S., Sanchez K.M. Power generation in a plant-microbial fuel cell assembly with graphite and stainless steel electrodes growing *Vigna Radiata* // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2019. V. 703, No 1. Art. 012037. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/703/1/012037>.
6. Al-Badani M., Chong P.L., Lim H.S. A mini review of the effect of modified carbon paper, carbon felt, and carbon cloth electrodes on the performance of microbial fuel cell // *Int. J. Green Energy.* 2024. V. 21, No 1. P. 170–186. <https://doi.org/10.1080/15435075.2023.2194979>.
7. Azri Y.M., Tou I., Sadi M. Electrodes materials evaluation in plant microbial fuel cells: A comparison of graphite and stainless steels // *Biofuels.* 2023. V. 14, No 10. P. 1077–1086. <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2212987>.
8. Zhang C., Zeng X., Xu X., Nie W., Dubey B.K., Ding W. PDA- Fe_3O_4 decorated carbon felt anode enhancing electrochemical performance of microbial fuel cells: Effect of electrode materials on electroactive bio-film // *Chemosphere.* 2024. V. 355. Art. 141764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141764>.
9. Agüero-Quiñones R., Ávila-Sánchez Z., Rojas-Flores S., Cabanillas-Chirinos L., De La Cruz-Noriega M., Nazario-Naveda R., Rojas-Villacorta W. Activated carbon electrodes for bioenergy production in microbial fuel cells using synthetic wastewater as substrate // *Sustainability.* 2023. V. 15, No 18. Art. 13767. <https://doi.org/10.3390/su151813767>.
10. Zou J., Chang Q., Guo C., Yan M. Vanadium nitride decorated carbon cloth anode promotes aniline degradation and electricity generation of MFCs by efficiently enriching electroactive bacteria and promoting extracellular electron transfer // *J. Environ. Manage.* 2023. V. 346. Art. 119048. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119048>.
11. Zhu K., Wang S., Liu H., Liu S., Zhang J., Yuan J., Fu W., Dang W., Xu Y., Yang X., Wang Z. Heteroatom-doped porous carbon nanoparticle-decorated carbon cloth (HPCN/CC) as efficient anode electrode for microbial fuel cells (MFCs) // *J. Cleaner Prod.* 2022. V. 336. Art. 130374. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130374>.
12. Chen L., Jiang L., Cheng L., Gao Y., Wang M., Xu L., Zhu Z. Kinetic study of electron transfer process in methyl orange decolorization by *Shewanella* in MFCs with covalent organic frameworks modified anode // *Chemosphere.* 2024. V. 350. Art. 141073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141073>.

13. Hidalgo D., Tommasi T., Bocchini S., Chiolerio A., Chiodoni A., Mazzarino I., Ruggeri B. Surface modification of commercial carbon felt used as anode for microbial fuel cells // *Energy*. 2016. V. 99. P. 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.01.039>.
14. Yang J., Zhao Y.-G., Liu X., Fu Y. Anode modification of sediment microbial fuel cells (SMFC) towards bioremediating mariculture wastewater // *Mar. Pollut. Bull.* 2022. V. 182. Art. 114013. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114013>.
15. Huang X., Ma G. Graphite felt modified-graphene oxide/graphene as novel vanadium battery electrode material // *Ferroelectrics*. 2021. V. 579, No 1. P. 12–22. <https://doi.org/10.1080/00150193.2021.1903263>.
16. Zheng X., Hou S., Amanze C., Zeng Z., Zeng W. Enhancing microbial fuel cell performance using anode modified with Fe₃O₄ nanoparticles // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2022. V. 45, No 5. P. 877–890. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02705-z>.
17. Mumtaz M.W., Mukhtar H., Miran W., Alessa A.H., Waleed A., Sarwar Z., Ashraf H. Impact of CeO₂ modified cathode and PANI modified anode on tannery wastewater fed microbial fuel cell performance // *Saudi J. Biol. Sci.* 2024. V. 31, No 8. Art. 104024. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.104024>.
18. Liu X., Zhao X., Yu Y.-Y., Wang Y.-Z., Shi Y.-T., Cheng Q.-W., Fang Z., Yong Y.-C. Facile fabrication of conductive polyaniline nanoflower modified electrode and its application for microbial energy harvesting // *Electrochim. Acta*. 2017. V. 255. P. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.09.153>.
19. Yoon C.-M., Long D., Jang S.-M., Qiao W., Ling L., Miyawaki J., Rhee C.-K., Mochida I., Yoon S.-H. Electrochemical surface oxidation of carbon nanofibers // *Carbon*. 2011. V. 49, No 1. P. 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.08.047>.
20. Zhang W., Xie B., Yang L., Liang D., Zhu Y., Liu H. Brush-like polyaniline nanoarray modified anode for improvement of power output in microbial fuel cell // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 233. P. 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.124>.
21. Zhou M., Chi M., Wang H., Jin T. Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performance of microbial fuel cells // *Biochem. Eng. J.* 2012. V. 60. P. 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.014>.
22. Luo J., Chi M., Wang H., He H., Zhou M. Electrochemical surface modification of carbon mesh anode to improve the performance of air-cathode microbial fuel cells // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2013. V. 36, No 12. P. 1889–1896. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0963-x>.
23. Hirose S., Takasugi K., Nakamoto T., Taguchi K. Cobalt-intercalated birnessite-type manganese oxide catalysts for low-cost cathodes in microbial fuel cells // *Resourceedings*. 2023. V. 3, No 3. P. 17–22. <https://doi.org/10.21625/resourceedings.v3i3.1025>.
24. Chen J., Zhao K., Wu Y., Liu J., Wang R., Yang Y., Liu Y. Improved bioelectrochemical performance of MnO₂ nanorods modified cathode in microbial fuel cell // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2023. V. 30, No 17. P. 49052–49059. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25787-y>.
25. Wang Y., Hu G., Zheng D., Dong J., Wang J. High-capacitance manganese dioxide oxide/carbon nanotube/carbon felt as a bioanode for enhanced energy output in microbial fuel cells // *Coatings*. 2023. V. 13, No 6. Art. 1043. <https://doi.org/10.3390/coatings13061043>.
26. Ravinuthala S., Anilbhai B.V., Settu S. Fabrication of low-cost, green material-based microbial fuel cell for bioelectricity production through textile wastewater remediation // *Mater. Today: Proc.* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.528>.
27. Majidi M.R., Farahani F.S., Hosseini M., Ahadzadeh I. Low-cost nanowired α-MnO₂/C as an ORR catalyst in air-cathode microbial fuel cell // *Bioelectrochemistry*. 2019. V. 125. P. 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.09.004>.
28. Xu Q., Wang J.-M., Cheng X.-L., Jiang Y.-Q., Tian R.-R., Fu H., Ji Y.-X., Zhou J., Ji G.-S., Yong X.-Y. Electricity generation and energy storage in microbial fuel cells with manganese dioxide capacitive electrode // *J. Power Sources*. 2024. V. 598. Art. 234192. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2024.234192>.
29. Zhang C., Liang P., Jiang Y., Huang X. Enhanced power generation of microbial fuel cell using manganese dioxide-coated anode in flow-through mode // *J. Power Sources*. 2015. V. 273. P. 580–583. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.09.129>.

30. Phonsa S., Sreearunothai P., Charojrochkul S., Sombatmankhong K. Electrodeposition of MnO_2 on polypyrrole-coated stainless steel to enhance electrochemical activities in microbial fuel cells // *Solid State Ionics*. 2018. V. 316. P. 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2017.11.022>.
31. Yu S., Liu Y., Zhao Y., Khan R., Cao X., Li C. CNFs@ MnO_2 nanofiber as anode material for improving the extracellular electron transfer of microbial fuel cells // *Catal. Sci. Technol.* 2024. V. 14, No 2. P. 464–477. <https://doi.org/10.1039/D3CY01510F>.
32. Zhang C., Liang P., Yang X., Jiang Y., Bian Y., Chen C., Zhang X., Huang X. Binder-free graphene and manganese oxide coated carbon felt anode for high-performance microbial fuel cell // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 81. P. 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.051>.
33. ГОСТ 32426-2013 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Испытание ряски на угнетение роста. М.: Стандартинформ, 2019. 20 с.
34. Юшин Ю.В., Подкопайло Р.В., Петрова Д.А., Егоров К.А., Трухин В.П. Обзор питательных сред, используемых для культивации рекомбинантной *Escherichia coli* // *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019. Т. 21, № 3. С. 444–453.
35. Земскова Л.А., Войт А.В., Баринов Н.Н., Кайдалова Т.А. Функциональные материалы на основе диоксида марганца, нанесенного на углеродное волокно // *Физика и химия стекла*. 2014. Т. 40, № 1. С. 3–10.
36. Yong X.-Y., Gu D.-Y., Wu Y.-D., Yan Z.-Y., Zhou J., Wu X.-Y., Wei P., Jia H.-H., Zheng T., Yong Y.-C. Bio-Electron-Fenton (BEF) process driven by microbial fuel cells for triphenyltin chloride (TPTC) degradation // *J. Hazard. Mater.* 2017. V. 324. Pt. B. P. 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.047>.
37. Hodkiewicz J. Characterizing graphene with Raman spectroscopy // *Thermo-Fisher Scientific Application Note*. 2010. 3 p.
38. Bonpua J., Yagües Y., Aleshin A., Disappa S., Camacho J. Flame temperature effect on sp^2 bonds on nascent carbon nanoparticles formed in premixed flames ($T_{f,max} > 2100$ K): A Raman spectroscopy and particle mobility sizing study // *Proc. Combust. Inst.* 2019. V. 37, No 1. P. 943–951. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2018.06.124>.
39. Armano A., Agnello S. Two-dimensional carbon: A review of synthesis methods, and electronic, optical, and vibrational properties of single-layer graphene // *C*. 2019. V. 5, No 4. Art. 67. <https://doi.org/10.3390/c5040067>.
40. Eckmann A., Felten A., Mishchenko A., Britnell L., Krupke R., Novoselov K.S., Casiraghi C. Probing the nature of defects in graphene by Raman spectroscopy // *Nano Lett.* 2012. V. 12, No 8. P. 3925–3930. <https://doi.org/10.1021/nl300901a>.
41. Lübke M., Sumboja A., McCafferty L., Armer C.F., Handoko A.D., Du Y., McColl K., Cora F., Brett D., Liu Zh., Darr J.A. Transition-metal-doped $\alpha\text{-MnO}_2$ nanorods as bifunctional catalysts for efficient oxygen reduction and evolution reactions // *ChemistrySelect*. 2018. V. 3, No 9. P. 2613–2622. <https://doi.org/10.1002/slct.201702514>.
42. Julien C., Massot M., Rangan S., Lemal M., Guyomard D. Study of structural defects in $\gamma\text{-MnO}_2$ by Raman spectroscopy // *J. Raman Spectrosc.* 2002. V. 33, No 4. P. 223–228. <https://doi.org/10.1002/jrs.838>.
43. Langner J., Bruns M., Dixon D., Nefedov A., Wöll Ch., Scheiba F., Ehrenberg H., Roth C., Melke J. Surface properties and graphitization of polyacrylonitrile based fiber electrodes affecting the negative half-cell reaction in vanadium redox flow batteries // *J. Power Sources*. 2016. V. 321. P. 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.04.128>.
44. Ataherian F., Lee K.-T., Wu N.-L. Long-term electrochemical behaviors of manganese oxide aqueous electrochemical capacitor under reducing potentials // *Electrochim. Acta*. 2010. V. 55, No 25. P. 7429–7435. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.01.102>.
45. Ouda E., Yousf N., Magar H.S., Hassan R.Y.A., Duraia E.-S.M. Electrochemical properties of MnO_2 -based carbon nanomaterials for energy storage and electrochemical sensing // *J. Mater. Sci: Mater. Electron.* 2023. V. 34, No 8. Art. 731. <https://doi.org/10.1007/s10854-023-10107-4>.

46. Yang L., Wang A., Wen Q., Chen Y. Modified cobalt-manganese oxide-coated carbon felt anodes: An available method to improve the performance of microbial fuel cells // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2021. V. 44, No 12. P. 2615–2625. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02631-6>.
47. Yuan H., Deng L., Chen Y., Yuan Y. MnO₂/polypyrrole/MnO₂ multi-walled-nanotube-modified anode for high-performance microbial fuel cells // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 196. P. 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.02.183>.
48. Mishra P., Jain R. Electrochemical deposition of MWCNT-MnO₂/PPy nanocomposite application for microbial fuel cells // *Int. J. Hydrogen Energy.* 2016. V. 41, No 47. P. 22394–22405. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.020>.
49. Gnana Kumar G., Awan Z., Nahm K.S., Xavier J.S. Nanotubular MnO₂/graphene oxide composites for the application of open air-breathing cathode microbial fuel cells // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 53. P. 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.012>.
50. Bataillou G., Haddour N., Vollaie C. Bioelectricity production of PMFC using *Lobelia Queen Cardinalis* in individual and shared soil configurations // *E3S Web Conf.* 2022. V. 334. Art. 08001. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202233408001>.
51. Sarma P.J., Mohanty K. Development and comprehensive characterization of low-cost hybrid clay based ceramic membrane for power enhancement in plant based microbial fuel cells (PMFCs) // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 296. Art. 127337. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127337>.
52. Sarma P.J., Mohanty K. A novel three-chamber modular PMFC with bentonite/flyash based clay membrane and oxygen reducing biocathode for long term sustainable bioelectricity generation // *Bioelectrochemistry.* 2022. V. 144. Art. 107996. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107996>.
53. Bataillou G., Ondel O., Haddour N. 900-Days long term study of plant microbial fuel cells and complete application for powering wireless sensors // *J. Power Sources.* 2024. V. 593. Art. 233965. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2023.233965>.
54. Zhou X., Xu Y., Mei X., Du N., Jv R., Hu Z., Chen S. Polyaniline/ β -MnO₂ nanocomposites as cathode electrocatalyst for oxygen reduction reaction in microbial fuel cells // *Chemosphere.* 2018. V. 198. P. 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.058>.
55. Zhang H., Wu Y., Zhong C., Wang G., Wang B., Ma C., Zhang H., Ding C., Liu Y., Kong C., Yang Z., Wang T., Zhu H. MnO₂@rGO modified stainless steel mesh as cathode membrane in MFC-MBR for enhanced bioelectricity generation and membrane fouling mitigation // *J. Water Process Eng.* 2024. V. 66. Art. 106111. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106111>.
56. Ntyam Mendo S.A., Kouitcheu Mabeku L.B., Tounkara L.S., Nguemezi S.T., Ngane R.A.N., Sameza L.M. Abiotic conditions on growth of *Pseudomonas fluorescens* (DS17R) and its ability to produce secondary metabolites (including phenazines) against *Phytophthora colocasiae*, the causal agent of taro leaf blight // *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* 2018. V. 5, No 2. Art. 1095.
57. Mavrodi D.V., Blankenfeldt W., Thomashow L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>.
58. Horvath A.S., Garrick L.V., Moreau J.W. Manganese-reducing *Pseudomonas fluorescens*-group bacteria control arsenic mobility in gold mining-contaminated groundwater // *Environ. Earth Sci.* 2014. V. 71, No 9. P. 4187–4198. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2809-x>.
59. Fu Y., Yu J., Zhang Y., Meng Y. Graphite coated with manganese oxide/multiwall carbon nanotubes composites as anodes in marine benthic microbial fuel cells // *Appl. Surf. Sci.* 2014. V. 317. P. 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.08.044>.
60. Gao C., Liu L., Yu T., Yang F. Development of a novel carbon-based conductive membrane with in-situ formed MnO₂ catalyst for wastewater treatment in bio-electrochemical system (BES) // *J. Membr. Sci.* 2018. V. 549. P. 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.12.053>.
61. Olias L.G., Otero A.R., Cameron P.J., Di Lorenzo M. A soil microbial fuel cell-based biosensor for dissolved oxygen monitoring in water // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 362. Art. 137108. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137108>.

References

1. Machol B., Rizk S. Economic value of U.S. fossil fuel electricity health impacts. *Environ. Int.*, 2013, vol. 52, pp. 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.03.003>.
2. Abdelkareem M.A., Elsaid K., Wilberforce T., Kamil M., Sayed E.T., Olabi A. Environmental aspects of fuel cells: A review. *Sci. Total Environ.*, 2021, vol. 752, art. 141803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141803>.
3. Sonawane A.V., Rikame S., Sonawane S.H., Gaikwad M., Bhanvase B., Sonawane S.S., Mungray A.K., Gaikwad R. A review of microbial fuel cell and its diversification in the development of green energy technology. *Chemosphere*, 2024, vol. 350, art. 141127. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141127>.
4. Rabaey K., Verstraete W. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.*, 2005, vol. 23, no. 6, pp. 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>.
5. Pamintuan K.R.S., Sanchez K.M. Power generation in a plant-microbial fuel cell assembly with graphite and stainless steel electrodes growing *Vigna Radiata*. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2019, vol. 703, no. 1, art. 012037. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/703/1/012037>.
6. Al-Badani M., Chong P.L., Lim H.S. A mini review of the effect of modified carbon paper, carbon felt, and carbon cloth electrodes on the performance of microbial fuel cell. *Int. J. Green Energy*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 170–186. <https://doi.org/10.1080/15435075.2023.2194979>.
7. Azri Y.M., Tou I., Sadi M. Electrodes materials evaluation in plant microbial fuel cells: A comparison of graphite and stainless steels. *Biofuels*, 2023, vol. 14, no. 10, pp. 1077–1086. <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2212987>.
8. Zhang C., Zeng X., Xu X., Nie W., Dubey B.K., Ding W. PDA-Fe₃O₄ decorated carbon felt anode enhancing electrochemical performance of microbial fuel cells: Effect of electrode materials on electroactive biofilm. *Chemosphere*, 2024, vol. 355, art. 141764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141764>.
9. Agüero-Quñones R., Ávila-Sánchez Z., Rojas-Flores S., Cabanillas-Chirinos L., De La Cruz-Noriega M.D.L., Nazario-Naveda R., Rojas-Villacorta W. Activated carbon electrodes for bioenergy production in microbial fuel cells using synthetic wastewater as substrate. *Sustainability*, 2023, vol. 15, no. 18, art. 13767. <https://doi.org/10.3390/su151813767>.
10. Zou J., Chang Q., Guo C., Yan M. Vanadium nitride decorated carbon cloth anode promotes aniline degradation and electricity generation of MFCs by efficiently enriching electroactive bacteria and promoting extracellular electron transfer. *J. Environ. Manage.*, 2023, vol. 346, art. 119048. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119048>.
11. Zhu K., Wang S., Liu H., Liu S., Zhang J., Yuan J., Fu W., Dang W., Xu Y., Yang X., Wang Z. Heteroatom-doped porous carbon nanoparticle-decorated carbon cloth (HPCN/CC) as efficient anode electrode for microbial fuel cells (MFCs). *J. Cleaner Prod.*, 2022, vol. 336, art. 130374. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130374>.
12. Chen L., Jiang L., Cheng L., Gao Y., Wang M., Xu L., Zhu Z. Kinetic study of electron transfer process in methyl orange decolorization by *Shewanella* in MFCs with covalent organic frameworks modified anode. *Chemosphere*, 2024, vol. 350, art. 141073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141073>.
13. Hidalgo D., Tommasi T., Bocchini S., Chiolerio A., Chiodoni A., Mazzarino I., Ruggeri B. Surface modification of commercial carbon felt used as anode for microbial fuel cells. *Energy*, 2016, vol. 99, pp. 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.01.039>.
14. Yang J., Zhao Y.-G., Liu X., Fu Y. Anode modification of sediment microbial fuel cells (SMFC) towards bioremediating mariculture wastewater. *Mar. Pollut. Bull.*, 2022, vol. 182, art. 114013. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114013>.
15. Huang X., Ma G. Graphite felt modified-graphene oxide/graphene as novel vanadium battery electrode material. *Ferroelectrics*, 2021, vol. 579, no. 1, pp. 12–22. <https://doi.org/10.1080/00150193.2021.1903263>.

16. Zheng X., Hou S., Amanze C., Zeng Z., Zeng W. Enhancing microbial fuel cell performance using anode modified with Fe₃O₄ nanoparticles. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2022, vol. 45, no. 5, pp. 877–890. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02705-z>.
17. Mumtaz M.W., Mukhtar H., Miran W., Alessa A.H., Waleed A., Sarwar Z., Ashraf H. Impact of CeO₂ modified cathode and PANI modified anode on tannery wastewater fed microbial fuel cell performance. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2024, vol. 31, no. 8, art. 104024. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.104024>.
18. Liu X., Zhao X., Yu Y.-Y., Wang Y.-Z., Shi Y.-T., Cheng Q.-W., Fang Z., Yong Y.-C. Facile fabrication of conductive polyaniline nanoflower modified electrode and its application for microbial energy harvesting. *Electrochim. Acta*, 2017, vol. 255, pp. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.09.153>.
19. Yoon C.-M., Long D., Jang S.-M., Qiao W., Ling L., Miyawaki J., Rhee C.-K., Mochida I., Yoon S.-H. Electrochemical surface oxidation of carbon nanofibers. *Carbon*, 2011, vol. 49, no. 1, pp. 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.08.047>.
20. Zhang W., Xie B., Yang L., Liang D., Zhu Y., Liu H. Brush-like polyaniline nanoarray modified anode for improvement of power output in microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.*, 2017, vol. 233, pp. 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.124>.
21. Zhou M., Chi M., Wang H., Jin T. Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performance of microbial fuel cells. *Biochem. Eng. J.*, 2012, vol. 60, pp. 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.014>.
22. Luo J., Chi M., Wang H., He H., Zhou M. Electrochemical surface modification of carbon mesh anode to improve the performance of air-cathode microbial fuel cells. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2013, vol. 36, no. 12, pp. 1889–1896. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0963-x>.
23. Hirose S., Takasugi K., Nakamoto T., Taguchi K. Cobalt-intercalated birnessite-type manganese oxide catalysts for low-cost cathodes in microbial fuel cells. *Resourceedings*, 2023, vol. 3, no. 3, pp. 17–22. <https://doi.org/10.21625/resourceedings.v3i3.1025>.
24. Chen J., Zhao K., Wu Y., Liu J., Wang R., Yang Y., Liu Y. Improved bioelectrochemical performance of MnO₂ nanorods modified cathode in microbial fuel cell. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2023, vol. 30, no. 17, pp. 49052–49059. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25787-y>.
25. Wang Y., Hu G., Zheng D., Dong J., Wang J. High-capacitance manganese dioxide oxide/carbon nanotube/carbon felt as a bioanode for enhanced energy output in microbial fuel cells. *Coatings*, 2023, vol. 13, no. 6, art. 1043. <https://doi.org/10.3390/coatings13061043>.
26. Ravinuthala S., Anilbhai B.V., Settu S. Fabrication of low-cost, green material-based microbial fuel cell for bioelectricity production through textile wastewater remediation. *Mater. Today: Proc.*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.528>.
27. Majidi M.R., Farahani F.S., Hosseini M., Ahadzadeh I. Low-cost nanowired α-MnO₂/C as an ORR catalyst in air-cathode microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 2019, vol. 125, pp. 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.09.004>.
28. Xu Q., Wang J.-M., Cheng X.-L., Jiang Y.-Q., Tian R.-R., Fu H., Ji Y.-X., Zhou J., Ji G.-S., Yong X.-Y. Electricity generation and energy storage in microbial fuel cells with manganese dioxide capacitive electrode. *J. Power Sources*, 2024, vol. 598, art. 234192. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2024.234192>.
29. Zhang C., Liang P., Jiang Y., Huang X. Enhanced power generation of microbial fuel cell using manganese dioxide-coated anode in flow-through mode. *J. Power Sources*, 2015, vol. 273, pp. 580–583. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.09.129>.
30. Phonsa S., Sreearunothai P., Charojrochkul S., Sombatmankhong K. Electrodeposition of MnO₂ on polypyrrole-coated stainless steel to enhance electrochemical activities in microbial fuel cells. *Solid State Ionics*, 2018, vol. 316, pp. 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2017.11.022>.
31. Yu S., Liu Y., Zhao Y., Khan R., Cao X., Li C. CNFs@MnO₂ nanofiber as anode material for improving the extracellular electron transfer of microbial fuel cells. *Catal. Sci. Technol.*, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 464–477. <https://doi.org/10.1039/D3CY01510F>.

32. Zhang C., Liang P., Yang X., Jiang Y., Bian Y., Chen C., Zhang X., Huang X. Binder-free graphene and manganese oxide coated carbon felt anode for high-performance microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, vol. 81, pp. 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.051>.
33. State Standard 32426-2013 Testing of chemicals of environmental hazard. *Lemna* spp. growth inhibition test. Moscow, Standartinform, 2019. 20 p. (In Russian)
34. Yushin Yu.V., Podkopailo R.V., Petrova D.A., Egorov K.A., Trukhin V.P. A review of culture media used for growing recombinant *Escherichia coli*. *Med. Ekstremal'nykh Situats.*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 444–453. (In Russian)
35. Zemskova L.A., Voyt A.V., Barinov N.N., Kaydalova T.A. Functional materials based on manganese dioxide deposited on carbon fiber. *Glass Phys. Chem.*, 2014, vol. 40, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1134/S1087659614010209>.
36. Yong X.-Y., Gu D.-Y., Wu Y.-D., Yan Z.-Y., Zhou J., Wu X.-Y., Wei P., Jia H.-H., Zheng T., Yong Y.-C. Bio-Electron-Fenton (BEF) process driven by microbial fuel cells for triphenyltin chloride (TPTC) degradation. *J. Hazard. Mater.*, 2017, vol. 324, pt. B, pp. 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.047>.
37. Hodkiewicz J. Characterizing graphene with Raman spectroscopy. Thermo-Fisher Scientific Application Note, 2010. 3 p.
38. Bonpua J., Yagües Y., Aleshin A., Disappa S., Camacho J. Flame temperature effect on sp^2 bonds on nascent carbon nanoparticles formed in premixed flames ($T_{f,max} > 2100$ K): A Raman spectroscopy and particle mobility sizing study. *Proc. Combust. Inst.*, 2019, vol. 37, no. 1, pp. 943–951. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2018.06.124>.
39. Armano A., Agnello S. Two-dimensional carbon: a review of synthesis methods, and electronic, optical, and vibrational properties of single-layer graphene. *C*, 2019, vol. 5, no. 4, art. 67. <https://doi.org/10.3390/c5040067>.
40. Eckmann A., Felten A., Mishchenko A., Britnell L., Krupke R., Novoselov K.S., Casiraghi C. Probing the nature of defects in graphene by Raman spectroscopy. *Nano Lett.*, 2012, vol. 12, no. 8, pp. 3925–3930. <https://doi.org/10.1021/nl300901a>.
41. Lübke M., Sumboja A., McCafferty L., Armer C.F., Handoko A.D., Du Y., McColl K., Cora F., Brett D., Liu Zh., Darr J.A. Transition-metal-doped α - MnO_2 nanorods as bifunctional catalysts for efficient oxygen reduction and evolution reactions. *ChemistrySelect*, 2018, vol. 3, no. 9, pp. 2613–2622. <https://doi.org/10.1002/slct.201702514>.
42. Julien C., Massot M., Rangan S., Lemal M., Guyomard D. Study of structural defects in γ - MnO_2 by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 2002, vol. 33, no. 4, pp. 223–228. <https://doi.org/10.1002/jrs.838>.
43. Langner J., Bruns M., Dixon D., Nefedov A., Wöll Ch., Scheiba F., Ehrenberg H., Roth C., Melke J. Surface properties and graphitization of polyacrylonitrile based fiber electrodes affecting the negative half-cell reaction in vanadium redox flow batteries. *J. Power Sources*, 2016, vol. 321, pp. 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.04.128>.
44. Ataherian F., Lee K.-T., Wu N.-L. Long-term electrochemical behaviors of manganese oxide aqueous electrochemical capacitor under reducing potentials. *Electrochim. Acta*, 2010, vol. 55, no. 25, pp. 7429–7435. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.01.102>.
45. Ouda E., Yousf N., Magar H.S., Hassan R.Y.A., Duraia E.-S.M. Electrochemical properties of MnO_2 -based carbon nanomaterials for energy storage and electrochemical sensing. *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.*, 2023, vol. 34, no. 8, art. 731. <https://doi.org/10.1007/s10854-023-10107-4>.
46. Yang L., Wang A., Wen Q., Chen Y. Modified cobalt-manganese oxide-coated carbon felt anodes: An available method to improve the performance of microbial fuel cells. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2021, vol. 44, no. 12, pp. 2615–2625. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02631-6>.

47. Yuan H., Deng L., Chen Y., Yuan Y. MnO₂/polypyrrole/MnO₂ multi-walled-nanotube-modified anode for high-performance microbial fuel cells. *Electrochim. Acta*, 2016, vol. 196, pp. 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.02.183>.
48. Mishra P., Jain R. Electrochemical deposition of MWCNT-MnO₂/PPy nanocomposite application for microbial fuel cells. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2016, vol. 41, no. 47, pp. 22394–22405. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.020>.
49. Gnana Kumar G., Awan Z., Nahm K.S., Xavier J.S. Nanotubular MnO₂/graphene oxide composites for the application of open air-breathing cathode microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, vol. 53, pp. 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.012>.
50. Bataillou G., Haddour N., Vollaie C. Bioelectricity production of PMFC using Lobelia Queen Cardinalis in individual and shared soil configurations. *E3S Web Conf.*, 2022, vol. 334, art. 08001. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202233408001>.
51. Sarma P.J., Mohanty K. Development and comprehensive characterization of low-cost hybrid clay based ceramic membrane for power enhancement in plant based microbial fuel cells (PMFCs). *Mater. Chem. Phys.*, 2023, vol. 296, art. 127337. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127337>.
52. Sarma P.J., Mohanty K. A novel three-chamber modular PMFC with bentonite/flyash based clay membrane and oxygen reducing biocathode for long term sustainable bioelectricity generation. *Bioelectrochemistry*, 2022, vol. 144, art. 107996. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107996>.
53. Bataillou G., Ondel O., Haddour N. 900-Days long term study of plant microbial fuel cells and complete application for powering wireless sensors. *J. Power Sources*, 2024, vol. 593, art. 233965. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2023.233965>.
54. Zhou X., Xu Y., Mei X., Du N., Jv R., Hu Z., Chen S. Polyaniline/β-MnO₂ nanocomposites as cathode electrocatalyst for oxygen reduction reaction in microbial fuel cells. *Chemosphere*, 2018, vol. 198, pp. 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.058>.
55. Zhang H., Wu Y., Zhong C., Wang G., Wang B., Ma C., Zhang H., Ding C., Liu Y., Kong C., Yang Z., Wang T., Zhu H. MnO₂@rGO modified stainless steel mesh as cathode membrane in MFC-MBR for enhanced bioelectricity generation and membrane fouling mitigation. *J. Water Process Eng.*, 2024, vol. 66, art. 106111. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106111>.
56. Ntyam Mendo S.A., Kouitcheu Mabeku L.B., Tounkara L.S., Nguemezi S.T., Ngane R.A.N., Sameza L.M. Abiotic conditions on growth of *Pseudomonas fluorescens* (DS17R) and its ability to produce secondary metabolites (including phenazines) against *Phytophthora colocasiae*, the Causal agent of taro leaf blight. *Austin J. Biotechnol. Bioeng.*, 2018, vol. 5, no. 2, art. 1095.
57. Mavrodi D.V., Blankenfeldt W., Thomashow L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006, vol. 44, pp. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>.
58. Horvath A.S., Garrick L.V., Moreau J.W. Manganese-reducing *Pseudomonas fluorescens*-group bacteria control arsenic mobility in gold mining-contaminated groundwater. *Environ. Earth Sci.*, 2014, vol. 71, no. 9, pp. 4187–4198. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2809-x>.
59. Fu Y., Yu J., Zhang Y., Meng Y. Graphite coated with manganese oxide/multiwall carbon nanotubes composites as anodes in marine benthic microbial fuel cells. *Appl. Surf. Sci.*, 2014, vol. 317, pp. 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.08.044>.
60. Gao C., Liu L., Yu T., Yang F. Development of a novel carbon-based conductive membrane with in-situ formed MnO₂ catalyst for wastewater treatment in bio-electrochemical system (BES). *J. Membr. Sci.*, 2018, vol. 549, pp. 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.12.053>.
61. Olias L.G., Otero A.R., Cameron P.J., Di Lorenzo M. A soil microbial fuel cell-based biosensor for dissolved oxygen monitoring in water. *Electrochim. Acta*, 2020, vol. 362, art. 137108. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137108>.

Информация об авторах

Роман Владимирович Лепикаш, младший научный сотрудник лаборатории экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

E-mail: mr.romalep@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7853-2937>

Никита Сергеевич Захаров, младший научный сотрудник лаборатории экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

E-mail: zakharofnikita@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6364-3949>

Павел Владимирович Оськин, младший научный сотрудник лаборатории экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

E-mail: pavelfraj@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9308-6496>

Дэвард Иосифович Стом, доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник Высшей Школы РФ, главный научный сотрудник Байкальского музея СО РАН; профессор кафедры зоологии позвоночных и экологии биолого-почвенного факультета, заведующий лабораторией водной токсикологии НИИ биологии, Иркутский государственный университет; профессор кафедры инженерных коммуникаций и систем жизнеобеспечения, Иркутский национальный исследовательский технический университет

E-mail: stomd@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9496-2961>

Дарья Геннадьевна Лаврова, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

E-mail: d.g.fedoseeva@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5708-5453>

Сергей Валерьевич Алферов, кандидат химических наук, заведующий лабораторией экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

E-mail: s.v.alferov@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-7815>

Author Information

Roman V. Lepikash, Junior Researcher, Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula State University

E-mail: mr.romalep@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7853-2937>

Nikita S. Zakharov, Junior Researcher, Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula State University

E-mail: zakharofnikita@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6364-3949>

Pavel V. Oskin, Junior Researcher, Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula State University

E-mail: pavelfraj@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9308-6496>

Devard I. Stom, Dr. Sci. (Biology), Full Professor, Honored Worker of the Higher School of Russian Federation, Chief Researcher, Baikal Museum, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Professor of Department of Vertebrate Zoology and Ecology, Faculty of Biology and Soil Studies, Head of Laboratory

of Aquatic Toxicology, Research Institute of Biology, Irkutsk State University; Professor of Department of Engineering Communications and Life Support Systems, Irkutsk National Research Technical University

E-mail: *stomd@mail.ru*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9496-2961>

Daria G. Lavrova, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula State University

E-mail: *d.g.fedoseeva@gmail.com*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5708-5453>

Sergey V. Alferov, Cand. Sci. (Chemistry), Head of Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula State University

E-mail: *s.v.alferov@gmail.com*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-7815>

Поступила в редакцию 13.09.2024

Принята к публикации 01.12.2024

Received September 13, 2024

Accepted December 1, 2024

Оригинальная статья

УДК 546.04

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.223-241>**Комплексообразование трехзарядных катионов лантаноидов с амино(О-алкил)метиленфосфоновыми кислотами – ближайшими фосфорорганическими аналогами нитрилотриуксусной кислоты****А.Р. Гарифзянов¹, И.И. Мирзаянов²✉, И.Д. Шурыгин¹, Е.О. Чибирев¹, Ф.В. Девятков¹**¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия²Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия✉ MirzayanovII@corp.knrtu.ru**Аннотация**

Исследованы процессы комплексообразования новых комплексонов – аналогов нитрилотриуксусной ($H_3\text{НТА}$) и нитрилотриметиленфосфоновой ($H_6\text{НТФ}$) кислот, содержащих в качестве кислотных групп одноосновные (О-алкил)метиленфосфоновые фрагменты, с трехзарядными катионами лантаноидов. Методом рН-метрического титрования в сочетании с математическим моделированием определены константы устойчивости и депротонирования комплексов состава 1:1, а также долевое распределение комплексных форм. С использованием принципа линейности свободных энергий проведено сопоставление комплексообразующих свойств N -[(О-бутил)гидроксифосфорилметил]иминодиуксусной кислоты с $H_3\text{НТА}$.

Ключевые слова: комплексоны фосфорорганические, НТА, НТФ, кислотно-основные свойства, лантаноиды, редкоземельные элементы, комплексообразование, константы устойчивости.

Для цитирования: Гарифзянов А.Р., Мирзаянов И.И., Шурыгин И.Д., Чибирев Е.О., Девятков Ф.В. Комплексообразование трехзарядных катионов лантаноидов с амино(О-алкил)метиленфосфоновыми кислотами – ближайшими фосфорорганическими аналогами нитрилотриуксусной кислоты // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 223–241. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.223-241>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.223-241>

Complexation of trivalent lanthanide cations with amino(*O*-alkyl)methylenephosphonic acids as the closest organophosphorus analogues of nitrilotriacetic acid

A.R. Garifzyanov¹, I.I. Mirzayanov²✉, I.D. Shurygin¹, E.O. Chibirev¹, F.V. Devyatov¹

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

✉MirzayanovII@corp.knrtu.ru

Abstract

The complexation of new complexones, analogues of nitrilotriacetic ($H_3\text{NTA}$) and nitrilotrimethylenephosphonic ($H_6\text{NTP}$) acids containing monobasic (*O*-alkyl)methylenephosphonic fragments as donor groups, with trivalent cations of lanthanides was studied. The stability and deprotonation constants of 1:1 complexes and the fractional distribution of complex forms were determined using pH-metric titration in combination with mathematical modeling. The complexation properties of *N*-[(*O*-butyl)hydroxyphosphorylmethyl]iminodiacetic acid were compared with those of $H_3\text{NTA}$ based on the linear free-energy relationships.

Keywords: organophosphorus complexones, NTA, NTP, acid–base properties, lanthanides, rare earths, complexation, stability constants

For citation: Garifzyanov A.R., Mirzayanov I.I., Shurygin I.D., Chibirev E.O., Devyatov F.V. Complexation of trivalent lanthanide cations with amino(*O*-alkyl)methylenephosphonic acids as the closest organophosphorus analogues of nitrilotriacetic acid. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 223–241. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.223-241>. (In Russian)

Введение

Нитрилотириуксусная кислота ($H_3\text{NTA}$) – один из первых представителей комплексонов аминополикарбоксилатного ряда, уникальные комплексообразующие свойства которых были установлены еще Шварценбахом [1] – и ее фосфорорганический аналог, нитрилотриметиленфосфоновая кислота ($H_6\text{NTP}$), до настоящего времени вызывают значительный интерес с точки зрения термодинамики комплексообразования в водных растворах [2–16], структуры комплексов [17–24] и различных аспектов практического использования. Эти лиганды применяются в качестве ингибиторов солеотложения в замкнутых системах [25–27], для создания наноматериалов и ионообменников [28–31]. Координационно-ненасыщенные комплексы $H_3\text{NTA}$ проявляют каталитическую активность в процессах окисления воды [32], ацетализации альдегидов и алкоголизе производных этиленоксида [33]. Изучены кислотнo-основные и комплексообразующие свойства фосфорорганических комплексонов,

содержащих в качестве кислотных групп (*O*-алкил)метиленфосфоновые фрагменты, по отношению к катионам щелочноземельных переходных элементов [34–38].

В работе [34] впервые получены в виде средних калиевых солей *N*-[(*O*-бутил)гидроксифосфорилметил]иминодиуксусная (H_3L1), *N,N*-бис-[(*O*-бутил)гидроксифосфорилметил]аминоуксусная (H_3L2) и нитрилотрис(*O*-бутил)метиленфосфоновая (H_3L3) кислоты (рис. 1). Цель настоящей работы состоит в оценке характеристик комплексообразования трехзарядными катионами лантаноидов с этими лигандами, которые можно позиционировать как ближайшие фосфорорганические аналоги аминокарбоксилатных комплексонов с точки зрения стехиометрии протолитических равновесий и процессов комплексообразования, поскольку, в отличие от шестиосновной H_6HTF , они являются трехосновными тетрадентатными лигандами.

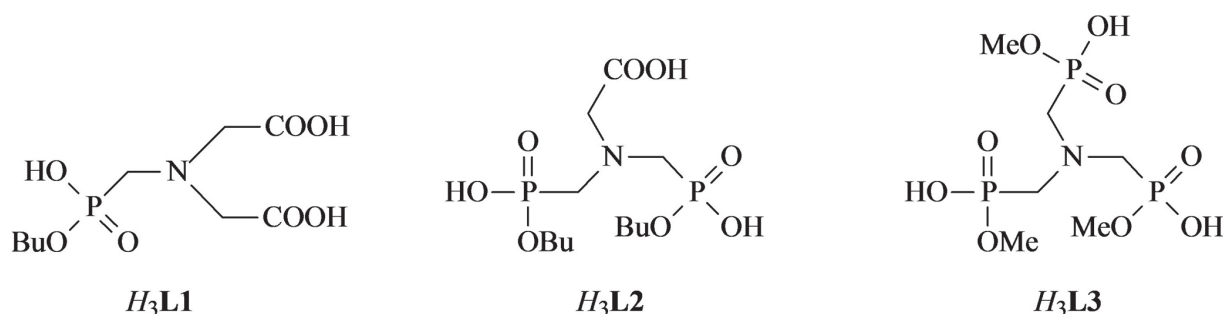


Рис. 1. Структура исследуемых лигандов H_3L1 , H_3L2 , H_3L3

Fig. 1. Structure of the studied H_3L1 , H_3L2 , and H_3L3 ligands

1. Материалы и методы

1.1. Оборудование и реактивы. Спектры ЯМР 1H , ^{31}P и ^{13}C регистрировали с помощью спектрометра Bruker AVANCE III 400 NanoBay (Bruker, США) с рабочей частотой 400, 162 и 100 МГц соответственно. Химические сдвиги определяли относительно сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя (D_2O), сигналы ядер фосфора определяли относительно сигнала 85% H_3PO_4 .

ИК спектры регистрировали на приборе Spectrum Two FT-IR Spectrometer (PerkinElmer, США) в интервале волновых чисел 400–4000 cm^{-1} .

Определение температуры плавления (разложения) проводили на приборе Stuart SMP10 (Stuart Scientific, Великобритания) с точностью ± 1 $^{\circ}C$.

Элементный анализ на калий проводили на пламенном фотометре PFP7 (Jenway Ltd., Великобритания) с использованием смеси пропан-бутан-воздух методом ограничивающих растворов.

Потенциометрические измерения проводили на приборе «ЭКСПЕРТ-001» (ООО «Эко-никс-Эксперт», Россия) с дискретностью 0.001 ед. pH со стеклянным и хлоридсеребряным электродами (ЭС-10603 и ЭСр-10108 соответственно от НПО «Измерительная техника», Россия), откалиброванными по стандартным буферным растворам с pH 1.65, 4.01, 6.86 и 9.18 (погрешность ± 0.005 ед. pH).

Значения констант равновесий свободных лигандов и их комплексов рассчитывали из данных pH-метрического титрования при ионной силе 0.2 моль/л (KNO_3). Начальные концентрации металла и лиганда составляли $\approx 1.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Титрование аликвоты комплекса объемом 15.00 мл проводилось стандартным раствором 0.1000 моль/л HNO_3 , содержа-

щим соответствующее количество фонового электролита для доведения значения ионной силы раствора до 0.2 моль/л. Температуру рабочих растворов 25.0 ± 0.1 °C поддерживали термостатированием. Время установления равновесия во всех изучаемых системах не превышало 20 мин. Обработку экспериментальных рН-потенциометрических данных проводили по программе CPESP (Complex formation Parameters of Equilibria in Solutions with Solid Phases) [39], позволяющей обрабатывать данные различных методов исследования (ЯМР, рН-метрии, потенциометрия, поляриметрия, спектрофотометрия и т. д.), характеристический параметр которых подчиняется правилу аддитивности, путем нахождения минимума критерия Фишера в ходе итерационной процедуры [40]. Эффективность программы продемонстрирована при изучении сложных многокомпонентных равновесных систем, включающих протолитические равновесия с учетом самоассоциации лиганда [41], образование гетероядерных (гетерометалльных) [42–44] и гетеролигандных [45] комплексов.

1.2. Синтез калиевой соли нитрилотрис(О-бутил)метиленфосфоновой кислоты. Синтез лиганда H_3L3 в виде средней калиевой соли проводили по ранее разработанной методике [34] взаимодействием диметилфосфита и трис(бутоксиметил) амина при пониженном давлении с последующим щелочным гидролизом гидроксидом калия и перекристаллизацией продукта из смеси этилацетат–метанол (1:1). Выход 31 % (10.50 г), $T_{\text{разл.}}$ 245 °C. Спектр ЯМР 1H (D_2O), δ , м. д. (J , Гц): 3.05 (д, 9H, CH_2 , $^3J_{HH}$ 11.0), 3.56 (д, 6H, PCH_2N , $^3J_{HP}$ 10.2). Спектр ЯМР $^{13}C\{^1H\}$ (D_2O), δ , м. д. (J , Гц): 51.4 (дт, PCH_2N , $^1J_{CP}$ 149.6, $^3J_{CP}$ 14.9), 51.5 (д, OCH_3 , $^2J_{CP}$ 4.2). Спектр ЯМР $^{31}P\{^1H\}$ (D_2O), δ , м. д.: 22.4 (с). ИК спектр ($\tilde{\nu}$, cm^{-1}): 1045 (P–O–C), 1213 (P=O). Найдено, %: К 25.86. $C_6H_{15}K_3NO_9P_3$. Вычислено, %: К 25.76.

2. Результаты и их обсуждение

Обозначения констант, использованные в работе, представленные в табл. 1.

Табл. 1. Исследуемые равновесия в системах $H_3L - M^{3+}$

Table 1. Investigated equilibria in the $H_3L - M^{3+}$ systems

Равновесие	$\tilde{n}$	Обозначение
$H_3L \rightleftharpoons H^+ + H_2L^-$	1	pK_{H+H_2L}
$H_2L^- \rightleftharpoons H^+ + HL^{2-}$	2	pK_{H+HL}
$HL^{2-} \rightleftharpoons H^+ + L^{3-}$	3	pK_{H+L}
$M^{3+} + HL^{2-} \rightleftharpoons [MHL]^+$	2	lgK_{M+HL}
$M^{3+} + L^{3-} \rightleftharpoons [ML]$	3	lgK_{M+L}

Константы диссоциации свободных лигандов, необходимые для расчета констант устойчивости комплексов, представлены в табл. 2. Для соединений, содержащих в своей структуре (О-алкил)метиленфосфоновую группу, исследованы комплексообразующие свойства с редкоземельными элементами при соотношении металл : лиганд, равном 1 : 1, и получены зависимости функции образования $\tilde{n}$ от рН (рис. 2).

Табл. 2. Значения констант диссоциации для H_3L1 , H_3L2 , H_3L3 ($I = 0.2$ моль/л (KNO_3), $T = 25.0$ °C, ^{a, б, в} – диссоциация карбоксильной, amino- и фосфонатной групп соответственно)

Table 2. Dissociation constant for H_3L1 , H_3L2 , and H_3L3 ($I = 0.2$ mol/L (KNO_3), $T = 25.0$ °C, ^{a, b, c} superscripts correspond to the dissociation of carboxylic, amino, and phosphonate groups, respectively)

Кислота	pK_{H+H_2L}	pK_{H+HL}	pK_{H+L}
H_3L1	1.68 ± 0.04 ^a	2.41 ± 0.02 ^a	8.48 ± 0.03 ^б
H_3L2	1.39 ± 0.06 ^в	2.15 ± 0.04 ^a	7.30 ± 0.04 ^б
H_3L3^*	1.19 ± 0.04 ^в	1.24 ± 0.05 ^в	5.68 ± 0.04 ^б

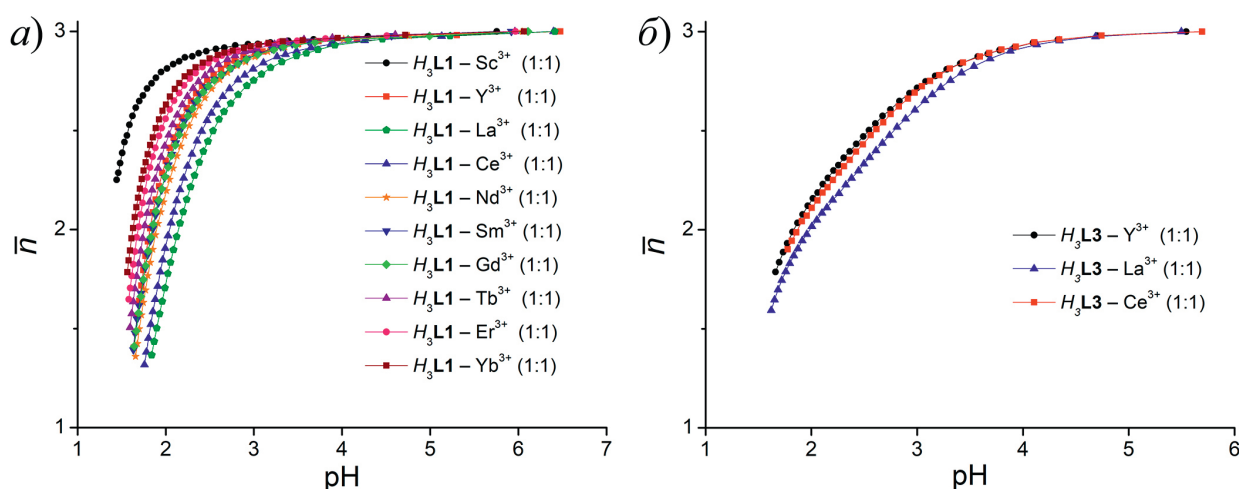


Рис. 2. Зависимости $\bar{n}$ от pH для систем H_3L1 (a) и H_3L3 (б) с M^{3+} ($I = 0.2$ М (KNO_3) / $T = 25.0$ °C)

Fig. 2. pH-dependent $\bar{n}$ for the H_3L1 (a) and H_3L3 (b) systems with M^{3+} ($I = 0.2$ М (KNO_3) / $T = 25.0$ °C)

На основе экспериментальных данных с помощью метода математического моделирования по программе CPRESSP [39] установлена стехиометрия образующихся комплексов, рассчитаны их константы устойчивости ($\lg K_{M+L}$ или $\lg K_{M+HL}$) и константы депротонирования ($\lg K_{H+ML}$) (табл. 3). Здесь и далее для простоты обозначения заряды не указаны. Отметим, что в матрицу исследуемых равновесий включались гидроксоформы типа $M(OH)_n^{3-n}$ и $[M(OH)_nL]^{-n}$, однако их накопление оказалось статистически незначимым. В случае лиганда H_3L2 во всех системах наблюдалось образование малорастворимых комплексных соединений во всем изученном диапазоне pH, поэтому точное определение констант устойчивости комплексов оказалось затрудненным.

В отличие от остальных исследуемых ди- и трифосфорилированных аналогов $H_3НТА$ лиганд H_3L1 образует только растворимые комплексные формы в области pH 1.5–7, поэтому системы $M^{3+} - H_3L1$ изучены более полно. В этом случае происходит образование высокопрочных комплексных соединений с депротонированной формой лиганда, которые переходят в протонированную форму $[MHL]^+$ только в сильноокислой области pH. В качестве примера описанных тенденций представлено мольно-долевое распределение комплексных форм для системы $Nd^{3+} - H_3L1$ (рис. 3).

Табл. 3. Состав, константы равновесия ($\lg K_p$), устойчивости ($\lg K_{M+L}$ или $\lg K_{M+HL}$) и депротонирования ($\lg K_{H+ML}$) комплексов катионов редкоземельных элементов с H_3L1 и H_3L3 и аналогичных комплексов с H_3NTA и H_6NTP (в формулах комплексных частиц заряды опущены)

Table 3. Composition and equilibrium ($\lg K_p$), stability ($\lg K_{M+L}$ or $\lg K_{M+HL}$), and deprotonation ($\lg K_{H+ML}$) constants for the rare-earth cation complexes with H_3L1 and H_3L3 , as well as analogous complexes with H_3NTA and H_6NTP (charges in the complexes are not shown)

M ³⁺	Лиганд	Комплекс	lgK _p	lgK _{H+ML} (δ ≤ 0.05)	lgK _{M+L} /lgK _{M+HL} (δ ≤ 0.05)	lgK _{M+L} /lgK _{M+HL} для H ₃ НТА [46, 47]	lgK _{M+L} /lgK _{M+HL} для H ₆ НТФ [16, 46]
Sc ³⁺	H ₃ L1	[MHL]	1.39 ± 0.09	1.13	5.48		
		[ML]	0.27 ± 0.07	—	12.83	12.7	
Y ³⁺	H ₃ L3	[MHL]	0.37 ± 0.02	2.30	2.80		
		[ML]	−1.94 ± 0.02	—	6.18		
	H ₃ L1	[MHL]	1.27 ± 0.03	1.84	5.35		
		[ML]	−0.59 ± 0.02	—	11.99	11.42	
La ³⁺	H ₃ L3	[MHL]	0.97 ± 0.06	2.65	3.40		
		[ML]	−1.68 ± 0.05	—	6.43	10.40	
	H ₃ L1	[MHL]	−1.11 ± 0.07	2.08	2.97	4.14	6.68
		[ML]	−3.19 ± 0.04	—	9.37	10.4	12.84
Ce ³⁺	H ₃ L3	[MHL]	0.71 ± 0.07	2.44	3.15		
		[ML]	−1.72 ± 0.05	—	6.39		
Ce ³⁺	H ₃ L1	[MHL]	−0.37 ± 0.06	2.10	3.70	4.15	5.77
		[ML]	−2.19 ± 0.06	—	10.08	10.62	12.80
Nd ³⁺		[MHL]	0.31 ± 0.07	1.99	4.40	4,02	5.24
		[ML]	−1.68 ± 0.05	—	10.89	11.17	13.18
Sm ³⁺		[MHL]	1.23 ± 0.05	1.97	5.32	4.12	5.20
		[ML]	−0.74 ± 0.04	—	11.83	11.35	13.83
Gd ³⁺		[MHL]	1.35 ± 0.08	1.98	5.44	4.12	5.48
		[ML]	−0.63 ± 0.07	—	11.94	11.41	13.87
Tb ³⁺		[MHL]	1.43 ± 0.07	1.70	5.40	4.51	5.70
		[ML]	−0.12 ± 0.02	—	12.10	11.60	13.20
Er ³⁺		[MHL]	1.27 ± 0.07	1.60	5.36	4.80	6.12
		[ML]	−0.33 ± 0.02	—	12.24	12.02	12.48
Yb ³⁺		[MHL]	1.42 ± 0.08	1.55	5.51	5.30	6.19
		[ML]	−0.12 ± 0.02	—	12.44	12.20	12.62

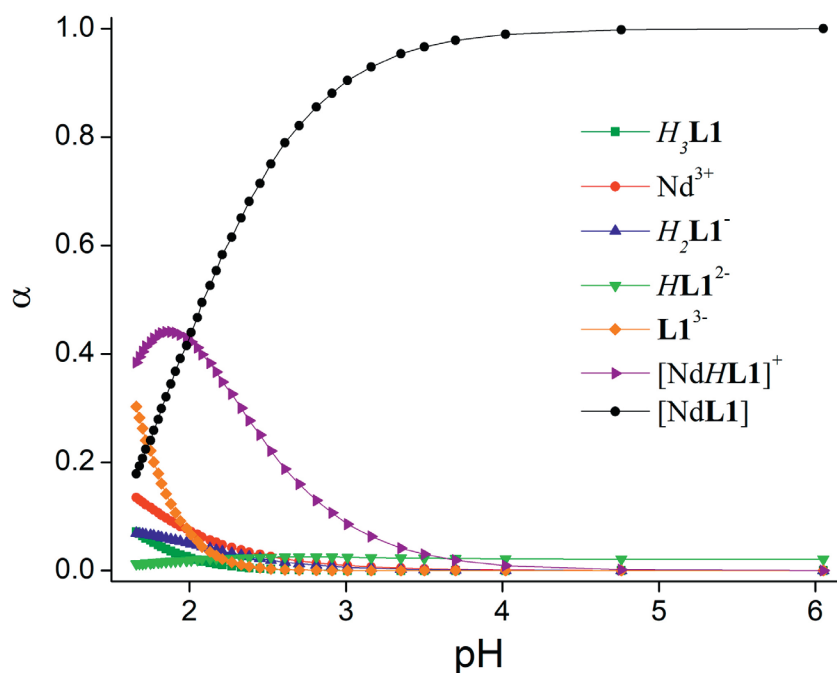


Рис. 3. Распределение комплексных форм для системы $\text{Nd}^{3+} - \text{H}_3\text{L1}$ ($c(\text{H}_3\text{L1}) = 0.01468 \text{ M}$, $c(\text{Nd}^{3+}) = 0.01437 \text{ M}$, $I = 0.2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$, $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$)

Fig. 3. Distribution of complex forms for the $\text{Nd}^{3+} - \text{H}_3\text{L1}$ system ($c(\text{H}_3\text{L1}) = 0.01468 \text{ M}$, $c(\text{Nd}^{3+}) = 0.01437 \text{ M}$, $I = 0.2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$, $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$)

Для $\text{H}_3\text{L1}$ характерны те же изменения констант устойчивости в ряду лантаноидов, что и для H_3HTA : понижение прочности комплексов при переходе от скандия(III) к лантану(III) и возрастание от лантана(III) к иттербию(III). Однако в отличие от H_3HTA , для которой изменение носит относительно монотонный характер в ряду лантаноидов, для $\text{H}_3\text{L1}$ можно выделить два участка на графике зависимости $\lg K_{\text{M+L}}$ от природы M^{3+} . Для «легких» лантаноидов от лантана до самария наблюдается резкий рост констант устойчивости. При этом различие в константах устойчивости депротонированных комплексов лантана(III) и самария(III) составляет ~ 2.5 логарифмических единицы, в то время как для аналогичных комплексов H_3HTA она меньше одного порядка и имеет значение 0.9 логарифмических единиц. Последующие увеличение атомного номера и переход от самария(III) к «тяжелым» лантаноидам приводит к меньшим изменениям констант устойчивости комплексов $[\text{ML1}]$ и $\Delta \lg K_{\text{M+L}}$ для комплексов иттербия(III) и самария(III) составляет 0.8 логарифмических единиц. При этом комплексы $[\text{ML1}]$ оказываются в среднем на 0.4 логарифмических единицы прочнее аналогичных комплексов H_3HTA .

Уменьшение pH приводит к образованию комплексов с протонированной формой лиганда. Как и в случае трифосфорилированного аналога $\text{H}_3\text{L3}$, доля таких частиц невелика, а область pH значимого накопления ($> 5\%$) составляет 2.0–2.5 единицы pH и ниже, и они сосуществуют в растворе с комплексами $[\text{ML}]$. Анализ констант протонирования $\lg K_{\text{H+ML}}$ для частиц $[\text{MHL1}]^+$, значения которых существенно меньше $pK_{\text{H+L}}$, показывает, что присоединение протона происходит по карбоксильной группе. Это сопровождается разрывом одного из хелатных циклов и приводит к резкому снижению констант устойчивости $[\text{MHL1}]^+$ по сравнению с $[\text{ML1}]$ в среднем на 6.5 порядков. Однако общие тенденции, характерные для депротонированных комплексов, сохраняются и у монопротонированных частиц: снижение устойчивости комплексов от скандия(III) к лантану(III), ее резкое повышение в ряду «лег-

ких» лантаноидов от лантана(III) к самарию(III) и практически неизменная устойчивость комплексов $[MHL1]^+$ от самария(III) к иттербию(III).

Для сравнения комплексообразующих свойств лиганда H_3L1 и H_3HTA использован принцип линейности свободных энергий в классическом варианте, предложенном еще Гамметом и Тафтом, и нашедший затем применение в анализе устойчивости комплексов металлов (в том числе для ионов лантаноидов) [48]. При этом в качестве стандартной реакционной серии закономерно использовать данные по константам устойчивости координационных соединений ионов металлов с нитрилотриуксусной кислотой, которые надежно определены и интерпретированы. Как показано ранее в работе [34], в ряду двухзарядных катионов щелочноземельных и переходных металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , H^+) наблюдается четкая линейная корреляция между логарифмами констант устойчивости комплексов H_3L1 и H_3HTA :

$$\lg K_{M+L}[ML1] = 0.87 \lg K_{M+L}[MHTA] - 0.11;$$

$$S = 0.05; r = 0.996; n = 11.$$

Использование этого подхода к результатам, полученным в настоящей работе, показало, что на графике корреляционной зависимости проявляются два четко выраженных линейных участка (рис. 4).

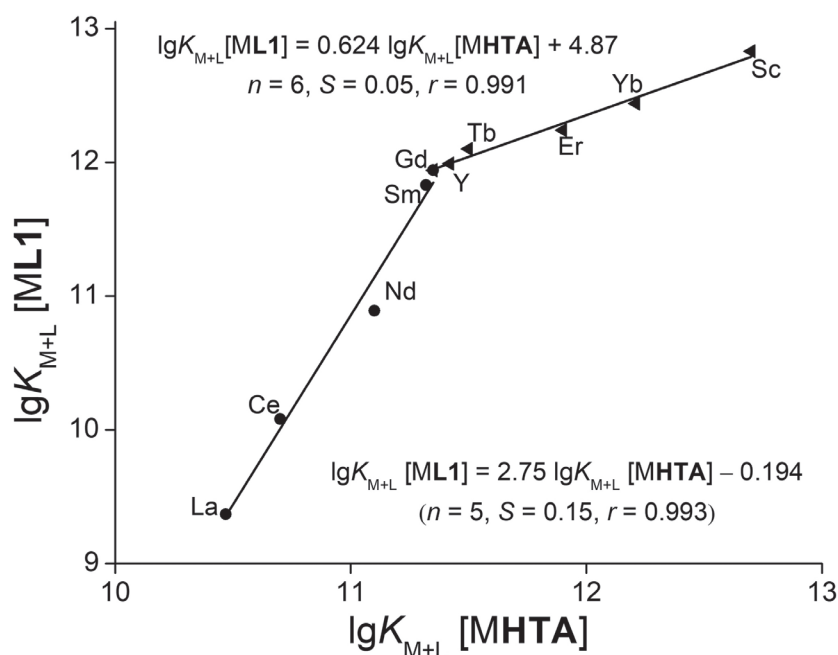


Рис. 4. Корреляционная зависимость между логарифмами констант устойчивости депротонированных форм координационных соединений катионов редкоземельных элементов с H_3L1 и H_3HTA

Fig. 4. Correlation between the stability constant logarithms for the deprotonated forms of coordination compounds of rare-earth cations with H_3L1 and H_3HTA

Начальный, более крутой участок формируется точками, соответствующими «легким» лантаноидам с большими значениями ионных радиусов, а второй, более пологий – скандием(III), иттрием(III) и «тяжелыми» лантаноидами, имеющими меньший ионный радиус. При этом реакционная константа для первого участка существенно выше единицы (2.75), то есть в ряду «легких» редкоземельных элементов $La^{3+} - Ce^{3+} - Nd^{3+} - Sm^{3+}$ замена карбоксильной группы в молекуле H_3HTA на (O-алкил)фосфоновый фрагмент приводит к росту

различий в константах устойчивости, в то время как для ионов с меньшим ионным радиусом, стоящих после гадолиния(III) ($r_{\text{иона}} 1.19 \text{ \AA}$ (координационное число 8) и ($r_{\text{иона}} 1.25 \text{ \AA}$ (координационное число 9) [49]) проявляется обратная тенденция. Подобное явление хорошо известно в химии координационных соединений под термином «гадолиниевый излом» [50–53]. Несмотря на большую фундаментальную работу физиков-теоретиков, абсолютная ясность в понимании этого явления, по сути, отсутствует. Однако химики считают, что изменения устойчивости комплексов одного состава в ряду лантаноидов определяются четырьмя факторами: изменением ионного радиуса, стерическими, ион-дипольными и диполь-дипольными эффектами в межлигандном взаимодействии в первой координационной сфере. То есть причина явления, отраженного на рис. 4, связана с проявлением стерических затруднений образования оптимального по геометрии координационного полиэдра, образованного донорными атомами, при введении в молекулу лиганда тетраэдрического объемного фосфонатного фрагмента вместо плоской и компактной карбоксильной группы, и, как следствие, при закономерном уменьшении ионного радиуса лантаноида(III) (усугубляющем влияние «объемного» эффекта) наблюдается уменьшение координационного числа с 9 до 8.

Интересно отметить, что изменение констант устойчивости в ряду координационных соединений лантаноидов(III) (за исключением Sc^{3+} и Y^{3+} , для которых отсутствуют данные о константах устойчивости комплексов с $H_6\text{НТФ}$) с исследуемым лигандом удовлетворительно описывается двухпараметрической корреляцией, в которой вторым независимым параметром выступают значения $\lg K_{\text{M+L}}$ комплексов редкоземельных элементов с нитрилотриметиленфосфоновой кислотой:

$$\lg K_{\text{M+L}}[\text{ML1}] = 1.73 \lg K_{\text{M+L}}[\text{МНТА}] + 0.54 \lg K_{\text{M+L}}[\text{МНТФ}] - 0.15;$$

$$S = 0.23; r = 0.985; n = 8.$$

Это указывает на возможность прогностического использования значений $\lg K_{\text{M+L}}[\text{МНТФ}]$ в качестве параметра, учитывающего «термодинамические возмущения», возникающие при замене карбоксильной группы в лиганде на фосфонатную ацидо-группу.

В случае лиганда $H_3\text{L2}$ во всех системах наблюдалось образование малорастворимых комплексных соединений во всем изученном диапазоне pH. В системах $\text{M}^{3+} - H_3\text{L3}$ было отмечено образование нерастворимых форм при $\text{pH} < 4.5$ для всех элементов, кроме иттрия(III), лантана(III) и церия(III).

В системах с $H_3\text{L3}$ и M^{3+} образуются самые прочные комплексы состава $[\text{ML}]$ для данного лиганда из всего ряда изученных катионов металлов, которые по устойчивости соизмеримы с аналогичными комплексами меди(II) [34]. При этом для иттрия(III), лантана(III) и церия(III) не наблюдается селективность связывания с лигандом $H_3\text{L3}$: значения $\lg K_{\text{M+L}}$ для $[\text{ML3}]$ имеют один порядок и мало отличаются друг от друга. Аналогичный факт был отмечен в работе [54], в которой рассмотрены комплексообразующие свойства редкоземельных элементов с $H_6\text{НТФ}$: различие в константах устойчивости La^{3+} и Ce^{3+} составляет всего 0.04 логарифмических единицы (то есть не превышает значение ошибки определения). В качестве примера на рис. 5. приведено мольно-долевое распределение комплексных форм для системы $\text{La}^{3+} - H_3\text{L3}$ (1:1).

При $\text{pH} < 3$ происходит значимое накопление ($> 10\%$) комплексов $[\text{MHL3}]^+$, константы устойчивости которых в среднем на три порядка ниже, чем для $[\text{ML3}]$. Значение $\lg K_{\text{H+ML}}$ для монопротонированных частиц меньше, чем $\text{p}K_{\text{H+L}}$, соответствующее протонированию атома азота лиганда $H_3\text{L3}$, что свидетельствует о присоединении протона к одной из фосфоновых

групп. Дальнейшее уменьшение pH приводит к полному разрушению комплексов в изученных системах и переходу комплексообразователя в акваион.

В целом, тенденции изменения констант устойчивости комплексов в ряду исследованных лигандов приведены на рис. 6.

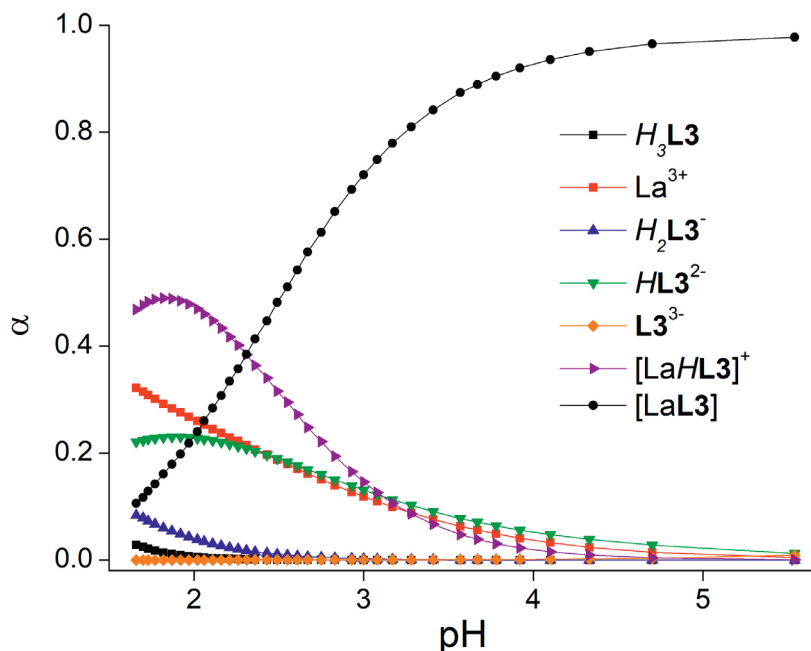


Рис. 5. Распределение комплексных форм для системы $\text{La}^{3+} - \text{H}_3\text{L3}$ ($c(\text{H}_3\text{L3}) = 0.01558 \text{ M}$, $c(\text{La}^{3+}) = 0.01528 \text{ M}$, $I = 0.2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$, $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$)

Fig. 5. Distribution of complex forms for the $\text{La}^{3+} - \text{H}_3\text{L3}$ system ($c(\text{H}_3\text{L3}) = 0.01558 \text{ M}$, $c(\text{La}^{3+}) = 0.01528 \text{ M}$, $I = 0.2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$, $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$)

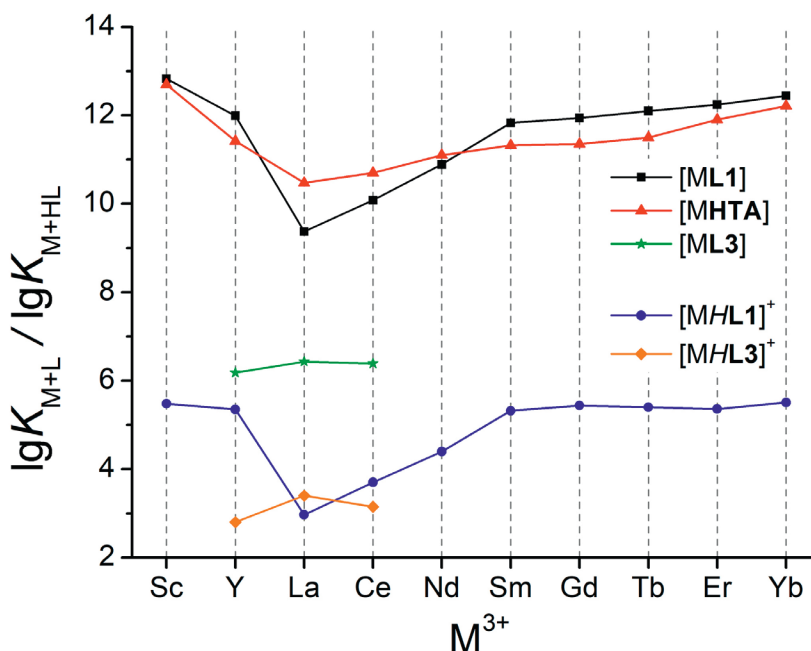


Рис. 6. Изменение констант устойчивости ($\lg K_{\text{M+L}}$ или $\lg K_{\text{M+HL}}$) комплексов в ряду исследованных ионов редкоземельных элементов

Fig. 6. Variations in the stability constants ($\lg K_{\text{M+L}}$ or $\lg K_{\text{M+HL}}$) for the complexes in the series of the studied rare-earth ions

Заключение

На основе детального анализа экспериментальных данных можно сделать общие выводы о комплексообразовании ионов редкоземельных элементов с H_3L1 , H_3L2 и H_3L3 . Изменение устойчивости комплексов при сравнении как с H_3NTA , так и между собой по ряду комплексообразователей Sc^{3+} , Y^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} определяется ионным радиусом и вариативностью координационного числа со стороны комплексообразователя, стерическими (объем координирующейся группы при неизменном координационном числе) и электростатическими (ион-дипольными и диполь-дипольными) взаимодействиями внутри координационной сферы по мере замещения карбоксильной группы на $RO-P(=O)-OH$, где $R = -Bu$ ($-Me$), со стороны лигандов. Итоговый энергетический баланс (ΔG) определяет устойчивость комплексов. Следует отметить, что наличие алкильной группы у донорной группы лигандов дает аргументированную возможность прогноза селективной экстракции катионов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. *Schwarzenbach G., Biedermann W.* Komplexe VII. Titration von Metallen mit Nitrilotriessigsäure H_3X . Endpunktsindikation durch p_H -Effekte // *Helv. Chim. Acta*. 1948. Bd. 31, H. 2. S. 331–340. <https://doi.org/10.1002/hlca.19480310204>.
2. *Корнев В.И., Булдакова Н.С.* Протолитические и координационные равновесия в водных растворах комплексонов никеля(II) // *Журн. неорг. химии*. 2015. Т. 60, № 3. С. 453–457. <https://doi.org/10.7868/S0044457X15030101>.
3. *Пырзу Д.Ф., Гридчин С.Н.* Образование смешанно-лигандных комплексов металлов(II) с моноаминными комплексонами и аминокислотами в растворе // *Журн. физ. химии*. 2018. Т. 92, № 5. С. 741–750. <https://doi.org/10.7868/S0044453718050126>.
4. *Пырзу Д.Ф., Груздев М.С., Кумеев Р.С.* Образование смешанных комплексов ртути(II) с моно- и диаминными комплексонами в водном растворе // *Журн. физ. химии*. 2019. Т. 93, № 3. С. 325–331. <https://doi.org/10.1134/S0044453719030154>.
5. *Пырзу Д.Ф., Алексеева Е.С., Симагина Т.А., Груздев М.С., Кумеев Р.С., Гридчин С.Н.* Смешанолигандное комплексообразование комплексонов цинка и кобальта(II) с аминокислотами в водном растворе // *Журн. неорг. химии*. 2018. Т. 63, № 2. С. 170–179. <https://doi.org/10.7868/S0044457X18020071>.
6. *De Stefano C., Foti C., Giuffrè O., Milea D.* Complexation of Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , Sn^{2+} and $(CH_3)_2Sn^{2+}$ with phosphonic NTA derivatives // *New J. Chem.* 2016. V. 40, No 2. P. 1443–1453. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02531A>.
7. *Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н., Волков А.В., Крутова Е.Д.* Термодинамика растворения нитрилотриметилфосфоновой кислоты в воде // *Журн. физ. химии*. 2018. Т. 92, № 12. С. 1944–1946. <https://doi.org/10.1134/S0036024418120282>.
8. *Pyreu D., Gridchin S.* Thermodynamics of mixed ligand complex formation of metal(II) iminodiacetates and nitrilotriacetates with dipyridyl and phenanthroline in solution // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2020. V. 139, No 2. P. 1435–1441. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08453-9>.
9. *Cordaro M., Foti C., Giacobello F., Giuffrè O., Sammartano S.* Phosphonic derivatives of nitrilotriacetic acid as sequestering agents for Ca^{2+} in aqueous solution: A speciation study for application in natural waters // *ACS Earth Space Chem.* 2019. V. 3, No 9. P. 1942–1954. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00183>.

10. Алабдулла Г.Ф., Корнев В.И. Разнолигандные гетерополиядерные этилендиаминтетраацетаты кобальта(II) и никеля(II) в водных растворах нитрилотриуксусной кислоты // Химическая физика и мезоскопия. 2016. Т. 18, № 2. С. 272–280.
11. Шилов В.П., Федосеев А.М., Гоголев А.В. Реакция Np(VI) с нитрилотриуксусной кислотой в хлорнокислых растворах // Радиохимия. 2017. Т. 59, Вып. 3. С. 201–203.
12. Shankar V., Singh D., Verma S., Krishna V. Mixed metal mixed ligand complexation equilibria of transition metal ions involving nitrilotriacetic acid (NTA) and L-2-amino-3-methyl butanoic acid (valine) // Natl. Acad. Sci. Lett. 2016. V. 39, No 3. P. 185–189. <https://doi.org/10.1007/s40009-016-0432-6>.
13. Козловский Е.В., Александрова С.А., Чеснокова Л.Н., Пырзу Д.Ф. Применение корреляционного анализа для описания устойчивости комплексных соединений ионов лантаноидов с H[3]Nta и H[6]Ntph в водном растворе // Журн. общей хим. 2010. Т. 80, № 7. С. 1066–1069.
14. Воскресенская О.О., Скорик Н.А., Степанова Н.В. Термодинамическая и кинетическая устойчивость комплексов церия(IV) с рядом аминополиуксусных кислот // Журн. прикл. химии. 2016. Т. 89, № 11. С. 1375–1385.
15. Козловский Е.В., Пырзу Д.Ф., Хоченкова Т.Б. Термохимическое исследование реакций образования смешанолигандных комплексов в системе M^{2+} -Nta³⁻-En (M = Ni, Cu, Zn, Cd) в водном растворе // Журн. неорг. химии. 2008. Т. 53, № 7. С. 1244–1247.
16. Козловский Е.В., Александрова С.А., Чеснокова Л.Н. Потенциометрическое исследование комплексообразования Ln(III) с нитрилотриметиленфосфоновой кислотой в водном растворе // Журн. неорг. химии. 2002. Т. 47, № 9. С. 1566–1568.
17. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Закирова Р.М., Петров В.Г., Шумилова М.А. Кристаллическая структура тетра- и пентанатриевых солей нитрилотрисметиленфосфоновой кислоты // Журн. неорг. химии. 2018. Т. 63, № 1. С. 46–53. <https://doi.org/10.7868/S0044457X18010063>.
18. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Ломова Н.В., Закирова Р.М., Петров В.Г., Жиров Д.К., Шумилова М.А. Координационные соединения иттрия с нитрило-трис-метиленфосфоновой кислотой // Коорд. химия. 2019. Т. 45, № 5. С. 311–320. <https://doi.org/10.1134/S0132344X19030095>.
19. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Закирова Р.М., Федотова И.В. Синтез, структура и свойства комплексов нитрило-трис-метиленфосфоновой кислоты с никелем $[Ni(H_2O)_3N(CH_2PO_3H)_3]$ и $Na_4[Ni(H_2O)_3N(CH_2PO_3)_3] \cdot 11H_2O$ // Кристаллография. 2016. Т. 61, № 2. С. 238–246. <https://doi.org/10.7868/S0023476116020260>.
20. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Закирова Р.М., Петров В.Г., Шумилова М.А., Александров В.А. Синтез и структура тригидрата бис-нитрило-трис-метиленфосфонатодекааквамоногогексанатрий-лантаната бис-гексаакванатрия $[Na(H_2O)_6]_2[LaNa_6H(H_2O)_{10}\{N(CH_2PO_3)_3\}_2] \cdot 3H_2O$ // Коорд. химия. 2017. Т. 43, № 6. С. 369–375. <https://doi.org/10.7868/S0132344X1706010X>.
21. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Закирова Р.М. Синтез и структура цезиевых комплексов нитрило-трис-метиленфосфоновой кислоты $[Cs-\mu^6-NH(CH_2PO_3)_3H_4]$ и $[Cs_2-\mu^{10}-NH(CH_2PO_3)_3] \cdot H_2O$ // Кристаллография. 2017. Т. 62, № 4. С. 587–594. <https://doi.org/10.7868/S0023476117040245>.
22. Сомов Н.В., Чаусов Ф.Ф., Закирова Р.М., Ломова Н.В., Гильмутдинов Ф.З., Шабанова И.Н., Петров В.Г., Шумилова М.А., Жиров Д.К. Дигидронитрилотрисметиленфосфонатодиртуть(I) ртуть(II) $[(Hg^I_2)Hg^{II}N(CH_2PO_3)_3H_2]$: синтез и структура. // Коорд. химия. 2018. Т. 44, № 1. С. 20–27. <https://doi.org/10.7868/S0132344X18010036>.
23. Чаусов Ф.Ф., Сомов Н.В., Ломова Н.В., Шабанова И.Н., Закирова Р.М., Петров В.Г., Шумилова М.А. Электронная структура и природа химической связи переходного металла с неинноцентным лигандом в комплексе $Na_3[Mo(NO)(NH_2O)\{N(CH_2PO_3)_3H\}] \cdot 8H_2O$ // Изв. РАН, сер. физ. 2018. Т. 82, № 7. С. 983–985. <https://doi.org/10.1134/S0367676518070141>.
24. Wang J., Zhang X.D., Zhang Y., Jia W.G., Liu Zh.R. Coordinate structures of Pr^{III}, Gd^{III}, Tm^{III}, and Yb^{III} complexes with nitrilotriacetic acids // J. Struct. Chem. 2004. V. 45, No 1. P. 114–123. <https://doi.org/10.1023/B:JORY.0000041509.59005.d6>.

25. Ощепков М.С., Рудакова Г.Я., Ткаченко С.В., Ларченко В.Е., Попов К.И., Тушева М.А. Современное состояние теории действия ингибиторов солеотложений (обзор) // Теплоэнергетика. 2021. № 5. С. 43–55. <https://doi.org/10.1134/S0040363621040056>.
26. Попов К.И., Ковалева Н.Е., Рудакова Г.Я., Комбарова С.П., Ларченко В.Е. Современное состояние разработок биоразлагаемых ингибиторов солеотложений для различных систем водопользования (обзор) // Теплоэнергетика. 2016. № 2. С. 46–53. <https://doi.org/10.1134/S0040363616010094>.
27. Luchini C., Leguay S., Aupiais J., Cannes C., Le Naour C. Complexation of protactinium(V) with nitrilotriacetic acid: A study at the tracer scale // New J. Chem. 2018. V. 42, No 10. P. 7789–7795. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04683A>.
28. Wang S.-Y., Dong X., Chen J.-F. Zhou Z.-H. Iron molybdenum nitrilotriacetate and iminodiacetate-spectroscopy, structural characterization and CO₂ adsorption // New J. Chem. 2018. V. 42, No 23. P. 18526–18532. <https://doi.org/10.1039/C8NJ03475C>.
29. Ерохина Е.В., Галашина В.Н., Дымникова Н.С., Морыганов А.П. Синтез бикомпонентных наночастиц меди и серебра в присутствии нитрилотриметиленфосфоновой кислоты // Российский хим. Журн. 2018. Т. 60, № 5–6. С. 9–16.
30. Kropacheva T.N., Antonova A.S., Kornev V.I. Organophosphonate-functionalized nanosized magnetic iron oxides as sorbents for heavy metal cations // Mendeleev Commun. 2019. V. 29, No 3. P. 358–360. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.05.040>.
31. Шевченко Г.П., Журавков В.А., Третьяк Е.В., Новиков А.Г., Королик О.В. Синтез и исследование гидрозолей серебра в присутствии комплексонов ряда карбоксиалкилированных аминов // Журн. неорг. химии. 2018. Т. 63, № 1. С. 19–25. <https://doi.org/10.7868/S0044457X18010026>.
32. Ekebas E., Cetin A., Önal A.M., Esenturk E.N. Magnesium substituted cobalt spinel nanostructures for electrocatalytic water oxidation // J. Appl. Electrochem. 2019. V. 49, No 3. P. 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10800-018-01285-9>.
33. Mendes R.F., Antunes M.M., Silva P., Barbosa P., Figueiredo F., Linden A., Rocha J., Valente A.A., Almeida Paz F.A. A lamellar coordination polymer with remarkable catalytic activity // Chem. – Eur. J. 2016. V. 22, No 37. P. 13136–13146. <https://doi.org/10.1002/chem.201602157>.
34. Гарифзянов А.Р., Шурыгин И.Д., Черкасов Р.А. Комплексообразующие свойства фосфорорганических аналогов нитрилтриуксусной кислоты – аминоксис(О-алкил)метилфосфоновых кислот // Журн. общ. химии. 2018. Т. 88, № 9. С. 1517–1523. <https://doi.org/10.1134/S0044460X18090160>.
35. Гарифзянов А.Р., Шурыгин И.Д., Мирзаянов И.И., Девятков Ф.В. Синтез, кислотно-основные и комплексообразующие свойства этилендиаминтетра(О-алкил)метилфосфоновых фосфорорганических аналогов этилендиаминтетрауксусной кислоты // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2022. Т. 164, кн. 1. С. 5–21. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.1.5-21>.
36. Шурыгин И.Д., Гарифзянов А.Р., Черкасов Р.А., Ившин К.А., Катаева О.Н. Синтез, кислотно-основные и комплексообразующие свойства N,N,N',N'-тетракис(О-бутил-гидроксифосфорилметил)-1,2-диаминоэтана // Журн. общ. химии. 2017. Т. 87, № 9. С. 1534–1537.
37. Мирзаянов И.И., Гарифзянов А.Р., Девятков Ф.В. Кислотно-основные и комплексообразующие свойства N,N-бис(карбоксиметил)-О,О'-диизопропиламинометилфосфоната // Журн. общ. химии. 2021. Т. 91, № 10. С. 1609–1616. <https://doi.org/10.31857/S0044460X21100188>.
38. Шурыгин И.Д., Гарифзянов А.Р., Черкасов Р.А. Синтез, кислотно-основные и комплексообразующие свойства бис(О-бутилгидроксифосфорилметил)глицина // Журн. общ. химии. 2017. Т. 87, № 8. С. 1396–1397. <https://doi.org/10.1134/S1070363217080394>.
39. Сальников Ю.И., Глебов А.Н., Девятков Ф.В. Полиядерные комплексы в растворах. Казань: Издательство Казанского университета, 1989. 288 с.
40. Богатырев О.В., Ямалудинова А.Ф., Девятков Ф.В. Комплексообразование 1-гидрокси-1,1-бисфосфоновой кислоты (HEDP) с марганцем(II) в водном растворе // Учен. Зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2016. Т. 158, кн. 1. С. 44–54.

41. Мусин Д.Р., Рубанов А.В., Девятков Ф.В. Кисотно-основные свойства 1-гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты (ОЭДФК) в водных растворах // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т. 153, кн. 3. С. 40–47.
42. Корнев В.И., Алабдулла Г.Ф., Кропачева Т.Н., Батуева Е.В. Гетерополиядерные этилендиаминетраацетаты кобальта(II) и никеля(II) в водных растворах аминокетановой кислоты // Журн. неорг. химии. 2016. Т. 61, № 5. С. 692–697. <https://doi.org/10.7868/S0044457X1605010X>.
43. Девятков Ф.В., Богатырев О.В., Игнатъева К.А. Образование гомо- и гетероядерных комплексов 1-гидроксиэтилиден-1,1-дифосфоновой кислоты с Mn^{II} и Fe^{III} в водных растворах // Изв. АН, сер. хим. 2018. Т. 67, № 8. С. 1369–1375.
44. Девятков Ф.В., Мусин Д.Р. Изучение гомо- и гетероядерного комплексообразования в системах 1-гидроксиэтилиден-1,1-дифосфоновая кислота (HEDP)-эрбий(III) и (HEDP)-эрбий(III)-кальций(II) в водном растворе // Изв. АН, сер. хим. 2015. Т. 64, № 8. С. 1866–1870.
45. Корнев В.И., Семенова М.Г. Комплексные соединения никеля(II) с 2-гидроксиэтилиминодиуксусной кислотой в водных растворах дикарбоновых кислот // Журн. неорг. химии. 2012. Т. 57, № 4. С. 681–686.
46. Чеснокова Л.Н. Потенциометрическое изучение процессов комплексообразования ионов лантаноидов (H1) с нитрилотриуксусной и нитрилотриметиленфосфоновой кислотами в водном растворе: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иваново, 2003. 16 с.
47. Anderegg G. Critical survey of stability constants of NTA complexes // Pure Appl. Chem. 1982. V. 54, No 12. P. 2693–2758. <https://doi.org/10.1351/pac198254122693>.
48. Lee J.H., Byrne R.H. Examination of comparative rare earth element complexation behavior using linear free-energy relationships // Geochim. Cosmochim. Acta. 1992. V. 56, No 3. P. 1127–1137. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90050-S](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90050-S).
49. Heheey J. Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity. 3rd ed. New York, NY: Harper & Row, 1983. xvi, 936 p.
50. Спицын В.И., Мартыненко Л.И. Координационная химия редкоземельных элементов. М.: Изд-во Московского университета, 1979. 254 с.
51. Sinha S.P. A systematic correlation of the properties of the f-transition metal ions // Rare Earths. Structure and Bonding. V. 30. Berlin, Heidelberg: Springer, 1976. P. 1–64. https://doi.org/10.1007/3-540-07887-8_1.
52. Ионова Г.В., Вохмин В.Г., Спицын В.И. Закономерности изменения свойств лантаноидов и актиноидов. М.: Наука, 1990. 240 с.
53. Мартыненко Л.И. Особенности комплексообразования редкоземельных элементов(III) // Успехи химии. 1991. Т. 60, № 9. С. 1969–1999. <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n09ABEH001125>.
54. Sawada K., Kuribayashi M., Suzuki T., Miyamoto H. Protonation equilibria of nitrilotris(methylene-phosphonato)- and ethylenediamine-tetrakis(methylenephosphonato)-complexes of scandium, yttrium, and lanthanoids // J. Solution Chem. 1991. V. 20, No 8. P. 829–839. <https://doi.org/10.1007/bf00675114>.

References

1. Schwarzenbach G., Biedermann W. Komplexe VII. Titration von Metallen mit Nitrilotriessigsäure H₃X. Endpunktsindikation durch p_H-Effekte. *Helv. Chim. Acta*, 1948, Bd. 31, H. 2, S. 331–340. <https://doi.org/10.1002/hlca.19480310204>. (In German)
2. Kornev V.I., Buldakova N.S. Protolytic and coordination equilibria in aqueous solutions of nickel(II) complexones. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 398–402. <https://doi.org/10.1134/S0036023615030109>.
3. Pyreu D.F., Gridchin S.N. Formation of mixed-ligand complexes of metals(II) with monoamine complexones and amino acids in solution. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2018, vol. 92, no. 5, pp. 909–917. <https://doi.org/10.1134/S0036024418050254>.

4. Pyreu D.F., Gruzdev M.S., Kumeev R.S. Formation of mixed-ligand complexes of mercury(II) with mono- and diamine complexone ligands in aqueous solution. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2019, vol. 93, no. 3, pp. 401–406. <https://doi.org/10.1134/S0036024419030154>.
5. Pyreu D.F., Alekseeva E.S., Simagina T.A., Gruzdev M.S., Kumeev R.S., Gridchin S.N. Mixed-ligand complexation of zinc and cobalt(II) complexonates with amino acids in an aqueous solution. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 180–190. <https://doi.org/10.1134/S0036023618020183>.
6. De Stefano C., Foti C., Giuffrè O., Milea D. Complexation of Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , Sn^{2+} and $(\text{CH}_3)_2\text{Sn}^{2+}$ with phosphonic NTA derivatives. *New J. Chem.*, 2016, vol. 40, no. 2, pp. 1443–1453. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02531A>.
7. Lytkin A.I., Chernikov V.V., Krutova O.N., Volkov A.V., Krutova E.D. Thermodynamics of the dissolution of nitrilotrimethylphosphonic acid in water. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2018, vol. 92, no. 12, pp. 2485–2487. <https://doi.org/10.1134/S0036024418120282>.
8. Pyreu D., Gridchin S. Thermodynamics of mixed ligand complex formation of metal(II) iminodiacetates and nitrilotriacetates with dipyritydyl and phenanthroline in solution. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2020, vol. 139, no. 2, pp. 1435–1441. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08453-9>.
9. Cordaro M., Foti C., Giacobello F., Giuffrè O., Sammartano S. Phosphonic derivatives of nitrilotriacetic acid as sequestering agents for Ca^{2+} in aqueous solution: A speciation study for application in natural waters. *ACS Earth Space Chem.*, 2019, vol. 3, no. 9, pp. 1942–1954. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00183>.
10. Alabdulla G.F., Kornev V.I. Heteropolynuclear mixed-ligand ethylenediaminetetraacetates of cobalt(II) and nickel(II) in aqueous solutions of nitrilotriacetic acid. *Khim. Fiz. Mezosk.*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 272–280. (In Russian)
11. Shilov V.P., Fedoseev A.M., Gogolev A.V. Reaction of Np(VI) with nitrilotriacetic acid in perchloric acid solutions. *Radiochemistry*, 2017, vol. 59, no. 3, pp. 229–232. <https://doi.org/10.1134/S1066362217030031>.
12. Shankar V., Singh D., Verma S., Krishna V. Mixed metal mixed ligand complexation equilibria of transition metal ions involving nitrilotriacetic acid (NTA) and α -2-amino-3-methyl butanoic acid (valine). *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 2016, vol. 39, no. 3, pp. 185–189. <https://doi.org/10.1007/s40009-016-0432-6>.
13. Kozlovskii E.V., Aleksandrova S.A., Chesnokova L.N., Pyreu D.F. Application of correlation analysis to description of stability of complex compounds of lanthanoid ions with H_3Nta and H_6Ntph in aqueous solution. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2010, vol. 80, no. 7, pp. 1232–1235. <https://doi.org/10.1134/S1070363210070029>.
14. Voskresenskaya O.O., Skorik N.A., Stepanova N.V. Thermodynamic and kinetic stability of cerium(IV) complexes with a series of aminopolyacetic acids. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2016, vol. 89, no. 11, pp. 1747–1756. <https://doi.org/10.1134/S1070427216110033>.
15. Kozlovskii E.V., Pyreu D.F., Khochenkova T.B. Thermochemical study of mixed-ligand complex formation in the system $\text{M}^{2+}\text{--Nta}^{3-}\text{--En}$ ($\text{M} = \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}, \text{or Cd}$) in aqueous solution. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2008, vol. 53, no. 7, pp. 1158–1161. <https://doi.org/10.1134/S0036023608070309>.
16. Kozlovskii E.V., Aleksandrova S.A., Chesnokova L.N. A potentiometric study of lanthanides(III) complexing by nitrilotrimethylenephosphonic acid in an aqueous solution. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2002, vol. 47, no. 9, pp. 1434–1436.
17. Somov N.V., Chausov F.F., Zakirova R.M., Petrov V.G., Shumilova M.A. Crystal structure of tetra- and pentasodium salts of nitrilotris(methylenephosphonic acid). *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 40–47. <https://doi.org/10.1134/S0036023618010199>.
18. Somov N.V., Chausov F.F., Lomova N.V., Zakirova R.M., Petrov V.G., Zhiron D.K., Shumilova M.A. Yttrium coordination compounds with nitrilotris(methylenephosphonic acid). *Russ. J. Coord. Chem.*, 2019, vol. 45, no. 5, pp. 361–370. <https://doi.org/10.1134/S1070328419030096>.
19. Somov N.V., Chausov F.F., Zakirova R.M., Fedotova I.V. Synthesis, structure, and properties of nickel complexes with nitrilotris(methylenephosphonic acid) $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_3\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H})_3]$

- and $\text{Na}_4[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3)_3]\cdot 11\text{H}_2\text{O}$. *Crystallogr. Rep.*, 2016, vol. 61, no. 2, pp. 216–224. <https://doi.org/10.1134/S1063774516020243>.
20. Somov N.V., Chausov F.F., Zakirova R.M., Petrov V.G., Shumilova M.A., Alexandrov V.A. Synthesis and structure of bis-hexaaquasodium bis-nitrilotris(methylenephosphonato)decaaquamonohydro-hexaasodiumlanthanate trihydrate $[\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6]_2[\text{LaNa}_6\text{H}(\text{H}_2\text{O})_{10}\{\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3)_3\}_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. *Russ. J. Coord. Chem.*, 2017, vol. 43, no. 6, pp. 373–379. <https://doi.org/10.1134/S1070328417060082>.
 21. Somov N.V., Chausov F.F., Zakirova R.M. Synthesis and structure of cesium complexes of nitrilotris(methylenephosphonic) acid $[\text{Cs}-\mu^6\text{-NH}(\text{CH}_2\text{PO}_3)_3\text{H}_4]$ and $[\text{Cs}_2-\mu^{10}\text{-NH}(\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H})_3]\cdot \text{H}_2\text{O}$. *Crystallogr. Rep.*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 572–579. <https://doi.org/10.1134/S1063774517040241>.
 22. Somov N.V., Chausov F.F., Zakirova R.M., Lomova N.V., Gil'mutdinov F.Z., Shabanova I.N., Petrov V.G., Shumilova M.A., Zhirov D.K. Dihydroneitrilotris(methylenephosphonato)dimercury(II) mercury(I) $[(\text{Hg}^{\text{I}})_2\text{Hg}^{\text{II}}\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3)_3\text{H}_2]$: Synthesis and structure. *Russ. J. Coord. Chem.*, 2018, vol. 44, no. 2, pp. 109–116. <https://doi.org/10.1134/S1070328418020100>.
 23. Chausov F.F., Somov N.V., Lomova N.V., Shabanova I.N., Zakirova R.M., Petrov V.G., Shumilova M.A. Electronic structure and nature of the chemical bonds of a transition metal with a non-innocent ligand in coordination complex $\text{Na}_3[\text{Mo}(\text{NO})(\text{NH}_2\text{O})\{\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}_3)_3\text{H}\}]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$. *Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys.*, 2018, vol. 82, no. 7, pp. 892–894. <https://doi.org/10.3103/S1062873818070146>.
 24. Wang J., Zhang X.D., Zhang Y., Jia W.G., Liu Zh.R. Coordinate structures of Pr^{III} , Gd^{III} , Tm^{III} , and Yb^{III} complexes with nitrilotriacetic acids. *J. Struct. Chem.*, 2004, vol. 45, no. 1, pp. 114–123. <https://doi.org/10.1023/B:JORY.0000041509.59005.d6>.
 25. Oshchepkov M.S., Rudakova G.Ya., Tkachenko S.V., Larchenko V.E., Popov K.I., Tusheva M.A. Recent state-of-the-art of antiscalant-driven scale inhibition theory (review). *Therm. Eng.*, 2021, vol. 68, no. 5, pp. 370–380. <https://doi.org/10.1134/S0040601521040054>.
 26. Popov K.I., Kovaleva N.E., Rudakova G.Ya., Kombarova S.P., Larchenko V.E. Recent state-of-the-art of biodegradable scale inhibitors for cooling-water treatment applications (review). *Therm. Eng.*, 2016, vol. 63, no. 2, pp. 122–129. <https://doi.org/10.1134/S0040601516010092>.
 27. Luchini C., Leguay S., Aupiais J., Cannes C., Le Naour C. Complexation of protactinium(V) with nitrilotriacetic acid: A study at the tracer scale. *New J. Chem.*, 2018, vol. 42, no. 10, pp. 7789–7795. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04683A>.
 28. Wang S.-Y., Dong X., Chen J.-F., Zhou Z.-H. Iron molybdenum nitrilotriacetate and iminodiacetate-spectroscopy, structural characterization and CO_2 adsorption. *New J. Chem.*, 2018, vol. 42, no. 23, pp. 18526–18532. <https://doi.org/10.1039/C8NJ03475C>.
 29. Erokhina E.V., Galashina V.N., Dymnikova N.S., Moryganov A.P. Synthesis of copper-silver bicomponent nanoparticles in the presence of nitrilotrimethylenephosphonic acid. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2018, vol. 88, no. 9, pp. 1951–1957. <https://doi.org/10.1134/S1070363218090359>.
 30. Kropacheva T.N., Antonova A.S., Kornev V.I. Organophosphonate-functionalized nanosized magnetic iron oxides as sorbents for heavy metal cations. *Mendeleev Commun.*, 2019, vol. 29, no. 3, pp. 358–360. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.05.040>.
 31. Shevchenko G.P., Zhuravkov V.A., Tret'yak E.V., Novikov A.G., Korolik O.V. Synthesis and characterization of silver hydrosols in the presence of carboxyalkylated amine complexones. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 16–21. <https://doi.org/10.1134/S0036023618010163>.
 32. Ekebas E., Cetin A., Önal A.M., Esenturk E.N. Magnesium substituted cobalt spinel nanostructures for electrocatalytic water oxidation. *J. Appl. Electrochem.*, 2019, vol. 49, no. 3, pp. 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10800-018-01285-9>.
 33. Mendes R.F., Antunes M.M., Silva P., Barbosa P., Figueiredo F., Linden A., Rocha J., Valente A.A., Almeida Paz F.A. A lamellar coordination polymer with remarkable catalytic activity. *Chem. – Eur. J.*, 2016, vol. 22, no. 37, pp. 13136–13146. <https://doi.org/10.1002/chem.201602157>.

34. Garifzyanov A.R., Shurygin I.D., Cherkasov R.A. Complexing properties of organophosphorus analogs of nitrilotriacetic acid: Aminotris(*O*-alkyl methylenephosphonic acids). *Russ. J. Gen. Chem.*, 2018, vol. 88, no. 9, pp. 1860–1866. <https://doi.org/10.1134/S1070363218090165>.
35. Garifzyanov A.R., Shurygin I.D., Mirzayanov I.I., Devyatov F.V. Synthesis, acid-base, and complexing properties of ethylenediaminetetra(*O*-alkyl)methylenephosphonic acids – the closest organophosphorus analogs of ethylenediaminetetraacetic acid. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 1, pp. 5–21. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.1.5-21>. (In Russian)
36. Shurygin I.D., Garifzyanov A.R., Cherkasov R.A., Ivshin K.A., Kataeva O.N. Synthesis, acid-base and complexing properties of *N,N,N',N'*-tetrakis(*O*-butylhydroxyphosphorylmethyl)-1,2-diaminoethane. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2017, vol. 87, no. 9, pp. 2089–2092. <https://doi.org/10.1134/S1070363217090274>.
37. Mirzayanov I.I., Garifzyanov A.R., Devyatov F.V. Acid-base and complexing properties of 2,2'-[(diisopropoxyphosphoryl)methyl]azanediyldiacetic acid. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2021, vol. 91, no. 10, pp. 2045–2051. <https://doi.org/10.1134/S1070363221100182>.
38. Shurygin I.D., Garifzyanov A.R., Cherkasov R.A. Synthesis, acid-base properties, and complexing properties of *N,N*-bis[butoxy(hydroxy)phosphinoylmethyl]glycine. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2017, vol. 87, no. 8, pp. 1882–1883. <https://doi.org/10.1134/S1070363217080394>.
39. Sal'nikov Y.I., Glebov A.N., Devyatov F.V. *Poliyadernnye komplekсы v rastvorakh* [Polynuclear Complexes in Solutions]. Kazan, Izd. Kazan. Univ., 1989. 288 p. (In Russian)
40. Bogatyrev O.V., Yamaltdinova A.F., Devyatov F.V. Complexation of 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP) and manganese(II) in aqueous solution. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 1, pp. 44–54. (In Russian)
41. Musin D.R., Rubanov A.V., Devyatov F.V. Acid-base properties of the aqueous 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid (HEDPA). *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2011, vol. 153, no. 3, pp. 40–47. (In Russian)
42. Kornev V.I., Alabdullah G.F., Kropacheva T.N., Batueva E.V. Heteropolynuclear cobalt(II) and nickel(II) ethylenediaminetetraacetates in aqueous solutions of aminoethanoic acid. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2016, vol. 61, no. 5, pp. 660–665. <https://doi.org/10.1134/S0036023616050107>.
43. Devyatov F.V., Bogatyrev O.V., Ignat'eva K.A. Formation of homo- and heteronuclear complexes of 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid with Mn^{II} and Fe^{III} in aqueous solutions. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, vol. 67, no. 8, pp. 1369–1375. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2226-0>.
44. Devyatov F.V., Musin D.R. Study of homo- and heteronuclear complex formation in 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid (HEDP)–erbium(III) and HEDP–erbium(III)–calcium(II) systems in an aqueous solution. *Russ. Chem. Bull.*, 2015, vol. 64, no. 8, pp. 1866–1870. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1085-1>.
45. Kornev V.I., Semenova M.G. Nickel(II) complexes with 2-hydroxyethyliminodiacetic acid in aqueous solutions of dicarboxylic acids. *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2012, vol. 57, no. 4, pp. 616–621. <https://doi.org/10.1134/S0036023612040146>.
46. Chesnokova L.N. Potentiometric study of complexation between lanthanide ions (H1) and nitriloacetic and nitrilotrimethylenephosphonic acids in water solution. *Extended Abstract of Cand. Sci. (Chemistry) Diss.* Ivanovo, 2003. 16 p. (In Russian)
47. Anderegg G. Critical survey of stability constants of NTA complexes. *Pure Appl. Chem.*, 1982, vol. 54, no. 12, pp. 2693–2758. <https://doi.org/10.1351/pac198254122693>.
48. Lee J.H., Byrne R.H. Examination of comparative rare earth element complexation behavior using linear free-energy relationships. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1992, vol. 56, no. 3, pp. 1127–1137. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90050-S](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90050-S).
49. Huheey J.E. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*. New York, NY, Harper & Row, 1983. xvi, 936 p.

50. Spitsyn V.I., Martynenko L.I. *Koordinatsionnaya khimiya redkozemel'nykh elementov* [Coordination Chemistry of Rare-Earth Elements]. Moscow, Izd. Mosk. Univ., 1979. 254 p. (In Russian)
51. Sinha S.P. A systematic correlation of the properties of the f-transition metal ions. In: *Rare Earths. Structure and Bonding*. Vol. 30. Berlin, Heidelberg, Springer, 1976, pp. 1–64.
https://doi.org/10.1007/3-540-07887-8_1.
52. Ionova G.V., Vokhmin V.G., Spitsyn V.I. *Zakonomernosti izmeneniya svoistv lantanoidov i aktinoidov* [Regularities of Changes of Lanthanide and Actinide Properties]. Moscow, Nauka, 1990. 240 p. (In Russian)
53. Martynenko L.I. Features of the complexation of trivalent rare earths. *Russ. Chem. Rev.*, 1991, vol. 60, no. 9, pp. 1008–1022. <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n09ABEH001125>.
54. Sawada K., Kuribayashi M., Suzuki T., Miyamoto H. Protonation equilibria of nitrilotris(methylene-phosphonato)- and ethylenediamine-tetrakis(methylenephosphonato)-complexes of scandium, yttrium, and lanthanoids. *J. Solution Chem.*, 1991, vol. 20, no. 8, pp. 829–839.
<https://doi.org/10.1007/bf00675114>.

Информация об авторах

Айрат Ризванович Гарифзянов, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: agar56@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6613-8788>

Ильдар Ирекович Мирзаянов, кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества Института нефти, химии и нанотехнологий, Казанский национальный исследовательский технологический университет

E-mail: MirzayanovII@corp.knrtu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4204-201X>

Игорь Дмитриевич Шурыгин, аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: idshurygin@gmail.com

Егор Олегович Чибирев, ассистент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: chibirevegor@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9509-0664>

Федор Владимирович Девятков, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: feddev54@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2985-1920>

Author Information

Airat R. Garifzyanov, Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University

E-mail: agar56@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6613-8788>

Ildar I. Mirzayanov, Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Department of Analytical Chemistry, Certification and Quality Management, Institute of Petroleum, Chemistry and Nanotechnologies, Kazan National Research Technological University

E-mail: MirzayanovII@corp.knrtu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4204-201X>

Igor D. Shurygin, Postgraduate Student, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University

E-mail: *idshurygin@gmail.com*

Egor O. Chibirev, Assistant Professor, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University

E-mail: *chibirevegor@mail.ru*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9509-0664>

Fedor V. Devyatov, Dr. Sci. (Chemistry), Full Professor, Department of Inorganic Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University

E-mail: *feddev54@gmail.com*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2985-1920>

Поступила в редакцию 19.12.2024

Received December 19, 2024

Принята к публикации 31.01.2025

Accepted January 31, 2025

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.242-253>

**Antioxidant potential and phenolic composition of *Cistanche tinctoria*:
A comparative study of crude, flavonoid, and tannin extracts**

A. Chouikh, A. Ben Ali✉, A. Chenguel

El Oued University, El Oued, Algeria

✉benali-anis@univ-eloued.dz

Abstract

The antioxidant capacity and phenolic composition of *Cistanche tinctoria* (Orobanchaceae) were evaluated in the crude, flavonoid, and tannin extracts prepared from air-dried flowers using methanol, ethyl acetate, and acetone, respectively. The highest extraction yield (11.3 %) was obtained with the crude extract. The elevated total phenolic (168 ± 24 mg GAE/g) and flavonoid (27 ± 3 mg QE/g) contents in the crude extract were revealed. The tannin extract exhibited the highest antioxidant activity ($IC_{50} 8 \pm 2$ µg/mL), but, in terms of antioxidant and antiradical properties, all extracts were significantly less effective than ascorbic acid. The flavonoid extract demonstrated the greatest hemolysis inhibition (23 %). The highest absorbance (0.432) was observed for the tannin extract at a concentration of 0.1 mg/mL. Based on the high-performance liquid chromatography analysis, chlorogenic acid and naringenin were identified as the major phenolic compounds in the crude extract. The results validate the health benefits of phenolic compounds in *C. tinctoria* and highlight further research priorities for its applied and medicinal use.

Keywords: *Cistanche tinctoria*, antioxidant activity, phenolics, flavonoids, tannins, DPPH, hemolysis, reducing power, high-performance liquid chromatography

Institutional Review Board Statement. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2000).

Acknowledgments. This study was supported by the Laboratory of Biology, Environment and Health (El Oued University) and performed as part of University Research and Training Project (PRFU, Projet de Recherche Formation Universitaire) D01N01UN390120220003.

For citation: Chouikh A., Ben Ali A., Chenguel A. Antioxidant potential and phenolic composition of *Cistanche tinctoria*: A comparative study of crude, flavonoid, and tannin extracts. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 242–253. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.242-253>.

Оригинальная статья

УДК 615.322:543.8

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.242-253>**Антиоксидантная способность и состав фенольных соединений
Cistanche tinctoria: сравнительное исследование
неочищенного, флавоноидного и дубильного экстрактов****А. Шуих, А. Бен Али✉, А. Шенгель**

Университет Эль-Уэд, г. Эль-Уэд, Алжир

✉ benali-anis@univ-eloued.dz**Аннотация**

Изучены антиоксидантная способность и состав фенольных соединений *Cistanche tinctoria* (Orobanchaceae) на основе анализа неочищенного, флавоноидного и дубильного экстрактов, полученных из воздушно-высушенных цветков с помощью метанола, этилацетата и ацетона соответственно. Наибольший выход экстракта (11.3 %) достигнут при использовании метанола. Показано высокое содержание фенольных (168 ± 24 мг-экв. галловой кислоты/г) и флавоноидных (27 ± 3 мг-экв. кверцетина/г) соединений в неочищенном экстракте. Наибольшую антиоксидантную активность проявил дубильный экстракт ($IC_{50} 8 \pm 2$ мкг/мл). При этом антиоксидантные и антирадикальные свойства всех экстрактов оказались менее выражены по сравнению с аскорбиновой кислотой. Наилучшую способность к защите мембран эритроцитов от перекисного гемолиза продемонстрировал флавоноидный экстракт (23 %). Максимальное значение оптической плотности (0.432) зафиксировано для дубильного экстракта в концентрации 0.1 мг/мл. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что основными фенольными соединениями неочищенного экстракта являются хлорогеновая кислота и нарингенин. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном терапевтическом потенциале фенольных соединений в составе *C. tinctoria* и указывают на перспективность дальнейших исследований их прикладного и лекарственного применения.

Ключевые слова: *Cistanche tinctoria*, антиоксидантная активность, фенольные соединения, флавоноиды, таннины, ДФПГ, гемолиз, восстановительная способность, высокоэффективная жидкостная хроматография

Закключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 2000 г.

Благодарности. Работа выполнена на базе лаборатории биологии, экологии и охраны здоровья Университета Эль-Уэд в рамках университетского научно-образовательного проекта (PRFU, Projet de Recherche Formation Universitaire) D01N01UN390120220003.

Для цитирования: Шуих А., Бен Али А., Шенгель А. Антиоксидантная способность и состав фенольных соединений *Cistanche tinctoria*: сравнительное исследование неочищенного, флавоноидного и дубильного экстрактов // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 242–253. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.242-253>.

Introduction

Natural antioxidants have attracted much attention in recent years due to their potential health benefits for preventing and treating diseases induced by oxidative stress [1].

Oxidative stress, driven by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to detoxify these harmful compounds, is implicated in the pathogenesis of many chronic diseases, including cardiovascular dysfunction, cancer, and neurodegenerative disorders [2]. Natural oxidants from plants effectively neutralize ROS, thereby mitigating or averting oxidative damage [3]. Phenolic compounds, such as flavonoids and tannins, are potent antioxidants, which is attributed to their ability to donate hydrogen atoms or electrons and stabilize free radicals [4].

Among the wide variety of medicinal plants known for their antioxidant properties, *Cistanche tinctoria* (Orobanchaceae) is especially rich in bioactive compounds, particularly phenolics and flavonoids. This desert parasitic plant is native to North Africa, the Arabian Peninsula, and Asia [5]. It attaches itself to the roots of its primary host plants (*Tamarix gallica*, *Calligonum comosum*, and *Pulicaria*) and derives nutrients from them for growth.

C. tinctoria has been traditionally utilized not only for its aesthetic and decorative value but also for its medicinal effects [6] to treat and relieve many ailments such as abdominal pains, diarrhea, dystonia, bruises, gynecological diseases, delayed lactogenesis, and diabetes [5].

This study aims to explore the antioxidant capacity of *C. tinctoria*, identify key phenolic compounds in its extracts that reduce oxidative stress, and validate its potential as a source of natural antioxidants.

1. Material and Methods

1.1. Laboratory equipment used in sample preparation and analysis. A Buchi R-200 rotary evaporator was used for solvent removal during the extraction process. Filtering was performed with standard filter paper. Absorbance of the samples in the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power assays was measured with a Shimadzu UV-Vis spectrophotometer (Japan). In the hemolysis and reducing power assays, a centrifuge was employed to separate the particles suspended in the prepared extracts. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out using a Shimadzu LC 20 AL system (Japan) equipped with a Hamilton 25 μ L universal injector, a Shim-pack VP-ODS C18 analytical column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), and a UV-VIS detector (SPD 20A, Shimadzu, Japan) to determine and quantify phenolic compounds.

1.2. Plant material. *C. tinctoria* flowers were collected in the full flowering stage (Fig. 1) on March 29, 2018 from the Taleb Larbi region in the El-Oued state of Algeria (33°42'27.8" N, 07°18'57.1" E), approximately 60 km along the Tebessa road.

The collected plant material was air-dried in the dark at room temperature for 3 to 4 weeks. Once dried, it was ground into a fine powder using a mechanical grinder. The obtained powder was stored at room temperature in airtight containers shielded from bright light until experimentation.

1.3. Preparation of methanolic extract. To prepare a methanolic extract of *C. tinctoria*, 10 g of the dried plant material were macerated in 150 mL of methanol in the dark at room temperature for 24 h and then filtered through filter paper. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure in a rotary evaporator at 50 °C to obtain the crude extract, which was stored away from light and protected from moisture intake [7].



Fig. 1. *C. tinctoria* plant in full flowering stage, Taleb Larbi region (El-Oued state, Algeria)

1.4. Extraction of flavonoids. To extract flavonoids, the same amount (10 g) of the dried plant material was macerated in 150 mL of methanol in the dark at room temperature for 24 h. After the filtration through filter paper, the solvent was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator at 50 °C. Then, 150 mL of warm distilled water and 150 mL of ethyl acetate were added to the methanolic extract, and the mixture was placed in a separatory funnel. The ethyl acetate phase was collected, evaporated at 50 °C, and used as the flavonoid extract [8].

1.5. Extraction of tannins. Tannins were extracted by macerating 30 g of the *C. tinctoria* powder in 60 mL of distilled water and 140 mL of acetone in the dark at room temperature for 72 h. The resulting solution was filtered through filter paper. To remove acetone, the solvent was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator at 50 °C. Then, to remove lipid-soluble substances, 150 mL of dichloromethane was added to the remaining solution. The mixture was allowed to stand in a separatory funnel for about 2 h. The ethyl acetate phase was collected and evaporated to dryness at 50 °C to obtain the tannin extract [9].

1.6. Determination of total phenolic contents. The total phenolic contents (TPC) of the crude extract were determined using the Folin–Ciocalteu method with modifications [10]. A mixture containing 0.2 mL of the extract, 1 mL of the Folin–Ciocalteu reagent (diluted 1 : 10 with water), and 0.8 mL of sodium carbonate solution (7.5 %) was incubated for 30 min. The absorbance was measured by a spectrophotometer at a wavelength of 765 nm. Gallic acid was used as a standard, and the TPC content was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of the extract.

1.7. Determination of total flavonoid contents. The total flavonoid contents were measured using the method adapted from Chouikh et al. [11]. For this purpose, 1 mL of the sample solution was mixed with 1 mL of aluminum trichloride in methanol (2 %) and incubated at room

temperature for 10–15 min. The absorbance was measured at a wavelength of 430 nm. Quercetin was used as a standard, and the flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of the extract.

1.8. DPPH radical scavenging assay. The DPPH radical scavenging activity was estimated by the method of Brand-Williams [12] with modifications. Exactly 1 mL of each extract at different concentrations was added to 1 mL of DPPH solution (0.1 mM in methanol). Following the incubation at room temperature for 10–15 min, the absorbance was measured at a wavelength of 517 nm. Ascorbic acid, a strong antioxidant compound, was used as a standard.

1.9. Hemolysis assay. The hemolysis assay was conducted following the protocol by Chouikh et al. [13]. A volume of 40 μ L of human erythrocytes was mixed with 2 mL of the plant extract and incubated at 37 °C for 5 min. Then, 40 μ L each of H₂O₂ (30 mM), FeCl₃ (80 mM), and ascorbic acid solution (50 mM) were added. After 1 h of incubation at 37 °C, the mixture was centrifuged at 700 rpm for 10 min, and the absorbance of the supernatant was read at a wavelength of 540 nm.

1.10. Ferric reducing antioxidant power assay. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed according to Mesbahi et al. [14]. A mixture of 0.5 mL of the plant extract, 1.25 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), and 1.25 mL of potassium ferricyanide (1 %) was incubated at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1.25 mL of trichloroacetic acid (10 %), followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. After the centrifugation, 1 mL of the supernatant was mixed with 0.25 mL of FeCl₃ (0.1 %) and 1.25 mL of distilled water. The absorbance was read at a wavelength of 700 nm. Ascorbic acid was used as a positive control.

1.11. High-performance liquid chromatography. The high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out as described by Ben Ali et al. [15]. For this procedure, 20 μ L of the crude extract was injected into the HPLC system. The mobile phase solvent was forced through the column using a high-pressure pump to separate the compounds based on their polarity. To identify the compounds, present in the sample, chromatograms were generated by a detector connected to the column and a computer.

2. Results and Discussion

2.1. Determination of extraction yield. Extraction yield is a key metric, which quantifies the proportion of bioactive components recovered from raw plant material.

In this study, notable differences were revealed in the yields of the crude, flavonoid (ethyl acetate phase), and tannin extracts of *C. tinctoria*. The crude extract had the highest yield (11.3 %). The flavonoid extract ranked second (1.3 %). The lowest yield (0.5 %) was obtained for the tannin extract.

The above differences may be related to a variety of factors, among which is the type and polarity of the solvent, with ethyl acetate being less polar compared to methanol and thus yielding lower extraction efficiency [16]. Other factors significantly affecting extraction yield values are sampling conditions, drying and storage methods, extraction techniques such as maceration, solvent-to-plant material ratio, and extraction duration [17]. The quality of extracted compounds also depends on environmental stresses altering plant physiology [18]. Of particular importance is the age of the plant, with older perennial plants characterized by lower yields. In many cases, the quality and quantity of extracted compounds are determined by climate and the plant's growth environment [19].

2.2. Total phenolics and flavonoids and their antioxidant effects. Phenolics and flavonoids are the two secondary metabolites commonly found in *C. tinctoria* and directly contributing to its antioxidant capacity.

In the crude *C. tinctoria* extract, the TPC determined using the Folin–Ciocalteu method was 168 ± 24 mg GAE/g DM. The total flavonoid content was 27 ± 3 mg QE/g DM. These levels are considered high.

Generally, elevated levels of phenolics and flavonoids may be related to high solubility of these compounds in methanol, which is known to inhibit polyphenol oxidase and evaporates quicker compared to water [20]. They are also influenced by various environmental factors, including season, sampling dates, soil composition, climate, temperature, light, humidity, and water stress [21], as well as the plant's age and growth stage. Pre-extraction drying and selection of an appropriate extraction method are crucial as well for the recovering of bioactive compounds like phenolics and flavonoids [22]. With few studies focusing on phenolics and flavonoids contained in *C. tinctoria* flowers, our findings fill an important gap existing in the literature.

2.3. Antioxidant activity evaluated by DPPH assay. The antioxidant activity of *C. tinctoria* constituents was determined by calculating IC_{50} from the DPPH assay with ascorbic acid as a standard. IC_{50} was evaluated by plotting the extract concentrations versus DPPH inhibition (Fig. 2). The inhibitor with lower IC_{50} was considered more potent under identical testing conditions, as suggested by Johari and Khong [23]. Fig. 2 shows that the tannin extract had the lowest IC_{50} value (8 ± 2 μ g/mL), indicating that it exhibited the most pronounced antiradical activity among the tested extracts. The crude and flavonoid extracts with the higher IC_{50} values (23 ± 6 and 20 ± 6 μ g/mL, respectively) were less effective in DPPH scavenging. Compared to the plant extracts, ascorbic acid used as a reference antioxidant exhibited even higher scavenging activity with IC_{50} of 5 ± 1 μ g/mL.

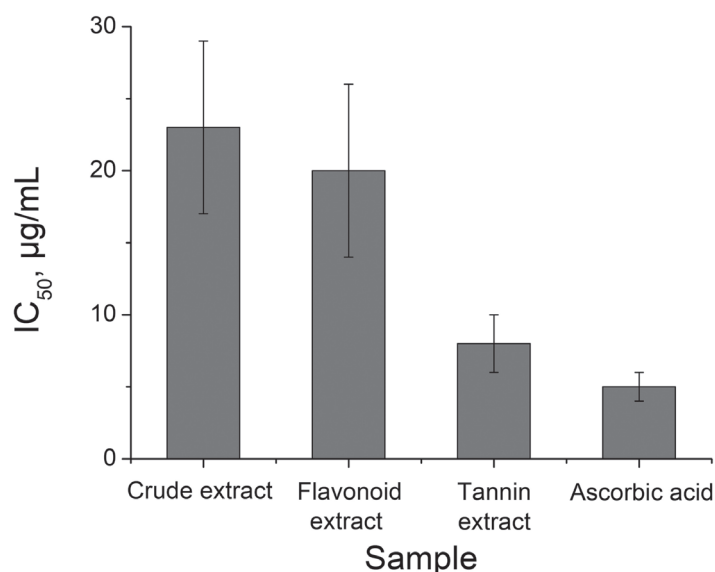


Fig. 2. IC_{50} values (μ g/mL) of the *C. tinctoria* extracts and ascorbic acid in DPPH assay

Therefore, higher concentrations of all plant extracts were needed in order to achieve the same effect as with ascorbic acid. However, in the study by Mahtout et al. [24], the ethyl acetate extract demonstrated higher DPPH scavenging activity than BHT and ascorbic acid. In our study, the differences observed in the DPPH scavenging activity between the plant extracts may be attributed to the structure, type, and concentration of phenolic compounds [25]. In [26, 27], the antioxidant strength of plant extracts varied depending on the content of polyphenols, which are strong ROS scavengers due to the presence of hydroxyl groups on the aromatic ring. The flavonoid content is of no less significance. The study by Zheng et al. [28] reports that the position of hydroxyl groups

and their hydrogen-donating ability, along with the presence of a double bond between C2 and C3 atoms, play a crucial role in the inhibition of radicals [29]. Ascorbic acid, a well-established antioxidant and radical scavenger [30], was used as a positive standard due to concerns about the direct determination of the DPPH radical scavenging activity from the calibration curve [31].

2.4. Hemolysis evaluation. The hemolysis assay is a simple and robust screening test to evaluate the antioxidant activity of compounds by using erythrocytes as a model to study the interactions between oxidants and antioxidants. The membranes of erythrocytes are rich in unsaturated fatty acids, which are highly sensitive to free radicals. These membranes are also responsible for oxygen transport to hemoglobin molecules [13]. Lipid oxidation in erythrocyte membranes induces oxidative stress by affecting membrane fluidity and receptor functions, leading to erythrocyte degeneration [32].

Fig. 3 illustrates the percentage of hemolysis (break down of red blood cells) in the presence of the plant extracts and ascorbic acid at a concentration of 1 mg/mL. The lowest value was observed for ascorbic acid (17 %). The crude, flavonoid, and tannin extracts had higher values (34, 23, and 44 %, respectively).

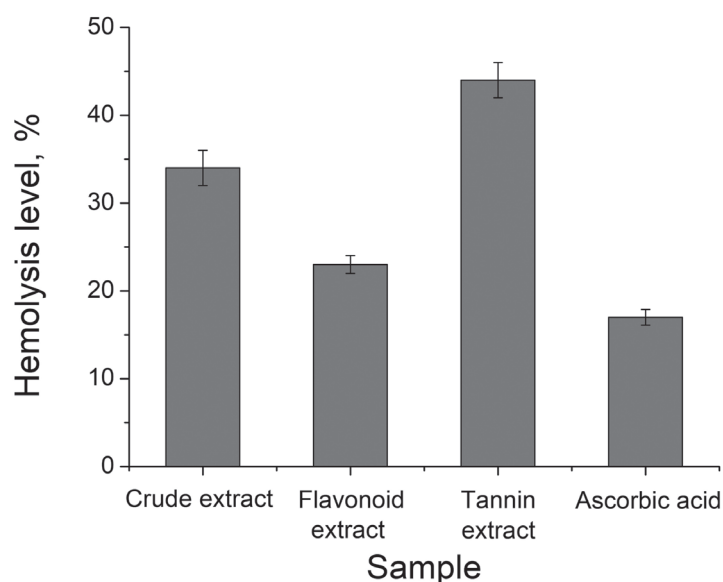


Fig. 3. Hemolysis levels with the *C. tinctoria* extracts and ascorbic acid, 1 mg/mL

In our study, the ability of erythrocytes to resist free radicals in the extracts was monitored using spectrophotometry. The antioxidant activity of the extracts varied considerably, with significant differences from ascorbic acid, which aligns with the results of the DPPH assay. Nevertheless, the extracts still displayed notable antioxidant potential due to their phenolic compounds, which protect biofilms from oxidation by free radicals and thus act as antioxidant agents terminating the chain reaction associated with these reactive metabolites [33].

2.5. Evaluation of reducing power. Reducing power is associated with the ability of a compound to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} and serves as an indicator of its antioxidant activity. During the FRAP test, the yellow color of the solution changes to various shades of green and blue, depending on the reducing power. At higher concentrations of a reducing agent, the amount of Fe^{2+} increases, which is evident from greater absorbance of the sample. Reducing agents act as antioxidants by breaking the free radical chain through hydrogen atom donation and reacting with certain peroxide precursors, preventing peroxide formation [34].

As seen from Fig. 4, at a concentration of 0.1 mg/mL, the tannin extract demonstrated the highest ferric reducing ability compared to all other tested extracts.

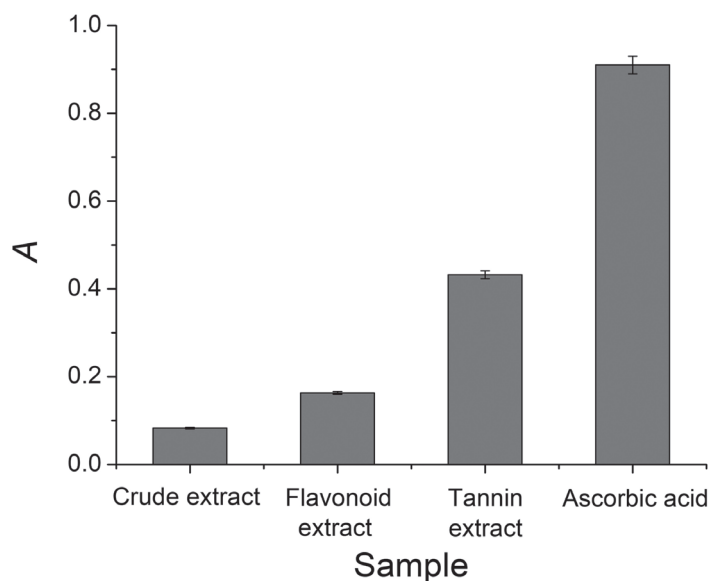


Fig. 4. Reducing power of the *C. tinctoria* extracts and ascorbic acid, 0.1 mg/mL

Previous studies have shown a direct correlation between the antioxidant capacity and reducing power of certain plant extracts [35]. In this study, the reducing power of all extracts increased with concentration, closely correlating with their antioxidant capacity. Thus, the antioxidant properties of the extracts were enhanced by reducing agents [36]. The FRAP assay was also consistent with the DPPH assay, suggesting a correlation between the reducing power and the DPPH scavenging activity due to similar underlying mechanisms [37].

2.6. High-performance liquid chromatography. To analyze and separate phenolic compounds present in the extracts, a HPLC analysis was performed (Fig. 5, Table). Based on the chromatogram of the methanolic (crude) extract (Fig. 5), two phenolic compounds can be identified (chlorogenic acid and naringin). Their concentrations differed significantly (1.152 and 27.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Ext for chlorogenic acid and naringin, respectively).

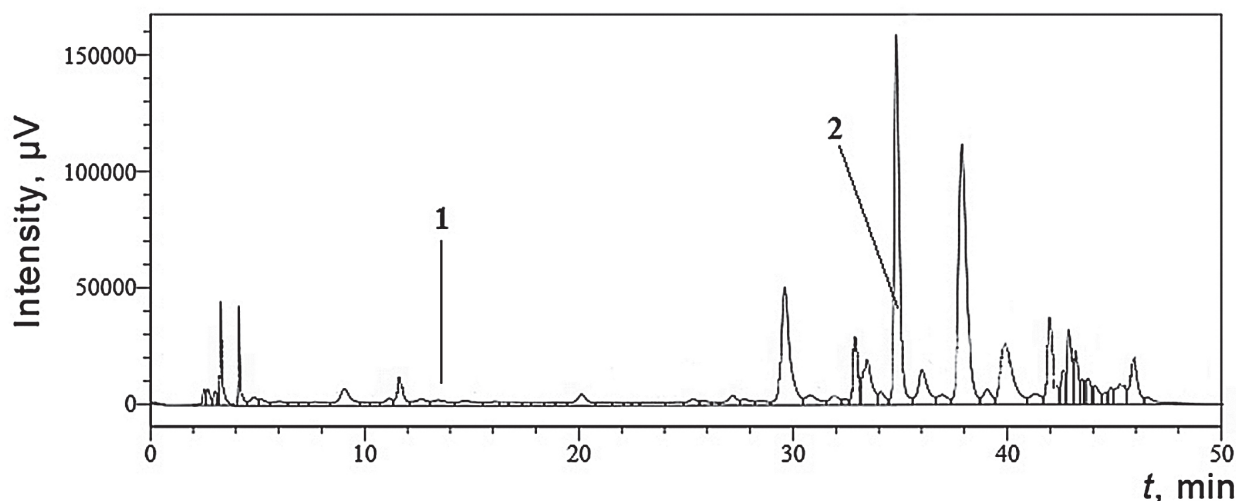


Fig. 5. Chromatogram of the methanolic extract of *C. tinctoria*. 1 – chlorogenic acid, 2 – naringin

Table. Phenolic compounds in the methanolic extract of *C. tinctoria* and their concentrations

Compound	Retention time, min	Concentration, µg /mg Ext
Gallic acid	5.275	—
Chlorogenic acid	13.437	1.152
Vanillic acid	15.562	—
Caffeic acid	16.225	—
Vanillin	21.462	—
<i>p</i> -Coumaric acid	23.911	—
Rutin	28.868	—
Naringin	34.092	27.46
Quercetin	45.018	—

Chlorogenic acid, also known as 5-*O*-caffeoylquinic acid (5-CQA), is an ester of cinnamic acids, such as caffeic and quinic acids [38]. It exhibits various bioactive properties, including antibacterial, antioxidant, and anticarcinogenic [39], as well as donates hydrogen atoms to reduce free radicals and inhibit oxidation reactions [40]. Naringin, a predominant flavanone glycoside (flavonoid) that occurs naturally in many plants, has been reported to possess antioxidant and antimicrobial activities [41].

Conclusions

The antioxidant capacity and phenolic composition of *C. tinctoria* extracts (crude, flavonoid, and tannin) were examined. All extracts exhibited antioxidant activity in the DPPH, hemolysis, and FRAP assays, with the tannin extract being the most effective. However, they were still less potent than ascorbic acid used as a reference compound. The HPLC analysis revealed the presence of two antioxidant phenolic compounds, chlorogenic acid and naringin, in the crude extract. The antioxidant efficacy of the extracts varied significantly, which may be attributed to the differences in their phenolic contents and the influence of environmental factors on the plant's phytochemical characteristics. The findings provide valuable insights into the potential of *C. tinctoria* as a natural source of antioxidants, as well as into the health benefits it offers. The mechanisms underlying the antioxidant capacity and medicinal value of *C. tinctoria* set an agenda for future research.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Chaudhary P., Janmeda P., Docea A.O., Yeskalyeva B., Abdull Razis A.F., Modu B., Calina D., Sharifi-Rad J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front. Chem.*, 2023, vol. 11, art. 1158198. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>.
2. Sharifi-Rad M., Anil Kumar N.V., Zucca P., Varoni E.M., Dini L., Panzarini E., Rajkovic J., Tsouh Fokou P.V., Azzini E., Peluso I., Prakash Mishra A., Nigam M., El Rayess Y., Beyrouthy M.E., Polito L., Iriti M., Martins N., Martorell M., Docea A.O., Setzer W.N., Calina D., Cho W.C., Sharifi-Rad J. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front. Physiol.*, 2020, vol. 11, art. 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.

3. Akbari B., Baghaei-Yazdi N., Bahmaie M., Mahdavi Abhari F. The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *BioFactors*, 2022, vol. 48, no. 3, pp. 611–633. <https://doi.org/10.1002/biof.1831>.
4. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.*, 2020, vol. 94, no. 3, pp. 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
5. Bouzitouna A., Ouali K., Djeddi S. Protective effects of *Cistanche tinctoria* aqueous extract on blood glucose and antioxidant defense system of pancreatic β -cells in experimental diabetes in rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2015, vol. 32, no. 2, pp. 243–249.
6. Lakhdari W., Dehliz A., Acheuk F., Mlik R., Hammi H., Doumandji-Mitiche B., Gheriani S., Berrekbia M., Guermit K., Chergui S. Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara). *J. Med. Plants Stud.*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. 204–211.
7. Chouikh A., Alia F. Phytochemical properties, antibacterial and anti-free radical activities of the phenolic extracts of *Retama raetam* (Forssk) Webb. & Berthel. collected from Algeria Desert. *Ovidius. Univ. Ann. Chem.*, 2021, vol. 32, no. 1, pp. 33–39. <https://doi.org/10.2478/auoc-2021-0005>.
8. Chouikh A., Mekki M., Adjal E.H. Effects of extraction methods on antibacterial activity of different extracts of *Calligonum comosum* L'her. growing in Sahara Algerian. *Int. J. Recent Sci. Res.*, 2015, vol. 6, no. 4, pp. 3534–3536.
9. Chouikh A., Chems A.E., Aounallah C., Aounallah I., Alia F. Phytochemical study, nutritive value, antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic extracts from desert plant *Calligonum comosum* L'Hér. *Alger. J. Biosci.*, 2020, vol. 1, no. 2, pp. 68–75. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4395515>.
10. Chouikh A., Ben Ali A., Bousbia Brahim A., Khezzani K., Bekkouche S. Comparative analysis of phytochemical composition and biological activities of sprouted and unsprouted *Chenopodium quinoa* Willd. seeds: Insights into nutritional value and functional properties. *Acta Univ. Cibiensis, Ser. E: Food Technol.*, 2024, vol. 28, no. 1, pp. 55–64. <https://doi.org/10.2478/auocft-2024-0005>.
11. Chouikh A., Ben Ali A., Bousbia Brahim A. Exploring therapeutic potential of *Malcolmia aegyptiaca* Spr. and *Matthiola livida* DC. extracts in rat models using hot-plate, writhing and carrageenan-induced paw edema tests. *Acta Med. Bulg.*, 2024, vol. 51, suppl. 2, pp. 102–109. <https://doi.org/10.2478/amb-2024-0060>.
12. Ben Ali A., Chouikh A. Bioactive potential of Algerian *Citrullus colocynthis* resin: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Not. Sci. Biol.*, 2024, vol. 16, no. 3, art. 11782. <https://doi.org/10.55779/nsb16311782>.
13. Chouikh A., Ben Ali A., Bousbia Brahim A., Bekkouche A., Seghaier S. Phytochemical analysis and biological activities of *Matthiola livida* DC. extracts from Oued-Souf region: Insights into antioxidant and anti-inflammatory potential. *Acta Period. Technol.*, 2024, vol. 55, no. 1, pp. 107–124. <https://doi.org/10.2298/APT2455107C>.
14. Mesbahi M.A., Ouahrani M.R., Rebiai A., Amara D.G., Chouikh A. Characterization of *Zygophyllum album* L monofloral honey from El-Oued, Algeria. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2019, vol. 15, no. 5, pp. 476–483. <https://doi.org/10.2174/1573401314666180223135430>.
15. Ben Ali A., Chouikh A., Haddad L. *Cyperus rotundus* tubers resin from Algeria: A promising source of natural antioxidants, anti-inflammatory, and photoprotective compounds. *OvidiusUniv. Ann. Chem.*, 2023, vol. 34, no. 2, pp. 132–139. <https://doi.org/10.2478/auoc-2023-0017>.
16. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, no. 25, pp. 7292–7295. <https://doi.org/10.1021/jf0344385>.
17. Lazarjani M.P., Young O., Kebede L., Seyfoddin A. Processing and extraction methods of medicinal cannabis: A narrative review. *J. Cannabis Res.*, 2021, vol. 3, no. 1, art. 32. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00087-9>.
18. Nejad Ebrahimi S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food. Chem.*, 2008, vol. 110, no. 4, pp. 927–931. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.083>.

19. Onofre S.B., Abatti D., Tessaro A.A., Tessaro A.B. Total phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke. *Ciência. Natura.*, 2016, vol. 38, no. 3, pp. 1197–1204. <https://doi.org/10.5902/2179460X21363>.
20. Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomás-Barberán F., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2004, vol. 59, no. 3, pp. 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>.
21. Hermans C., Hammond J.P., White P.J., Verbruggen N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.*, 2006, vol. 11, no. 12, pp. 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007>.
22. de Toledo C.E.M., Britta E.A., Ceole L.F., Silva E.R., de Mello J.C., Dias Filho B.P., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, vol. 133, no. 2, pp. 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.021>.
23. Johari M.A., Khong H.Y. Total phenolic content and antioxidant and antibacterial activities of *Pereskia bleo*. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 2019, vol. 2019, no. 1, art. 7428593. <https://doi.org/10.1155/2019/7428593>.
24. Mahtout R., Zaidi F., Saadi L.O., Boudjou S., Oomah B.D., Hosseinian F. Carob (*Ceratonia siliqua* L.) supplementation affects kefir quality and antioxidant capacity during storage. *Int. J. Eng. Tech.*, 2016, vol. 2, no. 2, pp. 168–177.
25. Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, 2006, vol. 78, no. 25, pp. 2872–2888. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.004>.
26. Debouba M., Balti R., Hwiwi S., Zouari S. Antioxidant capacity and total phenols richness of *Cistanche violacea* hosting *Zygophyllum album*. *Int. J. Phytomed.*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 399–402.
27. Diplock A.T. Will the ‘good fairies’ please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radical Res.*, 1997, vol. 27, no. 5, pp. 511–532. <https://doi.org/10.3109/10715769709065791>.
28. Zheng C.-D., Li G., Li H.-Q., Xu X.-J., Gao J.-M., Zhang A.-L. DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. *Nat. Prod. Commun.*, 2010, vol. 5, no. 11, art. 1934578X1000501112. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501112>.
29. Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 2004, vol. 74, no. 17, pp. 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>.
30. Truong D.-H., Nguyen D.H., Ta N.T.A., Bui A.V., Do T.H., Nguyen H.C. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *J. Food Qual.*, 2019, vol. 2019, art. 178294. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>.
31. Abeyesuriya H.I., Bulugahapitiya V.P., Jayatissa L.P. Total vitamin C, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, antioxidant properties, and iron content of underutilized and commonly consumed fruits in Sri Lanka. *Int. J. Food Sci.*, 2020, vol. 2020, no. 1, art. 4783029. <https://doi.org/10.1155/2020/4783029>.
32. Dolci A., Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clin. Chim. Acta*, 2014, vol. 432, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.012>.
33. Kalaivani T., Rajasekaran C., Mathew L. Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. Ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. *J. Food Sci.*, 2011, vol. 76, no. 6, pp. T144–T149. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02243.x>.
34. Makni M., Jemai R., Kriaa W., Chtourou Y., Fetoui H. *Citrus limon* from Tunisia: Phytochemical and physicochemical properties and biological activities. *BioMed Res. Int.*, 2018, vol. 2018, art. 251546. <https://doi.org/10.1155/2018/6251546>.

35. Guo T., Wei L., Sun J., Hou C.-I., Fan L. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Massee. *Food Chem.*, 2011, vol. 127, no. 4, pp. 1634–1640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.030>.
36. Saague P.W.K., Moukette Moukette B., Njimou J.R., Biapa P.C.N., Nzufo Tankeu F., Moor V.J.A., Pieme C.A., Ngogang J.Y. Phenolic compounds from water-ethanol extracts of *Tetrapleura tetraptera* produced in Cameroon, as potential protectors against *In vivo* CCl₄-induced liver injuries. *Sci. World J.*, 2019, vol. 2019, art. 236851. <https://doi.org/10.1155/2019/5236851>.
37. Jothy S.L., Aziz A., Chen Y., Sasidharan S. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Polyalthia longifolia* and *Cassia spectabilis* leaves against paracetamol-induced liver injury. *Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2012, vol. 2012, art. 561284. <https://doi.org/10.1155/2012/561284>.
38. Gil M., Wianowska D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. AA: Chem.*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 61–104. <http://dx.doi.org/10.17951/aa.2017.72.1.61>.
39. Santana-Gálvez J., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D.A. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 2017, vol. 22, no. 3, art. 358. <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>.
40. Liang N., Kitts D.D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 2015, vol. 8, no. 1, art. 16. <https://doi.org/10.3390/nu8010016>.
41. Raja Kumar S., Mohd Ramli E.S., Abdul Nasir N.A., Ismail N.H.M., Mohd Fahami N.A. Preventive effect of naringin on metabolic syndrome and its mechanism of action: A systematic review. *Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2019, vol. 2019, art. 752826. <https://doi.org/10.1155/2019/752826>.

Author Information

Atef Chouikh, Professor of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Head of Laboratory of Biology, Environment and Health, University of El Oued

E-mail: chouikhateff@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6356-4271>

Anis Ben Ali, PhD Student, Department of Cellular and Molecular Biology, Associate Member of Laboratory of Biology, Environment and Health, University of El Oued

E-mail: benali-anis@univ-eloued.dz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5301-8587>

Aouatef Chenguel, Student, Department of Cellular and Molecular Biology, El Oued University

E-mail: Aouatef-Chenguel@gmail.com

Информация об авторах

Атеф Шуих, профессор биологических наук, факультет естественных наук и наук о жизни, заведующий лабораторией биологии, экологии и охраны здоровья, Университет Эль-Уэд

E-mail: chouikhateff@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6356-4271>

Анис Бен Али, докторант, кафедра клеточной и молекулярной биологии, ассоциированный научный сотрудник лаборатории биологии, экологии и охраны здоровья, Университет Эль-Уэд

E-mail: benali-anis@univ-eloued.dz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5301-8587>

Ауатеф Шенгель, студент, кафедра клеточной и молекулярной биологии, Университет Эль-Уэд

E-mail: Aouatef-Chenguel@gmail.com

Received September 28, 2024

Accepted November 25, 2024

Поступила в редакцию 28.09.2024

Принята к публикации 25.11.2024

Оригинальная статья

УДК 547.823

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.254-267>

Фотохимическая E/Z-изомеризация изоникотиноилгидразонов на основе производных пиридоксина

Н.В. Штырлин¹✉, Р.М. Хазиев¹, Д.Р. Исламов², Ю.Г. Штырлин^{1*}¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия²ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия

✉Nikita.Shtyrilin@kpfu.ru, Yurii.Shtyrilin@kpfu.ru

Аннотация

Изоникотиноилгидразон 6-карбальдегида пиридоксина **1**, существующий в виде смеси E- и Z-изомеров, проявляет высокую активность в отношении лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. В продолжение исследований по разработке противотуберкулезных лекарственных средств оценена фотостабильность соединения **1** и его структурных аналогов, что является важным при производстве фармацевтических субстанций и установлении специфической активности различных изомеров *in vivo*. Показано, что под действием УФ-облучения в растворах соединений **1** и **2**, содержащих свободные гидроксиметильные группы в четвертом и пятом положениях пиридоксина, происходит существенное осмоление реакционной смеси, обусловленное, по-видимому, образованием реакционноспособных орто-хинонметидов. При введении кетальной защиты гидроксиметильных групп в производное пиридоксина, содержащее изоникотиноилгидразонный фрагмент в шестом положении, под действием УФ-облучения реализуется переход из термодинамически более устойчивого E-изомера в Z- вследствие образования внутримолекулярной водородной связи типа NH...N_{пир}. Производное пиридоксина, содержащее изоникотиноилгидразонный фрагмент во втором положении, практически не подвергается фотоизомеризации, что обусловлено наличием внутримолекулярной водородной связи типа OH...N_{C=N}.

Ключевые слова: пиридоксин, изоникотиноилгидразоны, фотоизомеризация.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности № FZSM-2023-0010.

Для цитирования: Штырлин Н.В., Хазиев Р.М., Исламов Д.Р., Штырлин Ю.Г. Фотохимическая E/Z-изомеризация изоникотиноилгидразонов на основе производных пиридоксина // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 254–267. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.254-267>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.254-267>

Photochemical *E/Z* isomerization of isonicotinoyl hydrazones based on pyridoxine derivatives

N.V. Shtyrlin¹✉, R.M. Khaziev¹, D.R. Islamov², Y.G. Shtyrlin^{1*}

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

✉Nikita.Shtyrlin@kpfu.ru, Yurii.Shtyrlin@kpfu.ru

Abstract

Isonicotinoyl hydrazone of 6-carbaldehyde pyridoxine **1**, existing as a mixture of *E* and *Z* isomers, is known to exhibit potent activity against drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. This article continues earlier research on the development of anti-tuberculosis drugs by examining the photostability of compound **1** and its structural analogs, which is important for the production of pharmaceutical substances and the determination of the specific activity of various isomers *in vivo*. Under the action of UV irradiation, a significant tarring of the reaction mixture in the solutions of compounds **1** and **2** containing free hydroxymethyl groups at positions 4 and 5 of pyridoxine was observed, apparently due to the formation of reactive *ortho*-quinone methides. However, when ketal protection was employed for hydroxymethyl groups in the pyridoxine derivative containing the isonicotinoyl hydrazone fragment at position 6, a transition from the thermodynamically more stable *E* isomer to *Z* isomer was induced by UV irradiation through the formation of an intramolecular hydrogen bond of the NH...N_{pyr} type. In contrast, owing to the presence of an intramolecular hydrogen bond of the OH...N_{C=N} type, the pyridoxine derivative bearing the isonicotinoyl hydrazone fragment at position 2, underwent no significant photoisomerization.

Keywords: pyridoxine, isonicotinoyl hydrazones, photoisomerization

Acknowledgments. This study was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the project part of the state assignment in the sphere of scientific activities (project no. FZSM-2023-0010).

For citation: Shtyrlin N.V., Khaziev R.M., Islamov D.R., Shtyrlin Y.G. Photochemical *E/Z* isomerization of isonicotinoyl hydrazones based on pyridoxine derivatives. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 254–267. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.254-267>. (In Russian)

Введение

Ацилгидразоны представляют собой класс органических соединений с широким спектром практического применения. Разнообразная биологическая активность (антибактериальная, антимикотическая, антигемморагическая, миорелаксантная, антиаритмическая, противоопухолевая), обеспечившая внедрение в клиническую практику более десяти лекарственных препаратов, позволяет отнести ацилгидразоны к привилегированным структурам в медицинской химии [1]. Кроме того, интерес исследователей к подобным структу-

рам связан с их склонностью к комплексообразованию [2], реакциям циклизации [3] и *E*-, *Z*-изомеризации [4].

Для ацилгидразонов характерна *E/Z*-изомерия, причем *E*-изомеры термодинамически более устойчивы. Образование *Z*-изомеров возможно при определенных условиях, например, при наличии внутримолекулярной водородной связи [5, 6]. Благодаря этому, в растворе *Z*-изомеры могут образовываться самопроизвольно или под действием УФ-излучения. Удобным объектом для изучения *E/Z*-изомеризации являются 2-пиридилгидразоны, в которых *Z*-изомеры стабилизированы за счет внутримолекулярной водородной связи типа $\text{NH}\dots\text{N}_{\text{пир}}$ [5]. При этом *Z*-изомер – продукт кинетического контроля – со временем переходит в термодинамически более устойчивый *E*-изомер [5, 6].

Гидразоны, содержащие гидразид изоникотиновой кислоты (изониазид), называют изоникотиноилгидразонами. Некоторые их производные, разработанные еще в СССР (препараты фтивазид, салюзид и другие), представляют собой пролекарственную форму изониазида и применяются до сих пор в качестве противотуберкулезных лекарственных средств [7]. Синтез новых соединений этого класса продолжается и в настоящее время с целью разработки средств для лечения, в первую очередь, лекарственно-устойчивого туберкулеза [8, 9].

Одним из первых изоникотиноилгидразонов стал изоникотиноилгидразон пиридоксаля (рис. 1), который первоначально позиционировался как перспективное противотуберкулезное средство [10]. Однако в ходе клинических исследований это лекарственное средство вследствие высокого сродства к ионам железа вызывало нарушение обмена веществ, приводящее к избыточному накоплению ионов железа в органах и тканях [11]. Позже были предприняты попытки использовать изоникотиноилгидразон пиридоксаля и его аналоги в терапии атаксии Фрейдриха и других нейродегенеративных заболеваний [12, 13].

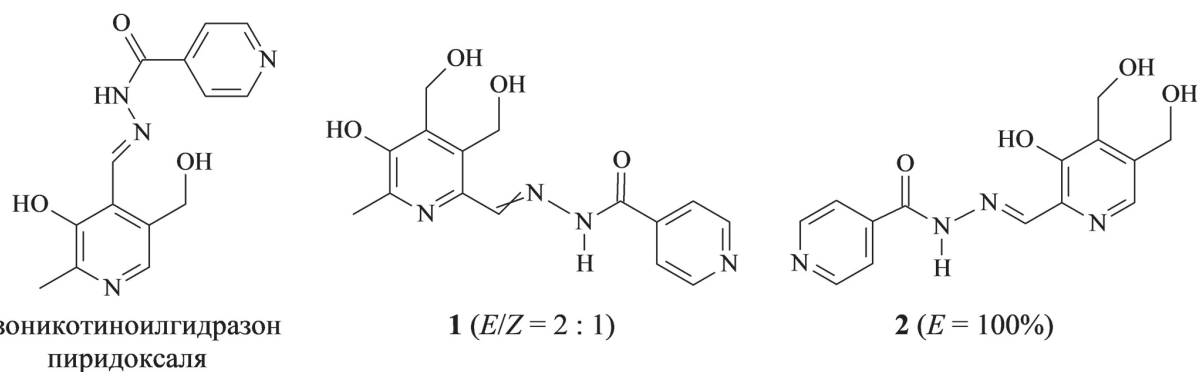


Рис. 1. Структура соединений 1 и 2

Fig. 1. Structure of compounds 1 and 2

В работе [14] показано, что изоникотиноилгидразон 6-карбальдегида пиридоксина 1 обладает высокой активностью в отношении лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. В среде диметилсульфоксида (ДМСО) за счет внутримолекулярной водородной связи $\text{NH}\dots\text{N}_{\text{пир}}$ соединение 1 существует в виде смеси *E/Z*-изомеров в соотношении 2:1. Изоникотиноилгидразон 2-карбальдегида пиридоксина 2 присутствует исключительно в виде *E*-изомера, что обусловлено большей устойчивостью внутримолекулярной водородной связи $\text{OH}\dots\text{N}_{\text{C=N}}$ по сравнению с $\text{NH}\dots\text{N}_{\text{пир}}$. В отсутствие каких-либо стабилизирующих факторов производные пиридоксина, содержащие в пятом положении изоникотиноилгидра-

зоновый фрагмент, также представлены исключительно *E*-изомерами, что согласуется с литературными данными [6, 15].

Поскольку в соответствии с XV фармакопеей [16] исследование фотостабильности фармацевтических субстанций является необходимым этапом в разработке лекарственных средств, в настоящей работе рассмотрена фотохимическая изомеризация противотуберкулезного соединения-лидера **1** и его аналогов.

1. Экспериментальная часть

1.1. Приборы и условия проведения эксперимента. Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C регистрировали на приборе Bruker Avance 400WB (Bruker Corporation, Германия) при рабочих частотах 400.13 и 100.62 МГц на ядрах ^1H и ^{13}C соответственно. В качестве внутреннего стандарта в спектрах ^1H и ^{13}C использовали сигналы трихлорметана ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ и $\delta_{\text{C}} = 77.16$ м.д. соответственно) и ДМСО ($\delta_{\text{H}} = 2.50$ и $\delta_{\text{C}} = 39.52$ м.д. соответственно).

Масс-спектрометрическое детектирование в высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили с помощью масс-спектрометра высокого разрешения TripleTOF 5600 (AB Sciex, Сингапур) в условиях ионизации электростатическим распылением (турбоионный спрей) при энергии столкновения с молекулами азота 10 эВ. Для анализа использовали 1 мкМ растворы веществ в метаноле.

Температуры плавления продуктов определяли на приборе Stanford Research Systems MPA-100 OptiMelt (Stanford Research Systems, США). Хроматографическую очистку полученных соединений проводили с использованием колоночной хроматографии на силикагеле Acros (60–200 меш) (Acros Organics, Бельгия). Контроль за ходом реакций и чистотой соединений проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия).

УФ-облучение проводили с помощью ультрафиолетовой кварцевой лампы ОУФк-01 «Солнышко» (мощность 300 Вт; эффективный диапазон облучения 180–270 нм).

Для рентгеноструктурного анализа кристаллов использовали четырехкружный дифрактометр XtaLAB Synergy S (Rigaku, Япония) с детектором HyPix и микрофокусной рентгеновской трубкой PhotonJet (излучение CuK_α ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$)) при температуре 100 К. Полученные данные были проиндексированы и интегрированы с помощью пакета программ CrysAlisPro (Agilent Technologies Ltd, Великобритания). Структуру расшифровывали прямым методом с использованием SHELXT [17] и уточняли методом наименьших квадратов с использованием SHELXL [18]. Изображения сгенерированы с помощью программы Mercury 4.1 [19]. Кристаллы соединений **6** и **11** получали методом медленного испарения из насыщенных растворов в метаноле.

Кристаллографические данные и параметры уточнения соединения **6**: триклинная сингония, пространственная группа *P*-1 (no. 2), $a = 9.1785(5) \text{ \AA}$, $b = 9.4868(5) \text{ \AA}$, $c = 14.4713(5) \text{ \AA}$, $\alpha = 84.017(4)^\circ$, $\beta = 77.365(4)^\circ$, $\gamma = 79.599(4)^\circ$, $V = 1206.61(10) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $T = 100.0(6) \text{ K}$, $\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.763 \text{ мм}^{-1}$, $D_{\text{calc}} = 1.256 \text{ г/см}^3$, 14229 отражений измерено ($6.274^\circ \leq 2\theta \leq 152.784^\circ$), 4864 уникальных отражений ($R_{\text{int}} = 0.0595$, $R_\sigma = 0.0567$). $R_1 = 0.0814$ ($I > 2\sigma(I)$) и $wR_2 = 0.2347$. Идентификатор CCDC: 2403778.

Кристаллографические данные и параметры уточнения соединения **11**: триклинная сингония, пространственная группа *P*-1 (no. 2), $a = 7.8939(2) \text{ \AA}$, $b = 15.3775(5) \text{ \AA}$, $c = 15.9429(5) \text{ \AA}$, $\alpha = 76.214(3)^\circ$, $\beta = 88.968(2)^\circ$, $\gamma = 76.582(3)^\circ$, $V = 1826.80(10) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $T = 99.8(9) \text{ K}$,

$\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.842 \text{ мм}^{-1}$, $D_{\text{calc}} = 1.361 \text{ г/см}^3$, 7409 отражений измерено ($5.712^\circ \leq 2\theta \leq 152.688^\circ$), 7409 уникальных отражений ($R_\sigma = 0.0376$). $R_1 = 0.0626$ ($I > 2\sigma(I)$) и $wR_2 = 0.2010$. Идентификатор CCDC: 2403777.

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Spectrum Two FT-IR (Perkin Elmer Inc., США) с приставкой UATR (Single Reflection Diamond) в диапазоне от 4000 до 450 см^{-1} , с разрешением 4 см^{-1} путем усреднения четырех сканов. Образец помещали на поверхность алмаза и прижимали прессом до достижения максимального поглощения с последующей регистрацией спектра.

Названия соединений даны с использованием программы ChemBioDraw Ultra 13.0 (PerkinElmer Inc., США). Нумерация положения заместителей проведена в соответствии с заместительной номенклатурой пиридоксина.

1.2. Методика синтеза соединений. 9-(Трет-бутоксикарбонил)окси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-6-карбальдегид (**5**) получали из соединения **4** (0.39 г, 1.65 ммоль), которое суспензировали в 10 мл хлороформа, добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (0.40 мл, 1.73 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (0.04 г, 0.33 ммоль). По окончании выделения газа (CO_2), реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 14 ч. Растворитель удаляли в вакууме при температуре не более 25 °С. Остаток очищали колоночной хроматографией (элюент – смесь этилацетата с хлороформом (1 : 2)). Выход составил 0.52 г (93 %), получено белое кристаллическое вещество, т. пл. 129–131 °С (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ , м. д.: 1.50 (с, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.57 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.49 (с, 3H, CH_3), 4.83 (с, 2H, CH_2), 5.31 (с, 2H, CH_2), 10.06 (с, 1H, CHO). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ , м. д.: 18.97 (CH_3), 23.75 (CH_3), 27.66 (CH_3), 58.65 (CH_2), 60.62 (CH_2), 85.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.79 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 137.48, 142.23, 145.09, 145.78, 150.05, 150.51 ($\text{C}_{\text{ар}} + \text{C}=\text{O}$), 195.10 ($\text{HC}=\text{O}$) (рис. ДМ1). Масс-спектр высокого разрешения (рис. ДМ2): найдено m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.1607, рассчитано для $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_6$ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.1598.

(E)–Изоникотиноилгидразон 9-(трет-бутоксикарбонил)окси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-6-карбальдегида (**6**) получали следующим образом.

В 10 мл метанола растворяли соединение **5** (0.22 г, 0.65 ммоль) и изониазид (0.09 г, 0.65 ммоль), после чего реакционную смесь перемешивали 12 ч при 25 °С. Выпавшие кристаллы (0.16 г) отделяли и промывали 5 мл холодного метанола. Колоночной хроматографией (элюент – этилацетат) из маточного раствора выделено еще 0.06 г продукта. Выход составил 0.22 г (73 %), получено белое кристаллическое вещество, т.пл. 173–175 °С (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) конформер № 1, δ , м. д.: 1.27 (с, 6H, 2CH_3), 1.45 (с, 9H, 3CH_3), 2.28 (с, 3H, CH_3), 4.52 (с, 2H, CH_2), 4.64 (с, 2H, CH_2), 7.59 (д, AA' часть AA'XX' системы, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Гц}$), 8.14 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.70 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Гц}$), 12.25 (с, 1H, NH). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) конформер № 2, δ , м. д.: 1.49 (с, 6H, 2CH_3), 1.51 (с, 9H, 3CH_3), 2.33 (с, 3H, CH_3), 4.76 (с, 2H, CH_2), 5.23 (с, 2H, CH_2), 7.84 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.7 \text{ Гц}$), 8.53 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.81 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.7 \text{ Гц}$), 12.25 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (100 МГц, CDCl_3) смесь конформеров, δ , м. д.: 18.86 (CH_3), 23.65 (CH_3), 23.83 (CH_3), 27.69 (CH_3), 58.81 (CH_2), 58.88 (CH_2), 61.61 (CH_2), 61.99 (CH_2), 85.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.60 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 102.74 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 121.22, 122.99, 134.34, 135.48, 141.07, 141.80, 142.85, 145.22, 145.28, 147.17, 149.61, 149.88, 150.51, 150.59, 150.86 ($\text{C}_{\text{ар}} + 2\text{C}=\text{N}$), 166.79 ($\text{C}=\text{O}$), 166.91 ($\text{C}=\text{O}$) (рис. ДМ3). Масс-спектр высокого разрешения (рис. ДМ4): найдено m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457.2087, рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6$

m/z $[M+H]^+$ 457.2082. ИК $\nu_{\max}$ = 2986, 2938, 1754, 1692, 1604, 1551, 1497, 1410, 1386, 1273, 1257, 1219, 1145, 1098, 870, 686 cm^{-1} (рис. ДМ5).

(Z)–изоникотиноилгидразон 9-(*трет*-бутоксикарбонил)окси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-6-карбальдегид (7) получали из соединения 6 (0.30 г, 0.66 ммоль), которое растворяли в 10 мл хлороформа и выдерживали при 25 °С в течение 24 ч под действием УФ-облучения (180–270 нм). Затем растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией (элюент – этилацетат). Выход составил 0.12 г (30 %), получено бесцветное маслообразное вещество. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ , м. д.: 1.52 (с, 6H, 2CH_3), 1.58 (с, 9H, 3CH_3), 2.50 (с, 3H, CH_3), 4.85 (с, 2H, CH_2), 5.17 (с, 2H, CH_2), 7.65 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 7.81 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Гц), 8.81 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Гц), 15.73 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ , м. д.: 19.29 (CH_3), 23.66 (CH_3), 27.68 (CH_3), 58.80 (CH_2), 59.94 (CH_2), 85.55 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 103.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 121.49, 134.85, 135.45, 140.86, 142.84, 143.15, 144.99, 148.45, 150.20, 150.87 ($\text{C}_{\text{ар}} + \text{C}=\text{N}$), 163.20 ($\text{C}=\text{O}$) (рис. ДМ6). Масс-спектр высокого разрешения (рис. ДМ7): найдено m/z $[M+H]^+$ 457.2087, рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6$ m/z $[M+H]^+$ 457.2082. ИК $\nu_{\max}$ = 2985, 1756, 1688, 1598, 1555, 1480, 1407, 1369, 1272, 1261, 1211, 1143, 1098, 899, 688 cm^{-1} (рис. ДМ8).

Для получения (E)–изоникотиноилгидразона 9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-6-карбальдегида (8) в 10 мл метанола растворяли соединение 4 (0.24 г, 1.01 ммоль) и изониазид (0.14 г, 1.01 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 8 ч при 25 °С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 5 мл метанола и высушивали в вакууме. Выход составил 0.32 г (90 %), получено желтое кристаллическое вещество, т. пл. 158–161 °С (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) конформер № 1, δ , м. д.: 1.44 (с, 6H, 2CH_3), 2.40 (с, 3H, CH_3), 4.86 (с, 2H, CH_2), 5.19 (с, 2H, CH_2), 7.82 (дд, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Гц, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Гц), 8.47 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.79 (дд, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Гц, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Гц), 9.39 (с, 1H, OH), 12.03 (с, 1H, NH). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) конформер № 2, δ , м. д.: 1.27 (с, 6H, 2CH_3), 2.35 (с, 3H, CH_3), 4.50 (с, 2H, CH_2), 4.74 (с, 2H, CH_2), 7.58 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Гц), 8.08 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.69 (дд, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Гц, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Гц), 9.39 (с, 1H, OH), 12.05 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (100 МГц, $\text{DMSO}-d_6$), смесь конформеров, δ , м. д.: 19.31 (CH_3), 19.47 (CH_3), 23.52 (CH_3), 23.71 (CH_3), 58.69 (CH_2), 58.83 (CH_2), 60.85 (CH_2), 61.22 (CH_2), 101.57 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 101.78 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 121.60, 122.36, 133.27, 134.09, 135.12, 139.43, 139.55, 140.48, 142.57, 143.94, 144.25, 147.21, 147.72, 147.99, 149.47, 150.42, 151.78 ($\text{C}_{\text{ар}} + \text{C}=\text{N}$), 161.64 ($\text{C}=\text{O}$), 168.83 ($\text{C}=\text{O}$) (рис. ДМ9). Масс-спектр высокого разрешения: найдено m/z $[M+H]^+$ 357.1567, рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$ m/z $[M+H]^+$ 357.1557 (рис. ДМ10). ИК $\nu_{\max}$ = 2991, 1666, 1555, 1416, 1374, 1320, 1283, 1213, 1148, 1111, 1081, 888, 695 cm^{-1} (рис. ДМ11).

(Z)–Изоникотиноилгидразон 9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-6-карбальдегид (9) получали выдерживанием соединения 8 (0.10 г, 0.28 ммоль) при 25 °С в течение 50 часов под действием УФ-облучения (180–270 нм) в метаноле (10 мл). Реакционную смесь высушивали в вакууме при 20–25 °С. Выход составил 0.10 г (100 %), получено светло-зеленое кристаллическое вещество, т. пл. 222–225 °С (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ , м. д.: 1.44 (с, 6H, 2CH_3), 2.48 (с, 3H, CH_3), 4.87 (с, 2H, CH_2), 5.16 (с, 2H, CH_2), 7.70 (с, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 7.80 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Гц), 8.84 (д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Гц), 10.02 (уш. с., 1H, OH), 15.92 (с, 1H, NH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (100 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ , м. д.: 19.45 (с, CH_3), 23.54 (с, CH_3), 58.60 (с, CH_2), 59.24 (с, CH_2), 102.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 121.10, 135.62, 135.96,

136.45, 138.80, 140.72, 142.83, 148.59, 150.81 ($C_{ap} + C=N$), 161.75 ($C=O$) (рис. ДМ12). Масс-спектр высокого разрешения (рис. ДМ13): найдено m/z $[M+H]^+$ 357.1564, рассчитано для $C_{18}H_{21}N_4O_4$ m/z $[M+H]^+$ 357.1557. ИК $\nu_{max} = 2908, 1683, 1594, 1553, 1488, 1420, 1398, 1282, 1252, 1219, 1163, 1090, 851, 685 \text{ см}^{-1}$ (рис. ДМ14).

(*E*)-Изоникотиноилгидразон 9-гидрокси-3,3-диметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксипино[5,6-с]пиридин-2-карбальдегид (**11**) получали следующим образом. К раствору соединения **10** (0.06 г, 0.26 ммоль) в метаноле (3 мл) добавляли изониазид (0.04 г, 0.26 ммоль) и перемешивали 12 ч при 25 °С, затем охлаждали до 4–6 °С и выдерживали при этой температуре в течение 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 1 мл холодного метанола и высушивали в вакууме. Выход составил 0.07 г (79 %), получено желтое кристаллическое вещество, т. пл. 200–205 °С. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ , м. д.: 1.44 (с, 6H, $2CH_3$), 4.84 (с, 2H, CH_2), 4.93 (с, 2H, CH_2), 7.85 (д, 2H, $^3J_{HH} = 5.7 \text{ Гц}$), 8.02 (с, 1H, CH_{ap}), 8.61 (с, 1H, $CH=N$), 8.83 (д, 2H, $^3J_{HH} = 5.5 \text{ Гц}$), 11.91 (с, 1H, OH), 12.66 (с, 1H, NH). $^{13}C\{^1H\}$ ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6) δ , м. д.: 23.56 (CH_3), 58.06 (CH_2), 60.99 (CH_2), 102.30 ($C(CH_3)_2$), 121.53, 134.24, 134.27, 134.31, 136.91, 139.17, 139.38, 150.56, 151.40, 151.43 ($C_{ap} + C=N$), 161.61 ($C=O$) (рис. ДМ15). Масс-спектр высокого разрешения (рис. ДМ16): найдено m/z $[M+H]^+$ 343.1406, рассчитано для $C_{17}H_{19}N_4O_4$ m/z $[M+H]^+$ 343.1401. ИК $\nu_{max} = 3446, 3147, 2981, 1643, 1602, 1553, 1480, 1409, 1371, 1281, 1221, 1156, 1088, 885, 685 \text{ см}^{-1}$ (рис. ДМ17).

2. Результаты и их обсуждение

На начальном этапе исследований была предпринята попытка провести изомеризацию изоникотиноилгидразонов по шестому и второму положениям пиридоксина (соединения **1** и **2** соответственно) [14] под действием УФ-облучения в метаноле. Однако в обоих случаях наблюдалось существенное осмоление реакционной смеси. Причиной этого, по-видимому, является образование *орто*-хинонметидов, известных своей высокой, а зачастую неконтролируемой, реакционной способностью [20]. Поэтому во всех последующих экспериментах использованы производные пиридоксина, в которых гидроксильные группы защищены кетальной или *трет*-бутоксикарбонильной группами.

Реакцией 6-карбальдегида **4** [21] с ди-*трет*-бутилдикарбонатом в присутствии 4-диметиламинопиридина получен альдегид **5** (схема 1). Последующая конденсация с изониазидом в метаноле при комнатной температуре позволила получить изоникотиноилгидразон **6** исключительно в виде *E*-изомера. Структура полученного продукта подтверждается данными рентгеноструктурного анализа (рис. 2).

Длительное выдерживание изоникотиноилгидразона **6** в хлороформе под действием УФ-облучения привело к получению смеси *E/Z*-изомеров **6** и **7** в соотношении 1 : 1, которые удалось выделить в индивидуальном виде колоночной хроматографией. В спектре ЯМР 1H химические сдвиги амидных протонов проявляются в характерных для этого класса соединений областях: для *Z*-изомера синглет находится в более слабых полях (15.56 м. д.) (рис. ДМ18), а для *E*-изомера – в более сильных (12.25 м. д.). Длительное выдерживание (около 2 месяцев) *Z*-изомера **7** в растворе ДМСО- d_6 при комнатной температуре приводило к обратной изомеризации в термодинамически более стабильный *E*-изомер **6**.

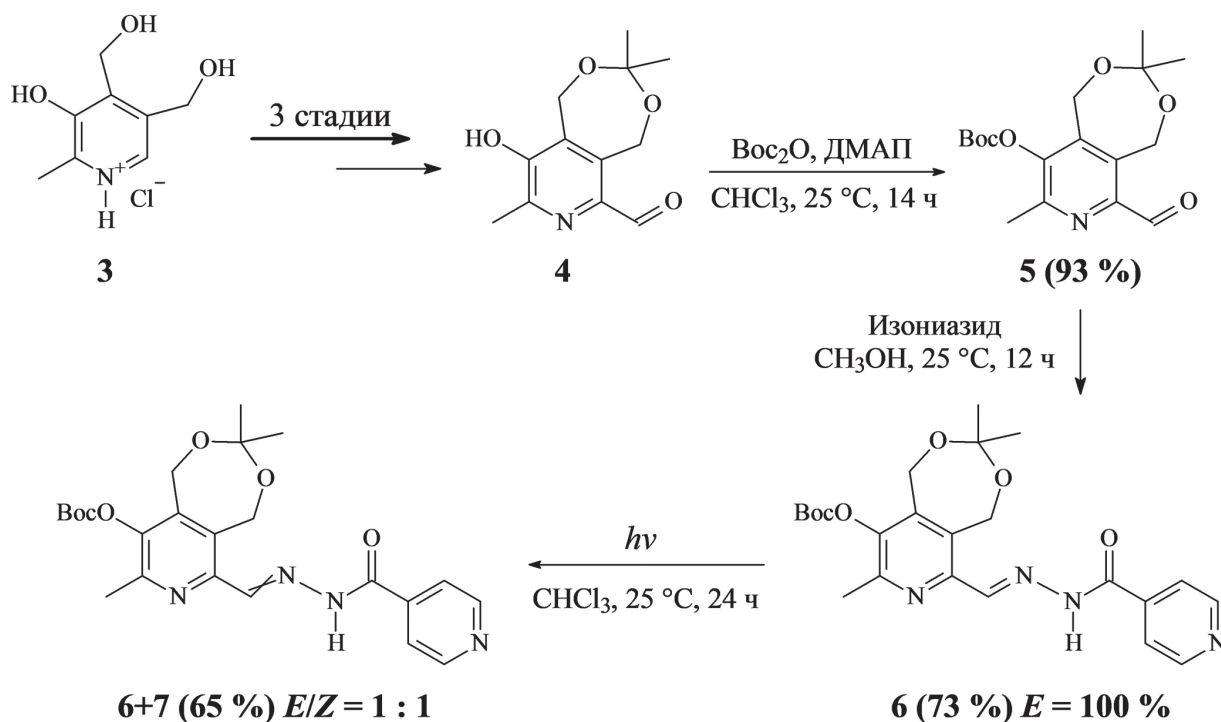


Схема 1. Синтез изоникотиноилгидразонов 6 и 7

Scheme 1. Synthesis of isonicotinoyl hydrazones 6 and 7

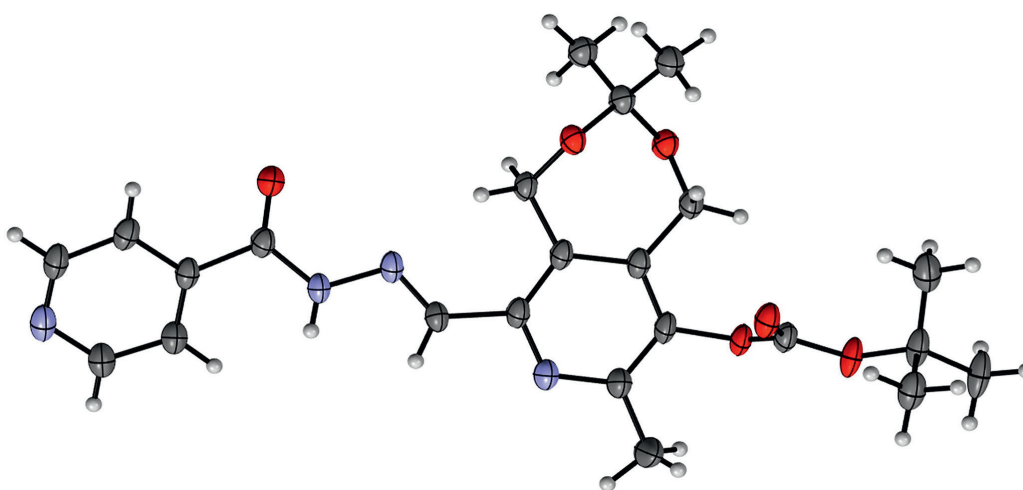


Рис. 2. ORTEP изображение соединения 6. Эллипсоиды тепловых колебаний приведены при 50 %. Атомы С представлены серым, О – красным и N – голубым цветами

Fig. 2. ORTEP image of compound 6. Thermal ellipsoids are shown at 50 % probability level. C, O, and N atoms are colored gray, red, and blue, respectively

Также был синтезирован изоникотиноилгидразон **8**, в котором ароматическая гидроксигруппа оставалась открытой, а гидроксиметильные группы были защищены с помощью семичленного кетального цикла. Выделенное исключительно в виде *E*-изомера соединение **8** под действием УФ-облучения переходит в *Z*-изомер **9**, что доказывается смещением сигнала NH-группы в слабые поля ЯМР-спектра (15.92 м.д.). Выдерживание соединения **9** при комнатной температуре в растворе ДМСО- d_6 в течение 2 месяцев приводило к обратной изомеризации в более стабильный *E*-изомер **8** (схема 2). Следует отметить, что в ЯМР ^1H

спектрах *E*-изомеров **6** и **8** наблюдалось удвоение сигналов, обусловленное медленным в шкале ЯМР обменом протонов из-за заторможенного вращения вокруг амидной связи, что характерно для подобных структур [22, 23].

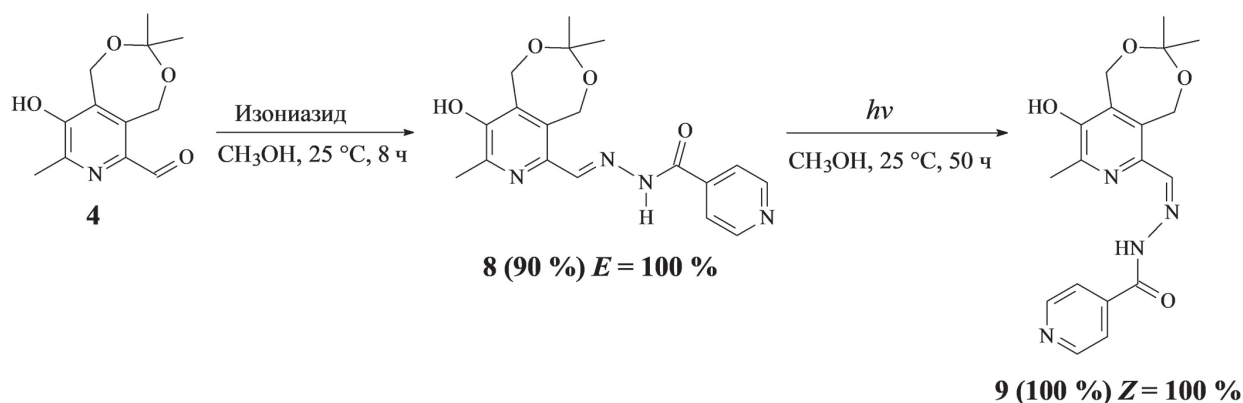


Схема 2. Синтез изоникотиноилгидразонов **8** и **9**

Scheme 2. Synthesis of isonicotinoyl hydrazones **8** and **9**

В отличие от изоникотиноилгидразонов по шестому положению пиридоксина, изоникотиноилгидразон **11**, синтезированный из альдегида **10** [24] (схема 3), оказался устойчивым к фотоизомеризации.

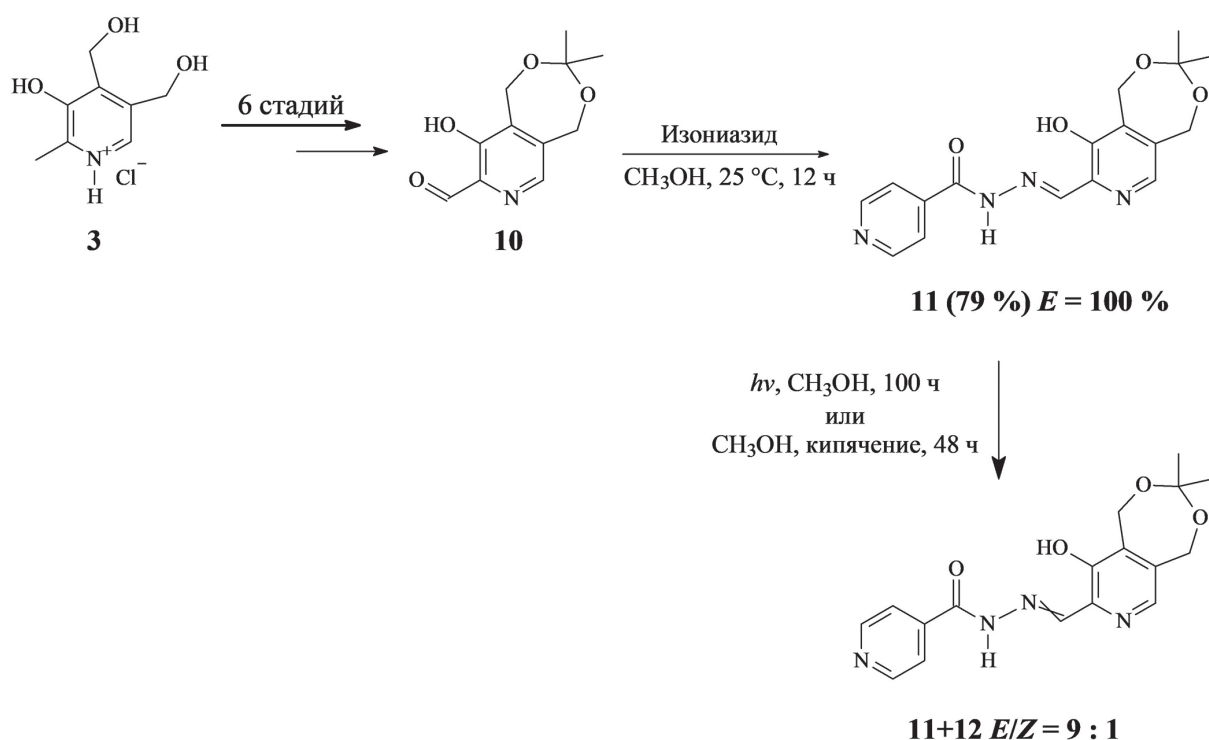


Схема 3. Синтез изоникотиноилгидразона **11**

Scheme 3. Synthesis of isonicotinoyl hydrazone **11**

Первоначально выделенный в виде *E*-изомера гидразон **11** даже по прошествии 100 ч УФ-облучения при комнатной температуре изомеризовался всего лишь на 10 %. Аналогичный результат был получен и при длительном кипячении в метаноле. Структура гидразона **11** по данным рентгеноструктурного анализа представлена на рис. 3. Образование ответственной за устойчивость к УФ-облучению внутримолекулярной водородной связи

типа $\text{OH}\cdots\text{N}_{\text{C}=\text{N}}$, подтверждается как смещением химического сдвига ароматической гидроксильной группы гидразона **11** в более слабые поля спектра ^1H ЯМР (12.66 м.д.), так и коротким расстоянием между атомом водорода гидроксильной группы и атомом азота связи $\text{C}=\text{N}$ (1.904 Å).

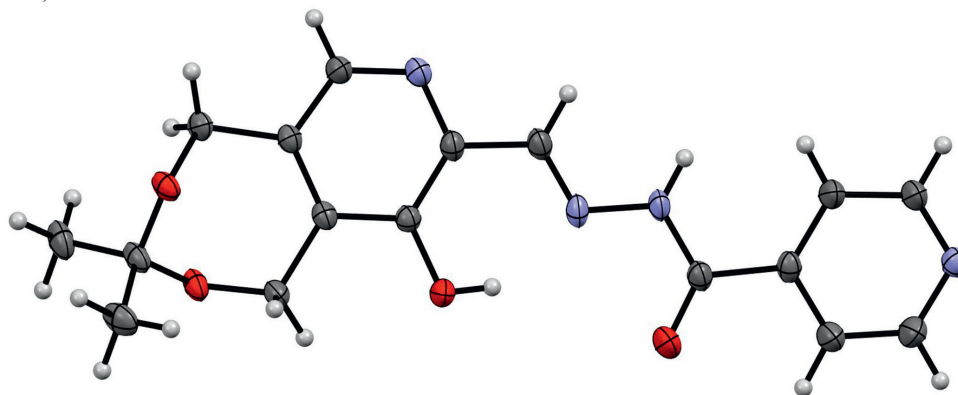


Рис. 3. ORTEP изображение соединения **11**. Эллипсоиды тепловых колебаний приведены при 50 %. Атомы С представлены серым, О – красным и N – голубым цветами. Молекулы растворителя и вторая независимая молекула не показаны для ясности

Fig. 3. ORTEP image of compound **11**. Thermal ellipsoids are shown at 50 % probability level. C, O, and N atoms are colored gray, red, and blue, respectively. Solvent molecules and the second independent molecule are omitted for clarity

Заключение

Таким образом, синтезированы и охарактеризованы физико-химическими методами новые производные пиридоксина, содержащие во втором и шестом положениях изоникотиноилгидразоновые фрагменты. Для ряда соединений под действием УФ-облучения показана возможность фотохимической изомеризации из термодинамически более устойчивого *E*-изомера в *Z*-, что необходимо учитывать при оценке их биологической активности и стабильности при длительном хранении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Socea L.-I., Barbuceanu S.-F., Pahontu E.M., Dumitru A.-C., Nitulescu G.M., Sfetea R.C., Apostol T.-V. Acylhydrazones and their biological activity: A review // *Molecules*. 2022. V. 27, No 24. Art. 8719. <https://doi.org/10.3390/molecules27248719>.
2. Jabeen M. A comprehensive review on analytical applications of hydrazone derivatives // *J. Turk. Chem. Soc., Sect. A*. 2022. V. 9, No 3. P. 663–698. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1020357>.
3. Lv Y., Meng J., Li C., Wang X., Ye Y., Sun K. Update on the synthesis of N-heterocycles via cyclization of hydrazones (2017–2021) // *Adv. Synth. Catal.* 2021. V. 363, No 23. P. 5235–5265. <https://doi.org/10.1002/adsc.202101184>.
4. Shao B., Aprahamian I. Hydrazones as new molecular tools // *Chem*. 2020. V. 6, No 9. P. 2162–2173. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.08.007>.
5. Su X., Aprahamian I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43, No 6. P. 1963–1981. <https://doi.org/10.1039/C3CS60385G>.

6. Palla G., Predieri G., Domiano P., Vignali C., Turner W. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-aroylehydrazones // *Tetrahedron*. 1986. V. 42, No 13. P. 3649–3654. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87332-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87332-4).
7. Шукина М.Н., Першин Г.Н., Сазонова Е.Д., Макеева О.О. Ароматические изоникотиноилгидразоны – новый класс химиотерапевтических противотуберкулезных веществ // *Проблемы туберкулеза*. 1954. № 2. С. 44–50.
8. Ridahunlang N., Bisht R., Rishanlang N. Isoniazid derivatives as anti-tubercular agents: From structural design to clinical investigations // *Infect. Disord.: Drug Targets*. 2023. V. 23, No 3. P. 44–68. <https://doi.org/10.2174/1871526522666221004152324>.
9. Hu Y.-Q., Zhang S., Zhao F., Gao C., Feng L.-S., Lv Z.-S., Xu Z., Wu X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity // *Eur. J. Med. Chem*. 2017. V. 133. P. 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002>.
10. Sah P.P.T. Nicotiny and isonicotiny hydrazones of pyridoxal // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76, No 1. P. 300. <https://doi.org/10.1021/ja01630a096>.
11. Poňka P., Borová J., Neuwirt J., Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes: Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent // *FEBS Lett*. 1979. V. 97, No 2. P. 317–321. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80111-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80111-8).
12. Lim C.K., Kalinowski D.S., Richardson D.R. Protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in Friedreich's ataxia fibroblasts using novel iron chelators of the 2-pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class // *Mol. Pharmacol*. 2008. V. 74, No 1. P. 225–235. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046847>.
13. Singh Y.P., Pandey A., Vishwakarma S., Modi G. A review on iron chelators as potential therapeutic agents for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Mol. Diversity*. 2019. V. 23, No 2. P. 509–526. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9878-4>.
14. Shtyrlin N.V., Khaziev R.M., Shtyrlin V.G., Gilyazetdinov E.M., Agafonova M.N., Usachev K.S., Islamov D.R., Klimovitskii A.E., Vinogradova T.I., Dogonadze M.Z., Zabolotnykh N.V., Sokolovich E.G., Yablonskiy P.K., Shtyrlin Y.G. Isonicotinoyl hydrazones of pyridoxine derivatives: Synthesis and antimycobacterial activity // *Med. Chem. Res*. 2021. V. 30, No 4. P. 952–963. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02705-w>.
15. Bartolić M., Matošević A., Maraković N., Bušić V., Roca S., Vikić-Topić D., Sabljic A., Bosak A., Gašo-Sokač D. Evaluation of hydrazone and N-acylhydrazone derivatives of vitamin B6 and pyridine-4-carbaldehyde as potential drugs against Alzheimer's disease // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2024. V. 39. No 1. Art. 2431832. <https://doi.org/10.1080/14756366.2024.2431832>.
16. ОФС.1.1.0029. Определение фотостабильности лекарственных средств // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. Т. 1. С. 412–421.
17. Sheldrick G.M. *SHELXT* – integrated space-group and crystal-structure determination // *Acta Crystallogr., Sect. A*. 2015. V. 71, Pt. 1. P. 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
18. Sheldrick G.M. A short history of *SHELX* // *Acta Crystallogr., Sect. A*. 2007. V. 64, Pt. 1. P. 112–122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
19. Macrae C.F., Edgington P.R., McCabe P., Pidcock E., Shields G.P., Taylor R., Towler M., Van De Streek J. Visualization and analysis of crystal structures // *J. Appl. Crystallogr*. 2006. V. 39. P. 453–457. <https://doi.org/10.1107/S002188980600731X>.
20. Brousmiche D.W., Wan P. Photogeneration of quinone methide-type intermediates from pyridoxine and derivatives // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2002. V. 149, Nos 1–3. P. 71–81. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00654-2](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00654-2).
21. Shtyrlin N.V., Lodochnikova O.A., Shtyrlin Y.G. Regioisomeric oximes and thiosemicarbazones derived from 6-substituted pyridoxines // *Mendeleev Commun*. 2012. V. 22, No 3. P. 169–170. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2012.05.021>.

22. Aarjane M., Slassi S., Amine A. Novel series of N-acylhydrazone based on acridone: Synthesis, conformational and theoretical studies // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1225, Art. 129079. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129079>.
23. Syakaev V.V., Podyachev S.N., Buzykin B.I., Latypov S.K., Habicher W.D., Kononov A.I. NMR study of conformation and isomerization of aryl- and heteroarylaldehyde 4-tert-butylphenoxyacetylhydrazones // *J. Mol. Struct.* 2006. V. 788, Nos 1–3. P. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.11.018>.
24. Agrawal K.C., Clayman S., Sartorelli A.C. Synthesis of site-directed chelating agents II: 2-Formyl-3-hydroxy-4,5-bis (hydroxymethyl) pyridine thiosemicarbazone // *J. Pharm. Sci.* 1976. V. 65, No 2. P. 297–300. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650231>.

References

1. Socea L.-I., Barbuceanu S.-F., Pahontu E.M., Dumitru A.-C., Nitulescu G.M., Sfetea R.C., Apostol T.-V. Acylhydrazones and their biological activity: A review. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 24, art. 8719. <https://doi.org/10.3390/molecules27248719>.
2. Jabeen M. A comprehensive review on analytical applications of hydrazone derivatives. *J. Turk. Chem. Soc., Sect. A*, 2022, vol. 9, no. 3, pp. 663–698. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1020357>.
3. Lv Y., Meng J., Li C., Wang X., Ye Y., Sun K. Update on the synthesis of N-heterocycles via cyclization of hydrazones (2017–2021). *Adv. Synth. Catal.*, 2021, vol. 363, no. 23, pp. 5235–5265. <https://doi.org/10.1002/adsc.202101184>.
4. Shao B., Aprahamian I. Hydrazones as new molecular tools. *Chem*, 2020, vol. 6, no. 9, pp. 2162–2173. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.08.007>.
5. Su X., Aprahamian I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, vol. 43, no. 6, pp. 1963–1981. <https://doi.org/10.1039/C3CS60385G>.
6. Palla G., Predieri G., Domiano P., Vignali C., Turner W. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-aroylehydrazones. *Tetrahedron*, 1986, vol. 42, no. 13, pp. 3649–3654. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87332-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87332-4).
7. Shchukina M.N., Pershin G.N., Sazonova E.D., Makeeva O.O. Aromatic isonicotinoyl hydrazones, a new class of chemotherapeutic anti-tuberculosis substances. *Probl. Tuberk.*, 1954, no. 2, pp. 44–50. (In Russian)
8. Ridahunlang N., Bisht R., Rishanlang N. Isoniazid derivatives as anti-tubercular agents: From structural design to clinical investigations. *Infect. Disord.: Drug Targets*, 2023, vol. 23, no. 3, pp. 44–68. <https://doi.org/10.2174/1871526522666221004152324>.
9. Hu Y.-Q., Zhang S., Zhao F., Gao C., Feng L.-S., Lv Z.-S., Xu Z., Wu X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, vol. 133, pp. 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002>.
10. Sah P.P.T. Nicotinyl and isonicotinyl hydrazones of pyridoxal. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, vol. 76, no. 1, p. 300. <https://doi.org/10.1021/ja01630a096>.
11. Poňka P., Borová J., Neuwirt J., Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes: Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett.*, 1979, vol. 97, no. 2, pp. 317–321. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80111-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80111-8).
12. Lim C.K., Kalinowski D.S., Richardson D.R. Protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in Friedreich's ataxia fibroblasts using novel iron chelators of the 2-pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class. *Mol. Pharmacol.*, 2008, vol. 74, no. 1, pp. 225–235. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046847>.
13. Singh Y.P., Pandey A., Vishwakarma S., Modi G. A review on iron chelators as potential therapeutic agents for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Diversity*, 2019, vol. 23, no. 2, pp. 509–526. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9878-4>.

14. Shtyrlyn N.V., Khaziev R.M., Shtyrlyn V.G., Gilyazetdinov E.M., Agafonova M.N., Usachev K.S., Islamov D.R., Klimovitskii A.E., Vinogradova T.I., Dogonadze M.Z., Zabolotnykh N.V., Sokolovich E.G., Yablonskiy P.K., Shtyrlyn Y.G. Isonicotinoyl hydrazones of pyridoxine derivatives: Synthesis and antimycobacterial activity. *Med. Chem. Res.*, 2021, vol. 30, no. 4, pp. 952–963. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02705-w>.
15. Bartolić M, Matošević A, Maraković N, Bušić V, Roca S, Vikić-Topić D, Sabljic A, Bosak A, Gašo-Sokač D. Evaluation of hydrazone and N-acylhydrazone derivatives of vitamin B6 and pyridine-4-carbaldehyde as potential drugs against Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2024, vol. 39, no. 1, art. 2431832. <https://doi.org/10.1080/14756366.2024.2431832>.
16. GPM.1.1.0029. Photostability testing of medicinal products. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV ed. Vol. 1. Moscow, Minist. Zdravookhr. Ross. Fed., 2023, pp. 412–421. (In Russian)
17. Sheldrick G.M. *SHELXT* – integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. A*, 2015, vol. 71, pt. 1, pp. 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
18. Sheldrick G.M. A short history of *SHELX*. *Acta Crystallogr., Sect. A*, 2007, vol. 64, pt. 1, pp. 112–122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
19. Macrae C.F., Edgington P.R., McCabe P., Pidcock E., Shields G.P., Taylor R., Towler M., Van De Streek J. Visualization and analysis of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, vol. 39, pp. 453–457. <https://doi.org/10.1107/S002188980600731X>.
20. Brousmiche D.W., Wan P. Photogeneration of quinone methide-type intermediates from pyridoxine and derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2002, vol. 149, nos. 1–3, pp. 71–81. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00654-2](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00654-2).
21. Shtyrlyn N.V., Lodochnikova O.A., Shtyrlyn Y.G. Regioisomeric oximes and thiosemicarbazones derived from 6-substituted pyridoxines. *Mendeleev Commun.*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 169–170. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2012.05.021>.
22. Aarjane M., Slassi S., Amine A. Novel series of N-acylhydrazone based on acridone: Synthesis, conformational and theoretical studies. *J. Mol. Struct.*, 2021, vol. 1225, art. 129079. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129079>.
23. Syakaev V.V., Podyachev S.N., Buzykin B.I., Latypov S.K., Habicher W.D., Konovalov A.I. NMR study of conformation and isomerization of aryl- and heteroarylaldehyde 4-tert-butylphenoxyacetylhydrazones. *J. Mol. Struct.*, 2006, vol. 788, nos. 1–3, pp. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.11.018>.
24. Agrawal K.C., Clayman S., Sartorelli A.C. Synthesis of site-directed chelating agents II: 2-Formyl-3-hydroxy-4,5-bis (hydroxymethyl) pyridine thiosemicarbazone. *J. Pharm. Sci.*, 1976, vol. 65, no. 2, pp. 297–300. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650231>.

Информация об авторах

Никита Валерьевич Штырлин, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: Nikita.Shtyrlyn@kpfu.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7926-5121>

Раиль Маратович Хазиев, кандидат химических наук, научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: RMHaziev@kpfu.ru

Даут Ринатович Исламов, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ Казанский научный центр РАН

E-mail: daut1989@mail.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Юрий Григорьевич Штырлин, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: *Yurii.Shtyrlin@kpfu.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2777-719X>

Author Information

Nikita V. Shtyrlin, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Scientific and Educational Center for Pharmacy, Kazan Federal University

E-mail: *Nikita.Shtyrlin@kpfu.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7926-5121>

Rail M. Khaziev, Cand. Sci. (Chemistry), Researcher, Scientific and Educational Center for Pharmacy, Kazan Federal University

E-mail: *RMHaziev@kpfu.ru*

Daut R. Islamov, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory for Structural Analysis of Biomacromolecules, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences

E-mail: *daut1989@mail.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Yurii G. Shtyrlin, Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher, Scientific and Educational Center for Pharmacy, Kazan Federal University

E-mail: *Yurii.Shtyrlin@kpfu.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2777-719X>

Поступила в редакцию 29.11.2024

Принята к публикации 01.02.2025

Received November 29, 2024

Accepted February 1, 2025

Оригинальная статья

УДК 548.312+57.088

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>**Применение контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для улучшения пространственного разрешения рефлексов на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus*****Д.Р. Исламов¹, А.Д. Биктимиров¹, Э.А. Клочкова¹, К.С. Усачев^{1,2}✉**¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия²Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский Институт», г. Москва, Россия✉k.usachev@kpfi.ru**Аннотация**

Получение пространственных структур с высоким разрешением с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) до сих пор сопряжено со значительными трудностями при использовании лабораторных монокристалльных дифрактометров, оснащенных современными конфокальными многослойными оптиками, которые характеризуются высокой светимостью и малым диаметром рентгеновского пучка (≤ 100 мкм). С увеличением размеров элементарной ячейки расстояние между отражениями на дифракционной картине сокращается, что приводит к их наложению и перекрытию. Для минимизации перекрытия и выделения отражений в виде отдельных пиков традиционно увеличивают расстояние от кристалла до детектора. Однако такой подход не всегда приводит к успешному разделению из-за расхождения рентгеновского пучка. Одной из возможностей решения этой проблемы является оптимизация параметров расходимости пучка в оптическом устройстве источника рентгеновского излучения. На примере кристалла белка Era из *Staphylococcus aureus* с большими параметрами элементарной ячейки ($a = b = 78.1(1)$ Å и $c = 244.9(2)$ Å) показано успешное применение оптимизации выбора параметра расходимости рентгеновского пучка для сбора данных РСА с высоким разрешением.

Ключевые слова: белковая кристаллография, РСА, дифракция рентгеновских лучей, ГТФаза Era.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

Для цитирования: Исламов Д.Р., Биктимиров А.Д., Клочкова Э.А., Усачев К.С. Применение контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для улучшения пространственного разрешения рефлексов на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 268–275. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>

Controlled beam divergence on a laboratory diffractometer to improve spatial resolution of reflections for Era protein crystals from *Staphylococcus aureus*

D.R. Islamov¹, A.D. Biktimirov¹, E.A. Klochkova¹, K.S. Usachev^{1,2}✉

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

✉k.usachev@kpfu.ru

Abstract

Obtaining spatial structures with high resolution by the XRD method is still associated with significant difficulties for laboratory single-crystal diffractometers incorporating modern confocal multilayer optics with high intensity and small X-ray beam diameter ($\leq 100 \mu\text{m}$). As the unit cell size increases, the distance between reflections in the diffraction pattern decreases, which leads to their overlapping. To minimize the overlap and separate reflections as distinct peaks, the distance from the crystal to the detector is traditionally increased. However, this approach is not always successful due to the divergence of the X-ray beam. A potential alternative solution is to optimize the beam divergence parameters in the optical device of the X-ray source. Using an Era protein crystal from *Staphylococcus aureus* with large unit cell parameters ($a = b = 78.1(1) \text{ \AA}$ and $c = 244.9(2) \text{ \AA}$), a successful optimization of the X-ray beam divergence parameter selection for high-resolution XRD data acquisition was demonstrated.

Keywords: protein crystallography, XRD, X-ray diffraction, GTPase Era

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-74-20034).

For citation: Islamov D.R., Biktimirov A.D., Klochkova E.A., Usachev K.S. Controlled beam divergence on a laboratory diffractometer to improve spatial resolution of reflexes for Era protein crystals from *Staphylococcus aureus*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 268–275. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>. (In Russian)

Введение

Рентгеноструктурный анализ (РСА) является одним из самых эффективных методов исследования кристаллических материалов, особенно в области биомолекулярной кристаллографии. Он предоставляет информацию о точной атомной структуре белков, что имеет ключевое значение для понимания их функций, взаимодействий и роли в биологических системах. Однако анализ кристаллов белков с большими параметрами элементарной ячейки представляет особую проблему [1] вследствие наложения рефлексов,

которое может значительно затруднять интерпретацию данных и снижать качество получаемой информации.

Наложение рефлексов возникает при перекрывании близко расположенных дифракционных отражений, соответствующих различным кристаллическим плоскостям, что ведет к искажению измеряемых дифракционных интенсивностей. Это наиболее актуально для кристаллов белков с большими параметрами элементарной ячейки, которые, как правило, обладают более сложной трехмерной структурой и менее предсказуемыми конформациями, что приводит к недостаточному разрешению рефлексов, а также сложностям при определении электронной плотности и, соответственно, атомных координат [2].

Настоящая работа направлена на решение проблемы наложения рефлексов в РСА кристаллов белков с большими размерами элементарной ячейки на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus*.

Белок Era является гуанозинтрифосфатсвязывающей гидролазой и участвует в сборке и обеспечении стабильности рибосом за счет взаимодействия с рибосомными белками L17, S2 и S10 [3], 16S рРНК и 30S субъединицей [4]. Делеция гена *era* приводит к значительному снижению скорости роста клеток, сопровождающемуся исчезновением полисом, накоплением предшественников 16S rRNA и свободных 30S и 50S рибосомных субъединиц [5]. *In vitro* эксперименты показали, что в присутствии Era увеличивается скорость связывания белков S9, S11, S5, и S12, а также S7, S10, S13, S14, S19 с 3'-концевым домом 16S rRNA [6], однако точный механизм действия данного белка до сих пор остается неизвестным. В настоящее время отсутствуют данные о строении и взаимодействии Era с рибосомой патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* [7–9], что диктует необходимость структурных исследований данного белка методом РСА.

1. Материалы и методы

1.1. Объект исследования, условия роста кристаллов. Образец белка Era из *S. aureus* получали согласно описанной ранее методике [10]. Концентрацию белка доводили до 30 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl буферном растворе с pH 8.0, содержащем 0.8 М NaCl. К объему белка Era, предназначенному для кристаллизационного эксперимента, добавляли нерасщепляемый аналог гуанозинтрифосфата (GppCp, Jena Bioscience, Германия) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Поиск кристаллизационных условий проведен с использованием наборов JBScreen JCSG++ 1–4 (Jena Bioscience, Германия) методом диффузии водяных паров в модификации «висячая капля» при 22 °С в 24-луночных планшетах (Hampton Research, США). Кристаллизационные капли наносили на покровное стекло путем смешивания 1 : 1 по объему (1.25 мкл) раствора с белком Era + GppCp и раствора осадителя из резервуара, и монтировали над резервуаром, содержащим 250 мкл раствора с компонентами, обеспечивающими кристаллизацию (25 % (масс./об.) ПЭГ 3350, 228 мМ цитрат калия, pH 8.3). В результате были обнаружены монокристаллы белка Era.

1.2. Рентгеноструктурный анализ. Сбор данных дифракции рентгеновского излучения проводили на монокристалльном дифрактометре XtaLab Synergy S (Rigaku, Япония) с источником рентгеновского излучения PhotonJet-S [$\lambda(\text{CuK}_\alpha) = 1.54184 \text{ \AA}$] и детектором HyPix-6000HE с размером пикселя 100 мкм. Сбор, редактирование данных и уточнение параметров элементарных ячеек проводили с использованием пакета программы CrysAlisPro (Agilent Technologies Ltd, Великобритания) [11].

2. Результаты и их обсуждение

Полученные кристаллы белка Era визуализированы с использованием поляризационного микроскопа. Для последующих экспериментов выбран ограниченный прозрачный кристалл, не имеющий видимых дефектов и трещин, а также свободный от наростов и налипших мелких кристаллов (рис. 1).



Рис. 1. Полученные кристаллы белка Era. Овалом отмечен кристалл, использованный в дальнейших экспериментах

Fig. 1. Era protein crystals. The crystal used in subsequent experiments is marked by an ellipse

Выбранный монокристалл белка Era с размерами 125 мкм × 130 мкм × 160 мкм был помещен под рентгеновский луч лабораторного монокристалльного дифрактометра XtaLAB SynergyS, оснащенного медным анодом с длиной волны 1.54184 Å, и в результате предварительного эксперимента была получена дифракционная картина (рис. 2).

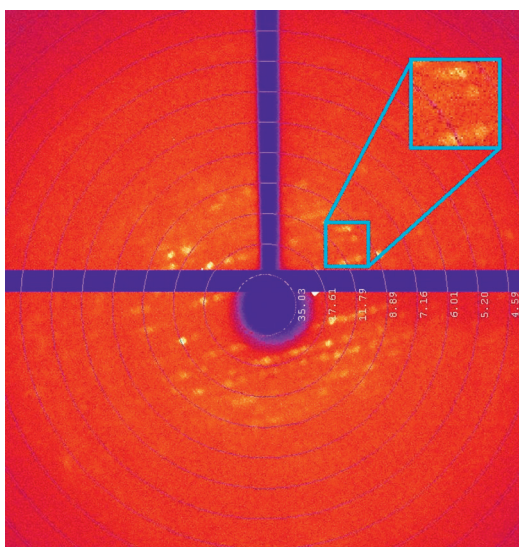


Рис. 2. Дифракционная картина кристалла белка Era

Fig. 2. Diffraction pattern of the Era protein crystal

Анализ дифракционной картины (рис. 2) показывает, что один из параметров элементарной решетки значительно превышает два других. Более того, высокое значение этого параметра приводит к наложению отражений друг на друга. Это, в свою очередь, осложняет точное измерение интенсивностей отдельных отражений, что является необходимым условием для получения карты электронной плотности.

Следует отметить, что в увеличенной области рис. 2 размеры пикселей детектора значительно меньше размеров отражений. Более того, каждое отражение формирует конус с расходимостью. В результате этого увеличение расстояния между образцом и детектором не способствует разделению пиков. Для уменьшения расходимости конуса отражений использована контролируемая дивергенция рентгеновского пучка.

Дивергенция рентгеновского пучка представляет собой угол, под которым рентгеновские лучи расходятся от источника. Уменьшение зазора на источнике рентгеновского излучения повышает параллельность излучения, которое доходит до образца, но при этом снижает интенсивность излучения. Поэтому необходимо определить оптимальный параметр дивергенции рентгеновского пучка для кристалла белка Era. Для этого была проведена серия измерений из семи изображений при различных величинах зазора и одинаковой ориентации кристалла (рис. 3).

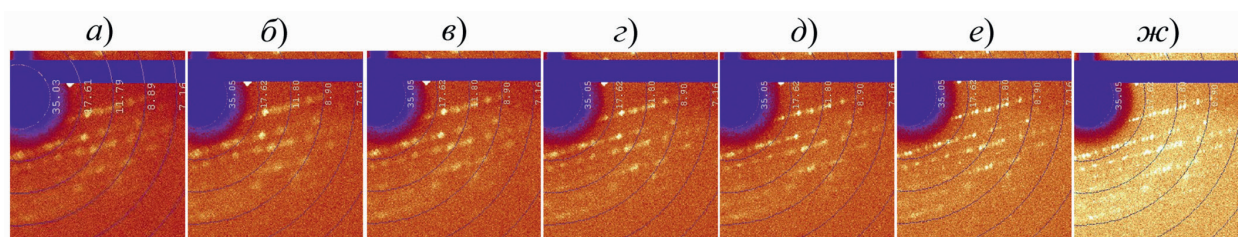


Рис. 3. Дифракционная картина кристалла белка Era при различных значениях дивергенции: а) 10 мрад; б) 8.6 мрад; в) 7.1 мрад; г) 5.3 мрад; д) 4.1 мрад; е) 2.3 мрад; ж) 1.0 мрад

Fig. 3. Diffraction pattern of the Era protein crystal at different divergence values: а) 10 mrad; б) 8.6 mrad; в) 7.1 mrad; г) 5.3 mrad; д) 4.1 mrad; е) 2.3 mrad; ж) 1.0 mrad

Из рис. 3 следует, что уменьшение дивергенции рентгеновского пучка способствует разделению отдельных отражений. Однако снижение дивергенции также приводит к уменьшению интенсивности рентгеновского излучения, что приходится компенсировать увеличением времени экспозиции. Таким образом, параметр дивергенции необходимо подбирать с учетом особенностей конкретного кристалла. В случае кристаллов белка Era оптимальное значение дивергенции для достижения разделения отражений составляет 2.3 мрад.

Корректный выбор экспериментальных параметров позволил получить полный набор дифракционных данных, автоиндексация которых привела к определению примитивной тетрагональной ячейки с параметрами $a = b = 78.1(1) \text{ \AA}$ и $c = 244.9(2) \text{ \AA}$. Следует отметить, что согласно опубликованным результатам РСА [12], белок Era из *E. coli* кристаллизуется в виде димера. Однако полученные нами параметры элементарной ячейки свидетельствуют о том, что в исследуемых кристаллах расположен мономер белка Era в независимой части элементарной ячейки.

Заключение

Проведенное исследование подчеркивает важность оптимизации параметров расходимости рентгеновского пучка для успешного решения задач белковой кристаллографии, особенно при регистрации данных на лабораторных монокристалльных дифрактометрах.

Показано, что правильный выбор параметров расходимости может существенно улучшить качество получаемых дифракционных данных, позволяя эффективно минимизировать наложение отражений и обеспечить их четкое разделение. На примере кристалла белка Era (*Staphylococcus aureus*) с большими параметрами элементарной ячейки подтверждена целесообразность применяемой методологии. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований и оптимизации технологий получения кристаллических структур биомолекул с большими параметрами элементарной ячейки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Meulenbroek E.M., Pannu N.S. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Cockayne syndrome protein A in complex with DNA damage-binding protein 1 // Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun. 2012. V. F68. Pt. 1. P. 45–48. <https://doi.org/10.1107/S1744309111045842>.
2. Timofeev V., Samygina V. Protein crystallography: Achievements and challenges // Crystals. 2023. V. 13, No 1. Art. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.
3. Goyal A., Muthu K., Panneerselvam M., Pole A.K., Ramadas K. Molecular dynamics simulation of the *Staphylococcus aureus* YsxC protein: Molecular insights into ribosome assembly and allosteric inhibition of the protein // J. Mol. Model. 2011. V. 17, No 12. P. 3129–3149. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-0998-3>.
4. Sayed A., Matsuyama S., Inouye M. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 264, No 1. P. 51–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1471>.
5. Inoue K., Alsina J., Chen J.Q., Inouye M. Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2003. V. 48, No 4. P. 1005–1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03475.x>.
6. Bunner A.E., Nord S., Wikström P.M., Williamson J.R. The effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution // J. Mol. Biol. 2010. V. 398, No 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.036>.
7. Stijn Blot R.N., Vandewoude K., Colardyn F. *Staphylococcus aureus* infections // N. Engl. J. Med. 1998. V. 339, No 27. P. 2025–2026. <https://doi.org/10.1056/nejm199812313392716>.
8. Jeljaszewicz J., Mlynarczyk G., Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. V. 16, No 4. P. 473–478. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00289-2).
9. Fierobe L., Decré D., Müller C., Lucet J.-C., Marmuse J.-P., Mantz J., Desmonts J.-M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of postoperative intra-abdominal infection: Relation to nasal colonization // Clin. Infect. Dis. 1999. V. 29, No 5. P. 1231–1238. <https://doi.org/10.1086/313454>.
10. Ключкова Э.А., Исламов Д.Р., Биктимиров А.Д., Рогачев А.В., Валидов Ш.З., Бикмуллин А.Г., Симакин А.В., Петерс Г.С., Юсупов М.М., Усачев К.С. Выделение, очистка и кристаллизация ГТФазы Era из золотистого стафилококка // Кристаллография. 2023. Т. 68, № 2. С. 276–280. <https://doi.org/10.31857/S0023476123010137>.
11. Agilent. CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England. 2014.
12. Chen X., Court D.L., Ji X. Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif // PNAS. 1999. V. 96, No 15. P. 8396–8401. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8396>.

References

1. Meulenbroek E., Pannu N. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Cockayne syndrome protein A in complex with DNA damage-binding protein 1. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.*, 2012, vol. F68, pt. 1, pp. 45–48. <https://doi.org/10.1107/S1744309111045842>.
2. Timofeev V., Samygina V. Protein crystallography: Achievements and challenges. *Crystals*, 2023, vol. 13, no. 1, art. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.
3. Goyal A., Muthu K., Panneerselvam M., Pole A.K., Ramadas K. Molecular dynamics simulation of the *Staphylococcus aureus* YsxC protein: Molecular insights into ribosome assembly and allosteric inhibition of the protein. *J. Mol. Model.*, 2011, vol. 17, no. 12, pp. 3129–3149. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-0998-3>.
4. Sayed A., Matsuyama S., Inouye M. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 264, no. 1 pp. 51–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1471>.
5. Inoue K., Alsina J., Chen J.Q., Inouye M. Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2003, vol. 48, no. 4, pp. 1005–1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03475.x>.
6. Bunner A.E., Nord S., Wikström P.M., Williamson J.R. The effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution. *J. Mol. Biol.*, 2010, vol. 398, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.036>.
7. Stijn Blot R.N., Vandewoude K., Colardyn F. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, 1998, vol. 339, no. 27, pp. 2025–2026. <https://doi.org/10.1056/nejm199812313392716>.
8. Jeljaszewicz J., Mlynarczyk G., Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, vol. 16, no. 4, pp. 473–478. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00289-2).
9. Fierobe L., Decré D., Müller C., Lucet J.-C., Marmuse J.-P., Mantz J., Desmonts J.-M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of postoperative intra-abdominal infection: Relation to nasal colonization. *Clin. Infect. Dis.*, 1999, vol. 29, no. 5, pp. 1231–1238. <https://doi.org/10.1086/313454>.
10. Klochkova E.A., Islamov D.R., Biktimirov A.D., Rogachev A.V., Validov Sh.Z., Bikmullin A.G., Simakin A.V., Peters G.S., Yusupov M.M., Usachev K.S. Extraction, purification, and crystallization of GTPase Era from *Staphylococcus aureus*. *Crystallogr. Rep.*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 288–292. <https://doi.org/10.1134/S1063774523010133>.
11. Agilent. CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England. 2014.
12. Chen X., Court D.L., Ji X. Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *PNAS*, 1999, vol. 96, no. 15, pp. 8396–8401. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8396>.

Информация об авторах

Даут Ринатович Исламов, кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: daut1989@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Артем Дмитриевич Биктимиров, лаборант-исследователь, НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: biktimirov.artiom@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3600-4839>

Эвелина Андреевна Клочкова, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Константин Сергеевич Усачев, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет; заместитель руководителя центра Интегративной структурной биологии, Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский Институт»

E-mail: k.usachev@kpfu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Author Information

Daut R. Islamov, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: daut1989@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Artem D. Biktimirov, Laboratory Research Assistant, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: biktimirov.artiom@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3600-4839>

Evelina A. Klochkova, Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Konstantin S. Usachev, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Leading Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University; Deputy Head of Center for Integrative Structural Biology, Kurchatov Complex of NBICS Nature-Like Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute”

E-mail: k.usachev@kpfu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Поступила в редакцию 05.11.2024

Принята к публикации 27.11.2024

Received November 5, 2024

Accepted November 27, 2024

Оригинальная статья

УДК 591.8+615.275.4

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.276-296>**Ксимедон и его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой при лечении экспериментально вызванного фиброза печени крыс****Г.П. Беляев** ✉, **А.Б. Выштакалюк, А.А. Парфенов, И.В. Галяметдинова, В.Э. Семенов, В.В. Зобов***Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия*✉ gregoir4@gmail.com**Аннотация**

Работа посвящена оценке антифиброзных свойств производного пиримидина ксимедона (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-она) и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой при лечении экспериментального фиброза печени крыс. Фиброз печени моделировали у самок крыс линии Wistar путем перорального введения 5 %-ного масляного раствора CCl_4 в дозе 2 мл/кг два раза в неделю и 5 %-ного этанола через поилки при постоянном доступе на протяжении 8 недель. Затем введение токсикантов отменяли и проводили лечение фиброза ксимедоном в дозе 0.24 мг/кг или его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой в эквимольной дозе 0.5 мг/кг в течение двух или четырех недель. Затем, используя методы окраски гематоксилин–эозином и по Ван-Гизону, проводили гистологическую оценку ткани печени, а также биохимических сывороточных показателей состояния печени. Кроме того, с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа MagPlex рассмотрен цитокиновый профиль печени и сыворотки крови, а также выявлен уровень циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) в печени по данным вестерн-блот-анализа. Показано, что лечение фиброза печени конъюгатом ксимедона с L-аскорбиновой кислотой в течение двух недель способствует более выраженному разрешению фиброза за счет уменьшения площади коллагеновых волокон в ткани печени крыс. Кроме того, конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой приводит к нормализации биохимических показателей крови, маркеров цитокинового профиля, а также уровня ЦОГ-2 по сравнению с группой, получавшей только ксимедон, и контрольной группой.

Ключевые слова: производные пиримидина, ксимедон, фиброз, воспаление, цитокины, циклооксигеназа-2.

Заключение Комитета по этике. Протокол исследования одобрен Комиссией по Биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (Протокол № 24/1 от 4 октября 2024 года).

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».

Для цитирования: Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Ксимедон и его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой при лечении экспериментально вызванного фиброза печени крыс // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 276–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.276-296>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.276-296>

Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid for treating experimentally induced liver fibrosis in rats

G.P. Belyaev ✉, **A.B. Vyshtakalyuk**, **A.A. Parfenov**, **I.V. Galyametdinova**,
V.E. Semenov, **V.V. Zobov**

*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

✉ gregoir4@gmail.com

Abstract

This study evaluates the antifibrotic properties of Xymedon, a pyrimidine derivative (1,2-dihydro-4,6-dimethyl-1-(2-hydroxyethyl)-pyrimidin-2-one), and its conjugate with L-ascorbic acid in a rat model of experimental liver fibrosis. Liver fibrosis was induced in female Wistar rats by oral administration of 5 % oil solution of CCl₄ at a dose of 2 mL/kg twice weekly and 5 % ethanol in drinking water with constant access for 8 weeks. After discontinuing the administration of toxicants, the rats were treated with Xymedon at a dose of 0.24 mg/kg and its conjugate with L-ascorbic acid at an equimolar dose of 0.5 mg/kg for 2 or 4 weeks. Histological evaluation of the liver tissue was performed using hematoxylin–eosin and Van Gieson’s staining. Serum biochemical indicators of liver function were determined. Additionally, the cytokine profile of the liver tissue and serum was examined using the MagPix multiplex immunoassay, and liver COX-2 levels were measured by western blot analysis. The findings demonstrate that the treatment with the conjugate of Xymedon with L-ascorbic acid for 2 weeks significantly promoted fibrosis resolution by reducing the area of collagen fibers in the liver tissue of rats. This treatment also resulted in a more pronounced normalization of blood biochemical parameters, cytokine profile markers, and COX-2 levels compared to Xymedon alone and the untreated control group.

Keywords: pyrimidine derivatives, Xymedon, fibrosis, inflammation, cytokines, cyclooxygenase-2

Institutional Review Board Statement. The animal study protocol was approved by the Bioethics Committee of the FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (protocol code 24/1 dated October 4, 2024).

Acknowledgments. This study was performed as part of the state assignment to the FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Belyaev G.P., Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid for treating experimentally induced liver fibrosis in rats. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 276–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.276-296>. (In Russian)

Введение

Фиброз печени является патологическим состоянием, при котором нормальная ткань печени замещается соединительнотканными волокнами, в том числе коллагеном, что приводит к образованию рубца и дисфункции органа. Развитие фиброза связано с хроническим воспалением и повреждением ткани печени, которое может быть вызвано различными причинами. Прогрессирование фиброза приводит к развитию смертельно опасного цирроза. Цирроз печени, в свою очередь, является основной причиной трансплантации печени в мире. На сегодняшний день не существует эффективных антифиброзных препаратов, которые могли бы не только предотвращать, но и обращать фибротические изменения [1–3].

Одним из ключевых факторов развития фиброза является хроническое воспаление, которое приводит к активации звездчатых клеток печени и образованию избыточного количества волокон внеклеточного матрикса. Поэтому поиск соединений, которые могли бы воздействовать на клеточные сигнальные пути, участвующие в воспалении и ремоделировании фиброза тканей, является актуальной задачей [4, 5].

Исследование посвящено оценке антифиброзной активности производных пиримидина ксимедона (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-она) и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой при лечении фиброза печени крыс, индуцированного воздействием CCl_4 и этанола. Четыреххлористый углерод (CCl_4) является широко используемым гепатотоксином для моделирования фиброза печени [6, 7]. Производные пиримидина могут рассматриваться в качестве перспективных соединений для создания новых антифиброзных препаратов, так как они обладают разнообразной фармакологической активностью, включая противовоспалительную, антиоксидантную, противовирусную [8]. Эти свойства особенно важны для лечения фиброза, поскольку данный процесс включает хроническое воспаление и окислительный стресс.

В предыдущем исследовании [9] показано, что ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой при профилактическом введении на фоне воздействия токсикантов предотвращают развитие экспериментально вызванного токсического фиброза печени крыс. Однако неизвестен механизм антифиброзного действия этих соединений, а также не ясно, способны ли они снижать выраженность признаков развития фиброза при лечении. Таким образом, целью данного исследования является оценка антифиброзных свойств ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой при лечении экспериментального фиброза печени крыс, а также их влияния на молекулярные маркеры воспаления.

1. Материалы и методы

1.1. Соединения. Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-он) и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой (рис. 1) синтезированы по описанным ранее методикам [10, 11].

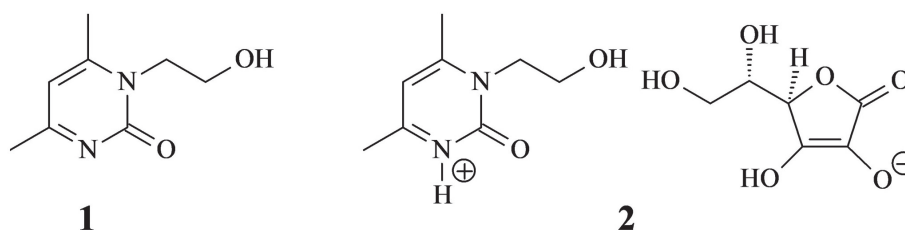


Рис. 1. Структурные формулы ксимедона (**1**) и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой (**2**)

Fig. 1. Structural formulas of Xymedon (**1**) and its conjugate with *L*-ascorbic acid (**2**)

1.2. Животные. Эксперимент проводился на 48 взрослых самках крыс линии Wistar массой 220–280 г., полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Животных содержали в соответствии с положениями руководства по доклиническим испытаниям под редакцией А.Н. Миронова [12] в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Кормление осуществляли стандартным гранулированным кормом для грызунов.

1.3. Схема эксперимента. Сначала крысы были случайным образом поделены на две группы: интактная группа ($n = 6$) и группа крыс, у которых моделировали фиброз ($n = 42$). Фиброз моделировали в течение 8 недель введением CCl_4 и этанола по следующей схеме: 5 %-ный масляный раствор CCl_4 в дозе 2 мл/кг вводили животным перорально 2 раза в неделю. Для потенцирования действия CCl_4 в течение 8 недель крысам давали 5 %-ный водный раствор этилового спирта через поилки при свободном доступе. На 9-й неделе крысам, у которых моделировали фиброз, отменяли введение CCl_4 и этанола, после чего разделяли их случайным образом на три аналогичные группы по 12 крыс в каждой (контрольная и две испытываемые группы) и в двух группах осуществляли внутрибрюшинное введение тестируемых веществ для лечения фиброза в течение двух или четырех недель. Контрольной группе вводили физиологический раствор в количестве 1 мл/кг, особям остальных двух групп вводили ксимедон или его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой в дозах 0.24 и 0.5 мг/кг соответственно, разбавляя их физиологическим раствором непосредственно перед введением. Объем вводимых растворов составлял 1 мл/кг, а дозы соединений были установлены в ходе предыдущего исследования [9]. Интактную группу не подвергали воздействию на протяжении всего опыта.

Для контроля используемой модели фиброза сразу после воздействия в течение 2 месяцев CCl_4 и этанола отбирали биоматериал, выводя из опыта часть крыс ($n = 6$). По окончании введения веществ, животных подвергали эвтаназии изофлураном и проводили забор материала по прошествии двух и четырех недель лечения фиброза.

1.4. Оценка массового коэффициента печени. Относительный показатель массового коэффициента печени выражали как соотношение массы печени к массе тела крысы, выраженное в процентах. Изменение физиологических параметров массы тела и органов является показателем общего состояния животного в эксперименте. Кроме того, известно [13], что при CCl_4 -индуцированном повреждении печени происходит увеличение абсолютной и относительной массы печени крыс в результате развития гидропической дистрофии, «набухания» гепатоцитов или накопления в них липидных включений.

1.5. Гистологический анализ. Образцы печени для гистологического анализа фиксировали в 10 %-ном забуференном формалине в течение суток и подготавливали по стандартным гистологическим методикам. Срезы печени толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилин–эозином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. Морфометрический анализ срезов печени проводили на прямом световом микроскопе Nikon H550S (Nikon, Япония) с программным обеспечением NIS-Elements Basic Research. Определяли площадь коллагена в % (% фиброзных изменений) как соотношение площади коллагена к общей площади среза ткани печени с использованием методов анализа цифровых изображений, как описано в работе [9].

1.6. Биохимический анализ крови. Кровь отбирали в пробирки с активатором свертывания (SiO_2) (ООО «МиниМед», Россия), затем, спустя 15–30 минут, проводили центри-

фугирование при 1800 g и +4 °C в течение 20 мин на центрифуге LMC-4200R (BioSan, Латвия) для получения сыворотки. С помощью автоматического биохимического анализатора АРД 200 («АРД», Россия) и готовых наборов реагентов (АО «Диакон-ДС», Россия) определяли такие сывороточные показатели состояния печени, как аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), щелочная фосфатаза (ЩФ), холестерин и глюкоза.

1.7. Оценка молекулярных маркеров воспаления. В сыворотке крови и гомогенатах печени определяли маркеры воспалительного процесса с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа MagPix, а также вестерн-блот-анализа. Сыворотку крови получали согласно методике в разделе 1.6. Гомогенаты ткани печени крыс готовили путем лизирования 50 мг образцов ткани печени в соответствии с протоколом набора MicroRotor for Lysis Kit (BioRad, США), с добавлением ингибиторов протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, США). Затем определяли содержание общего белка по методу Брэдфорда с использованием Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BioRad, США) и микропланшетного спектрофотометра Epoch (BioTech, США).

Мультиплексный иммуноферментный анализ осуществлялся с помощью набора MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MerkMillipore, США) на мультиплексном анализаторе MagPix Luminex (MerkMillipore, США) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы гомогенатов печени и сыворотки для анализа выравняли по уровню белка (150 мкг/мл). Проводили оценку показателей воспалительного процесса в гомогенатах печени и сыворотке крови крыс, в частности, фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкинов (IL-1 α , IL-2, IL-12 (p70)) и фактора роста фибробластов 2 (FGF-2).

В случае вестерн-блот-анализа проводили фракционирование белков гомогената печени при помощи денатурирующего электрофореза в 12.5 %-ном полиакриламидном геле. В каждую лунку геля вносили по 50 мкг белка. После электрофореза белок переносили на PVDF-мембрану (BioRad, США), которую блокировали в буферном растворе TBS/T (20 mM Трис-HCl (pH 7.6), 138 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) с 5 %-ным обезжиренным сухим молоком. Далее мембрану окрашивали в течение 12 ч при +4 °C раствором моноклональных первичных антител кролика против циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) (SAB5500087, Sigma-Aldrich, США) и β -актина (ZRB1312, Sigma-Aldrich, США) в разбавлении 1 : 1000. Затем мембрану окрашивали в течение 1.5 ч поликлональными вторичными антителами козы против иммуноглобулина кролика, конъюгированными пероксидазой хрена (A0545, Sigma-Aldrich, США) в разбавлении 1 : 10000. Иммуноблот проявляли с помощью коммерческого набора Clarity Western ECL Substrate (BioRad, США), регистрировали при помощи системы визуализации ChemiDoc Imaging Systems (BioRad, США) и анализировали изображения в программе Image Lab Touch Software (BioRad, США).

1.8. Статистический анализ. Результаты исследований представляли в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего, а также в виде медианы с 25–75 квартилем в зависимости от типа распределения данных. Нормальное распределение определяли по критерию Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения для статистического анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. При отсутствии нормального распределения для анализа данных использовали непараметрический критерий Краскела – Уоллиса и попарное сравнение по

тесту Манна – Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения [14]. При этом уровень значимости $p \leq 0.05$ считали статистически достоверным. Используемые статистические тесты представлены в тексте статьи в подрисуночных подписях. Статистический анализ проводили в программе Past 4.17.

2. Результаты

2.1. Оценка массового коэффициента печени. В процессе моделирования фиброза печени воздействием CCl_4 и этанола наблюдался естественный прирост массы тела крыс в среднем на 11 %. При этом массовый коэффициент печени значимо ($p = 0.02$) увеличился на 37.5 % относительно значения для интактной группы животных (рис. 2).

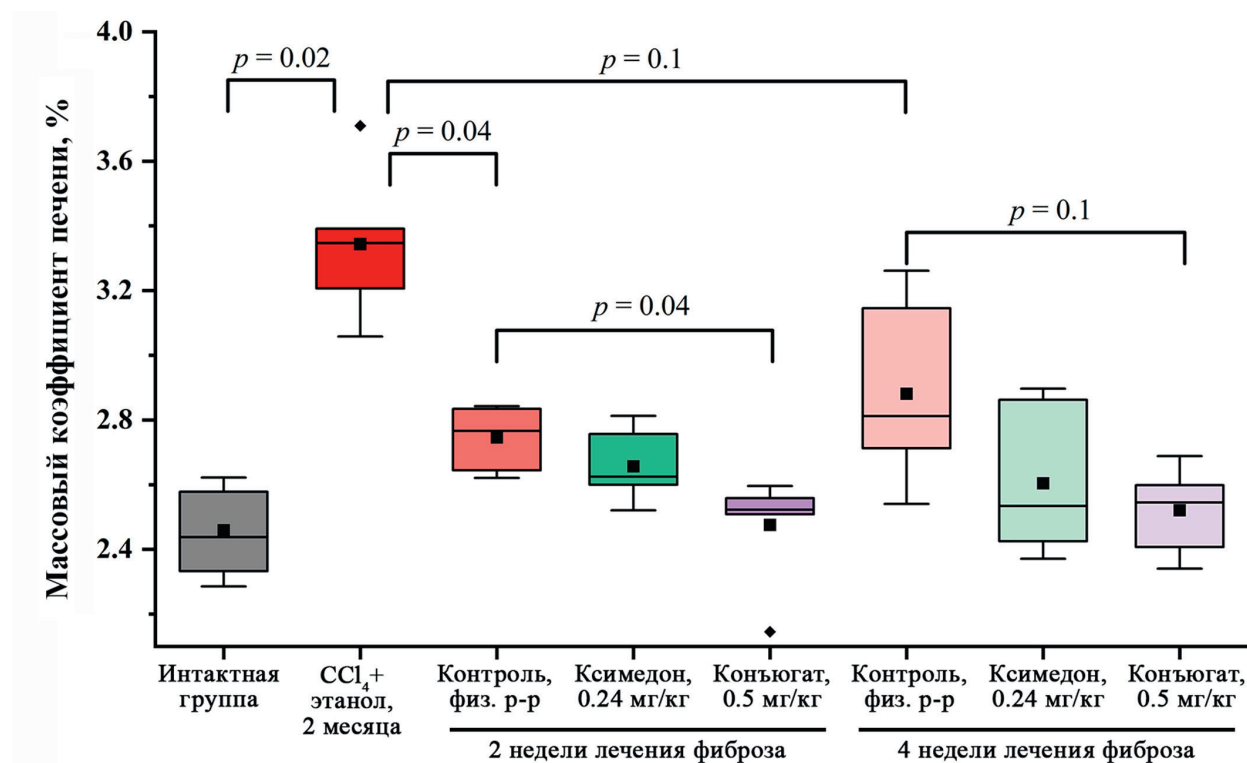


Рис. 2. Изменение массового коэффициента печени крыс спустя 2 и 4 недели лечения фиброза ксимедоном и его конъюгатом с *L*-аскорбиновой кислотой. Уровни значимости определены с помощью критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони

Fig. 2. Changes in the liver mass ratio of rats after 2 and 4 weeks of fibrosis treatment with Xymedon and its conjugate with *L*-ascorbic acid. Significance levels are based on the Mann–Whitney test with Bonferroni correction

Через две недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе происходило значимое ($p = 0.035$) снижение массового коэффициента печени на 15.2 % по сравнению с группой моделирования фиброза (рис. 2). В группах животных, получавших лечение, введение ксимедона недостоверно снижало массовый коэффициент печени на 7.1 % ($p = 0.63$), а введение его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой значимо уменьшало массовый коэффициент печени на 10.7 % ($p = 0.036$) по сравнению с контрольной группой. По прошествии четырех недель лечения фиброза в опытных группах наблюдались сходные результаты (рис. 2).

2.2. Гистопатологический анализ. Общая морфология ткани печени оценена с помощью окраски гематоксилин–эозином. В интактной группе животных наблюдали нормаль-

ную архитектуру ткани печени. В результате моделирования фиброза печени путем воздействия CCl_4 и этанола в ткани печени крыс были выявлены очаги гепатоцеллюлярного повреждения, баллонная и гидропическая дистрофия (рис. 3).

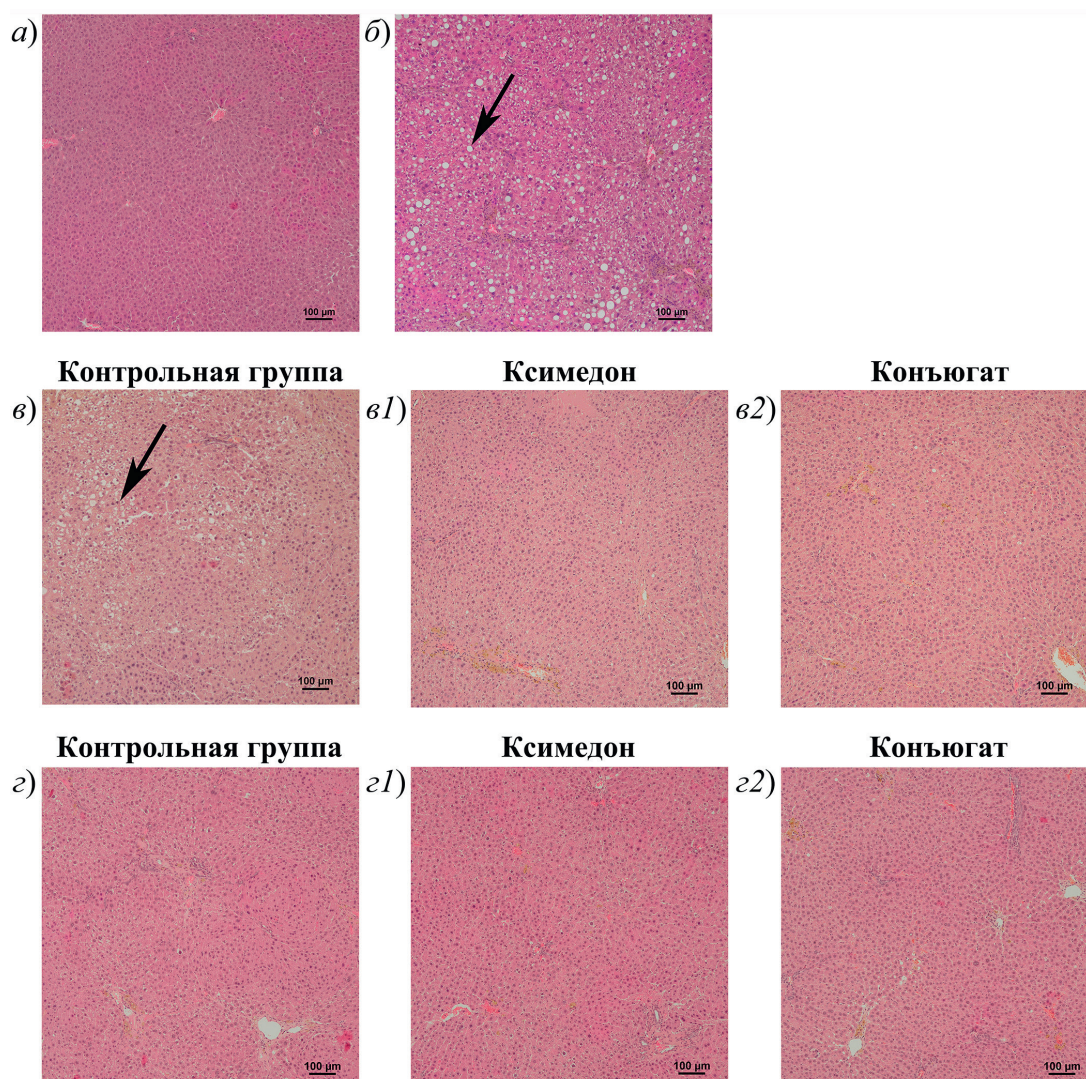


Рис. 3. Репрезентативные микрофотографии ткани печени крыс интактной группы (а), после 2 месяцев моделирования фиброза (б), а также спустя 2 (в–в2) и 4 недели (г–г2) лечения фиброза ксимедоном (в1 и г1) и его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой (в2 и г2) относительно контрольной группы (в и г для 2 и 4 недель лечения соответственно). Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение 150×, масштаб 100 мкм. Стрелкой показаны гепатоцеллюлярные повреждения

Fig. 3. Representative micrographs of the rat liver tissue from the intact group (a), after 2 months of fibrosis modeling (b), as well as after 2 (c–c2) and 4 (d–d2) weeks of fibrosis treatment with Xymedon (c1 and d1) and its conjugate with L-ascorbic acid (c2 and d2) versus the control group (c and d for 2 and 4 weeks of treatment, respectively). Hematoxylin–eosin staining. Magnification 150×, scale 100 μm. Hepatocellular damage is indicated by an arrow

Спустя две недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе ткань печени оставалась поврежденной, были заметны обширные очаги гепатоцеллюлярных дистрофий и некроза. Полное восстановление архитектуры ткани печени в контрольной группе до состояния в интактной группе достигалось только спустя четыре недели после отмены воздействия. При лечении ксимедоном или его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой уже

спустя две недели происходило заметное восстановление структуры ткани печени, что говорит о более быстрой регенерации. В ткани печени были выявлены лишь единичные случаи жирового перерождения клеток – стеатоза, а некротические повреждения отсутствовали. Спустя четыре недели лечения фиброза после отмены воздействия CCl_4 и этанола в опытных группах наблюдалось полное восстановление архитектуры ткани печени (рис. 3).

Основным маркером развития фиброза печени является наличие сверхотложения волокон коллагена в межклеточном пространстве. В результате моделирования фиброза печени путем воздействия CCl_4 и этанола происходило значимое ($p < 0.0001$) увеличение площади коллагеновых волокон в 3.5 раза по сравнению с интактной группой (рис. 4 и 5).

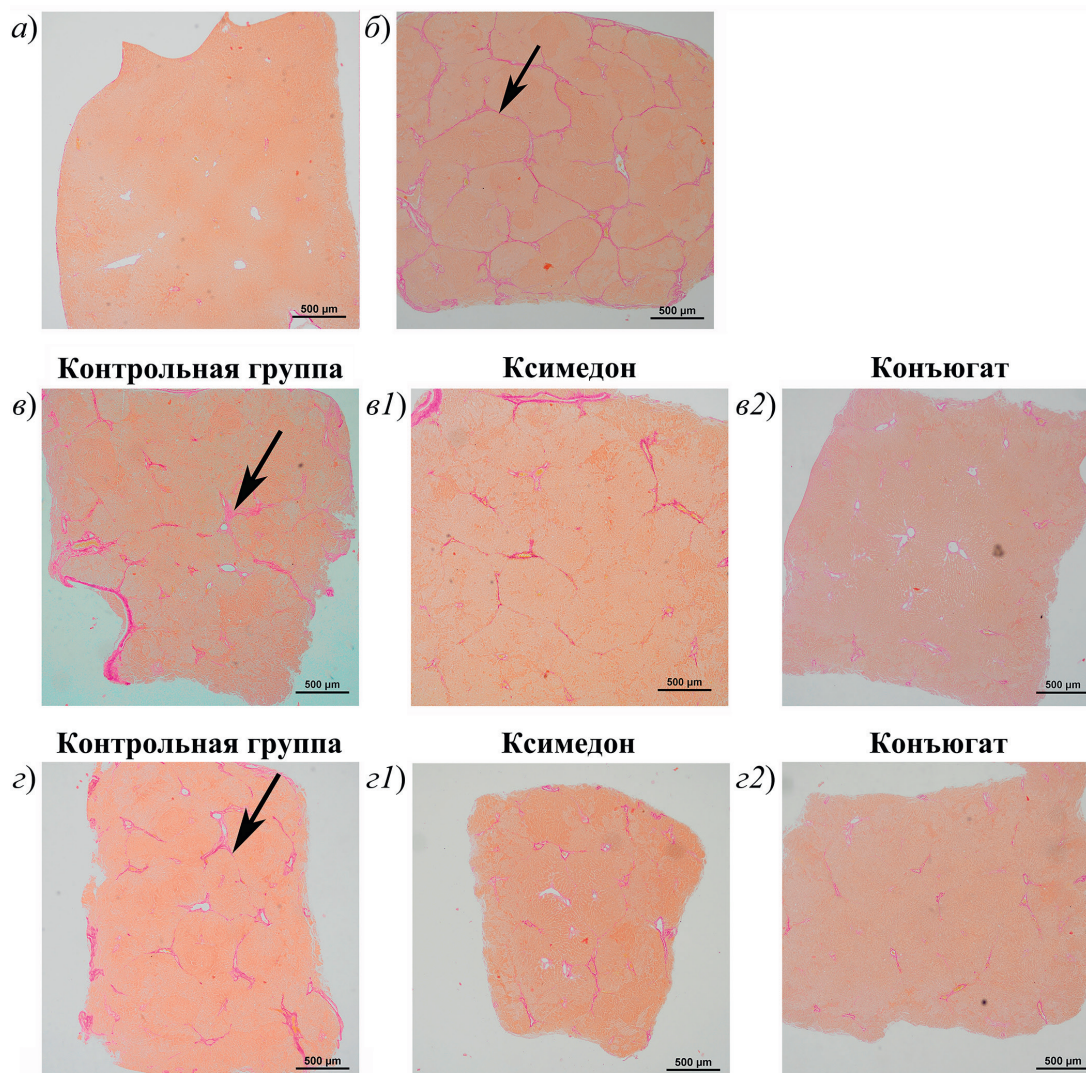


Рис. 4. Репрезентативные микрофотографии ткани печени крыс интактной группы (а), после 2 месяцев моделирования фиброза (б), а также спустя 2 (в–в2) и 4 недели (г–г2) лечения фиброза ксимедоном (в1 и г1) и его конъюгатом с *L*-аскорбиновой кислотой (в2 и г2) относительно контрольной группы (в и г для 2 и 4 недель лечения соответственно). Окраска по методу Ван-Гизона. Увеличение 60×, масштаб 500 мкм. Стрелкой показаны волокна коллагена

Fig. 4. Representative micrographs of the rat liver tissue from the intact group (a), after 2 months of fibrosis modeling (b), as well as after 2 (c–c2) and 4 (d–d2) weeks of fibrosis treatment with Xymedon (c1 and d1) and its conjugate with *L*-ascorbic acid (c2 and d2) versus the control group (c and d for 2 and 4 weeks of treatment, respectively). Van Gieson's staining. Magnification 60×, scale 500 µm. Collagen fibers are indicated by an arrow

Спустя две недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе происходила деградация волокон коллагена и сокращение его площади до некоторого хронического значения, превышающего показатели интактной группы в 2.7 раза ($p < 0.0001$). Схожее значение площади коллагеновых волокон сохранялось и спустя четыре недели после отмены воздействия, что свидетельствует лишь о частичном восстановлении ткани печени в течение первых двух недель (рис. 5).

Лечение фиброза ксимедоном в течение двух недель не ускорило уменьшение площади коллагеновых волокон в ткани печени крыс. Однако введение конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой за тот же период привело к значительному ($p < 0.0001$) снижению площади коллагена в ткани печени на 37.0 % по сравнению с группой, получавшей ксимедон, и контрольной группой. Спустя четыре недели лечения фиброза после отмены воздействия CCl_4 и этанола наблюдалась сходная картина (рис. 5).

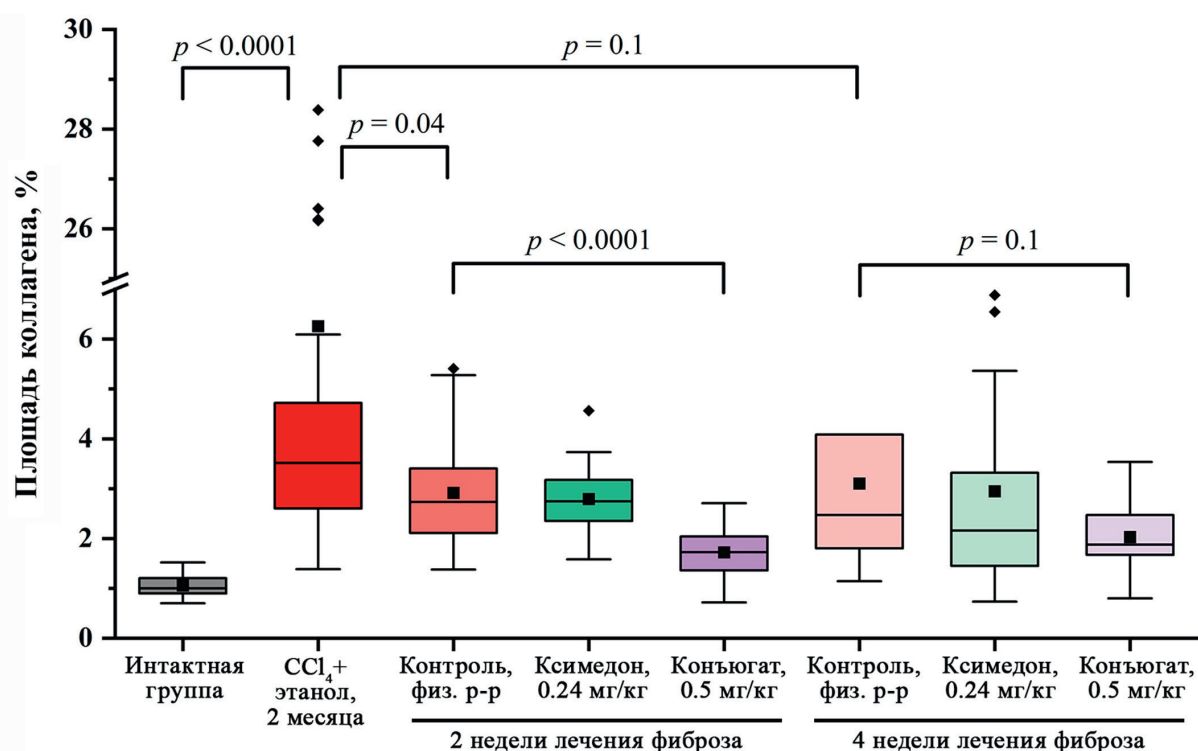


Рис. 5. Площадь коллагена в ткани печени крыс интактной группы, после 2 месяцев моделирования фиброза, а также спустя 2 и 4 недели лечения фиброза ксимедоном и его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой. Уровни значимости определены с помощью критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони

Fig. 5. Collagen area in the rat liver tissue from the intact group, after 2 months of fibrosis modeling, as well as after 2 and 4 weeks of fibrosis treatment with Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid. Significance levels are based on the Mann–Whitney test with Bonferroni correction

2.3. Оценка биохимических показателей крови. Моделирование фиброза печени воздействием CCl_4 и этанола привело к значимому изменению показателей цитолиза клеток печени. Так, активность АЛТ выросла в 2.8 раза ($p < 0.0001$), АСТ в 2 раза ($p = 0.02$), ЛДГ в 4 раза ($p = 0.02$), ЩФ в 2.9 раза ($p = 0.003$) по сравнению с интактной группой, что подтверждает развитие гепатоцеллюлярного повреждения. Кроме того, происходило значимое двукратное увеличение уровня холестерина ($p = 0.0001$) и снижение уровня глюкозы на 20 % ($p = 0.02$) по сравнению с интактной группой (табл. 1). Спустя две недели после от-

мены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе происходило восстановление сыровоточных биохимических показателей состояния ткани печени до уровня интактной группы здоровых животных (табл. 1), что свидетельствует о клиническом восстановлении ткани печени, но не морфологическом. Через четыре недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе наблюдались аналогичные результаты (данные не представлены).

В опытных группах животных, которым в течение двух или четырех недель внутрибрюшинно вводили ксимедон или его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой, биохимические показатели крови также достигали уровня референсных значений (данные для четырех недель лечения не представлены). При этом стоит отметить, что конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой способствовал более выраженному снижению биохимических показателей повреждения печени: АЛТ на 18.6 %, АСТ на 3.4 % и ЛДГ на 23.7 % по сравнению с ксимедоном (табл. 1). Однако выявленные различия статистически не достоверны.

Табл. 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс спустя две недели лечения фиброза ксимедоном и его конъюгатом с *L*-аскорбиновой кислотой

Table 1. Biochemical parameters of rat serum after 2 weeks of fibrosis treatment with Xymedon and its conjugate with *L*-ascorbic acid

Показатель	Экспериментальные группы				
	Интактная группа	CCl_4 +этанол, 2 месяца	2 недели лечения фиброза		
			Контроль, физ. р-р	Ксимедон, 0.24 мг/кг	Конъюгат, 0.5 мг/кг
АЛТ, Ед/л	48.5 [45.5; 55.3]	135* [112; 346]	46.5 [41.5; 51.3]	48.0 [38.0; 50.8]	39.5 [36.5; 45.0]
АСТ, Ед/л	113.5 [99.7; 128]	229* [133; 685]	104 [95.5; 111]	102 [92.0; 107]	98.5 [93.5; 107]
ЛДГ, Ед/л	612 [434; 855]	2493* [1328; 4001]	527 [401; 668]	491 [414; 594]	374 [335; 406]
ЩФ, Ед/л	110 [109; 159.0]	314* [221; 478]	146 [133; 197]	130 [119; 144]	145 [134; 186]
Холестерин, мМ	1.7 ± 0.1	$2.9 \pm 0.2^*$	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1
Глюкоза, мМ	10.4 ± 0.3	$8.3 \pm 1^*$	9.9 ± 0.2	8.6 ± 0.2	9.1 ± 0.2

Примечание: данные представлены в виде медианы и [25; 75 квартиля], кроме значений для холестерина и глюкозы. * – различия с интактной группой достоверны при $p < 0.05$

2.4. Оценка молекулярных маркеров воспаления. В связи с тем, что воспалительный процесс тесно связан с развитием фиброза печени [4], была проведена количественная оценка уровня воспалительных факторов в гомогенатах ткани печени крыс с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа.

Результаты показали, что моделирование фиброза печени воздействием CCl_4 и этанола привело к изменению цитокинового профиля ткани печени крысы. Произошло значимое снижение уровней провоспалительных цитокинов TNF- α в 2 раза ($p = 0.008$), IL-1 α в 1.7 раза ($p = 0.04$), а также противовоспалительных цитокинов IL-2 в 2 раза ($p = 0.004$), IL-12 в 1.9 раза ($p = 0.0002$) (табл. 2). При этом уровень FGF-2 увеличился в 2.2 раза ($p = 0.001$) по сравнению с интактной группой, что может свидетельствовать об увеличении активности звездчатых клеток печени. Спустя две недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе происходило некоторое восстановление цитокинового

профиля печени крыс до значений, приближенных к уровню интактного контроля, но не достигающих его (табл. 2).

В группах лечения фиброза ксимедоном или его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой установлено схожее с контрольной группой восстановление цитокинового профиля ткани печени, причем в случае конъюгата наблюдали более выраженное восстановление рассматриваемых маркеров воспаления по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей только ксимедон. Важно отметить, что в группе, получавшей конъюгат, уровень IL-2 значимо ($p = 0.04$) на 45.6 % превышал показатели контрольной группы и не отличался от интактной. В целом конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой приводил к наименьшим различиям цитокинового профиля в исследуемой группе относительно интактной. При этом уровень TNF- α в этой группе превышал соответствующие показатели в группе, получавшей только ксимедон, на 15.0 %, IL-1 α – на 23.9 %, IL-2 – на 33.4 %, IL-12 – на 10.3 % соответственно. Однако как ксимедон, так и его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой равноценно значимо снижали уровень FGF-2 (табл. 2). Оценку уровня цитокинов спустя четыре недели лечения не проводили в виду нецелесообразности, поскольку уже через две недели лечения фиброза наблюдалось достаточное восстановление показателей.

Табл. 2. Цитокиновый профиль гомогенатов ткани печени и сыворотки крови крыс спустя две недели лечения фиброза ксимедоном и его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой по данным мультиплексного иммуноферментного анализа

Table 2. Cytokine profile of the rat liver tissue homogenates and serum after 2 weeks of fibrosis treatment with Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid obtained using the multiplex enzyme-linked immunosorbent assay

Показатель	Экспериментальные группы				
	Интактная группа	CCl ₄ +этанол, 2 месяца	2 недели лечения фиброза		
			Контроль, физ. р-р	Ксимедон, 0.24 мг/кг	Конъюгат, 0.5 мг/кг
Гомогенаты ткани печени					
TNF-α, пг/мл	4.7 ± 0.4	2.4 ± 0.4*	4.0 ± 0.2[#]	4.0 ± 0.5[#]	4.6 ± 0.3[#]
IL-1α, пг/мл	22 ± 2	13 ± 2*	19 ± 2	16 ± 1	20.2 ± 0.9[#]
IL-2, пг/мл	8.2 ± 0.3	4.1 ± 0.9*	5.7 ± 0.5	6.2 ± 0.5	8.3 ± 0.7^{#, \$}
IL-12, пг/мл	108 ± 7	58 ± 9*	87 ± 4[#]	91 ± 6[#]	101 ± 3[#]
FGF-2, пг/мл	18 ± 2	71 ± 14*	46 ± 7	31 ± 2[#]	30 ± 2[#]
Сыворотка крови					
TNF-α, пг/мл	1.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.4	1.4 ± 0.3
IL-1α, пг/мл	39 ± 7	52 ± 2	52 ± 9	52 ± 13	28 ± 4
IL-2, пг/мл	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.4	0.8 ± 0.4
IL-12, пг/мл	2.0 ± 0.4	2.9 ± 0.5	1.9 ± 0.1	3.3 ± 0.8	1.9 ± 0.5
FGF-2, пг/мл	1.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.4	1.4 ± 0.3

Примечание: данные представлены в виде средних значений $\pm$ ошибки средних; * – различия с интактной группой достоверны при $p < 0.05$; [#] – различия с группой CCl₄+этанол в течение двух месяцев достоверны при $p < 0.05$; ^{\$} – различия с контрольной группой достоверны при $p < 0.05$

Оценка цитокинового профиля сыворотки крови крыс не показала существенных достоверных изменений ни в одной группе (табл. 2), что может говорить об отсутствии воспалительного процесса на системном уровне [15].

Известно [16], что цитокины приводят к индукции активности ЦОГ-2, в результате чего происходит стимуляция синтеза простагландина E2 (PGE2), что, в свою очередь, поддерживает воспаление и фиброгенез в ткани печени. В связи с этим оценен уровень фермента ЦОГ-2 – маркера воспалительного процесса – в гомогенатах ткани печени крыс при лечении фиброза с помощью вестерн-блот-анализа.

Моделирование фиброза печени привело к значимому ($p = 0.001$) повышению уровня ЦОГ-2 в 2 раза по сравнению с интактной группой, что говорит о развитии воспалительной реакции и поддержании процессов фиброгенеза (рис. 6).

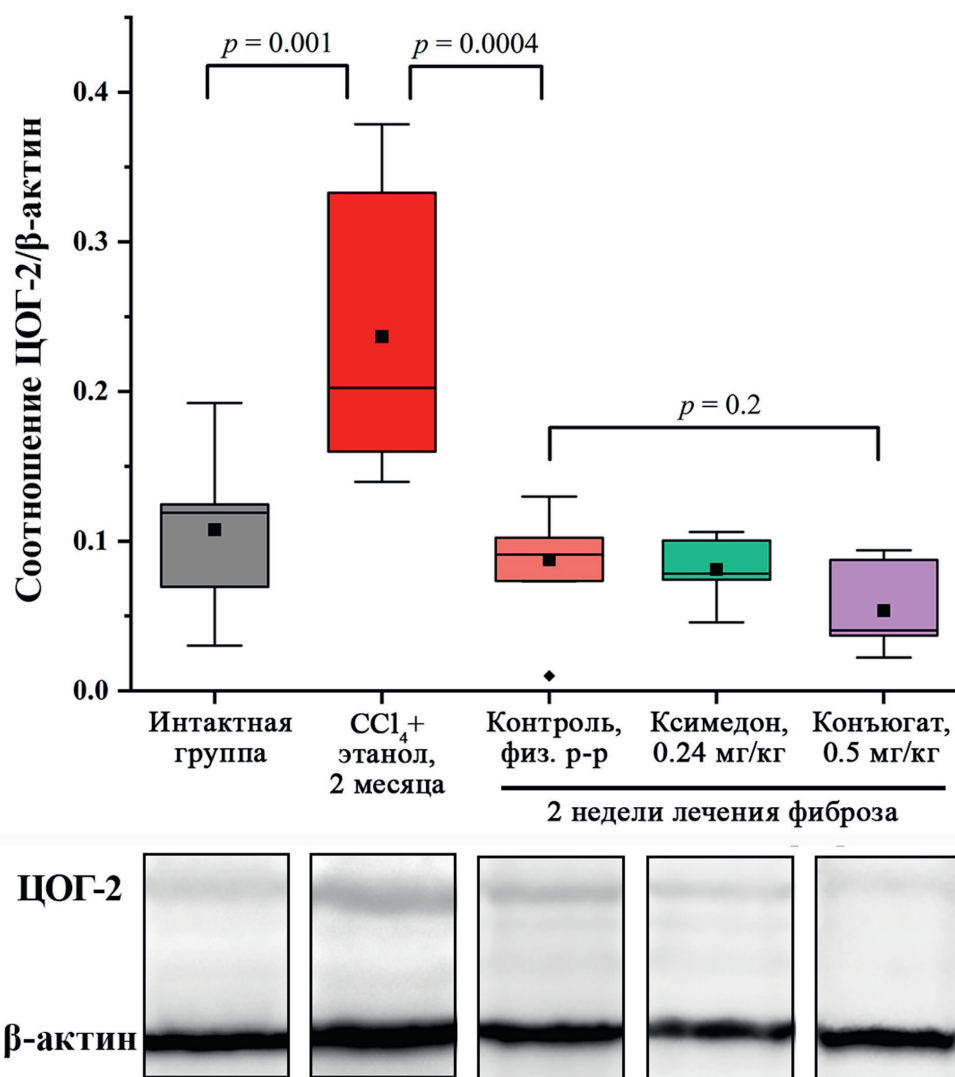


Рис. 6. Уровень ЦОГ-2 в ткани печени крыс интактной группы, после 2 месяцев моделирования фиброза, а также спустя две недели лечения фиброза ксимедоном и его конъюгатом с L-аскорбиновой кислотой по данным вестерн-блот-анализа. Уровни значимости определены с помощью критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони

Fig. 6. COX-2 level in the rat liver tissue from the intact group, after 2 months of fibrosis modeling, as well as after 2 weeks of fibrosis treatment with Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid obtained using western blot analysis. Significance levels are based on the Mann–Whitney test with Bonferroni correction

Спустя две недели после отмены воздействия CCl₄ и этанола в контрольной группе происходило значимое ($p = 0.0004$) снижение уровня ЦОГ-2 в 2 раза по сравнению с группой моделирования фиброза, что говорит о затухании воспалительной реакции в ткани печени

(рис. 6). При лечении фиброза путем введения ксимедона или его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой в течение двух недель уровень ЦОГ-2 менялся по аналогии с контрольной группой. При этом лечение фиброза конъюгатом ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой приводило к чуть более выраженному недостоверному снижению уровня ЦОГ-2 на 55.6 % по сравнению с контрольной группой и на 50 % по сравнению с группой, получавшей только ксимедон (рис. 6). В связи с восстановлением показателя ЦОГ-2 до уровня референсных значений его оценку спустя четыре недели лечения не проводили.

3. Обсуждение

Фиброз печени – это патологический процесс, характеризующийся сверхотложением волокон внеклеточного матрикса в результате непрерывного повреждения и воспаления ткани печени. В настоящее время поиск препаратов, способных эффективно инвертировать фиброз печени, является актуальной задачей [17]. Перспективными молекулами для создания антифиброзных препаратов могут являться производные пиримидина [18–20].

Проведенное моделирование фиброза печени крыс, вызванного воздействием CCl_4 и этанола, привело к развитию гепатоцеллюлярных повреждений, сверхотложению коллагена и нарушению биохимических показателей крови, что согласуется с данными других исследователей [21–25]. Наблюдаемое изменение цитокинового профиля печени крыс подобно описанному ранее в работах [26–28]. Следует отметить, что сохранение гомеостатического баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов важно для нормального функционирования и регенерации печени [29–31].

Спустя две недели после отмены воздействия CCl_4 и этанола в контрольной группе происходило некоторое восстановление биохимических показателей крови, ткани печени и частичная деградация фиброзных изменений. Известно [32, 33], что фиброз печени является частично обратимым процессом. В ходе проведенного исследования не наблюдалось полное восстановление ткани печени. Скорее речь идет о консервации некоторого повышенного уровня коллагеновых волокон в ткани печени. Кроме того, уровень цитокинов, хотя и нормализовался, но не достигал значений для интактной группы животных. В то же время уровень ЦОГ-2 восстановился полностью, что свидетельствует о затухании воспалительного процесса и замедлении фиброгенеза [17, 34].

Лечение фиброза как ксимедоном, так и его конъюгатом с *L*-аскорбиновой кислотой в течение двух недель приводило к ускорению регенерации ткани печени и значительному уменьшению гепатоцеллюлярных повреждений по сравнению с контрольной группой. При этом только конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой спустя две недели лечения фиброза ускорял процесс деградации коллагена и приводил к более значимому уменьшению площади коллагеновых волокон в ткани печени по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей только ксимедон, что говорит об антифиброзном эффекте конъюгата. Возможно, такое его действие связано с более выраженной нормализацией уровня маркеров воспалительного процесса. Так, восстановление уровня IL-2 и IL-12 может свидетельствовать об антифибротическом эффекте [4]. Нормализация уровня провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 α отражает восстановление гомеостатического уровня воспаления в ткани печени, которое необходимо, например, для борьбы с метаболитами бактерий, поступающих из кишечника [4]. Снижение уровня FGF-2 относительно контрольной группы может указывать на уменьшение активации звездчатых клеток печени и развитие волокон внеклеточного матрикса [35]. Кроме того, уменьшение уровня ЦОГ-2 на фоне полной регенерации ткани печени можно трактовать как более выраженное разрешение фиброза [17, 34].

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что происходящее ускорение регенерации ткани печени при лечении фиброза печени крыс изучаемыми соединениями связано с влиянием ксимедона на активность аденилатциклазы и уровень циклического аденозинмонофосфата в клетках [36]. Известно, что модуляция его содержания в клетке может влиять на различные процессы, такие как пролиферация, апоптоз, обмен веществ, воспаление, а также фиброгенез. Циклический аденозинмонофосфат играет ключевую роль в активации звездчатых клеток и развитии фиброза печени [37, 38]. Кроме того, недавно было показано, что ксимедон проявляет антиапоптозный эффект, снижая уровень маркеров раннего апоптоза BAD, Active Caspase-9 на модели острого CCl_4 -индуцированного поражения печени крыс [39]. Таким образом можно полагать, что регенеративный эффект ксимедона при лечении фиброза печени реализуется посредством воздействия на уровень циклического аденозинмонофосфата, что, в свою очередь, ведет к модуляции сигнальных каскадов, связанных с воспалением и апоптозом. При этом конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, очевидно, усиливает антифиброзный эффект ксимедона за счет более выраженного антиоксидантного эффекта, так как известно [40, 41], что конъюгат снижает уровень маркера окислительного стресса – малонового диальдегида – при лекарственных и токсических повреждениях ткани печени, подтверждая подавление перекисного окисления липидов. Кроме того, конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, возможно, имеет более высокую биодоступность, в том числе за счет взаимодействия с клеточными транспортерами *L*-аскорбиновой кислоты [42]. Как показано на моделях острого и хронического CCl_4 -индуцированного повреждения печени, *L*-аскорбиновая кислота в дозе 100 мг/кг обладает гепатопротекторными свойствами [43]. Однако эта доза в сотни раз превышает содержание аскорбиновой кислоты в составе конъюгата. В то же время известно [44], что хроническая недостаточность аскорбиновой кислоты усугубляет фиброз печени мышей, вызванный тиацетамидом. Также отмечается антифиброзный эффект аскорбиновой кислоты в исследованиях на крысах и морских свинках [45–47]. В связи с этим можно предположить, что в составе конъюгата усиливаются гепатопротекторные свойства аскорбиновой кислоты.

Заключение

Проведенные исследования показали, что лечение индуцированного воздействием CCl_4 и этанола фиброза печени крыс конъюгатом ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой приводит к деградации площади коллагеновых волокон на 37 % эффективнее по сравнению с лечением только ксимедоном и контрольной группой. Полученный антифиброзный эффект конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, по-видимому, связан с более выраженным восстановлением уровня маркеров воспалительного процесса в ткани печени.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Zhang C.-Y., Liu S., Yang M. Treatment of liver fibrosis: Past, current, and future // *World J. Hepatol.* 2023. V. 15, No 6. P. 755–774. <https://doi.org/10.4254/wjh.v15.i6.755>.
2. Pei Q., Yi Q., Tang L. Liver fibrosis resolution: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24, No 11. Art. 9671. <https://doi.org/10.3390/ijms24119671>.
3. Thiele M., Pose E., Juanola A., Mellinger J., Ginès P. Population screening for cirrhosis // *Hepatol. Commun.* 2024. V. 8, No 9. Art. e0512. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000512>.

4. Hammerich L., Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2023. V. 20, No 10. P. 633–646. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00807-x>.
5. Akkız H., Gieseler R.K., Canbay A. Liver fibrosis: From basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25, No 14. Art. 7873. <https://doi.org/10.3390/ijms25147873>.
6. Faccioli L.A., Dias M.L., Paranhos B.A., Goldenberg R.C.D.S. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents // *Life Sci.* 2022. V. 301. Art. 120615. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120615>.
7. Lee Y.-S., Seki E. In vivo and in vitro models to study liver fibrosis: Mechanisms and limitations // *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2023. V. 16, No 3. P. 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.05.010>.
8. Natarajan R., Samy H.N.A., Sivaperuman A., Subramani A. Structure-activity relationships of pyrimidine derivatives and their biological activity – a review // *Med. Chem.* 2023. V. 19, No 1. P. 10–30. <https://doi.org/10.2174/1573406418666220509100356>.
9. Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Антифиброзный эффект производных пиридина ксимедона и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* 2023. Т. 165, кн. 2. С. 175–189. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2023.2.175-189>.
10. Резник В.С., Паикуров Н.Г. Взаимодействие окси-и меркаптопириимидинов с этилен-и пропиленхлоргидринами // *Известия АН СССР. Серия химическая.* 1966. № 9. С. 1613–1617.
11. Выштакалюк А.Б., Семенов В.Э., Зобов В.В., Галяметдинова И.В., Гумарова Л.Ф., Парфенов А.А., Назаров Н.Г., Ленина О.А., Кондрашова С.А., Латыпов Ш.К., Черепнев Г.В., Шагин М.С., Резник В.С. Синтез и первичная оценка гепатопротекторных свойств новых производных пириимидинового ряда // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43, № 5. С. 572–580. <https://doi.org/10.7868/S0132342317040170>.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К, 2012, 536 с.
13. Sergazy S., Shulgau Z., Kamyshanskiy Y., Zhumadilov Z., Krivyyh E., Gulyayev A., Aljofan M. Blueberry and cranberry extracts mitigate CCL₄-induced liver damage, suppressing liver fibrosis, inflammation and oxidative stress // *Heliyon.* 2023. V. 9, No 4. Art. e15370. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15370>.
14. Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения // *Экология человека.* 2020. № 10. С. 55–64. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2020-10-55-64>.
15. Li M.-m., Zhou Y., Zuo L., Nie D., Li X.-a. Dietary fiber regulates intestinal flora and suppresses liver and systemic inflammation to alleviate liver fibrosis in mice // *Nutrition.* 2021. V. 81. Art. 110959. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110959>.
16. Yang H., Xuefeng Y., Shandong W., Jianhua X. COX-2 in liver fibrosis // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 506. P. 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.024>.
17. Gilgenkrantz H., Sayegh R.A., Lotersztajn S. Immunoregulation of liver fibrosis: New opportunities for antifibrotic therapy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2025. V. 65. P. 281–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-020524-012013>.
18. Liu C., Li S., Zhang C., Jin C.-H. Recent advances in research on active compounds against hepatic fibrosis // *Curr. Med. Chem.* 2024. V. 31, No 18. P. 2571–2628. <https://doi.org/10.2174/0929867331666230727102016>.
19. Gu Y.-F., Zhang Y., Yue F.-l., Li S.-t., Zhang Z.-q., Li J., Bai X. Synthesis of novel 2-(pyridin-2-yl) pyrimidine derivatives and study of their anti-fibrosis activity // *Molecules.* 2020. V. 25, No 22. Art. 5226. <https://doi.org/10.3390/molecules25225226>.
20. Ghobrial D.K., El-Nikhely N., Sheta E., Ragab H.M., Rostom S.A.F., Saeed H., Wahid A. The role of pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine-based kinase inhibitors in the attenuation of CCl₄-induced liver fibrosis in rats // *Antioxidants.* 2023. V. 12, No 3. Art. 637. <https://doi.org/10.3390/antiox12030637>.

21. Jiang M., Huang C., Wu Q., Su Y., Wang X., Xuan Z., Wang Y., Xu F., Ge C. Sini San ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice by inhibiting AKT-mediated hepatocyte apoptosis // J. Ethnopharmacol. 2023. V. 303. Art. 115965. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115965>.
22. Zhang L., Liu C., Yin L., Huang C., Fan S. Mangiferin relieves CCl₄-induced liver fibrosis in mice // Sci. Rep. 2023. V. 13, No 1. Art. 4172. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30582-3>.
23. Bai Y., Liang S., Zhou Y., Zhou B. Transcriptomic analysis reveals pharmacological mechanisms mediating efficacy of Yangyinghuoxue Decoction in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats // Front. Pharmacol. 2024. V. 15. Art. 1364023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1364023>.
24. Peugnet-González I., Martínez-Hernández S.L., Ávila-Blanco M.E., Hernández-Marín D.A., Macías-Pérez J.R., Aldaba-Muruato L.R., Quezada-Tristán T., Sosa-Ramírez J., Villa-Jaimes G.S., Ventura-Juárez J., Muñoz-Ortega M., Ibarra-Martínez D. Hepatoprotective and antifibrotic activity of watercress extract in a model of CCl₄-induced liver fibrosis in Wistar rats // J. Funct. Foods. 2023. V. 109. Art. 105760. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105760>.
25. Thomes P.G., Rasineni K., Yang L., Donohue T.M., Jr., Kubik J.L., McNiven M.A., Casey C.A. Ethanol withdrawal mitigates fatty liver by normalizing lipid catabolism // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2019. V. 316, No 4. P. G509–G518. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00376.2018>.
26. Hsieh H.-G., Huang H.-C., Lee F.-Y., Chan C.-Y., Lee J.-Y., Lee S.-D. Kinetics of cytokine expression in cirrhotic rats // J. Chin. Med. Assoc. 2011. V. 74, No 9. P. 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.08.002>.
27. Amer M.A., Othman A.I., El-Missiry M.A., Farag A.A., Amer M.E. Proanthocyanidins attenuated liver damage and suppressed fibrosis in CCl₄-treated rats // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29, No 60. P. 91127–91138. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22051-7>.
28. Rikans L.E., DeCicco L.A., Hornbrook K.R., Yamano T. Effect of age and carbon tetrachloride on cytokine concentrations in rat liver // Mech. Ageing Dev. 1999. V. 108, No 2. P. 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00012-3).
29. Ahmed O., Robinson M.W., O'Farrelly C. Inflammatory processes in the liver: Divergent roles in homeostasis and pathology // Cell. Mol. Immunol. 2021. V. 18, No 6. P. 1375–1386. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00639-2>.
30. Campana L., Esser H., Huch M., Forbes S. Liver regeneration and inflammation: From fundamental science to clinical applications // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021. V. 22, No 9. P. 608–624. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00373-7>.
31. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis // Cell. Mol. Immunol. 2016. V. 13, No 3. P. 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>.
32. Roehlen N., Crouchet E., Baumert T.F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives // Cells. 2020. V. 9, No 4. Art. 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
33. Zuñiga-Aguilar E., Ramírez-Fernández O. Fibrosis and hepatic regeneration mechanism // Transl. Gastroenterol. Hepatol. 2022. V. 7. Art. 9. <https://doi.org/10.21037/tgh.2020.02.21>.
34. Luangmonkong T., Parichatikanond W., Olinga P. Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges // Biochem. Pharmacol. 2023. V. 215. Art. 115740. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115740>.
35. Seitz T., Hellerbrand C. Role of fibroblast growth factor signalling in hepatic fibrosis // Liver Int. 2021. V. 41, No 6. P. 1201–1215. <https://doi.org/10.1111/liv.14863>.
36. Слабнов Ю.Д., Черепнев Г.В., Каримова Ф.Г., Гараев Р.С. Влияние пиримидиновых производных на аденилатциклазную систему регуляции иммунокомпетентных клеток *in vitro* // Бюл. эксп. биол. и мед. 1998. Т. 125, № 6. С. 663–665.
37. Beavo J.A., Brunton L.L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3, No 9. P. 710–717. <https://doi.org/10.1038/nrm911>.

38. Wahlang B., McClain C., Barve S., Gobejishvili L. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease // *Cell. Signalling*. 2018. V. 49. P. 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.06.005>.
39. Парфенов А.А., Выштакалюк А.Б., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Антиапоптотический механизм реализации гепатопротекторного эффекта производных пиримидина в исследованиях *in vivo* // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки*. 2022. Т. 164, кн. 2. С. 231–248. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.2.231-248>.
40. Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Гепатопротекторный эффект ксимедона и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой при отравлении мышей полулетальной дозой парацетамола // *Biomed. Chem.: Res. Methods*. 2024. V. 7, No 4. Art. e00249. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00249>.
41. Выштакалюк А.Б., Семенов В.Э., Судаков И.А., Бушмелева К.Н., Гумарова Л.Ф., Парфенов А.А., Назаров Н.Г., Галяметдинова И.В., Зобов В.В. Производные Ксимедона с биогенными кислотами. Антиоксидантные свойства производного Ксимедона с L-аскорбиновой кислотой // *Изв. АН, сер. хим.* 2018. № 4. С. 705–711.
42. Rivas C.I., Zúñiga F.A., Salas-Burgos A., Mardones L., Ormazabal V., Vera J.C. Vitamin C transporters // *J. Physiol. Biochem*. 2008. V. 64, No 4. P. 357–375. <https://doi.org/10.1007/BF03174092>.
43. Bashandy S.A., AlWasel S.H. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: Protective role of vitamin C // *J. Pharmacol. Toxicol*. 2011. V. 6, No 3. P. 283–292. <https://doi.org/10.3923/jpt.2011.283.292>.
44. Kim J.-H., Jeong Y.-J., Hong J.-M., Kim H.-R., Kang J.S., Lee W.J., Hwang Y.-i. Chronic vitamin C insufficiency aggravated thioacetamide-induced liver fibrosis in *gulo*-knockout mice // *Free Radical Biol. Med*. 2014. V. 67. P. 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.813>.
45. Weiskirchen R. Hepatoprotective and anti-fibrotic agents: It's time to take the next step // *Front. Pharmacol*. 2016. V. 6. Art. 303. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00303>.
46. Soyly A.R., Aydogdu N., Basaran U.N., Altaner S., Tarcin O., Gedik N., Umit H., Tezel A., Dokmeci G., Baloglu H., Ture M., Kutlu K., Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats // *World J. Gastroenterol*. 2006. V. 12, No 42. P. 6835–6841. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i42.6835>.
47. Abhilash P.A., Harikrishnan R., Indira M. Ascorbic acid supplementation down-regulates the alcohol induced oxidative stress, hepatic stellate cell activation, cytotoxicity and mRNA levels of selected fibrotic genes in guinea pigs // *Free Radical Res*. 2012. V. 46, No 2. P. 204–213. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.647691>.

References

1. Zhang C.-Y., Liu S., Yang M. Treatment of liver fibrosis: Past, current, and future. *World J. Hepatol.*, 2023, vol. 15, no. 6, pp. 755–774. <https://doi.org/10.4254/wjh.v15.i6.755>.
2. Pei Q., Yi Q., Tang L. Liver fibrosis resolution: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 11, art. 9671. <https://doi.org/10.3390/ijms24119671>.
3. Thiele M., Pose E., Juanola A., Mellinger J., Ginès P. Population screening for cirrhosis. *Hepatol. Commun.*, 2024, vol. 8, no. 9, art. e0512. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000512>.
4. Hammerich L., Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2023, vol. 20, no. 10, pp. 633–646. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00807-x>.
5. Akkız H., Gieseler R.K., Canbay A. Liver fibrosis: From basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, no. 14, art. 7873. <https://doi.org/10.3390/ijms25147873>.
6. Faccioli L.A., Dias M.L., Paranhos B.A., Goldenberg R.C.D.S. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. *Life Sci.*, 2022, vol. 301, art. 120615. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120615>.

7. Lee Y.-S., Seki E. In vivo and in vitro models to study liver fibrosis: Mechanisms and limitations. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2023, vol. 16, no. 3, pp. 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.05.010>.
8. Natarajan R., Samy H.N.A., Sivaperuman A., Subramani A. Structure-activity relationships of pyrimidine derivatives and their biological activity – a review. *Med. Chem.*, 2023, vol. 19, no. 1, pp. 10–30. <https://doi.org/10.2174/1573406418666220509100356>.
9. Belyaev G.P., Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Antifibrotic effect of pyrimidine derivatives of Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2023, vol. 165, no. 2, pp. 175–189. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2023.2.175-189>. (In Russian)
10. Reznik V.S., Pashkurov N.G. Reactions of pyrimidinols and pyrimidinethiols with 2-chloroethanol and with 2-chloro-1-propanol. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1966, vol. 15, no. 9, pp. 1554–1557. <https://doi.org/10.1007/BF00848915>.
11. Vyshtakalyuk A.B., Semenov V.E., Zobov V.V., Galyametdinova I.V., Gumarova L.F., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Lenina O.A., Kondrashova S.A., Latypov Sh.K., Cherepnev G.V., Shashyn M.S., Reznik V.S. Synthesis and primary evaluation of the hepatoprotective properties of novel pyrimidine derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 604–611. <https://doi.org/10.1134/S106816201704015X>.
12. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for Pre-clinical Studies of Drugs]. Pt. 2. Moscow, Grif i K, 2012. 536 p. (In Russian)
13. Sergazy S., Shulgau Z., Kamyshanskiy Y., Zhumadilov Z., Krivyyh E., Gulyayev A., Aljofan M. Blueberry and cranberry extracts mitigate CCL₄-induced liver damage, suppressing liver fibrosis, inflammation and oxidative stress. *Heliyon*, 2023, vol. 9, no. 4, art. e15370. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15370>.
14. Narkevich A.N., Vinogradov K.A., Grijbovski A.M. Multiple comparisons in biomedical research: The problem and its solutions. *Ekol. Chel.*, 2020, no. 10, pp. 55–64. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2020-10-55-64>. (In Russian)
15. Li M.-m., Zhou Y., Zuo L., Nie D., Li X.-a. Dietary fiber regulates intestinal flora and suppresses liver and systemic inflammation to alleviate liver fibrosis in mice. *Nutrition*, 2021, vol. 81, art. 110959. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110959>.
16. Yang H., Xuefeng Y., Shandong W., Jianhua X. COX-2 in liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta*, 2020, vol. 506, pp. 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.024>.
17. Gilgenkrantz H., Sayegh R.A., Lotersztajn S. Immunoregulation of liver fibrosis: New opportunities for antifibrotic therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2025, vol. 65, pp. 281–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-020524-012013>.
18. Liu C., Li S., Zhang C., Jin C.-H. Recent advances in research on active compounds against hepatic fibrosis. *Curr. Med. Chem.*, 2024, vol. 31, no. 18, pp. 2571–2628. <https://doi.org/10.2174/0929867331666230727102016>.
19. Gu Y.-F., Zhang Y., Yue F.-l., Li S.-t., Zhang Z.-q., Li J., Bai X. Synthesis of novel 2-(pyridin-2-yl) pyrimidine derivatives and study of their anti-fibrosis activity. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22, art. 5226. <https://doi.org/10.3390/molecules25225226>.
20. Ghobrial D.K., El-Nikhely N., Sheta E., Ragab H.M., Rostom S.A.F., Saeed H., Wahid A. The role of pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine-based kinase inhibitors in the attenuation of CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Antioxidants*, 2023, vol. 12, no. 3, art. 637. <https://doi.org/10.3390/antiox12030637>.
21. Jiang M., Huang C., Wu Q., Su Y., Wang X., Xuan Z., Wang Y., Xu F., Ge C. Sini San ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice by inhibiting AKT-mediated hepatocyte apoptosis. *J. Ethnopharmacol.*, 2023, vol. 303, art. 115965. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115965>.
22. Zhang L., Liu C., Yin L., Huang C., Fan S. Mangiferin relieves CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Sci. Rep.*, 2023, vol. 13, no. 1, art. 4172. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30582-3>.

23. Bai Y., Liang S., Zhou Y., Zhou B. Transcriptomic analysis reveals pharmacological mechanisms mediating efficacy of Yangyinghuoxue Decoction in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *Front. Pharmacol.*, 2024, vol. 15, art. 1364023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1364023>.
24. Peugnet-González I., Martínez-Hernández S.L., Ávila-Blanco M.E., Hernández-Marín D.A., Macías-Pérez J.R., Aldaba-Muruato L.R., Quezada-Tristán T., Sosa-Ramírez J., Villa-Jaimes G.S., Ventura-Juárez J., Muñoz-Ortega M., Ibarra-Martínez D. Hepatoprotective and antifibrotic activity of watercress extract in a model of CCl₄-induced liver fibrosis in Wistar rats. *J. Funct. Foods*, 2023, vol. 109, art. 105760. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105760>.
25. Thomes P.G., Rasineni K., Yang L., Donohue T.M., Jr., Kubik J.L., McNiven M.A., Casey C.A. Ethanol withdrawal mitigates fatty liver by normalizing lipid catabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2019, vol. 316, no. 4, pp. G509–G518. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00376.2018>.
26. Hsieh H.-G., Huang H.-C., Lee F.-Y., Chan C.-Y., Lee J.-Y., Lee S.-D. Kinetics of cytokine expression in cirrhotic rats. *J. Chin. Med. Assoc.*, 2011, vol. 74, no. 9, pp. 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2011.08.002>.
27. Amer M.A., Othman A.I., El-Missiry M.A., Farag A.A., Amer M.E. Proanthocyanidins attenuated liver damage and suppressed fibrosis in CCl₄-treated rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2022, vol. 29, no. 60, pp. 91127–91138. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22051-7>.
28. Rikans L.E., DeCicco L.A., Hornbrook K.R., Yamano T. Effect of age and carbon tetrachloride on cytokine concentrations in rat liver. *Mech. Ageing Dev.*, 1999, vol. 108, no. 2, pp. 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00012-3).
29. Ahmed O., Robinson M.W., O'Farrelly C. Inflammatory processes in the liver: Divergent roles in homeostasis and pathology. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, vol. 18, no. 6, pp. 1375–1386. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00639-2>.
30. Campana L., Esser H., Huch M., Forbes S. Liver regeneration and inflammation: From fundamental science to clinical applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2021, vol. 22, no. 9, pp. 608–624. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00373-7>.
31. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>.
32. Roehlen N., Crouch E., Baumert T.F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 4, art. 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
33. Zuñiga-Aguilar E., Ramírez-Fernández O. Fibrosis and hepatic regeneration mechanism. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.*, 2022, vol. 7, art. 9. <https://doi.org/10.21037/tgh.2020.02.21>.
34. Luangmonkong T., Parichatikanond W., Olinga P. Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges. *Biochem. Pharmacol.*, 2023, vol. 215, art. 115740. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115740>.
35. Seitz T., Hellerbrand C. Role of fibroblast growth factor signalling in hepatic fibrosis. *Liver Int.*, 2021, vol. 41, no. 6, pp. 1201–1215. <https://doi.org/10.1111/liv.14863>.
36. Slabnov Yu.D., Cherepnev G.V., Karimova F.G., Garaev R.S. Effect of pyrimidine derivatives on adenyl-ate cyclase system of immunocompetent cell regulation *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1998, vol. 125, no. 6, pp. 588–590. <https://doi.org/10.1007/bf02445248>.
37. Beavo J.A., Brunton L.L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 3, no. 9, pp. 710–717. <https://doi.org/10.1038/nrm911>.
38. Wahlang B., McClain C., Barve S., Gobejishvili L. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. *Cell. Signalling*, 2018, vol. 49, pp. 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.06.005>.
39. Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Anti-apoptosis mechanism of the hepatoprotective effect of pyrimidine derivatives in *in vivo* studies. *Uchenye*

- Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 2, pp. 231–248. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.2.231-248>. (In Russian)
40. Belyaev G.P., Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Hepatoprotective effect of Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid during poisoning of mice with a semilethal dose of Paracetamol. *Biomed. Chem.: Res. Methods*, 2024, vol. 7, no. 4, art. e00249. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00249>. (In Russian)
41. Vyshtakalyuk A.B., Semenov V.E., Sudakov I.A., Bushmeleva K.N., Gumarova L.F., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Galyametdinova I.V., Zobov V.V. Xymedon conjugate with biogenic acids. Antioxidant properties of a conjugate of Xymedon with L-ascorbic acid. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, vol. 67, no. 4, pp. 705–711. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2126-3>.
42. Rivas C.I., Zúñiga F.A., Salas-Burgos A., Mardones L., Ormazabal V., Vera J.C. Vitamin C transporters. *J. Physiol. Biochem.*, 2008, vol. 64, no. 4, pp. 357–375. <https://doi.org/10.1007/BF03174092>.
43. Bashandy S.A., AlWasel S.H. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: Protective role of vitamin C. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 283–292. <https://doi.org/10.3923/jpt.2011.283.292>.
44. Kim J.-H., Jeong Y.-J., Hong J.-M., Kim H.-R., Kang J.S., Lee W.J., Hwang Y.-i. Chronic vitamin C insufficiency aggravated thioacetamide-induced liver fibrosis in *gulo*-knockout mice. *Free Radical Biol. Med.*, 2014, vol. 67, pp. 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.813>.
45. Weiskirchen R. Hepatoprotective and anti-fibrotic agents: It's time to take the next step. *Front. Pharmacol.*, 2016, vol. 6, art. 303. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00303>.
46. Soylu A.R., Aydogdu N., Basaran U.N., Altaner S., Tarcin O., Gedik N., Umit H., Tezel A., Dokmeci G., Baloglu H., Ture M., Kutlu K., Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J. Gastroenterol.*, 2006, vol. 12, no. 42, pp. 6835–6841. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i42.6835>.
47. Abhilash P.A., Harikrishnan R., Indira M. Ascorbic acid supplementation down-regulates the alcohol induced oxidative stress, hepatic stellate cell activation, cytotoxicity and mRNA levels of selected fibrotic genes in guinea pigs. *Free Radical Res.*, 2012, vol. 46, no. 2, pp. 204–213. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.647691>.

Информация об авторах

Григорий Павлович Беляев, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: gregoir4@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3157-3402>

Александра Борисовна Выштакалюк, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории химико-биологических исследований, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: alex.vysh@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2152-2249>

Андрей Анатольевич Парфенов, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории химико-биологических исследований, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: aimt66@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5650-1910>

Ирина Владимировна Галяметдинова, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии нуклеотидных оснований, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: iragal2009@yahoo.com

Вячеслав Энгельсович Семенов, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химии нуклеотидных оснований, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: sve@iopc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8350-2433>

Владимир Васильевич Зобов, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химико-биологических исследований, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: vz30608@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6910-3540>

Author Information

Grigory P. Belyaev, Postgraduate Student, Junior Researcher, Laboratory of Neurophysiology, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: gregoir4@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3157-3402>

Alexandra B. Vyshtakalyuk, Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Chemical and Biological Research, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: alex.vysh@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2152-2249>

Andrey A. Parfenov, Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Chemical and Biological Research, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: aimt66@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5650-1910>

Irina V. Galyametdinova, Cand. Sci. (Chemistry), Researcher, Laboratory of Nucleotide Base Chemistry, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: iragal2009@yahoo.com

Vyacheslav E. Semenov, Dr. Sci. (Chemistry), Full Professor, Chief Researcher, Head of Laboratory of Nucleotide Base Chemistry, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: sve@iopc.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8350-2433>

Vladimir V. Zobov, Dr. Sci. (Biology), Full Professor, Chief Researcher, Head of Laboratory of Chemical and Biological Research, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: vz30608@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6910-3540>

Поступила в редакцию 16.12.2024

Принята к публикации 02.02.2025

Received December 16, 2024

Accepted February 2, 2025

Оригинальная статья

УДК 577.29

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>**Бесклеточная система трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus*****А.Г. Бикмуллин¹, Э.А. Клочкова², Н.М. Александрова², К.С. Усачев^{1,2}✉**¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия²ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия✉ k.usachev@knc.ru**Аннотация**

Бесклеточные системы трансляции активно используются в практической и фундаментальной науке. Спектр их применения широк, но в основном они необходимы для препаративного биосинтеза белков, экспрессия которых в живых клетках сложна или невозможна, а также для быстрого анализа влияния внешних компонентов на процесс трансляции. Известны бесклеточные системы на основе клеток бактерий, дрожжей, растений, насекомых, млекопитающих и человека. Однако среди этого разнообразия нет представителей класса птиц, несмотря на их распространение как в дикой природе, так и вокруг человека (в быту, пищевой, легкой промышленности, сельском хозяйстве и др.). Система бесклеточной трансляции на основе экстракта клеток птиц востребована в качестве биотехнологического инструмента для решения проблем птицеводства, а также для фундаментальных исследований белоксинтезирующего аппарата птиц. Разработана бесклеточная система трансляции на основе экстракта клеток эмбрионов домашней курицы *Gallus gallus*. После предварительной пробоподготовки и поиска подходящей мРНК проведена реакция бесклеточного биосинтеза люциферазы светлячка в химически дополненном клеточном экстракте.

Ключевые слова: бесклеточная система трансляции, *Gallus gallus*, биосинтез белка *in vitro*, IRES.

Благодарности. Авторы благодарны Евгении Андреевне Пановой, Илье Михайловичу Теренину и Сергею Евгеньевичу Дмитриеву (МГУ им. М. В. Ломоносова) за предоставленные мРНК и консультации при планировании и выполнении эксперимента, а также Александру Александровичу Голубеву за помощь и поддержку на всех этапах исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 075-15-2021-1344 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Для цитирования: Бикмуллин А.Г., Клочкова Э.А., Александрова Н.М., Усачев К.С. Бесклеточная система трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>

**Avian cell-free translation system
based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos**

A.G. Bikmullin¹, E.A. Klochkova², N.M. Alexandrova², K.S. Usachev^{1,2} ✉

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

✉ k.usachev@knc.ru

Abstract

Cell-free translation systems are gaining increasingly widespread use, from both practical and fundamental standpoints. Their applications are diverse but typically revolve around preparative biosynthesis of proteins in cases where expression in living cells is either problematic or unfeasible. They also enable rapid evaluation of the effects produced by external components on the translation process. Existing cell-free systems have been derived from bacterial, yeast, plant, insect, mammalian, and human cells. However, no cell-free systems have been developed from avian cells, despite the ecological and economic significance of birds (in daily life, food production, light industry, agriculture, etc.). Such systems would be powerful biotechnological tools and bring considerable benefits for both poultry farming and fundamental research on the protein synthesis in birds. To address this gap, a cell-free translation system using the extracts from the cells of domestic chicken (*Gallus gallus*) embryos was developed. Following the sample preparation and mRNA selection, the cell-free biosynthesis of firefly luciferase was performed in a chemically supplemented cell extract.

Keywords: cell-free translation system, *Gallus gallus*, *in vitro* protein biosynthesis, IRES

Acknowledgments. mRNA samples and expert guidance on the experiment design and execution were kindly provided by Evgeniya A. Panova, Ilya M. Terenin, and Sergey E. Dmitriev (Moscow State University). Alexander A. Golubev is gratefully acknowledged for his assistance throughout the study.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 075-15-2021-1344).

For citation: Bikmullin A.G., Klochkova E.A., Alexandrova N.M., Usachev K.S. Avian cell-free translation system based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.297-311>. (In Russian)

Введение

Бесклеточные (*in vitro*) системы биосинтеза белка (трансляции) являются широко распространенным инструментом молекулярной биологии и биотехнологии для исследования механизма работы белоксинтезирующего аппарата клетки и препаративного получения рекомбинантных белков, особенно когда их наработка в живых клетках затруднена или невозможна. Эта методология активно используется в области синтетической биологии и метаболической инженерии для моделирования клеточных процессов в различных заданных условиях. Трансляция *in vitro* – это полностью открытая система с возможностью внешнего контроля (состав и условия) и прямого внедрения дополнительных компонентов, в частности, потенциальных ингибиторов биосинтеза белка, ДНК-, РНК-матриц и генетических регуляторных элементов, белков, факторов и т. д., для исследования их влияния на работу системы. С помощью бесклеточных систем трансляции (БСТ) возможно включение синтетических модифицированных аминокислот в состав белка [1, 2].

Существуют два типа БСТ: система трансляции и сопряженная система транскрипции-трансляции. В первом типе происходит синтез полипептидной цепи с матричной РНК (мРНК). Сопряженные системы сочетают в себе оба фундаментальных этапа: транскрипцию (синтез мРНК с матрицы ДНК с помощью РНК-полимеразы) и трансляцию. В качестве ДНК матрицы могут быть использованы как плазмидные векторы, так и линейные фрагменты полимеразной цепной реакции. Достоинством сопряженных систем является значительная экономия времени получения целевого белка, так как отсутствует трудоемкий этап подготовки мРНК [3, 4].

Основу БСТ составляют клеточные экстракты (лизаты) различной степени чистоты или смеси очищенных компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки. Получение клеточных экстрактов является технологически более простым, быстрым и дешевым подходом. В отличие от способов непосредственного культивирования патогенов, БСТ на основе экстрактов клеток патогенных микроорганизмов не требуют специальных условий и уровня защиты лаборатории [5], что является их значимым преимуществом.

Клеточный лизат для получения белка *in vitro* был впервые использован в конце 1940-х годов. Для включения радиоактивно меченых аминокислот в состав синтезируемого белка и измерения скорости синтеза белка был применен лизат клеток печени крыс [6]. В течение следующих десятилетий были разработаны десятки БСТ на основе клеточных экстрактов различных организмов и их тканей. В настоящее время наиболее распространенными являются системы на основе клеточных лизатов грамотрицательных бактерий *E. coli*, проростков пшеницы, ретикулоцитов кроликов, яичников китайских хомячков СНО, пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, насекомых *S. frugiperda*, человеческих клеток HeLa и др. [7–14]. Со времени разработки эти БСТ были оптимизированы и приобрели ряд усовершенствований, что позволило увеличить стабильность, эффективность и время работы системы. БСТ на основе разных клеточных экстрактов стали более универсальными, например, стала возможна трансляция крупных эукариотических (даже мембранных) белков в бактериальных системах [15, 16]. На сегодняшний день доступны коммерческие наборы различных *in vitro* систем трансляции, сформированы основные алгоритмы разработки систем биосинтеза белка *in vitro*, что позволяет создавать системы под конкретные узконаправленные цели.

Для быстрой качественной и количественной оценки работы БСТ (например, при ее оптимизации) используют матрицы, несущие гены белков, наличие которых в смеси можно легко детектировать. В основном это флуоресцентные белки, например, зеленый флуорес-

центный белок GFP [17]. Также часто используют люциферазы, которые в присутствии субстрата люциферина катализируют реакцию его окисления, сопровождающуюся испусканием света. Поскольку люминесценция не подвержена влиянию компонентов экстракта, этот метод отличается высокой чувствительностью [18].

Метод трансляции *in vitro* в целом и каждая его разновидность в частности имеют свои преимущества и недостатки. В определенных условиях БСТ могут производить белок в количестве, сопоставимом с уровнем экспрессии внутри клеток. В таких системах отсутствует необходимость длительного культивирования клеточных культур, и срок получения целевого белка сокращается с 1–2 дней до нескольких часов. Поскольку биосинтез происходит уже вне клеток, становится возможной наработка токсичных, мембранных, вирусных и сложно экспрессируемых белков. Открытость БСТ позволяет адаптировать условия процесса, например, ионную силу, pH, температуру, окислительно-восстановительный потенциал, концентрации мРНК и компонентов реакционной смеси. Для увеличения эффективности синтеза белка становится возможным внесение и определение оптимального количества дополнительных компонентов (аминокислоты, тРНК, полиамины, ферментативные системы регенерации энергии и др.). Добавление в систему ингибиторов эндогенных протеаз и РНКаз позволяет избежать быстрого расщепления белка-продукта и мРНК, соответственно [19, 20]. Малые объемы реакционных смесей снижают потребление реактивов, а также время анализа белкового продукта и скрининга различных условий реакции и генетических регуляторных элементов. Клеточные экстракты могут содержать ферментативные системы посттрансляционной модификации, что необходимо для получения белка, обладающего нативной активностью [20].

Недостатком БСТ часто является высокая стоимость по сравнению с классическими методами внутриклеточной экспрессии белков. Чем больше размер белка, тем меньше эффективность его наработки в *in vitro* системе. Предварительная подготовка исходных реагентов и оптимизация работы системы занимает длительное время. Некоторые компоненты системы требуют специальных условий хранения и быстро теряют активность. Длительная работа системы требует добавления внешних источников энергии, а продукты работы ферментативных реакций экстракта ингибируют трансляцию.

Сопряженные БСТ с ДНК-матрицей обычно являются бактериальными, тогда как в эукариотические системы вносят готовую мРНК. Для инициации трансляции молекула мРНК эукариот должна нести на 5'-конце специальный модифицированный гуанозиновый нуклеотид – так называемый кэп. Также в регуляции трансляции и защите мРНК от расщепления играют важную роль 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО), между которыми расположена последовательность, кодирующая белок. Матрицы некоторых внутриклеточных белков, а также вирусов имеют специальные последовательности внутренней посадки рибосомы (IRES) на 5'-НТО, обеспечивающие кэп-независимую трансляцию. Эти знания помогают ученым с помощью молекулярно-генетического инструментария синтезировать мРНК, подходящие для трансляции в эукариотах. Имеется библиотека различных последовательностей IRES и НТО, которые активно применяются в БСТ. При разработке эукариотических БСТ для эффективного биосинтеза белка необходимо проводить поиск оптимальных НТО. Низкая стабильность мРНК, постоянный риск ее расщепления и необходимость выделения в условиях без РНКаз делают БСТ с матрицей мРНК более сложными в использовании [21].

Подходящая БСТ выбирается в зависимости от целей и области исследования, характеристик белкового продукта и организма-хозяина. Для большинства эукариотических белков

необходимы посттрансляционные модификации, что делает невозможным их синтез в бактериальных системах. Для исследования белков человека выбирают БСТ на основе лизатов клеток млекопитающих, так как они наиболее точно имитируют клетки человека [22]. Система на основе лизата имеет преимущество перед системой очищенных компонентов, так как экстракт содержит в себе вспомогательные гены белков посттрансляционных модификаций и белки шапероны, что обеспечивает правильное сворачивание белка-продукта. Однако система на основе лизата имеет более сложный состав, то есть имеется потенциально большее число источников фона, затрудняющих анализ количества и характеристик целевого белка [23].

Несмотря на большое разнообразие БСТ на основе экстрактов различных клеток (от прокариотических клеток до клеток млекопитающих), остается востребованной разработка новых систем для решения конкретных фундаментальных и практических задач. Существуют широко распространенные и используемые человеком организмы, для которых БСТ не представлены. К их числу относятся представители класса птиц. БСТ на основе клеток птиц имеют большой потенциал и будут востребованы в качестве эффективного биотехнологического инструмента для решения проблем птицеводства, а также для фундаментальных исследований белоксинтезирующего аппарата птиц.

В настоящее время птица является самым потребляемым видом мяса и главным источником пищевого белка для человека. В 2020 году производство мяса птицы составило более 40 % от общего мирового производства [24]. Количество фермерских хозяйств различного масштаба растет вместе с населением планеты. Огромное количество антибиотиков различных классов используют в птицеводстве для метафилактики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний (бактериальных и грибковых), а также в качестве стимуляторов роста [25]. Большая часть известных и применяемых в практике антибиотиков нацелена на остановку биосинтеза белка клетки, а именно на этапы транскрипции или трансляции. Однако влияние широко применяемых в птицеводстве антибиотиков непосредственно на биосинтез белка в птичьих клетках не исследовано. Система трансляции *in vitro* позволит определить, каким образом антибиотики против бактериальных и грибковых инфекций влияют на биосинтез белка в клетках птиц. Кроме того, представляет интерес сравнительный анализ действия различных антибиотиков на БСТ из других прокариотических и эукариотических организмов, что дает возможность оценки селективности антибиотиков. БСТ, в особенности сопряженная, является эффективным инструментом для быстрого скрининга потенциальных антибиотиков. БСТ на основе лизата клеток птиц в комплексе с БСТ бактерий, дрожжей и млекопитающих позволит подбирать селективные ингибиторы, наиболее безопасные для птиц.

Ключевым и центральным элементом системы трансляции является рибосома. Рибосомы эволюционно далеких друг от друга организмов имеют общую структурно-функциональную основу, но имеют определенные отличия. И если является очевидным существенное различие рибосом прокариот и эукариот, то между отдельными царствами эукариот рибосомы также варьируются. По мере эволюционного развития организмов строение рибосомы усложнялось. Недавние результаты, полученные с помощью метода криоэлектронной микроскопии, выявили структурные особенности рибосом домашних кур *Gallus gallus*, отличающие их от рибосом простейших эукариот (дрожжей) и млекопитающих [26]. Так, отличаются структуры фрагментов экспансии рРНК, функция которых неизвестна, но, вероятно, связана с работой транслирующей рибосомы. Это позволяют разработать хими-

чески активную молекулу, которая, подобно антибиотику, сможет избирательно связываться с определенным участком фрагмента экспансии рРНК и инактивировать рибосому конкретного организма. Эффективным методом скрининга таких потенциальных антибиотиков станет бесклеточная система биосинтеза белка.

В настоящей работе рассмотрена система трансляции *in vitro* на основе экстракта эмбрионов домашней курицы *Gallus gallus*. Оплодотворенные куриные яйца – это доступный для приобретения и недорогой источник необходимого биоматериала. Разработан протокол получения клеточного экстракта из эмбрионов куриц, подобраны состав реакционной смеси и условия реакции трансляции, произведен подбор подходящей мРНК и проведена реакция *in vitro* трансляции. Полученные результаты могут стать полезным инструментом для исследования белоксинтезирующего аппарата птиц, что имеет фундаментальное и практическое значение.

1. Экспериментальная часть

1.1. Планирование эксперимента. Выбор характеристик будущей БСТ на основе экстракта эмбрионов *Gallus gallus* базируется на данных научной литературы и опубликованного ранее патента [27], согласно которым наиболее распространенными и эффективными на сегодняшний день эукариотическими БСТ являются системы на основе клеточных экстрактов с мРНК в качестве матрицы [14, 28, 29]. Для обнаружения продукта биосинтеза и оценки уровня трансляции была выбрана люминесцентная люциферазная ферментативная система светлячка *Photinus pyralis*, в которой субстратом является люциферин [18]. Креатинфосфокиназная ферментативная система обеспечивает регенерацию энергии в реакционной смеси [14].

В качестве основы для разработки состава реакционной смеси рассмотрены БСТ на основе экстрактов дрожжевых клеток, клеток яичников китайских хомячков СНО, HeLa и золотистого стафилококка [9, 14, 30]. Для первоначального анализа использованы концентрации компонентов, оптимальные для описанных бесклеточных систем. Выбор подходящей матрицы был основан на скрининге нескольких вариантов мРНК, несущих ген люциферазы светлячка, отличающихся регуляторными НТО на 5'- и 3'-концах.

1.2. Получение клеточного экстракта. Для выделения экстракта из эмбрионов *Gallus gallus* использовали 5–10 оплодотворенных куриных яиц, инкубирование которых проводили в течение 5 сут в термостате при 38 °С и относительной влажности 70–80 %. Последующее извлечение эмбрионов из яиц осуществляли в стерильных условиях на льду [26] пинцетом через отверстие в скорлупе диаметром 2–3 см, после чего промывали на весу с помощью пипетки Пастера 1 мл холодного гипотонического буферного раствора (20 mM HEPES–KOH, pH 7.5; 10 mM CH₃COOK; 1.15 mM KCl; 1.8 mM Mg(CH₃COO)₂; 1 mM дитиотреитол; коктейль ингибиторов протеаз PIC (Thermo Fisher Scientific Inc., США) – 1 таблетка на 50 мл буферного раствора) и перемещали в пластиковую пробирку объемом 15 мл, содержащей 0.1–0.2 мл холодного гипотонического буферного раствора [14, 31]. Все дальнейшие манипуляции с эмбрионами и экстрактом производили при 4 °С или на льду. После инкубации на льду в течение 40 мин эмбрионы переносили в механический измельчитель тканей по типу гомогенизатора Поттера (Tissue grind comp, Kimble Chase, США). Разрушение проводили на льду, ~ 50 движений поршнем измельчителя обеспечивало получение гомогенного экстракта. Полученный лизат с помощью пипетки переносили в пластиковые пробирки объемом 2 мл и очищали от крупных клеточных обломков и жировой фракции центрифугированием на настольной центрифуге MiniSpin+ (Eppendorf, Германия) при 12000 g, 4 °С

в течение 5 мин. Среднюю фазу аккуратно отбирали, переносили в новую пробирку и повторяли центрифугирование в тех же условиях. Супернатант переносили в новую пробирку, измеряли объем и добавляли к нему 1/14 часть концентрированного буферного раствора (20 мМ HEPES-KOH, pH 7.5; 997.5 мМ CH_3COOK ; 1.15 мМ KCl; 1.8 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 1 мМ дитиотреитол). Для удаления эндогенных мРНК, которые являются источником фоновой трансляции, проводили обработку экстракта микрококковой нуклеазой S7 с последующей ее инактивацией этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)- N,N,N',N' -тетрауксусной кислотой [9]. Исходную нуклеазу с концентрацией 7500 Ед/мл (Roche, Германия) добавляли к экстракту до конечной концентрации 10 Ед/мл. Реакцию запускали добавлением CaCl_2 до концентрации 1 мМ, смесь инкубировали в течение 2 мин при 25 °С. Для остановки реакции в смесь добавляли этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)- N,N,N',N' -тетрауксусную кислоту до конечной концентрации 6.7 мМ.

После измерения оптической плотности экстракта при длине волны 260 нм (значение должно составлять ~ 70–100 отн.ед./мл) с помощью спектрофотометра Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., США) образец фракционировали по 110 мкл и замораживали в жидком азоте. Готовый экстракт хранили при –80 °С в течение нескольких месяцев.

1.3. Образцы мРНК для исследования. Образцы мРНК для проверки бесклеточной системы предоставлены Евгенией Андреевной Пановой, научным сотрудником Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им М. В. Ломоносова.

В набор входили:

1) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (EMCV-*fluc*-мРНК) [32];

2) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса пчел (BQCV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (BQCV-*fluc*-мРНК) [33];

3) 5'-кэпированная бицистронная матрица с IRES вируса классической чумы свиней (CSFV) перед геном люциферазы светлячка и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (CSFV-*fluc*-мРНК);

4) 5'-кэпированная моноцистронная матрица с геном люциферазы светлячка, 5'- и 3'-НТО гена $\alpha 1$ -субъединицы гемоглобина человека и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (HBA1-*fluc*-мРНК) [34];

5) 5'-кэпированная моноцистронная матрица с геном люциферазы светлячка, 5'НТО гена белка β -актина человека и 3'полиадениновой сигнальной последовательностью вируса SV40 (ACTB-*fluc*-мРНК) [32];

В бицистронных мРНК перед вирусными IRES находился ген *rluc* (люциферазы *Renilla reniformis*), экспрессия которого также происходила кэп-зависимо.

1.4. Приготовление реакционной смеси. Общий объем реакционной смеси для каждого варианта системы (контроль и опыт) составил 50 мкл (3 повторности по 15 мкл, 5 мкл запаса). Компоненты реакционной смеси, которые хранили при температуре –80 °С, разморозили на льду. Для осаждения агрегировавшей фракции оттаявший экстракт центрифугировали на настольной центрифуге MiniSpin+ (Eppendorf, Германия) при 14500 об/мин в течение 10 мин при 4 °С, супернатант переносили в новую пробирку. Смешивание компонентов проводили на льду [30]. Для приготовления реакционной смеси компоненты

вносили в фильтрованную деионизированную воду MQ в следующем порядке (в скобках указана концентрация компонента в смеси): HEPES-КОН pH 7.5 (20 мМ), дитиотреитол (4.5 мМ), ацетат магния (0.6 мМ), ацетат калия (100 мМ), смесь 20 аминокислот (по 0.1 мМ каждой), дрожжевая тРНК (0.25 мг/мл), аденозинтрифосфат (1.26 мМ), гуанозинтрифосфат (0.12 мМ), креатин фосфат в виде динатриевой соли (20 мМ) от Sigma-Aldrich (США), ингибитор РНКаз (1 Ед/мкл) от Биоллабмикс (Россия), креатинфосфокиназа (0.1 мг/мл) от Sigma-Aldrich (США), люциферин (0.1 мМ) от Merck (США), клеточный экстракт (50 % от объема смеси) [9, 14]. Затем реакционную смесь разделяли на две пробирки: опытную, в которую вносили мРНК (до финальной концентрации в смеси: 20 нг/мкл), и контрольную с водой MQ вместо матрицы. Общий объем раствора в каждой пробирке составлял 50 мкл. Для одновременного запуска реакции можно использовать многоканальную пипетку.

1.5. Постановка реакции. Реакцию трансляции *in vitro* проводили в 384-луночном планшете из черного непрозрачного пластика (Greiner Bio-One, Австрия) в фотометре Feyond-A300 (Allsheng, КНР) при температуре 30 °С. В лунку вносили 15 мкл реакционной смеси. Кинетику реакции испускания света измеряли в течение 1 ч с периодичностью 2 мин.

1.6. Статистическая обработка данных. Все измерения проводили в трех повторностях. Результаты представляли как среднее значение и стандартное отклонение, которые рассчитывали с помощью программного пакета Excel (Microsoft Corp., США).

2. Результаты и их обсуждение

Предварительные исследования показали, что пятидневные эмбрионы являются оптимальными для получения экстракта. Трех- и четырехдневные эмбрионы имеют слишком малый размер и мягкую консистенцию, что затрудняет манипуляции по их извлечению. Для эмбрионов на более поздних сроках наблюдается большая дифференциация тканей. Из оплодотворенных яиц было извлечено 9 пятидневных эмбрионов. В результате их гомогенизации, очистки полученного лизата последовательными этапами центрифугирования и ферментативной обработки нуклеазой S7 был получен клеточный экстракт объемом 1.55 мл с оптической плотностью при 260 нм, равной 76 отн.ед./мл.

Для установления рабочей матрицы проведено последовательно пять реакций с различными мРНК в идентичных условиях. Все мРНК имели кэп на 5'-конце, несли ген репортерной люциферазы светлячка (*fluc*) между различными 5'- и 3'НТО, имели полиадениновую последовательность на 3'конце. Бицистронные мРНК также имели ген люциферазы *rluc* (транслирующийся кэп-зависимо) перед последовательностями IRES. Экспрессия этого гена используется в люминесцентных ферментативных системах с целентеразином в качестве субстрата, что не имеет отношения к проводимому эксперименту. Выбор таких регуляторных последовательностей мРНК обусловлен их успешным применением в других эукариотических бесклеточных системах. В качестве контроля использовали реакционную смесь с деионизированной водой вместо мРНК.

В результате измерения люминесценции продуктов пяти реакций установлено, что синтез люциферазы произошел только в одном случае – НВА1-*fluc*-мРНК (рис. 1). Остальные варианты не отличались от контрольного. Вероятно, внутренняя (кэп-независимая) инициация невозможна в бесклеточной системе *Gallus gallus* в данных условиях для вирусных IRES, что, вероятно, связано с элементами вторичной структуры этих регионов. Кэп-зависимая инициация трансляции также не удалась, то есть можно считать, что 5'НТО гена белка β-актина человека является неподходящей в данной бесклеточной системе.

Испускание света в реакционной смеси с HBA1-*fluc*-мРНК было зафиксировано и стало экспоненциально расти через ~ 14 мин после начала реакции. Возможно, это время необходимо для прогрева реакционной смеси в планшете и наработки достаточного для регистрации сигнала количества люциферазы. Судя по графику (рис. 1), реакция продолжается в течение всего периода измерения (60 мин). Форма кривой совпадает с полученными ранее в экспериментах с сопряженной БСТ на основе клеточного экстракта *S. aureus* [35].

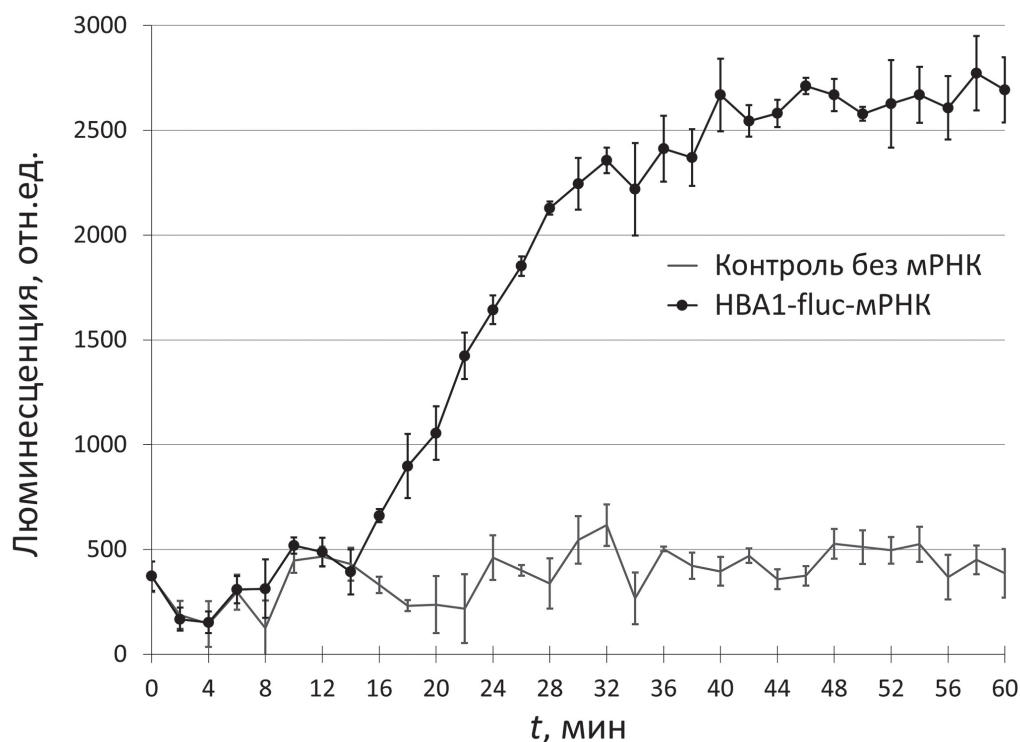


Рис. 1. Кинетика биосинтеза люциферазы с матрицы HBA1-*fluc*-мРНК в бесклеточной системе трансляции на основе клеточного экстракта эмбрионов *G. gallus*

Fig. 1. Kinetics of the firefly luciferase biosynthesis in a cell-free translation system based on the cell extract of *Gallus gallus* embryos with HBA1-*fluc*-mRNA template

Разработанный способ и зарегистрированные значения люминесценции в БСТ на основе клеточного экстракта эмбрионов *Gallus gallus* можно использовать как основу для дальнейших исследований по оптимизации количества компонентов в реакционной смеси (особенно K^+ , Mg^{2+} , и экстракта), а также для поиска оптимальных мРНК и IRES-регионов. Также существует возможность использования системы флуоресценции GFP в качестве репортерной.

Заключение

В результате исследования разработан протокол получения клеточного экстракта из эмбрионов домашних кур *Gallus gallus*, подобраны состав реакционной смеси и условия реакции трансляции *in vitro*, произведены подбор мРНК и реакция бесклеточного биосинтеза люциферазы в химически дополненном клеточном экстракте. Установлено, что для получения клеточного экстракта следует использовать пятидневные эмбрионы, 5'-кэпированная монокистронная мРНК с геном люциферазы светлячка *fluc*, 5'- и 3'-НТО гена $\alpha 1$ -субъединицы гемоглобина человека и полиадениновой последовательностью на 3'-конце (HBA1-*fluc*-мРНК) применима для бесклеточной системы на основе клеточного

экстракта эмбрионов *Gallus gallus*, а найденные экспериментально состав реакционной смеси и условия реакции обеспечивают успешный бесклеточный синтез белка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. *Spirin A.S., Swartz J.R.* (Eds.) Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. 262 p.
2. *Chong S.* Overview of cell-free protein synthesis: Historic landmarks, commercial systems, and expanding applications // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 108. P. 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>.
3. *Nevin D.E., Pratt J.M.* A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter // *FEBS Lett.* 1991. V. 291, No 2. P. 259–263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81297-L](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81297-L).
4. *Craig D., Howell M.T., Gibbs C.L., Hunt T., Jackson R.J.* Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20, No 19. P. 4987–4995. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.4987>.
5. *Tuckey C., Asahara H., Zhou Y., Chong S.* Protein synthesis using a reconstituted cell-free system // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 108. P. 16.31.1–16.31.22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1631s108>.
6. *Zamecnik P.C., Frantz I.D., Loftfield R.B., Stephenson M.L.* Incorporation in vitro of radioactive carbon from carboxyl-labeled DL-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers // *J. Biol. Chem.* 1948. V. 175, No 1. P. 299–314. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57260-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57260-4).
7. *Smolskaya S., Logashina Y.A., Andreev Y.A.* *Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, No 3. Art. 928. <https://doi.org/10.3390/ijms21030928>.
8. *Burgenson D., Gurramkonda C., Pilli M., Ge X., Andar A., Kostov Y., Tolosa L., Rao G.* Rapid recombinant protein expression in cell-free extracts from human blood // *Sci. Rep.* 2018. V. 8, No 1. Art. 9569. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27846-8>.
9. *Brödel A.K., Sonnabend A., Kubick S.* Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111, No 1. P. 25–36. <https://doi.org/10.1002/bit.25013>.
10. *Stech M., Quast R.B., Sachse R., Schulze C., Wüstenhagen D.A., Kubick S.* A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells // *PloS One.* 2014. V. 9, No 5. Art. e96635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096635>.
11. *Madin K., Sawasaki T., Ogasawara T., Endo Y.* A highly efficient and robust protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97, No 2. P. 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>.
12. *Stavnezer J., Huang R.C.C.* Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system // *Nat. New Biol.* 1971. V. 230, No 14. P. 172–176. <https://doi.org/10.1038/newbio230172a0>.
13. *Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., Imataka H.* An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors // *Protein Expression Purif.* 2006. V. 46, No 2. P. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.021>.
14. *Gan R., Jewett M.C.* A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthesis // *Biotechnol. J.* 2014. V. 9, No 5. P. 641–651. <https://doi.org/10.1002/biot.201300545>.

15. Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271, No 3. P. 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03959.x>.
16. Kalmbach R., Chizhov I., Schumacher M.C., Friedrich T., Bamberg E., Engelhard M. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *In situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371, No 3. P. 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.087>.
17. Garenne D., Haines M.C., Romantseva E.F., Freemont P., Strychalski E.A., Noireaux V. Cell-free gene expression // *Nat. Rev. Methods Primers.* 2021. V. 1, No 1. Art. 49. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>.
18. Sato W., Rasmussen M., Deich C., Engelhart A.E., Adamala K.P. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression // *Sci. Rep.* 2022. V. 12, No 1. Art. 11489. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15624-6>.
19. Thornton E.L., Paterson S.M., Stam M.J., Wood C.W., Laohakunakorn N., Regan L. Applications of cell free protein synthesis in protein design // *Protein Sci.* 2024. V. 33, No 9. Art. e5148. <https://doi.org/10.1002/pro.5148>.
20. Maharjan A., Par J.-H. Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2023. V. 70, No 6. P. 2136–2149. <https://doi.org/10.1002/bab.2514>.
21. Brödel A.K., Sonnabend A., Roberts L.O., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems // *PLoS One.* 2013. V. 8, No 12. Art. e82234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082234>.
22. Arduengo M., Schenborn E., Hurst R. The role of cell-free rabbit reticulocyte expression systems in functional proteomics // Kudlicki W., Katzen F., Bennett R. (Eds.) *Cell-Free Expression*. Austin, TX: Landes Biosci., 2007. P. 1–18.
23. Sword T.T., Abbas G.S.K., Bailey C.B. Cell-free protein synthesis for nonribosomal peptide synthetic biology // *Front. Nat. Prod.* 2024. V. 3. Art. 1353362. <https://doi.org/10.3389/fntr.2024.1353362>.
24. Abreu R., Semedo-Lemsaddek T., Cunha E., Tavares L., Oliveira M. Antimicrobial drug resistance in poultry production: Current status and innovative strategies for bacterial control // *Microorganisms.* 2023. V. 11, No 4. Art. 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>.
25. Rodrigues G., Santos L.S., Franco O.L. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 874153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874153>.
26. Nurullina L., Terrosu S., Myasnikov A.G., Jenner L.B., Yusupov M. Cryo-EM structure of the inactive ribosome complex accumulated in chick embryo cells in cold-stress conditions // *FEBS Lett.* 2024. V. 598, No 5. P. 537–547. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14831>.
27. Усачев К.С., Голубев А.А., Александрова Н.М., Ключкова Э.А., Бикмуллин А.Г., Валидов Ш.З., Юсупов М.М. Бесклеточная система синтеза белка на основе эмбриональных клеток *Gallus gallus* и способ синтеза белка на основе бесклеточной системы синтеза белка эмбриональных клеток // Патент РФ на изобретение № 2807690. 2023. Бюл. ФИПС № 33.
28. Brödel A.K., Wüstenhagen D.A., Kubick S. Cell-free protein synthesis systems derived from cultured mammalian cells // Owens R.J. (Ed.). *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*. Ser.: *Methods in Molecular Biology*. V. 1261. New York, NY: Humana Press, 2015. P. 129–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2230-7_7.
29. Pelham H.R.B., Jackson R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 67, No 1. P. 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x>.
30. Fatkhullin B., Golubev A., Garaeva N., Validov S., Gabdulkhakov A., Yusupov M. Y98 mutation leads to the loss of RsfS anti-association activity in *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23, No 18. Art. 10931. <https://doi.org/10.3390/ijms231810931>.

31. Lintner N.G., McClure K.F., Petersen D., Londregan A.T., Piotrowski D.W., Wei L., Xiao J., Bolt M., Loria P.M., Maguire B., Geoghegan K.F., Huang A., Rolph T., Liras S., Doudna J.A., Dullea R.J., Cate J.H.D. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain // *PLoS Biol.* 2017. V. 15, No 3. Art. E2001882. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001882>.
32. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m⁷G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37, No 18. P. 6135–6147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp665>.
33. Lidsky P.V., Yuan J., Lashkevich K.A., Dmitriev S.E., Andino R. Monitoring integrated stress response in live *Drosophila* // *bioRxiv* [Preprint]. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548942>.
34. Panova E.A., Kleymentov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. Art. 1098302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>.
35. Golubev A. Structural and functional studies of *S. aureus* translation machinery: PhD thesis. Univ. of Strasbourg, 2021. P. 79–93.

References

1. Spirin A.S., Swartz J.R. (Eds.) *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Weinheim, Wiley-VCH, 2008. 262 p.
2. Chong S. Overview of cell-free protein synthesis: Historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2014, vol. 108, pp. 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>.
3. Nevin D.E., Pratt J.M. A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 291, no. 2, pp. 259–263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81297-L](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81297-L).
4. Craig D., Howell M.T., Gibbs C.L., Hunt T., Jackson R.J. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, no. 19, pp. 4987–4995. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.4987>.
5. Tuckey C., Asahara H., Zhou Y., Chong S. Protein synthesis using a reconstituted cell-free system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2014, vol. 108, pp. 16.31.1–16.31.22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1631s108>.
6. Zamecnik P.C., Frantz I.D., Loftfield R.B., Stephenson M.L. Incorporation in vitro of radioactive carbon from carboxyl-labeled DL-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers. *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 175, no. 1, pp. 299–314. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57260-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57260-4).
7. Smolskaya S., Logashina Y.A., Andreev Y.A. *Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 3, art. 928. <https://doi.org/10.3390/ijms21030928>.
8. Burgenson D., Gurramkonda C., Pilli M., Ge X., Andar A., Kostov Y., Tolosa L., Rao G. Rapid recombinant protein expression in cell-free extracts from human blood. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 9569. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27846-8>.
9. Brödel A.K., Sonnabend A., Kubick S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, vol. 111, no. 1, pp. 25–36. <https://doi.org/10.1002/bit.25013>.
10. Stech M., Quast R.B., Sachse R., Schulze C., Wüstenhagen D.A., Kubick S. A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5, art. e96635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096635>.

11. Madin K., Sawasaki T., Ogasawara T., Endo Y. A highly efficient and robust protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 2, pp. 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>.
12. Stavnezer J., Huang R.C.C. Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Nat. New Biol.*, 1971, vol. 230, no. 14, pp. 172–176. <https://doi.org/10.1038/newbio230172a0>.
13. Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S., Imataka H. An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Protein Expression Purif.*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.021>.
14. Gan R., Jewett M.C. A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthesis. *Biotechnol. J.*, 2014, vol. 9, no. 5, pp. 641–651. <https://doi.org/10.1002/biot.201300545>.
15. Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 3, pp. 568–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03959.x>.
16. Kalmbach R., Chizhov I., Schumacher M.C., Friedrich T., Bamberg E., Engelhard M. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *In situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 371, no. 3, pp. 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.087>.
17. Garenne D., Haines M.C., Romantseva E.F., Freemont P., Strychalski E.A., Noireaux V. Cell-free gene expression. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2021, vol. 1, no. 1, art. 49. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>.
18. Sato W., Rasmussen M., Deich C., Engelhart A.E., Adamala K.P. Expanding luciferase reporter systems for cell-free protein expression. *Sci. Rep.*, 2022, vol. 12, no. 1, art. 11489. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15624-6>.
19. Thornton E.L., Paterson S.M., Stam M.J., Wood C.W., Laohakunakorn N., Regan L. Applications of cell free protein synthesis in protein design. *Protein Sci.*, 2024, vol. 33, no. 9, art. e5148. <https://doi.org/10.1002/pro.5148>.
20. Maharjan A., Par J.-H. Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2023, vol. 70, no. 6, pp. 2136–2149. <https://doi.org/10.1002/bab.2514>.
21. Brödel A.K., Sonnabend A., Roberts L.O., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12, art. e82234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082234>.
22. Arduengo M., Schenborn E., Hurst R. The role of cell-free rabbit reticulocyte expression systems in functional proteomics. In: Kudlicki W., Katzen F., Bennett R. (Eds.) *Cell-Free Expression*. Austin, TX, Landes Biosci., 2007, pp. 1–18.
23. Sword T.T., Abbas G.S.K., Bailey C.B. Cell-free protein synthesis for nonribosomal peptide synthetic biology. *Front. Nat. Prod.*, 2024, vol. 3, art. 1353362. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1353362>.
24. Abreu R., Semedo-Lemsaddek T., Cunha E., Tavares L., Oliveira M. Antimicrobial drug resistance in poultry production: Current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 4, art. 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>.
25. Rodrigues G., Santos L.S., Franco O.L. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13, art. 874153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874153>.
26. Nurullina L., Terrosu S., Myasnikov A.G., Jenner L.B., Yusupov M. Cryo-EM structure of the inactive ribosome complex accumulated in chick embryo cells in cold-stress conditions. *FEBS Lett.*, 2024, vol. 598, no. 5, pp. 537–547. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14831>.
27. Usachev K.S., Golubev A.A., Aleksandrova N.M., Klochkova E.A., Bikmullin A.G., Validov Sh.Z., Isusupov M.M. A cell-free protein synthesis system based on *Gallus gallus* embryonic cells and

- a method of protein synthesis based on cell-free protein synthesis system in embryonic cells. Patent RF no. 2807690. *Byull. FIPS*, 2023, no. 33. (In Russian)
28. Brödel A.K., Wüstenhagen D.A., Kubick S. Cell-free protein synthesis systems derived from cultured mammalian cells. In: Owens R.J. (Ed.) *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*. Ser.: Methods in Molecular Biology. Vol. 1261. New York, NY, Humana Press, 2015, pp. 129–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2230-7_7.
 29. Pelham H.R.B., Jackson R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, 1976, vol. 67, no. 1, pp. 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x>.
 30. Fatkhullin B., Golubev A., Garaeva N., Validov S., Gabdulkhakov A., Yusupov M. Y98 mutation leads to the loss of RsfS anti-association activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 18, art. 10931. <https://doi.org/10.3390/ijms231810931>.
 31. Lintner N.G., McClure K.F., Petersen D., Londregan A.T., Piotrowski D.W., Wei L., Xiao J., Bolt M., Loria P.M., Maguire B., Geoghegan K.F., Huang A., Rolph T., Liras S., Doudna J.A., Dullea R.J., Cate J.H.D. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain. *PLoS Biol.*, 2017, vol. 15, no. 3, art. E2001882. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001882>.
 32. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m⁷G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, no. 18, pp. 6135–6147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp665>.
 33. Lidsky P.V., Yuan J., Lashkevich K.A., Dmitriev S.E., Andino R. Monitoring integrated stress response in live *Drosophila*. bioRxiv (Preprint). 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548942>.
 34. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, art. 1098302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>.
 35. Golubev A. Structural and functional studies of *S. aureus* translation machinery. *PhD thesis*. Univ. of Strasbourg, 2021, pp. 79–93.

Информация об авторах

Айдар Галимжанович Бикмуллин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: aydar.bikmullin@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7146-3289>

Эвелина Андреевна Ключкова, старший научный сотрудник лаборатории структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Наталья Михайловна Александрова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических и микробиологических методов, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: natalya5566@yandex.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8131-2855>

Константин Сергеевич Усачев, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»

E-mail: k.usachev@knc.ru

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Author Information

Aydar G. Bikmullin, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: *aydar.bikmullin@gmail.com*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7146-3289>

Evelina A. Klochkova, Senior Researcher, Laboratory for Structural Analysis of Biomacromolecules, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *evelina.klochkova@gmail.com*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Natalya M. Alexandrova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Microbiological Methods, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *natalya5566@yandex.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8131-2855>

Konstantin S. Usachev, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory for Structural Analysis of Biomacromolecules, FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: *k.usachev@knc.ru*

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Поступила в редакцию 21.12.2024

Принята к публикации 20.01.2025

Received December 21, 2024

Accepted January 20, 2025

Обзорная статья

УДК 57.086.83:582.273

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.312-335>**Анализ и апробация методов отделения микроводорослей от культуральной среды, применимых для *Porphyridium purpureum*****С.Ю. Горбунова , А.Б. Боровков***Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, Россия* svetlana_8423@mail.ru**Аннотация**

Описаны современные методы отделения биомассы микроводорослей от культуральных сред, а также основные преимущества и недостатки, связанные с их использованием. При выборе наиболее подходящего и экономически обоснованного метода сбора урожая микроводорослей особое внимание следует уделять масштабам производства, видам микроводорослей, составу питательных сред. Проведена апробация методов центрифугирования, гравитационного осаждения и сепарирования для отделения клеток морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* от культуральной среды. Экспериментально установлено значимое превосходство метода сепарирования над двумя другими способами по сухому весу биомассы и по затраченному времени. При энергоемкости в 1 кВт метод сепарирования дает возможность обработать в 100 раз больший объем суспензии и получить 20.75 г сухой биомассы *P. purpureum*, что демонстрирует пятикратное превосходство над методом центрифугирования. Для обеспечения высокого коэффициента концентрирования биомассы и снижения энергетических затрат рекомендуется применять многостадийный процесс сбора *P. purpureum*, сочетающий первичное гравитационное осаждение и методы центрифугирования или сепарирования. Проведенные исследования могут служить основой для разработки практических рекомендаций по эффективному сбору микроводорослей в промышленных масштабах.

Ключевые слова: урожай микроводорослей, методы концентрирования биомассы, культура микроводорослей.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-26-20131).

Для цитирования: Горбунова С.Ю., Боровков А.Б. Анализ и апробация методов отделения микроводорослей от культуральной среды, применимых для *Porphyridium purpureum* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 312–335. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.312-335>.

Review article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.312-335>

Analysis and evaluation of methods used for harvesting microalgae from culture media and suitable for *Porphyridium purpureum*

S.Yu. Gorbunova ✉, A.B. Borovkov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences,
Sevastopol, Russia

✉ svetlana_8423@mail.ru

Abstract

This article reviews modern methods for harvesting microalgae biomass from culture media, explores their advantages and limitations, as well as argues that the choice of an optimal and efficient method depends on the scale of production, the types of microalgae, and the composition of culture media. Here, the methods of centrifugation, gravity sedimentation, and separation were evaluated for their efficiency in the recovery of *Porphyridium purpureum* cells. During the experiments, separation outperformed the other two methods in terms of the resulting biomass dry weight and the time consumed. When applied to *Porphyridium purpureum*, it yielded 20.75 g of dry biomass by processing a 100 times larger volume of the suspension at 1 kW of energy input, thus demonstrating a fivefold increase in overall efficiency compared to centrifugation. To achieve a high biomass concentration ratio and reduce energy costs in the recovery of *P. purpureum*, a multi-stage harvesting process, combining initial gravity sedimentation with either centrifugation or separation, was proposed. The findings can serve as the basis for developing practical guidelines on selecting an optimal strategy for large-scale harvesting of microalgae.

Keywords: microalgae harvest, biomass concentration methods, microalgae culture

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 24-26-20131).

For citation: Gorbunova S.Yu., Borovkov A.B. Analysis and evaluation of methods used for harvesting microalgae from culture media and suitable for *Porphyridium purpureum*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 312–335. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.312-335>. (In Russian)

1. Современные методы сбора урожая микроводорослей

Микроводоросли, являясь фотосинтезирующими автотрофными микроскопическими организмами, способны не только удваивать свое количество за несколько часов, но и вырабатывать при этом огромный комплекс соединений, который имеет значение не только для человека, но и для животных, водных организмов. Это обуславливает использование микроводорослей в качестве сырья для получения натуральных красителей, продуктов косметической и фармацевтической промышленности, медицинских и сельскохозяйственных препаратов. Следует учитывать, что при организации любого микроводорослевого производства как в открытых прудах, так и закрытых фотобиореакторах, одной из первоо-

чередных задач является выбор научно обоснованного, простого, безопасного и экономически эффективного метода сбора урожая. Процесс отделения клеток микроводорослей от культуральной среды является наиболее сложной частью технологической цепочки, так как требует технически сложного и дорогостоящего оборудования (производство сопровождается удорожанием или потерями продукции), а также определяет эффективность последующего использования или переработки полученного биологического материала [1]. В настоящее время в технологиях сбора микроводорослей преимущественно применяются гравитационные методы, флокуляция, флотация и методы фильтрации, включающие в себя биологические, химические и механические подходы, а также их различные комбинации (рис. 1) [2, 3].



Рис. 1. Систематизация существующих методов отделения микроводорослей от культуральной среды
Fig. 1. Systematic overview of methods employed for harvesting microalgae from culture media

В то же время отсутствует универсальный оптимальный метод извлечения биомассы микроводорослей, который мог бы быть применим во всех случаях. Каждый из методов обладает как преимуществами, так и недостатками, что отображено в табл. 1.

При выборе наиболее эффективного метода сбора урожая микроводорослей следует учитывать основные ключевые факторы, такие как размер и тип клеток микроводорослей, их концентрация, а также условия культивирования [4]. Согласно современным литературным данным, организация процесса отделения клеток от культуральной среды, являющегося одним из ключевых этапов производственного цикла, составляет от 30 до 60 % от общей стоимости [5–9]. Разработка экономически эффективных альтернативных методов обработки больших объемов суспензий микроводорослей является ключевым фактором, способствующим увеличению масштабов производства и коммерческому использованию микроводорослевой биомассы.

Табл. 1. Сравнение методов сбора микроводорослей

Table 1. Comparison of methods for microalgae harvesting

Метод	Преимущества	Недостатки	Урожай (сухое вещество, %)	Литература
1	2	3	4	5
Центрифугирование	Извлечение клеток – более 90 %; сохранение целостности клеток; надежность; подходит для большинства видов микроводорослей; быстрота и высокая эффективность сбора биомассы; возможность комбинирования с другими методами	Высокие капитальные и эксплуатационные затраты, энергоемкость	12–22	[10, 11]
Сепарирование	Извлечение клеток – 90–95 %; высокая центробежная сила	Ограниченный объем резервуара; требуется периодическая очистка	12–22	[12, 13]
Гравитационное осаждение	Извлечение клеток – 10–90 %; без применения химических соединений; низкая стоимость; возможность повторного использования культуральной среды	Длительность процесса, низкая эффективность	0.5–3	[13, 14]
Фильтрация	Извлечение клеток – 70–90 %; сохранение целостности клеток; возможность деликатной обработки клеток; широкий выбор доступных типов фильтров, и мембран; надежность	Зависимость от размера клеток, проблемы засорения или загрязнения фильтров и мембран; высокие капитальные и эксплуатационные затраты	5–27	[10, 15–18]
Мембранное разделение	Извлечение клеток – до 60 %; без применения химических соединений	Применим для культур с низкой плотностью, в небольших масштабах; периодическое загрязнение мембраны	2–5	[10, 15]
Флокуляция химическая	Извлечение клеток – более 90 %, широкий ассортимент доступных флокулянтов	Загрязнение биомассы флокулянтами, нарушение целостности клеток; длительное время отстаивания; биомасса микроводорослей не рекомендуется для использования в пищу	3–8	[19–24]
Флокуляция физическая	Извлечение клеток до 90 %; снижение энергозатрат; отсутствие токсического воздействия на клетки микроводорослей	Регулирование pH химическими соединениями; биомасса микроводорослей не рекомендуется для использования в пищу	3–6	[19, 25]

Окончание табл. 1 / End of Table 1

1	2	3	4	5
Биофлокуляция	Извлечение клеток – более 90 %; существенное снижения энергозатрат; высокая эффективность сбора биомассы	Загрязнение биомассы флокулянтами; низкий ассортимент доступных флокулянтов; высокая стоимость; длительное время отстаивания; стресс клеток и деградация ценных фитохимических веществ; необходимость регулирования pH химическими соединениями	3–10	[26]
Автофлокуляция	Извлечение клеток – 10–60 %; самопроизвольное осаждение клеток; низкая стоимость; рекомендовано использование в качестве первой ступени для снижения энергозатрат и стоимости последующих стадий	Рекомендован для плотных (тяжелых) неподвижных клеток; низкие скорости разделения; низкая конечная концентрация микроводорослей. Подходит не для всех типов питательных сред; высокие значения pH могут привести к стрессированию и разрушению клеток микроводорослей	0.5–4	[27, 28]
Электрокоагуляция	Извлечение клеток – до 90 %; экологическая безопасность, отсутствует необходимость добавления химических реагентов	Частое засорения катодов, повреждение оборудования	2–7	[29–31]
Флотация	Извлечение клеток – 50–90 %; скорость выше, чем при осаждении; возможность комбинирования с другими методами; низкое энергопотребление	Специфичность к отдельным видам микроводорослей; высокие капитальные и эксплуатационные затраты; низкая надежность; обычно требуются флокулянты	3–6	[2, 32]

Значительные экономические затраты, связанные со сбором урожая микроводорослей, целесообразны и оправданы в тех случаях, когда продукция из микроводорослей представляет собой товары с высокой добавленной стоимостью. Однако для массовых товаров с низкой ценностью необходимо значительное сокращение как капитальных, так и эксплуатационных затрат, чтобы обеспечить возможность и рентабельность их коммерческого производства [3, 33]. Поэтому поиск и анализ наиболее экономически эффективных методов сбора биомассы микроводорослей с учетом специфики и условий культивирования для определенных типов производств являются актуальной задачей.

1.1. Центрифугирование. Благодаря своей популярности, универсальности и экономической эффективности центрифугирование является одним из наиболее часто используемых методов быстрого отделения микроводорослей от культуральной среды. Центрифуги – наиболее распространенный тип оборудования непрерывного действия. Принцип работы центрифуги основан на создании центробежной силы в соответствии с законом Стокса, которая определяется разницей в плотностях между жидкой и твердой фазами, а также зависит от размера частиц и плотности компонентов среды [34]. Поэтому центрифуги эффективны при сборе подавляющего большинства видов микроводорослей [10, 11], что является одним из основных преимуществ этого метода. В отличие от других методов, для которых необходимо предварительное концентрирование суспензии клеток, при работе с небольшими объемами биомассы центрифугирование успешно применяют в качестве одностадийного процесса отделения микроводорослей от жидких сред [32]. Но несмотря на эффективность, метод характеризуется высокой энергоемкостью и сложностью масштабирования. Кроме того, процесс центрифугирования сопряжен со значительными расходами на техническое обслуживание. Поэтому в условиях работы с большими объемами биомассы рекомендуется проводить предварительное осаждение микроводорослей. Это позволяет сделать суспензию более плотной и многократно увеличить концентрацию клеток, что в результате сокращает время центрифугирования и снижает затраты энергии.

1.2. Сепарирование является разновидностью метода центрифугирования. Отделение клеток микроводорослей от культуральной среды осуществляют с помощью проточного трубчатого сепаратора, который широко используется для сбора урожая микроводорослей с размером клеток до 20–30 мкм, таких как *Chlorella vulgaris*, *Limnospira platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Porphiridium purpureum*, *Dunaliella vulgaris* [13]. За счет сильного центробежного поля происходит разделение культуральной среды и биомассы микроводорослей, которая оседает на внутренней стенке барабана сепаратора, при этом клеточные стенки не разрушаются, что позволяет предотвратить потерю их содержимого и обеспечивает высокое качество продукта [12].

1.3. Гравитационное осаждение – это недорогой способ сбора урожая микроводорослей, который представляет собой процесс осаждения клеток под воздействием собственной силы тяжести и часто используется при очистке сточных вод [17]. В результате над осевшими частицами остается прозрачная надосадочная жидкость – культуральная среда. Характеристики осевших частиц зависят от скорости осаждения [13]. Обычно это довольно медленный процесс, что обусловлено низким удельным весом клеток микроводорослей [35]. При этом существует вероятность того, что за время отстаивания большая часть биомассы может испортиться [14]. Однако метод характеризуется преимуществом с экономической и экологической точек зрения, так как исключает внесение каких-либо добавок в суспензию микроводорослей [36, 37]. Это особенно актуально для крупномасштабных производств, поскольку обеспечивает возможность повторного использования питательной среды [11].

1.4. Фильтрация представляет собой механический метод отделения клеток микроводорослей от культуральной жидкости с использованием сеток, фильтровальных материалов и проницаемых мембран, которые задерживают твердые частицы. Этот метод широко и успешно применяется для отделения биомассы микроводорослей рода *Spirulina* (*Arthrospira* or *Limnospira*) [18]. Однако большинство исследователей по-прежнему считают основным недостатком традиционного процесса фильтрации его непригодность для сбора микроводорослей с размером клеток менее 30 мкм [16], таких как *Chlorella* или *Dunaliella* [10].

Одной из разновидностей метода фильтрация является мембранное разделение. В контролируемых лабораторных условиях к вакуумной колбе крепится воронка с фильтром, через которую пропускают суспензию микроводорослей. Задержавшиеся на фильтре клетки подсыхают, при этом воздух постоянно отсасывают с помощью вакуумного насоса. Этот метод может быть адаптирован для сбора низкоконцентрированных культур микроводорослей в маломасштабных проектах. Одним из основных недостатков метода фильтрации является быстрое образование плотного слоя из клеток микроводорослей на фильтрах, мембранах или сите, что значительно снижает скорость потока культуральной жидкости [15] и приводит к существенному повышению эксплуатационных расходов, связанных с необходимостью замены дорогостоящих расходных материалов. Несмотря на то, что метод фильтрации уступает центрифугированию по скорости концентрирования клеток микроводорослей [10], он по-прежнему является более простым и экономически выгодным вариантом.

1.5. Флокуляция. Одним из подходов, используемых для отделения клеток микроводорослей от культуральной среды, является флокуляция [19]. В ходе этого процесса в суспензию водорослей вводится агент, способствующий агрегации клеток и приводящий к формированию крупных коллоидных структур под действием сил Ван-дер-Ваальса. Эффективность флокуляции определяется взаимодействием поверхностных зарядов клеток и добавленного флокулянта. В настоящее время исследованы различные методы флокуляции микроводорослей, включающие химические, физические, биологические подходы, а также автофлокуляцию и электрокоагуляцию [25, 38].

Химическую флокуляцию микроводорослей можно проводить с использованием трех основных категорий флокулянтов: неорганические соединения, включающие соли металлов и аммиак, неорганические и органические полимеры. В научной литературе представлены примеры успешного применения этого метода для извлечения клеток различных видов микроводорослей, что обусловлено высокой эффективностью процесса флокуляции и простотой сбора биомассы [22, 39]. К химическим агентам, применяющимся в процессах флокуляции, относятся магний сернокислый, хлорид железа [21], полиакриламидные полимеры, гидроксиды калия и натрия, алюминиевые квасцы [10, 20], а также карбонат натрия [24]. Однако процесс применения химических коагулянтов и флокулянтов имеет ряд значительных недостатков и ограничений. Во-первых, для эффективной работы необходимо использовать их высокие концентрации, что приводит к существенным эксплуатационным затратам, а также к образованию значительного количества осадка, который препятствует росту микроводорослей. Во-вторых, при использовании этих флокулянтов существует высокая вероятность загрязнения биомассы микроводорослей катионами металлов, что может отрицательно сказаться на обменных процессах в клетках [21]. Согласно исследованиям, проведенным в работе [40], несмотря на высокую эффективность применения квасцов в качестве флокулирующих агентов, биомасса пресноводных микроводорослей *Scenedesmus* и *Chlorella* оказалась непригодной для дальнейшего использования в аквакультуре или в качестве пищевых продуктов для животных. В-третьих, остаточные вещества (алюминий и другие канцерогенные компоненты), содержащиеся в клетках микроводорослей, представляют потенциальную опасность при дальнейшем использовании собранной биомассы в производстве пищевых продуктов и кормов для животных, а также удобрений [15, 41, 42]. Остаточные количества алюминия оказывают влияние на состав жирных кислот в форме метиловых эфиров и накапливаются в липидах, выделяемых из микроводорослей.

Соли алюминия, например, AlCl_3 и $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, способствуют повреждению клеточной структуры, а соли железа, такие как FeCl_3 и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, оказывают влияние на качество пигментов микроводорослей, особенно на содержание хлорофилла [19]. В-четверых, отсутствует возможность повторного использования питательных сред, поскольку существует риск попадания в них токсичных примесей, что может привести к вторичному загрязнению [19].

В научной литературе описан метод физической флокуляции, используемый для сбора биомассы микроводорослей посредством изменения pH в культуральной среде [43]. Эффективность этой методики зависит от различных факторов, включая характеристики поверхности клеток, концентрацию биомассы, состав среды и время проведения флокуляции [23]. В работе [44] показано, что флокуляция становится более эффективной при увеличении значения pH среды. Такой подход рассматривается как экономически выгодный и энергосберегающий, однако он протестирован на ограниченном числе штаммов микроводорослей [23, 39, 43].

Следующим перспективным, энергоэффективным и экологически безопасным способом сбора микроводорослей является биофлокуляция. Этот способ концентрирования биомассы микроводорослей осуществляется за счет использования полярных по заряду микроводорослей или симбиотических микроорганизмов, которые объединяются в огромные флокулы, оседающие под действием силы тяжести без необходимости использования химических флокулянтов [42, 45]. Однако в этом случае определяющими факторами являются кислотность среды и присутствие посторонних электролитов, оказывающих влияние на целостность клеток микроводорослей. Метод требует дополнительных затрат на культивирование микроорганизмов-флокулянтов [46, 47]. На сегодняшний момент этот способ изучен не полностью.

Благодаря своей высокой флокулирующей способности альтернативой химическим коагулянтам может стать хитозан. Это удачное решение как с экологической, так и с экономической точки зрения. Представляя собой катионный полисахарид, хитозан содержится в грибах и может быть получен путем деацетилирования хитина, который является вторым по распространенности природным полимером после целлюлозы [48]. Оставшиеся после переработки морепродуктов и моллюсков отходы служат недорогим сырьем для промышленного получения хитозана. В отличие от неорганических флокулянтов, таких как железные и алюминиевые хлориды и сульфаты, хитозан имеет ряд преимуществ. Он способствует образованию более крупных флокул, что ускоряет процесс осаждения биомассы и позволяет получить более чистый остаточный раствор, при этом не загрязняет извлеченную биомассу, которая может быть сразу использована в пищевой промышленности. Хитозан также нетоксичен и биоразлагаем, что позволяет повторно использовать питательную среду для культивирования микроводорослей [49].

Перед введением хитозана в суспензию микроводорослей, его предварительно растворяют в уксусной кислоте. При этом учитывают пропорции и концентрации компонентов в растворе, которые зависят от параметров плотности культуры, размера клеток и видовой принадлежности микроводорослей. На эффективность применения хитозана в качестве биофлокулянта существенно влияют его концентрация и скорость перемешивания раствора [48]. В кислой среде хитозан приобретает положительный заряд и способен притягивать отрицательно заряженные клетки микроводорослей, что способствует их седиментации за счет адсорбции [27]. В то же время в щелочной среде эффективность этого процесса сни-

жается, так как аминогруппы хитозана переходят в неионизированное состояние или несут слабый отрицательный заряд [50].

Несмотря на то, что метод биофлокуляции с применением хитозана отличается безопасностью применения и способностью к биоразложению, его использование для концентрирования и сбора микроводорослей пока ограничено и экономически не обосновано. При этом исследователи отмечают ряд недостатков, обусловленных зависимостью эффективности его применения от значений pH среды [51]. Так, в работе [22] показано, что при достижении в суспензии микроводорослей $\text{pH} \geq 10$ увеличивается мутность культуры, однако это не оказывает влияние на эффективность извлечения биомассы. Кроме того, в щелочной среде хитозан способен к формированию крупных и плотных хлопьев, тогда как в кислых растворах он образует мелкие и дисперсные агрегаты. Поскольку этот полисахарид имеет низкую растворимость в суспензии микроводорослей, требуются его значительные количества для дестабилизации клеток, что, в свою очередь, повышает затраты на сбор биомассы [46, 52]. Избыточная кислотность в растворах хитозана, применяемых при удалении нефтяных и других органических загрязнений из сточных вод, может вызывать стресс клеток и разрушение ценных фитохимических соединений [38]. Метод биофлокуляции может быть более эффективным, если сочетать его с процессами центрифугования и фильтрации, что позволит оптимизировать затраты времени и электроэнергии на концентрирование биомассы микроводорослей [50].

Еще одним методом, используемым для сбора клеток микроводорослей и представляющим значимый научный интерес, является автофлокуляция. Это начальная фаза этапа отделения клеток от водной среды. Осаждение может происходить естественным образом, например, при изменении условий окружающей среды в результате потребления растворенного диоксида углерода во время фотосинтеза. Также автофлокуляция может быть вызвана окончанием экспоненциальной фазы роста микроводорослей, либо спровоцирована стрессами окружающей среды, такими как изменение концентрации азота, содержания растворенного кислорода, концентрации некоторых ионов металлов в среде обитания микроводорослей, а также pH [28]. С увеличением pH наблюдается осаждение кальциево-фосфатных солей, при этом клетки микроводорослей выполняют роль твердых носителей. Однако чрезмерно высокие значения pH могут вызвать стресс у клеток микроводорослей и привести к их разрушению [53, 54]. Кроме того, при изменении pH среды в процессе автофлокуляции микроводоросли синтезируют флокулирующие вещества, такие как полисахариды и гликопротеины, которые обволакивают соседние клетки, образуя слизистые агрегатные структуры. Флокулянты считаются эффективными, если они недорогие, нетоксичные и пригодны для повторного использования [4]. В работе [26] показано, что в системах очистки сточных вод микроводоросли демонстрируют автофлокуляцию, образуя агломераты с нитевидными цианобактериями. Тем не менее этот метод применим не для всех типов питательных сред. Для более глубокого понимания механизмов, лежащих в основе автофлокуляции микроводорослей, необходимы дополнительные исследования. В литературе имеется ограниченный объем информации об автофлокуляции клеток, причем реальный механизм процесса до сих пор неясен [19]. В большинстве случаев для достижения полного разделения микроводорослей и культуральной среды требуются другие методы концентрирования клеток.

1.6. Электрокоагуляция представляет собой метод, в основе которого лежит воздействие электрического поля, приводящее к перемещению заряженных клеток микроводоро-

слей. Этот подход позволяет эффективно разделять водоросли и культуральную среду без добавления химических реагентов [30]. Таким образом, обладая естественным отрицательным зарядом, клетки микроводорослей могут быть разделены при помощи электрического поля, используемого в условиях электрофореза. Среди основных недостатков этого метода следует упомянуть риск засорения катодов и повреждения оборудования вследствие высоких температур, а также значительной солености большинства питательных сред [31]. Преимущества применения этого метода заключаются в его экологической безопасности, универсальности, селективности, а также экономичности [29].

1.7. Флотация – метод, применяемый для извлечения и концентрирования микроводорослей посредством перемешивания и завихрений с пузырьками воздуха [2, 32]. Этот метод, основывающийся на разнице в плотности материалов, уже не одно десятилетие успешно применяется в процессах очистки угля и руд. К главным достоинствам флотации относится ее низкое энергопотребление. Ключевыми факторами, обеспечивающими эффективность метода, являются скорость перемешивания и pH [55]. Флотация имеет несколько технологических ограничений. Для увеличения производительности часто применяют поверхностно-активные вещества в различных концентрациях, что влечет за собой необходимость установки дополнительных дорогостоящих систем сепарации и, следовательно, увеличение общих затрат [19].

Таким образом, проведенные за последние десятилетия исследования показывают, что современные методы сбора урожая позволяют эффективно отделять биомассу микроводорослей от культуральной среды. Однако по-прежнему не существует универсального метода, одинаково эффективно применимого для всех штаммов микроводорослей. Выбор наиболее подходящего и эффективного способа концентрирования и сбора биомассы в значительной мере зависит от специфических характеристик выращиваемых видов микроводорослей. Также следует отметить, что на протяжении длительного времени научные исследования были сосредоточены на изучении преимущественно пресноводных микроводорослей, тогда как изучению морских видов уделялось гораздо меньше внимания. В условиях роста дефицита пресноводных ресурсов целесообразно сосредоточить усилия на изучении и обработке морских видов микроводорослей.

2. Применимость существующих методов отделения биомассы микроводоросли от культуральной среды к *Porphyridium purpureum*

Как отмечалось выше, выбор оптимального метода сбора биомассы в значительной степени определяется морфологическими и физиологическими особенностями конкретного вида микроводорослей. Среди них важную роль играют такие критерии, как размер клеток, строение стенок, свойства клеточной поверхности (заряд, гидрофобность), состав культуральной среды, а также требования к качеству конечной продукции и его итоговая стоимость. В последние десятилетия востребованным и популярным объектом в пищевой промышленности, медицине, диетологии и аквакультуре является морская красная микроводоросль *Porphyridium purpureum*, поскольку она служит источником целого ряда ценных биологически активных компонентов, таких как экзополисахариды, полиненасыщенные жирные кислоты, β -фикоэритрин [56]. Принимая во внимание, что клетки *P. purpureum* имеют очень малый размер (около 8–15 мкм) и сферическую форму, проблема выбора экономически эффективного и безопасного метода сбора биомассы этой микроводоросли является актуальной.

Рассмотрим применимость основных методов сбора урожая микроводорослей, приведенных на рис. 1, к культуре *P. purpureum*. В первую очередь следует отметить, что данный вид морских микроводорослей не имеет жесткой клеточной стенки и, соответственно, его клеточная мембрана весьма подвержена повреждениям [57]. В связи с этим при выборе того или иного способа сбора урожая *P. purpureum* необходимо контролировать целостность клеточных мембран, поскольку при их повреждении могут быть потеряны ценные внутриклеточные соединения (например, пигменты и жирные кислоты).

Гравитационное осаждение является одним из самых простых и экономически эффективных методов отделения микроводорослей от питательной среды, применяемых для *P. purpureum*. Оно основано на действии силы тяжести, которая позволяет клеткам водорослей со временем оседать на дно резервуара без активного механического воздействия, что снижает риск разрыва клеток и потери ценных внутриклеточных соединений. Кроме того, метод гравитационного осаждения не требует дорогостоящего оборудования, сложной инфраструктуры или значительных энергозатрат, что делает его подходящим для сбора урожая *P. purpureum* при выращивании в небольших и пилотных установках.

Однако из-за небольшого размера и низкой плотности клеток *P. purpureum* естественный процесс осаждения может занимать от нескольких часов до нескольких дней. Кроме того, низкая эффективность процесса также обусловлена способностью микроводоросли вырабатывать внеклеточные полисахариды, которые увеличивают вязкость среды и препятствуют эффективному осаждению клеток [10]. При осаждении биомассы в открытых прудах или отстойниках существует высокая вероятность внешнего загрязнения, что может быть причиной роста бактерий и, соответственно, привести к снижению качества биомассы *P. purpureum*.

Центрифугирование является одним из самых распространенных и эффективных методов сбора биомассы микроводорослей, в том числе и *P. purpureum*. Авторы [58–60] использовали метод центрифугирования для отделения биомассы *P. purpureum* от культуральной среды, эффективность извлечения составила более 95 %. Однако высокоскоростное центрифугирование (свыше 8000 g) может разрушать клетки и привести к потере ценных внутриклеточных соединений, в частности, фикоэритрина и фикоцианина. Чтобы свести к минимуму повреждение клеток, целесообразно использовать более низкие скорости (3000–5000 g) и увеличить время центрифугирования (10–15 минут), что позволяет сохранить биоактивные соединения в сочетании с высокой эффективностью сбора биомассы [59–61]. Несмотря на это, метод имеет ряд недостатков, основными из которых являются большие затраты энергии, что приводит к нерентабельности крупномасштабных производств либо высокой стоимости продукции, и вязкость культуральной среды, обусловленная выделением клетками *P. purpureum* внеклеточных полисахаридов, что может снижать эффективность процесса центрифугирования.

Фильтрация является широко используемым методом сбора микроводорослей, благодаря своей способности эффективно концентрировать биомассу, сохраняя целостность клеток. Однако этот метод является малоэффективным для сбора биомассы *P. purpureum*. Как уже было сказано, *P. purpureum* способна продуцировать большое количество внеклеточных полисахаридов, что приводит к нарастанию желеобразного слоя на поверхности фильтра и засорению мембран, а, следовательно, значительно снижает эффективность фильтрации и повышает необходимость частой замены фильтров. Кроме того, из-за малого размера клет-

ки *P. purpureum* забивают поры мембраны, что приводит к повышению трансмембранного давления, быстрому снижению производительности и увеличению затрат на техническое обслуживание [10]. Биологическое обрастание, вызванное ростом микробов на мембранах, еще больше усугубляет засорение и требует дополнительных процедур очистки и химической обработки, что является небезопасным для окружающей среды [62]. Микрофильтрация и ультрафильтрация требуют значительных затрат энергии для поддержания рабочего давления и преодоления сопротивления мембран. Следует также учитывать, что при использовании высокого давления существует вероятность повреждения клеток *P. purpureum* и потери ценных внутриклеточных соединений. При организации крупномасштабного производства затраты энергии на фильтрацию могут стать непомерно высокими, что сделает ее экономически невыгодной по сравнению с альтернативными методами отделения биомассы [38, 63]. Кроме того, эффективность фильтрации снижается по мере увеличения объемов суспензии микроводорослей, что ограничивает возможности масштабирования процесса.

В работе [24] оценена эффективность метода флокуляции *P. purpureum* с использованием полиакриламидных полимеров и щелочей. Полимеры Floram TM и FO3801 продемонстрировали наибольшую эффективность флокуляции, превышающую 99 %, за счет нейтрализации заряда и образования полимерных мостиков. Добавление карбоната натрия и гидроксидов натрия и калия обеспечивало эффективность флокуляции на уровне 91 и 98 % соответственно, однако требовало введения более высоких количеств химических компонентов (более 500 мг на 1 г сухой биомассы). Гидроксид кальция оказался менее эффективным и обеспечивал лишь 75 % флокуляции. Основной движущей силой флокуляции, индуцированной гидроксидами, являлось образование осадка гидроксида магния. В случае карбоната натрия флокуляция происходила за счет совместного осаждения карбонатов магния и кальция.

Однако анализ целостности клеточных мембран флокулированных клеток *P. purpureum* показал, что использование полиакриламидных полимеров приводит к их значительному повреждению (96 %), тогда как при использовании щелочных реагентов степень повреждения составила от 70 до 96 %. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности полиакриламидной и щелочной флокуляции *P. purpureum*, однако применение этого метода неизбежно сопровождается снижением качества биомассы. Кроме того, некоторые флокулянты, например, синтетические полимеры, могут быть вредны для окружающей среды, а также увеличивают эксплуатационные расходы [47].

Метод флотации также можно использовать для отделения морских микроводорослей *P. purpureum* от культуральной жидкости. Микропузырьки газа, прикрепляясь к клеткам микроводорослей, снижают их плотность, позволяя легко всплывать на поверхность, с которой их можно собирать. Флотация эффективна для *P. purpureum*, благодаря небольшому размеру клеток и отрицательному заряду на их поверхности, что способствует прикреплению пузырьков и их агрегации. Добавление поверхностно-активных веществ или коагулянтов может повысить эффективность флотации [11, 38]. Несмотря на то, что для сбора биомассы *P. purpureum* флотация, как правило, более энергоэффективна, чем центрифугирование, она требует значительных затрат энергии на сжатие воздуха или электролиз, а необходимость в дополнительных этапах предварительной обработки суспензии, таких как изменение pH или добавление химических реагентов, увеличивает эксплуатационные расходы и может оказать влияние на масштабируемость процесса [25]. Неэффективность флотации связана с выработкой *P. purpureum* внеклеточных полисахаридов, что повышает вязкость питатель-

ной среды, тем самым снижая подвижность пузырьков воздуха, препятствуя их прикреплению к клеткам [10]. Кроме того, добавление флокулянтов, поверхностно-активных веществ или средств, регулирующих pH, для улучшения взаимодействия клеток *P. purpureum* и пузырьков воздуха может вызвать повреждение или разрыв клеток и привести к загрязнению собранной биомассы [38].

Несмотря на ограниченное число исследований, посвященных методам отделения биомассы *P. purpureum* от культуральной среды, каждая из рассмотренных стратегий имеет как преимущества, так и ограничения в контексте эффективности, затрат и влияния на качество конечного продукта.

3. Экспериментальная оценка эффективности отделения биомассы морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* от культуральной среды различными методами

Проведена апробация оптимальных методов отделения микроводорослей от культуральной среды, применимых для культуры *Porphyridium purpureum*. В опыте использовали альгологически чистую культуру *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R. Ross 1965 (син. *Porphyridium cruentum* (Gray) Nägeli, 1849) (Rhodophyta), штамм IBSS-70, выращиваемую на опытно-экспериментальном микроводорослевом производстве ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН».

На рис. 2 представлен внешний вид системы культивирования.



Рис. 2. Бассейн для культивирования красной микроводоросли *P. purpureum*

Fig.2. Pool for cultivation of the red microalgae *P. purpureum*

При достижении культурой фазы замедления роста (значение оптической плотности на уровне 0.360 отн. ед.) был осуществлен сбор урожая микроводоросли *P. purpureum* методами центрифугирования, сепарирования и гравитационного осаждения. Внешний вид используемого оборудования представлен на рис. 3.



Рис. 3. Оборудование для сбора урожая микроводоросли *P. purpureum*: проточный сепаратор GQ-75 (Россия) (а); лабораторная центрифуга ОС-6М (Россия) (б)

Fig. 3. Equipment for harvesting *P. purpureum* microalgae: GQ-75 flow separator (Russia) (a); OS-6M laboratory centrifuge (Russia) (b)

Для отделения клеток *P. purpureum* от культуральной среды методом гравитационного осаждения использовали лабораторные стеклянные стаканы с рабочим объемом 2 л. Культура микроводорослей находилась в покое в притенённом помещении в течение 100 мин. На рис. 4 представлена динамика оседания клеток *P. purpureum* при использовании метода гравитационного осаждения.

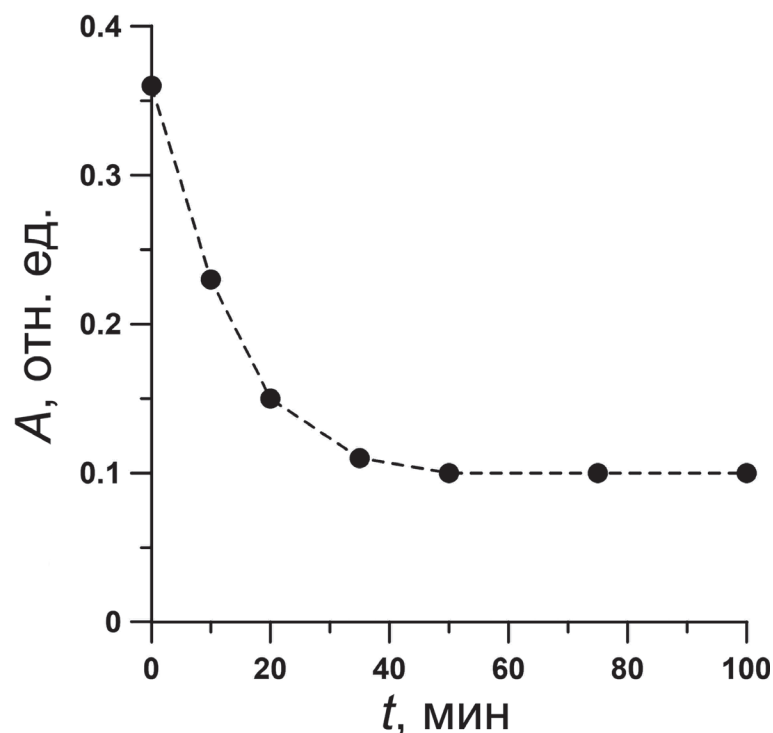


Рис. 4. Динамика плотности культуры (A) микроводоросли *Porphyridium purpureum*

Fig. 4. Dynamics of the *Porphyridium purpureum* culture density (A)

Хотя за счет присутствия пектиновых соединений клетки микроводоросли *P. purpureum* образуют вокруг себя так называемую «слизистую оболочку» [64], что приводит к агглютинации клеток с их последующим оседанием, экспериментальные данные свидетельствуют о низкой эффективности метода гравитационного осаждения. Так, за первые 20 мин около 58 % биомассы клеток оседает под действием естественных гравитационных сил. В течение 50 мин наблюдений плотность культуры не изменялась, и во взвешенном состоянии находилось еще около 30 % биомассы.

Основные характеристики оборудования и параметры эффективности различных методов сбора урожая *P. purpureum* представлены в табл. 2.

Табл. 2. Сравнение методов сбора микроводорослей

Table 2. Comparison of methods for microalgae harvesting

Метод	Оборудование	Частота вращения, об/мин	t , мин	Объем культуры, л	Сухой вес биомассы, г	Урожай, г/л	% извлеченной биомассы
Сепарирование	Проточный сепаратор GQ-75 (5 кВт)	20000	50	200	83.8	0.42	81
Центрифугирование	Лабораторная центрифуга ОС-6М (1.5 кВт)	2500	10	2	0.86	0.43	95
Гравитационное осаждение	Лабораторный стакан	—	50	2	0.60	0.30	69

Сопоставление методов гравитационного осаждения культуры *P. purpureum* и центрифугирования показало, что в первом случае потребовалось в 5 раз больше времени на обработку одного и того же объема суспензии микроводорослей. При этом процент извлеченной биомассы оказался в 1.4 раза ниже (табл. 2). Помимо отсутствия энергозатрат, у метода осаждения имеется еще одно преимущество – практически неограниченная возможность масштабирования для увеличения объема производства. Но эти два преимущества нивелируются низкой эффективностью метода (потеря 30 % выращенной культуры – «непозволительная роскошь» для реального производства).

Метод сепарирования показал значительное превосходство над остальными рассматриваемыми способами, как по сухому весу биомассы, так и по времени, затраченному на отделение микроводорослей от культуральной среды, поскольку позволил обработать в 100 раз больший объем суспензии. На 1 кВт затраченной энергии этот метод позволяет получить 20.75 г сухой биомассы *P. purpureum*, что в 5 раз больше, чем получаемый методом центрифугирования. Поэтому метод сепарирования рекомендуется как наиболее эффективный при работе с большими объемами суспензии микроводорослей в условиях полупромышленного и промышленного выращивания. Также экспериментально установлено, что доля потерь биомассы примерно на 10 % выше при использовании промышленного оборудования (GQ-75), чем лабораторного (ОС-6М), но, видимо, это неизбежная «плата» за возможность отделения больших количеств биомассы. Потери биомассы, вероятно, удастся снизить, если провести оптимизацию режима сепарирования за счет изменения скорости вращения ротора и скорости подачи суспензии микроводоросли.

Заключение

В зависимости от имеющихся возможностей производства *P. purpureum* можно рекомендовать различные сценарии отделения биомассы от культуральной среды. Для снижения энергетических затрат на сбор урожая рекомендуется использовать метод гравитационного осаждения, но с потерей 30 % урожая. Методы центрифугирования или сепарирования, обеспечивающие высокий конечный коэффициент отделения биомассы, являются предпочтительными. Анализ современного состояния проблемы выбора метода концентрирования и отделения биомассы микроводорослей от культуральных сред подчеркивает значимость оптимизации данных процессов и может служить основой для разработки практических рекомендаций по эффективному сбору микроводорослей в промышленных масштабах. В современных реалиях по-прежнему существует необходимость дальнейшего совершенствования имеющихся методов или создания новых подходов, которые были бы экологически устойчивыми и экономически эффективными для различных штаммов микроводорослей. Кроме того, особого внимания заслуживает развитие гибридных технологий сбора микроводорослей, сочетающих преимущества различных подходов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Garzon-Sanabria A.J., Davis R.T., Nikolov Z.L. Harvesting *Nannochloropsis oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 118. P. 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.057>.
2. Milledge J.J., Heaven S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2013. V. 12, No 2. P. 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>.
3. Rahman Md.M., Hosano N., Hosano H. Recovering microalgal bioresources: A review of cell disruption methods and extraction technologies // *Molecules.* 2022. V. 27, No 9. Art. 2786. <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>.
4. Leite G.B., Abdelaziz A.E.M., Hallenbeck P.C. Algal biofuels: Challenges and opportunities // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 145. P. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.007>.
5. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2010. V. 14, No 1. P. 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
6. Georgiana D.R., Mayfield S.P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels // *Nature.* 2012. V. 488, No 7411. P. 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature11479>.
7. Grima E.M., Belarbi E.-H., Fernández F.G.A., Medina A.R., Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 20, Nos 7–8. P. 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).
8. Fasaei F., Bitter J.H., Slegers P.M., van Boxtel A.J.B. Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems // *Algal Res.* 2018. V. 31. P. 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>.
9. Ogbonna C.N., Nwoba E.G. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production. A review // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2021. V. 139. Art. 110690. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110690>.
10. Barros A.I., Gonçalves A.L., Simões M., Pires J.C.M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2015. V. 41. P. 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>.

11. *Muyllaert K., Bastiaens L., Vandamme D., Gouveia L.* 5 – Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks // Gonzalez-Fernandez C., Muñoz R. (Eds.) *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. Ser.: Woodhead Publishing Series in Energy. Cambridge, MA: Woodhead Publ., 2017. P. 113–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00005-4>.
12. *Farooqui A., Tripathi G., Moheet K., Dubey P., Ahmad S., Husain A., Shamim A., Mahfooz S.* Algal biomass: Potential renewable feedstock for bioenergy production // Srivastava M., Srivastava N., Singh R. (Eds.) *Bioenergy Research: Integrative Solution for Existing Roadblock*. Singapore: Springer, 2021. P. 85–113. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1888-8_5.
13. *Mathimani T., Mallick N.* A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel – key challenges and future directions // *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2018. V. 91. P. 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>.
14. *Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J., Lovitt R.W., Flynn K.J.* Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges // *J. R. Soc. Interface.* 2010. V. 7, No 46. P. 703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>.
15. *Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C., Kruse O., Hankamer B.* Second generation biofuels: High efficiency microalgae for biodiesel production // *BioEnergy Res.* 2008. V. 1, No 1. P. 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.
16. *Gong Y., Jiang M.* Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33, No 7. P. 1269–1284. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0574-z>.
17. *Sharma K.K., Garg S., Li Y., Malekizadeh A., Schenk P.M.* Critical analysis of current microalgae dewatering techniques // *Biofuels.* 2013. V. 4, No 4. P. 397–407. <https://doi.org/10.4155/BFS.13.25>.
18. *Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Los D.A.* Spirulina/Arthrospira/Limnospira—three names of the single organism // *Foods.* 2024. V. 13, No 17. Art. 2762. <https://doi.org/10.3390/foods13172762>.
19. *Wan C., Alam Md.A., Zhao X.-Q., Zhang X.-Y., Guo S.-L., Ho S.-H., Chang J.-S., Bai F.-W.* Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 184. P. 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>.
20. *Vandamme D., Foubert I., Meesschaert B., Muyllaert K.* Flocculation of microalgae using cationic starch // *J. Appl. Phycol.* 2010. V. 22, No 4. P. 525–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9488-8>.
21. *Wyatt N.B., Gloe L.M., Brady P.V., Hewson J.C., Grillet A.M., Hankins M.G., Pohl P.I.* Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. V. 109, No 2. P. 493–501. <https://doi.org/10.1002/bit.23319>.
22. *Beach E.S., Eckelman M.J., Cui Z., Brentner L., Zimmerman J.B.* Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 121. P. 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.012>.
23. *Yang Z., Jia S., Zhuo N., Yang W., Wang Y.* Flocculation of copper(II) and tetracycline from water using a novel pH- and temperature-responsive flocculants // *Chemosphere.* 2015. V. 141. P. 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.050>.
24. *Vu H.P., Nguyen L.N., Vu M.T., Labeeuw L., Emmerton B., Commault A.S., Ralph P.J., Mahlia T.M.I., Nghiem L.D.* Harvesting *Porphyridium purpureum* using polyacrylamide polymers and alkaline bases and their impact on biomass quality // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 755, Pt. 1. Art. 142412. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142412>.
25. *Hou Y., Liu C., Liu Z., Han T., Hao N., Guo Z., Wang W., Chen S., Zhao L., Safavi M., Ji X., Chen F.* A novel salt-bridge electroflocculation technology for harvesting microalgae // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. Art. 902524. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.902524>.
26. *Iasimone F., Seira J., Panico A., De Felice V., Pirozzi F., Steyer J.-P.* Insights into bioflocculation of filamentous cyanobacteria, microalgae and their mixture for a low-cost biomass harvesting system // *Environ. Res.* 2021. V. 199. Art. 111359. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111359>.

27. Lananan F., Yunos F.H.M., Nasir N.M., Bakar N.S.A., Lam S.S., Jusoh A. Optimization of biomass harvesting of microalgae, *Chlorella* sp. utilizing auto-flocculating microalgae, *Ankistrodesmus* sp. as bio-flocculant // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2016. V. 113. P. 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.022>.
28. Кузнецова Т.А., Базарнова Ю.Г., Боргоякова А.С. Исследование влияния процесса автофлорации клеток микроводоросли *Chlorella sorokiniana* в аквакультуре на получение комплекса пигментов // Известия КГТУ. 2018. № 51. С. 69–80.
29. Pragma N., Pandey K.K., Sahoo P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae // Renewable Sustainable Energy Rev. 2013. V. 24. P. 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>.
30. Enamala M.K., Enamala S., Chavali M., Donepudi J., Yadavalli R., Kolapalli B., Aradhyula T.V., Velpuri J., Kuppan C. Production of biofuels from microalgae – a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae // Renewable Sustainable Energy Rev. 2018. V. 94. P. 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>.
31. Bajpai P. Third Generation Biofuels. Ser.: SpringerBriefs in Energy. Singapore: Springer, 2019. xv, 76 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2378-2>.
32. Soomro R.R., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Lin L., Danquah M.K. Development of a two-stage microalgae dewatering process – a life cycle assessment approach // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Art. 113. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00113>.
33. Wijffels R.H., Barbosa M.J. An outlook on microalgal biofuels // Science. 2010. V. 329, No 5993. P. 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>.
34. Show K.-Y., Lee D.-J. Chapter 5 – Algal biomass harvesting // Pandey A., Lee D.-J., Chisti Y., Soccol C.R. (Eds.) Biofuels from Algae. Oxford: Elsevier, 2014. P. 85–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00005-X>.
35. Pittman J.K., Dean A.P., Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources // Bioresour. Technol. 2011. V. 102, No 1. P. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>.
36. Li S., Hu T., Xu Y., Wang J., Chu R., Yin Z., Mo F., Zhu L. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives // Renew. Sustain. Energy Rev. 2020. V. 131. Art. 110005. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110005>.
37. Najjar Y.S.H., Abu-Shamleh A. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review // Algal Res. 2020. V. 51. Art. 102046. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046>.
38. Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production // Trends Biotechnol. 2013. V. 31, No 4. P. 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>.
39. Chen L., Wang C., Wang W., Wei J. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system // Bioresour. Technol. 2013. V. 133. P. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>.
40. Subhadra B., Edwards M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States // Energy Policy. 2010. V. 38, No 9. P. 4897–4902. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.036>.
41. Rastogi R.P., Pandey A., Larroche C., Madamwar D. Algal green energy – R & D and technological perspectives for biodiesel production // Renewable Sustainable Energy Rev. 2017. V. 82, Pt. 3. P. 2946–2969. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.038>.
42. Singh G., Patidar S.K. Microalgae harvesting techniques: A review // J. Environ. Manage. 2018. V. 217. P. 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
43. Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.101>.

44. Şirin S., Trobajo R., Ibanez C., Salvadó J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation // J. Appl. Phycol. 2012. V. 24, No 5. P. 1067–1080. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9736-6>.
45. Wuang S.C., Khin M.C., Chua P.Q.D., Luo Y.D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers // Algal Res. 2016. V. 15. P. 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.009>.
46. Watanabe K., Imase M., Sasaki K., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H. Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana* // Lett. Appl. Microbiol. 2006. V. 42, No 5. P. 538–543. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01886.x>.
47. Salim S., Bosma R., Vermuë M.H., Wijffels R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation // J. Appl. Phycol. 2011. V. 23, No 5. P. 849–855. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x>.
48. Sajjad A., Rizwan M., Mujtaba G., Rashid N. Chitosan as a flocculant: An approach to improve its solubility for efficient harvesting of microalgae // Korean Chem. Eng. Res. 2017. V. 55, No 4. P. 530–534. <https://doi.org/10.9713/kcer.2017.55.4.530>.
49. Rashid N., Rehman S.U., Han J.-I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan // Process Biochem. 2013. V. 48, No 7. P. 1107–1110. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.018>.
50. Xu Y., Purton S., Baganz F. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana* // Bioresour. Technol. 2013. V. 129. P. 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068>.
51. Farid M.S., Shariati A., Badakhshan A., Anvaripour B. Using nano-chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis* sp. // Bioresour. Technol. 2013. V. 131. P. 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.058>.
52. Pradana Y.S., Kusumastuti Y., Rahma F.N., Effendy N. Chitosan flocculation-sedimentation for harvesting selected microalgae species grown in monoculture and mixed cultures // Chem. Eng. Trans. 2017. V. 56. P. 1549–1554. <https://doi.org/10.3303/CET1756259>.
53. Christenson L., Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts // Biotechnol. Adv. 2011. V. 29, No 6. P. 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>.
54. Spilling K., Seppälä J., Tamminen T. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation // J. Appl. Phycol. 2011. V. 23, No 6. P. 959–966. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9616-5>.
55. Hadiyanto H., Widayat W., Christwardana M., Pratiwi M.E. The flocculation process of *Chlorella* sp. using chitosan as a bio-flocculant: Optimization of operating conditions by response surface methodology // Curr. Res. Green Sustain. Chem. 2022. V. 5. Art. 100291. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100291>.
56. Kavitha M.D., Kathiresan S., Bhattacharya S., Sarada R. Culture media optimization of *Porphyridium purpureum*: Production potential of biomass, total lipids, arachidonic, and eicosapentaenoic acid // J. Food Sci. Technol. 2016. V. 53, No 5. P. 2270–2278. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2185-0>.
57. Çakmak E.K., Ugurlu A. Enhanced biogas production of red microalgae via enzymatic pretreatment and preliminary economic assessment // Algal Res. 2020. V. 50. Art. 101979. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101979>.
58. Li T., Xu J., Wang W., Chen Z., Li C., Wu H., Wu H., Xiang W. A novel three-step extraction strategy for high-value products from red algae *Porphyridium purpureum* // Foods. 2021. V. 10, No 9. Art. 2164. <https://doi.org/10.3390/foods10092164>.
59. Erbil G.Ç., Elp M., Durmaz Y. Phycoerythrin accumulation of *Porphyridium cruentum* culture at indoor tubular photobioreactor // Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences. 2022. V. 32, No 1. P. 81–88. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.986286>.
60. Nguyen A.Q., Mohammadi M., Alian M., Muralitharan G., Chauhan V.S., Balan V. Exploring the versatility of *Porphyridium* sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction,

- purification, and characterization techniques // *Biotechnol. Adv.* 2024. V. 77. Art. 108471. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108471>.
61. Schoeters F., Spit J., Swinnen E., De Cuyper A., Vleugels R., Noyens I., Van Miert S. Pilot-scale cultivation of the red alga *Porphyridium purpureum* over a two-year period in a greenhouse // *J. Appl. Phycol.* 2023. V. 35, No 5. P. 2095–2109. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03045-5>.
 62. Zhao Z., Muylaert K., Vankelecom I.F.J. Combining patterned membrane filtration and flocculation for economical microalgae harvesting // *Water Res.* 2021. V. 198. Art. 117181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117181>.
 63. Jeevanandam J., Danquah M.K. Chapter 9 – Dewatering and drying of algal cultures // Jacob-Lopes E., Maroneze M.M., Queiroz M.I., Zepka L.Q. (Eds.) *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds*. Oxford: Acad. Press, 2020. P. 207–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00009-9>.
 64. Markina Z.V., Orlova T.Yu., Vasyanovich Y.A., Vardavas A.I., Stivaktakis P.D., Vardavas C.I., Kokkinakis M.N., Rezaee R., Ozcagli E., Golokhvast K.S. *Porphyridium purpureum* microalga physiological and ultrastructural changes under copper intoxication // *Toxicol. Rep.* 2021. V. 8. P. 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.015>.

References

1. Garzon-Sanabria A.J., Davis R.T., Nikolov Z.L. Harvesting *Nannochloropsis oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. *Bioresour. Technol.*, 2012, vol. 118, pp. 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.057>.
2. Milledge J.J., Heaven S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.*, 2013, vol. 12, no. 2, pp. 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>.
3. Rahman Md.M., Hosano N., Hosano H. Recovering microalgal bioresources: A review of cell disruption methods and extraction technologies. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 9, art. 2786. <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>.
4. Leite G.B., Abdelaziz A.E.M., Hallenbeck P.C. Algal biofuels: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 145, pp. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.007>.
5. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2010, vol. 14, no. 1, pp. 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
6. Georgiana D.R., Mayfield S.P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 2012, vol. 488, no. 7411, pp. 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature11479>.
7. Grima E.M., Belarbi E.-H., Fernández F.G.A., Medina A.R., Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, 2013, vol. 20, nos. 7–8, pp. 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).
8. Fasaei F., Bitter J.H., Slegers P.M., van Boxtel A.J.B. Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Res.*, 2018, vol. 31, pp. 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>.
9. Ogbonna C.N., Nwoba E.G. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production. A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2021, vol. 139, art. 110690. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110690>.
10. Barros A.I., Gonçalves A.L., Simões M., Pires J.C.M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2015, vol. 41, pp. 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>.
11. Muylaert K., Bastiaens L., Vandamme D., Gouveia L. 5 – Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. In: Gonzalez-Fernandez C., Muñoz R. (Eds.) *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. Ser.:

- Woodhead Publishing Series in Energy. Cambridge, MA, Woodhead Publ., 2017. pp. 113–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00005-4>.
12. Farooqui A., Tripathi G., Moheet K., Dubey P., Ahmad S., Husain A., Shamim A., Mahfooz S. Algal biomass: Potential renewable feedstock for bioenergy production. In: Srivastava M., Srivastava N., Singh R. (Eds.) *Bioenergy Research: Integrative Solution for Existing Roadblock*. Singapore, Springer, 2021. pp. 85–113. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1888-8_5.
 13. Mathimani T., Mallick N. A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel – key challenges and future directions. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2018, vol. 91, pp. 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>.
 14. Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J., Lovitt R.W., Flynn K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface*, 2010, vol. 7, no. 46, pp. 703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>.
 15. Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C., Kruse O., Hankamer B. Second generation biofuels: High efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.*, 2008, vol. 1, no. 1, pp. 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.
 16. Gong Y., Jiang M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel. *Biotechnol. Lett.*, 2011, vol. 33, no. 7, pp. 1269–1284. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0574-z>.
 17. Sharma K.K., Garg S., Li Y., Malekizadeh A., Schenk P.M. Critical analysis of current microalgae dewatering techniques. *Biofuels*, 2013, vol. 4, no. 4, pp. 397–407. <https://doi.org/10.4155/BFS.13.25>.
 18. Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Los D.A. Spirulina/Arthrospira/Limnospira—three names of the single organism. *Foods*, 2024, vol. 13, no. 17, art. 2762. <https://doi.org/10.3390/foods13172762>.
 19. Wan C., Alam Md.A., Zhao X.-Q., Zhang X.-Y., Guo S.-L., Ho S.-H., Chang J.-S., Bai F.-W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresour. Technol.*, 2015, vol. 184, pp. 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>.
 20. Vandamme D., Foubert I., Meesschaert B., Muylaert K. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.*, 2010, vol. 22, no. 4, pp. 525–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9488-8>.
 21. Wyatt N.B., Gloe L.M., Brady P.V., Hewson J.C., Grillet A.M., Hankins M.G., Pohl P.I. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, vol. 109, no. 2, pp. 493–501. <https://doi.org/10.1002/bit.23319>.
 22. Beach E.S., Eckelman M.J., Cui Z., Brentner L., Zimmerman J.B. Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans*. *Bioresour. Technol.*, 2012, vol. 121, pp. 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.012>.
 23. Yang Z., Jia S., Zhuo N., Yang W., Wang Y. Flocculation of copper(II) and tetracycline from water using a novel pH- and temperature-responsive flocculants. *Chemosphere*, 2015, vol. 141, pp. 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.050>.
 24. Vu H.P., Nguyen L.N., Vu M.T., Labeeuw L., Emmerton B., Commault A.S., Ralph P.J., Mahlia T.M.I., Nghiem L.D. Harvesting *Porphyridium purpureum* using polyacrylamide polymers and alkaline bases and their impact on biomass quality. *Sci. Total Environ.*, 2021, vol. 755, pt. 1, art. 142412. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142412>.
 25. Hou Y., Liu C., Liu Z., Han T., Hao N., Guo Z., Wang W., Chen S., Zhao L., Safavi M., Ji X., Chen F. A novel salt-bridge electroflocculation technology for harvesting microalgae. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, vol. 10, art. 902524. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.902524>.
 26. Iasimone F., Seira J., Panico A., De Felice V., Pirozzi F., Steyer J.-P. Insights into bioflocculation of filamentous cyanobacteria, microalgae and their mixture for a low-cost biomass harvesting system. *Environ. Res.*, 2021, vol. 199, art. 111359. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111359>.
 27. Lananan F., Yunos F.H.M., Nasir N.M., Bakar N.S.A., Lam S.S., Jusoh A. Optimization of biomass harvesting of microalgae, *Chlorella* sp. utilizing auto-flocculating microalgae,

- Ankistrodesmus* sp. as bio-flocculant. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2016, vol. 113, pp. 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.022>.
28. Kuznetsova T.A., Bazarnova Yu.G., Borgoyakova A.S. Autoflocculation of *Chlorella sorokiniana* cells in aquaculture and its effect on the recovery of a complex of pigments. *Izv. KGTU*, 2018, no. 51, pp. 69–80. (In Russian)
 29. Pragma N., Pandey K.K., Sahoo P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2013, vol. 24, pp. 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>.
 30. Enamala M.K., Enamala S., Chavali M., Donepudi J., Yadavalli R., Kolapalli B., Aradhyula T.V., Velpuri J., Kuppam C. Production of biofuels from microalgae – a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2018, vol. 94, pp. 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>.
 31. Bajpai P. *Third Generation Biofuels*. Ser.: SpringerBriefs in Energy. Singapore, Springer, 2019. xv, 76 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2378-2>.
 32. Soomro R.R., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Lin L., Danquah M.K. Development of a two-stage microalgae dewatering process – a life cycle assessment approach. *Front. Plant Sci.*, 2016, vol. 7, art. 113. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00113>.
 33. Wijffels R.H., Barbosa M.J. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 2010, vol. 329, no. 5993, pp. 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>.
 34. Show K.-Y., Lee D.-J. Chapter 5 – Algal biomass harvesting. In: Pandey A., Lee D.-J., Chisti Y., Soccol C.R. (Eds.) *Biofuels from Algae*. Oxford, Elsevier, 2014. pp. 85–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00005-X>.
 35. Pittman J.K., Dean A.P., Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.*, 2011, vol. 102, no. 1, pp. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>.
 36. Li S., Hu T., Xu Y., Wang J., Chu R., Yin Z., Mo F., Zhu L. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2020, vol. 131, art. 110005. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110005>.
 37. Najjar Y.S.H., Abu-Shamleh A. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Res.*, 2020, vol. 51, art. 102046. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102046>.
 38. Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.*, 2013, vol. 31, no. 4, pp. 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>.
 39. Chen L., Wang C., Wang W., Wei J. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 133, pp. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>.
 40. Subhadra B., Edwards M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. *Energy Policy*, 2010, vol. 38, no. 9, pp. 4897–4902. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.036>.
 41. Rastogi R.P., Pandey A., Larroche C., Madamwar D. Algal green energy – R & D and technological perspectives for biodiesel production. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2017, vol. 82, pt. 3, pp. 2946–2969. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.038>.
 42. Singh G., Patidar S.K. Microalgae harvesting techniques: A review. *J. Environ. Manage.*, 2018, vol. 217, pp. 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
 43. Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour. Technol.*, 2012, vol. 110, pp. 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.101>.

44. Şirin S., Trobajo R., Ibanez C., Salvadó J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *J. Appl. Phycol.*, 2012, vol. 24, no. 5, pp. 1067–1080. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9736-6>.
45. Wuang S.C., Khin M.C., Chua P.Q.D., Luo Y.D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res.*, 2016, vol. 15, pp. 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.009>.
46. Watanabe K., Imase M., Sasaki K., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H. Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 42, no. 5, pp. 538–543. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01886.x>.
47. Salim S., Bosma R., Vermuë M.H., Wijffels R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phycol.*, 2011, vol. 23, no. 5, pp. 849–855. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x>.
48. Sajjad A., Rizwan M., Mujtaba G., Rashid N. Chitosan as a flocculant: An approach to improve its solubility for efficient harvesting of microalgae. *Korean Chem. Eng. Res.*, 2017, vol. 55, no. 4, pp. 530–534. <https://doi.org/10.9713/kcer.2017.55.4.530>.
49. Rashid N., Rehman S.U., Han J.-I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochem.*, 2013, vol. 48, no. 7, pp. 1107–1110. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.018>.
50. Xu Y., Purton S., Baganz F. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 129, pp. 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068>.
51. Farid M.S., Shariati A., Badakhshan A., Anvaripour B. Using nano-chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 131, pp. 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.058>.
52. Pradana Y.S., Kusumastuti Y., Rahma F.N., Effendy N. Chitosan flocculation-sedimentation for harvesting selected microalgae species grown in monoculture and mixed cultures. *Chem. Eng. Trans.*, 2017, vol. 56, pp. 1549–1554. <https://doi.org/10.3303/CET1756259>.
53. Christenson L., Sims R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.*, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>.
54. Spilling K., Seppälä J., Tamminen T. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation. *J. Appl. Phycol.*, 2011, vol. 23, no. 6, pp. 959–966. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9616-5>.
55. Hadiyanto H., Widayat W., Christwardana M., Pratiwi M.E. The flocculation process of *Chlorella* sp. using chitosan as a bio-flocculant: Optimization of operating conditions by response surface methodology. *Curr. Res. Green Sustainable Chem.*, 2022, vol. 5, art. 100291. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100291>.
56. Kavitha M.D., Kathiresan S., Bhattacharya S., Sarada R. Culture media optimization of *Porphyridium purpureum*: Production potential of biomass, total lipids, arachidonic, and eicosapentaenoic acid. *J. Food Sci. Technol.*, 2016, vol. 53, no. 5, pp. 2270–2278. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2185-0>.
57. Çakmak E.K., Ugurlu A. Enhanced biogas production of red microalgae via enzymatic pretreatment and preliminary economic assessment. *Algal Res.*, 2020, vol. 50, art. 101979. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101979>.
58. Li T., Xu J., Wang W., Chen Z., Li C., Wu H., Wu H., Xiang W. A novel three-step extraction strategy for high-value products from red algae *Porphyridium purpureum*. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 9, art. 2164. <https://doi.org/10.3390/foods10092164>.
59. Erbil G.Ç., Elp M., Durmaz Y. Phycoerythrin accumulation of *Porphyridium cruentum* culture at indoor tubular photobioreactor. *Yuzuncu Yıl Univ. J. Agric. Sci.*, 2022, vol. 32, no. 1, pp. 81–88. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.986286>.
60. Nguyen A.Q., Mohammadi M., Alian M., Muralitharan G., Chauhan V.S., Balan V. Exploring the versatility of *Porphyridium* sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction,

- purification, and characterization techniques. *Biotechnol. Adv.*, 2024, vol. 77, art. 108471. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108471>.
61. Schoeters F., Spit J., Swinnen E., De Cuyper A., Vleugels R., Noyens I., Van Miert S. Pilot-scale cultivation of the red alga *Porphyridium purpureum* over a two-year period in a greenhouse. *J. Appl. Phycol.*, 2023, vol. 35, no. 5, pp. 2095–2109. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03045-5>.
62. Zhao Z., Muylaert K., Vankelecom I.F.J. Combining patterned membrane filtration and flocculation for economical microalgae harvesting. *Water Res.*, 2021, vol. 198, art. 117181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117181>.
63. Jeevanandam J., Danquah M.K. Chapter 9 – Dewatering and drying of algal cultures. In: Jacob-Lopes E., Maroneze M.M., Queiroz M.I., Zepka L.Q. (Eds.) *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds*. Oxford, Acad. Press, 2020. pp. 207–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00009-9>.
64. Markina Z.V., Orlova T.Yu., Vasyanovich Y.A., Vardavas A.I., Stivaktakis P.D., Vardavas C.I., Kokkinakis M.N., Rezaee R., Ozcagli E., Golokhvast K.S. *Porphyridium purpureum* microalga physiological and ultrastructural changes under copper intoxication. *Toxicol. Rep.*, 2021, vol. 8, pp. 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.015>.

Информация об авторах

Светлана Юрьевна Горбунова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов, Институт биологии Южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

E-mail: svetlana_8423@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2770-1221>

Боровков Андрей Борисович, кандидат биологических наук, заведующий отделом биотехнологий и фиторесурсов, Институт биологии Южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

E-mail: spirit2000sev@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Author Information

Svetlana Yu. Gorbunova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Biotechnology and Phytoresources, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences

E-mail: svetlana_8423@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2770-1221>

Andrei B. Borovkov, Cand. Sci. (Biology), Head of Department of Biotechnology and Phytoresources, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences

E-mail: spirit2000sev@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Поступила в редакцию 06.03.2025

Принята к публикации 23.03.2025

Received March 6, 2025

Accepted March 23, 2025

Оригинальная статья

УДК 574.3

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.336-352>

**Оценка перспектив динамики ценопопуляций *Quercus robur* L.
в сообществах музея-заповедника «Куликово поле»
методами популяционной биологии растений**

М.Н. Стаменов ✉

Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского
бассейна РАН, г. Тольятти, Россия

✉ mslv-eiksb@inbox.ru**Аннотация**

Исследована демографическая, виталитетная и пространственная структура ценопопуляций *Quercus robur* L. в вариантах фитоценологических условий музея-заповедника «Куликово поле» и его окрестностей (Тюльская область). Исследования проводили в различных вариантах дубрав, в мелколиственных лесах, приопушечных зарослях кустарников и в участках луговой степи. Исследуемые ценопопуляции расположены на водораздельных пространствах и на склонах балок, различающихся по крутизне и экспозиции склона, а также увлажненности тальвега. Всего исследовано 17 ценопопуляций. Наибольшую плотность имеют ценопопуляции одной из склоновых дубрав, мелколиственных лесов и участков луговых степей. Все ценопопуляции онтогенетически неполночленные, нормальные либо инвазионные. Для большинства ценопопуляций в дубравах характерны онтогенетические спектры с максимумом на средневозрастных генеративных особях при отсутствии прегенеративных особей. В большинстве ценопопуляций в мелколиственных лесах, зарослях кустарников и участках луговых степей онтогенетические спектры имеют максимум на прегенеративных особях. Абсолютное преобладание особей нормальной жизненности выявлено в участках луговых степей и кустарниковых зарослей. Большинство ценопопуляций *Q. robur* имеют неравномерную пространственную структуру. Наиболее благоприятные условия для поддержания потока поколений в ценопопуляциях вида отмечены в разреженной дубраве на пологом склоне увлажненной балки, в зарослях кустарников и в участках луговых степей.

Ключевые слова: *Quercus robur* L., ценопопуляция, онтогенетическое состояние, онтогенетический спектр, демографическая структура, виталитетная структура, пространственная структура, Куликово поле, северная лесостепь.

Благодарности. Исследования выполнены в рамках государственного задания Института экологии Волжского бассейна РАН «Комплексная оценка состояния биологических ресурсов и мониторинг природных экосистем Волжского бассейна (FMRW-2025-0047)», № 1024032600230-5-1.6.19.

Автор выражает благодарность доктору биологических наук, доценту Е.М. Волковой (Тюльский государственный университет), кандидату географических наук О.В. Буровой и работникам музея-заповедника «Куликово поле» за методическую и организационную помощь при проведении исследований.

Для цитирования: Стаменов М.Н. Оценка перспектив динамики ценопопуляций *Quercus robur* L. в сообществах музея-заповедника «Куликово поле» методами популяционной биологии растений // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 336–352. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.336-352>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.336-352>

Prospects for the dynamics of *Quercus robur* L. cenopopulations in the communities of the Kulikovo Field State Museum-Reserve assessed by the methods of plant population biology

M.N. Stamenov ✉

*Samara Federal Research Scientific Center RAS,
Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS,
Togliatti, Russia*

✉ mslv-eiksb@inbox.ru

Abstract

The demographic, vitality, and spatial structures of *Quercus robur* L. cenopopulations were examined under different phytocenotic conditions of the Kulikovo Field Museum-Reserve and its surroundings (Tula region), including various oak-dominated stands, small-leaved forests, shrub thickets along forest edges, and meadow steppe areas. A total of 17 cenopopulations were analyzed. These populations occupied the interfluves, as well as the ravine slopes of varying steepness, exposure, and moisture levels in the thalweg. The highest cenopopulation densities were observed in a slope oak stand, small-leaved forests, and meadow steppe areas. All cenopopulations were ontogenetically incomplete, classified as either normal or invasive. Most cenopopulations of the oak stands had ontogenetic spectra peaking at middle-aged generative individuals, with pregenerative stages notably absent. In contrast, most cenopopulations of the small-leaved forests, shrub thickets, and meadow steppe areas exhibited spectral peaks at pregenerative individuals. Individuals with normal vitality were most prevalent in the meadow steppe areas and shrub thickets. The spatial distribution structure was largely uneven. The most favorable conditions for maintaining the flow of generations in the species cenopopulations were revealed in the sparse oak stand on a gentle slope of the moist ravine, as well as in the shrub thickets and meadow steppe areas.

Keywords: *Quercus robur* L., cenopopulation, ontogenetic state, ontogenetic spectrum, demographic structure, vitality structure, spatial structure, Kulikovo Field, northern forest-steppe

Acknowledgments. This study was carried out as part of the state assignment to the Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS “Comprehensive assessment of the state of biological resources and monitoring of natural ecosystems of the Volga Basin (FMRW-2025-0047)” (project no. 1024032600230-5-1.6.19).

Sincere thanks are due to E.M. Volkova (Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Tula State University), O.V. Burova (Cand. Sci. (Geography)), and the staff of the Kulikovo Field State Museum-Reserve for their methodological and organizational support during the research.

For citation: Stamenov M.N. Prospects for the dynamics of *Quercus robur* L. cenopopulations in the communities of the Kulikovo Field State Museum-Reserve assessed by the methods of plant population biology. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 336–352. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.336-352>. (In Russian)

Введение

Биологические виды в живой природе существуют в форме популяций. Популяция локализована в более или менее выраженных географических границах и функционирует в определенных экологических условиях. У растений совокупность особей в пределах фитоценотической единицы принято обозначать как ценопопуляцию [1]. Она характеризуется набором структурно-функциональных параметров. Одним из важнейших параметров, применяемых в популяционных исследованиях, является возрастная, или демографическая, структура. В последние десятилетия широкое распространение получила концепция дискретного описания онтогенеза [2, 3], согласно которой жизненный цикл растения может быть описан как последовательность онтогенетических состояний с определенными морфофизиологическими характеристиками. Онтогенетическое состояние фактически отражает биологический возраст особи, который может не совпадать с календарным возрастом. Распределение особей по группам разного биологического возраста демонстрирует демографическую структуру ценопопуляции. Ее анализ дает представление о дальнейшей динамике возрастных групп и перспективах сохранения ценопопуляции в целом.

У дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) давно отмечено неудовлетворительное самоподдержание ценопопуляций в условно-коренных широколиственных лесах [4–7], что обусловлено высоким светолюбием вида [8]. При этом в последнее время было установлено, что особи вида способны успешно приживаться в фитоценозах различных сукцессионных стадий, включая материковые и пойменные луга [9–15]. Большинство исследований демографической структуры ценопопуляций *Q. robur* проведено в зонах хвойно-широколиственных и широколиственных лесов. С учетом угрожаемого состояния дубовых лесов в лесостепной и степной зонах [16, 17] не менее актуально исследовать состояние ценопопуляций *Q. robur* и в семиаридных условиях. В связи с этим целью работы является анализ состояния ценопопуляций *Q. robur* и прогноз их динамики популяционно-онтогенетическими методами на территории музея-заповедника «Куликово поле» и его окрестностей (Тульская область, подзона северной лесостепи).

1. Объекты и методы исследования

Музей-заповедник «Куликово поле» учрежден в 1996 г. Он расположен на юго-востоке Тульской области (рис. 1), в пределах Тульско-Пензенского округа лесостепи [18]. Климат района исследований умеренно-континентальный, рельеф эрозионно-денудационный со сплошным чехлом покровных суглинков. Представлены выщелоченные, оподзоленные и типичные черноземы, а также серые лесные почвы [19]. В дальнейшем в тексте статьи для удобства к «Куликову полю» отнесены и те объекты, которые не входят непосредственно в состав охраняемой территории.

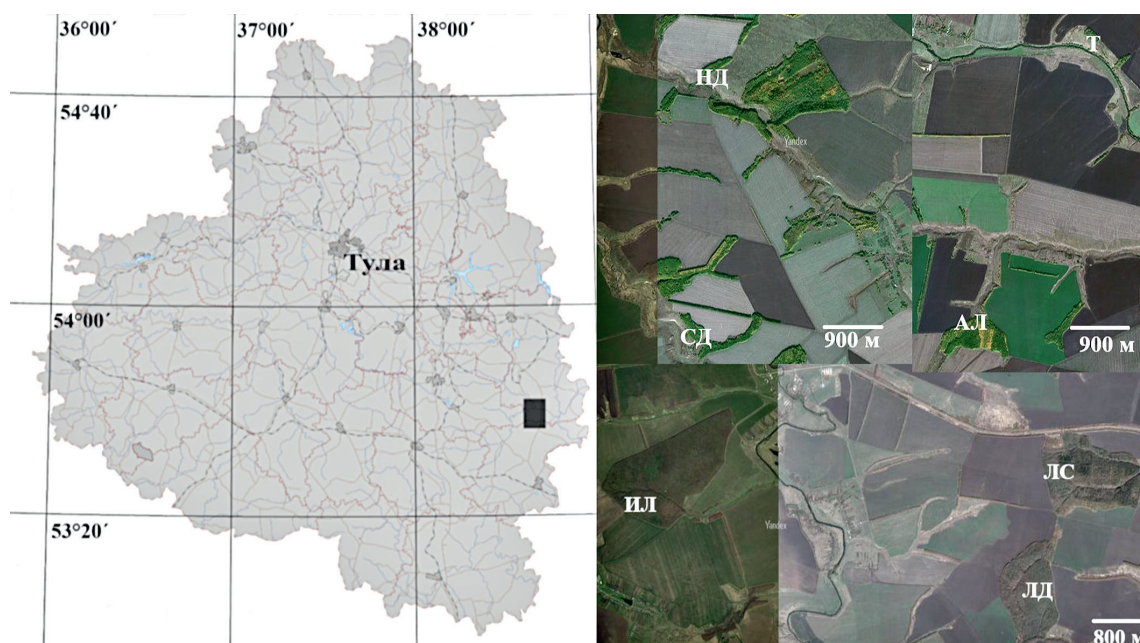


Рис. 1. Район исследований. Буквенные обозначения урочищ: СД – Средний Дубик; НД – Нижний Дубик; Т – Татинки; АЛ – Афоничев лес; ИЛ – Исакиевский лес; ЛС – Лес Стрельцы и ЛД – Лес Дубрава

Fig. 1. Study area. Designations of forest tracts: SD – Srednii Dubik; ND – Nizhnii Dubik; T – Tatinki; AL – Afonichev Les; IL – Isakievskii Les; LS – Les Strel'tsy; and LD – Les Dubrava

Ценопопуляции *Q. robur* исследовали в августе и октябре 2021 г. в урочищах, указанных в табл. 1.

Табл. 1. Объекты исследований

Table 1. Study sites

Урочища	Координаты	Аббревиатура	Ценопопуляции
Средний Дубик	N 53.585543°, E 38.555246°	СД	1-СД, 6-СД
Нижний Дубик	N 53.620787°, E 38.558143°	НД	3-НД, 9-НД, 10-НД
Татинки	N 53.669765°, E 38.730258°	Т	2-Т, 4-Т
Афоничев лес	N 53.632848°, E 38.702636°	АЛ	5-АЛ, 7-АЛ, 8-АЛ
Исакиевский лес	N 53.725854°, E 38.728792°	ИЛ	7-ИЛ, 9-ИЛ(1), 9-ИЛ(2)
Лес Стрельцы	N 53.733920°, E 38.832216°	ЛС	7-ЛС
Лес Дубрава	N 53.709357°, E 38.832173°	ЛД	7-ЛД, 8-ЛД, 9-ЛД

Примечания. Условные обозначения ценопопуляций даны с использованием номера варианта фитоценоотических условий (см. ниже) и аббревиатуры урочища. В урочище ИЛ две ценопопуляции в одинаковых фитоценоотических условиях рассматриваются отдельно в связи с тем, что они расположены на большом удалении друг от друга на противоположных окраинах лесного массива

Исследованиями были охвачены ассоциации в рамках эколого-флористической классификации [20–22]. Для каждой ассоциации были выделены один или несколько вариантов фитоценоотических условий. Варианты различаются по положению в рельефе, сомкнутости ярусов древостоя и подлеска и интенсивности антропогенного воздействия.

I. *Lathyro pisiformis–Quercetum roboris* Solomeshch et Grigoriev in Willner et al. 2016.

1. Нагорная остепненная дубрава с элементами оконной мозаики. Сомкнутость яруса подлеска и подрост в окнах – 0.2–0.5, сомкнутость яруса подлеска (без подрост) под пологом – 0.2–0.7. Площадь окон – 9–11 м². Сомкнутость древостоя вне окон – 0.7–0.8.

2. Нагорная остепненная дубрава, поврежденная низовым пожаром, местами переходившим в верховой. Сомкнутость древостоя – 0.7–0.8. В наиболее пострадавших от пожара участках активно развиваются порослевые особи *Betula pendula* Roth, *Populus tremula* L. и *Acer platanoides* L.

3. Остепненная дубрава с примесью *B. pendula* и *P. tremula* и подлеском сомкнутостью 0.2–0.4 на склоне северо-западной экспозиции в узкой и глубокой балке с временным водотоком по тальвегу. Сомкнутость древостоя – 0.8.

4. Разреженная остепненная дубрава «паркового» типа на склоне юго-западной экспозиции в долине р. Дон. Сомкнутость древостоя – 0.3–0.7. Подлесок и подрост отсутствуют. На склоне спорадически выпасают крупный рогатый скот.

5. Разреженная остепненная дубрава «паркового» типа на пологом склоне восточной экспозиции в закустаренной балке с временным водотоком по тальвегу. Сомкнутость древостоя и зарослей кустарников и подлеска – 0.3–0.6 и 0.3–0.7 соответственно.

6. Остепненная дубрава на крутом склоне юго-западной экспозиции в широкой слабооблесенной балке с сухим тальвегом. Сомкнутость древостоя – 0.8. Подлесок и подрост практически отсутствуют.

II. *Fraxino excelsioris–Quercetum roboris* Bulokhov et Solomeshch 2003.

7. Мелколиственные леса разнотравные на водоразделах с локусами подрост *A. platanoides*, *Fraxinus pennsylvanica* Marshall и *Q. robur*, скоплениями подлеска из *Sorbus aucuparia* L., *Frangula alnus* Mill. и *Crataegus* sp. Сомкнутость древостоя – 0.8, подрост и подлеска – 0.5–0.9.

III. *Prunetum spinosae* R. Tx. 1952.

8. Заросли *Prunus spinosa* L. на водоразделах с единичными кустами *Lonicera tatarica* L., *Padus avium* Mill., *Viburnum opulus* L. и особями подрост *Q. robur* по опушкам лесов шириной до 20 м. Сомкнутость – 0.7–0.8.

IV. Ассоциация, совмещающая черты асс. *Lathyro pisiformis–Quercetum roboris* и *Prunetum spinosae*.

9. Луговые степи на водоразделах в приопушечной 20-метровой полосе вдоль лесных массивов, включающие подрост *Q. robur* и *Malus* sp., а также единичные кусты *P. spinosa*. Сомкнутость подрост деревьев и кустов *P. spinosa* – 0.2.

V. *Lino flavi-Stipetum capillatae* ass. nov.

10. Луговая степь на юго-восточном склоне балки (с временным водотоком по тальвегу), включающая подрост *Q. robur* и *Malus* sp. Сомкнутость подрост – 0.2.

Всего исследовано 17 ЦП *Q. robur*. В каждой ценопопуляции в зависимости от занимаемой ею площади закладывали 2–4 учетных площадки размером 20×20 м. На площадке подсчитывали численность особей *Q. robur* и пересчитывали ее на 1 га. Таким способом определяли плотность особей на площадке. Среднее арифметическое значений плотности особей всех учетных площадок принимали за плотность особей всей ценопопуляции. Определяли онтогенетическое состояние и жизненность (нормальную, пониженную, низкую) особей, применяя диагностические признаки, описанные в

литературе [23, 24]. Проростки и ювенильные особи не учитывали. На основе распределения особей по онтогенетическим состояниям и категориям жизненности составляли онтогенетические и виталитетные спектры. Типологию ценопопуляций и онтогенетических спектров приводили по Л.А. Животовскому [25]. К инвазионным относили ЦП, состоящие только из прегенеративных особей, к нормальным – ценопопуляции с обязательным присутствием генеративных особей (в том числе при отсутствии прегенеративных особей). Левосторонними и центрированными считали такие онтогенетические спектры, у которых преобладают особи прегенеративных и генеративных онтогенетических состояний соответственно. К бимодальным относили спектры с близкими долями прегенеративных и генеративных особей. Для интегральной оценки демографической структуры ценопопуляций применяли классификацию «дельта – омега» [26]. Онтогенетический спектр каждой ценопопуляции представляли в виде гистограммы. Если в каком-либо варианте фитоценоотических условий исследовано несколько ценопопуляций, то гистограммы их онтогенетических спектров размещали на одном графике и приводили усредненный спектр в виде линейного графика.

Отмечено наличие элементов пространственной неоднородности в размещении особей в пространстве. Выявлено четыре варианта пространственной структуры ценопопуляций *Q. robur*:

- 1) относительно равномерное распределение на учетной площадке особей любых онтогенетических состояний;
- 2) разновозрастные локусы особей (в одном локусе представлены особи разных онтогенетических состояний);
- 3) один разновозрастный локус особей;
- 4) два разновозрастных локуса особей.

2. Результаты

Плотность особей в большинстве ценопопуляций не превышает 500–600 особей/га (рис. 2). Наибольшее число особей характерно для ценопопуляций 6-СД, 7-ИЛ и 9-ИЛ(2) (рис. 2, *е, ж, и* соответственно). Все исследованные ценопопуляции неполночленные (рис. 2), поскольку в них отсутствует фракция старых генеративных особей и особей постгенеративного периода онтогенеза. Наиболее приближена к полночленной ценопопуляция 5-АЛ (рис. 2, *д*), поскольку включает больше онтогенетических групп, чем все остальные. В мелколиственных лесах только одна ценопопуляция является нормальной (7-ИЛ), поскольку включает единичные молодые генеративные особи. Остальные ценопопуляции являются инвазионными. Также к инвазионной относится ценопопуляция 9-ИЛ(2) (рис. 2, *и*). За исключением указанных инвазионных ценопопуляций, остальные популяции во всех вариантах фитоценоотических условий можно отнести к нормальным, так как в них представлены генеративные особи.

Исследованные ценопопуляции *Q. robur* имеют левосторонние, центрированные и бимодальные спектры, а также спектры, в которых нет преобладающей фракции. Так, в ценопопуляции 1-СД (рис. 2, *а*) спектр бимодальный с максимумом на имматурных и средневозрастных генеративных особях. В ценопопуляции 5-АЛ спектр не имеет выраженного максимума (рис. 2, *д*), а в 2-Т, 3-НД, 4-Т, 6-СД (рис. 2, *б–г, е*) спектры центрированные с максимумом на средневозрастных генеративных особях.

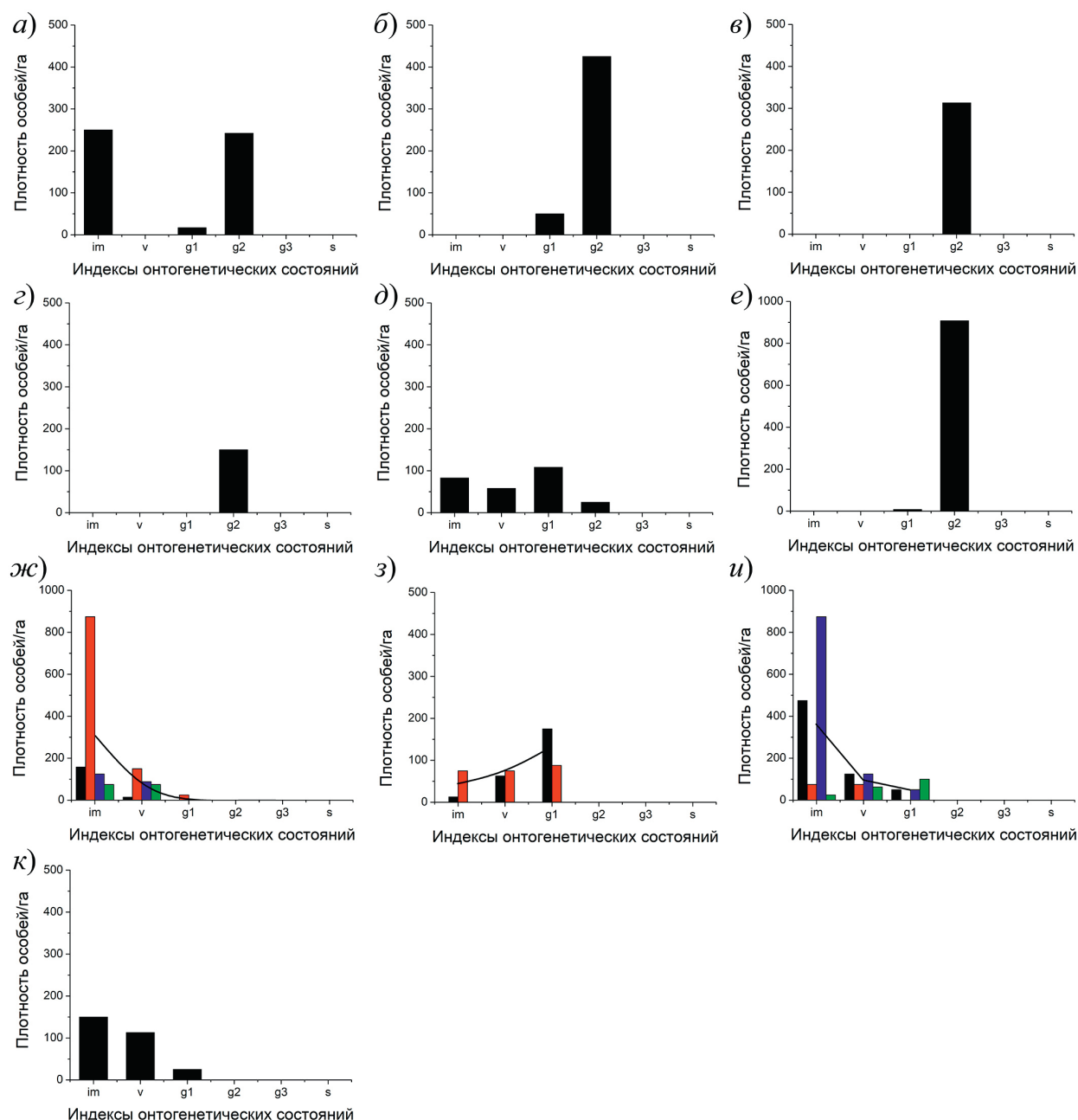


Рис. 2. Онтогенетические спектры ценопопуляций *Quercus robur* по вариантам фитоценотических условий 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г), 5 (д), 6 (е), 7 (ж), 8 (з), 9 (и) и 10 (к). Индексы онтогенетических состояний: im – имматурное, v – виргинильное, g1 – молодое генеративное, g2 – средневозрастное генеративное; g3 – старое генеративное; s – сенильное. Число столбцов на гистограммах ж–и для каждого индекса соответствует числу ценопопуляций, а линия отображает усредненный спектр

Fig. 2. Ontogenetic spectra of *Quercus robur* cenopulations under the phytocenotic conditions 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 7 (g), 8 (h), 9 (i), and 10 (j). Indices of ontogenetic states: im – immature, v – virginal, g1 – young reproductive, g2 – mature reproductive, g3 – old reproductive, s – senile. The number of bars in histograms g–i for each ontogenetic index corresponds to the number of cenopulations, while the line traces the average ontogenetic spectrum

У ценопопуляций 7-АЛ, 7-ИЛ, 7-ЛС, 7-ЛД (рис. 2, ж) спектры левосторонние, либо с максимумом на имматурных особях, либо с примерно равными долями имматурных и виргинильных особей. Спектр ценопопуляций варианта 8 либо является центрированным с

максимумом на молодых генеративных особях (8-АЛ), либо не имеет выраженных максимумов (8-ЛД) (рис. 2, з). Три из четырех ценопопуляций варианта 9 (9-НД, 9-ИЛ(1), 9-ИЛ(2)) имеют левосторонние спектры (либо с максимумом на имматурных особях, либо с равными долями имматурных и виргинильных особей), а у одной ценопопуляции спектр центрированный с максимумом на молодых генеративных особях (9-ЛД) (рис. 2, и). Наконец, у ценопопуляции 10-НД спектр левосторонний с максимумом на имматурных особях (рис. 2, к).

Согласно классификации «дельта – омега» большинство исследованных ценопопуляций *Q. robur* относится к молодым (рис. 3). Прежде всего это касается вариантов фитоценотических условий 7, 9 и 10. Также молодыми являются ценопопуляции 1-СД и 5-АЛ. К зреющим относится только одна ценопопуляция (8-АЛ). К зрелым относится 2/3 ценопопуляций разных вариантов дубрав.

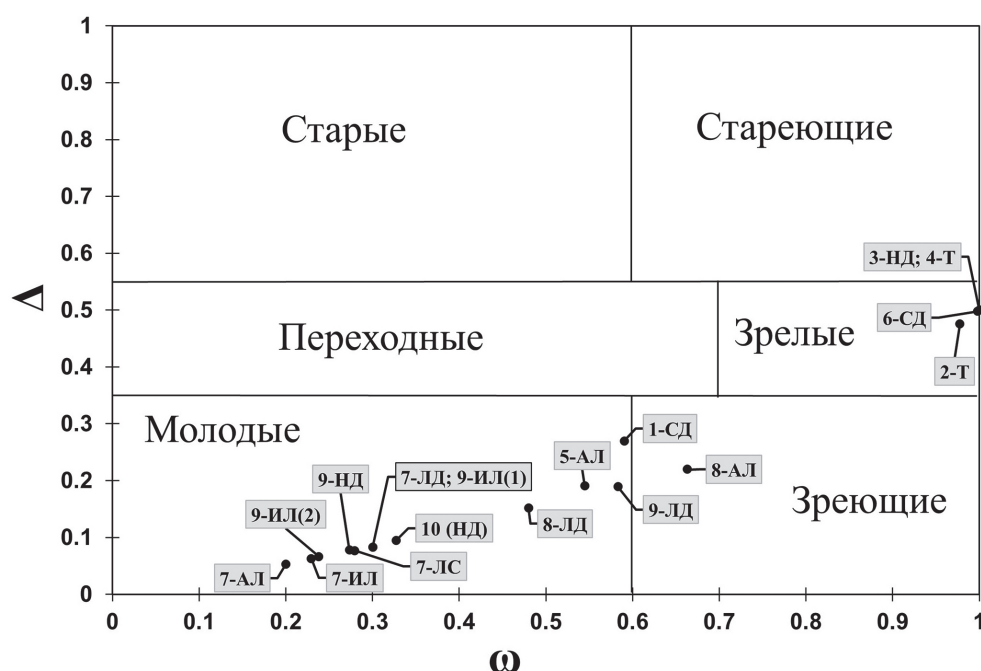


Рис. 3. Типы ценопопуляций *Quercus robur* согласно классификации «дельта – омега»

Fig. 3. Types of *Quercus robur* cenopopulations according to the “delta – omega” classification

В исследованных ценопопуляциях особи *Q. robur* относятся к трем категориям жизненности (рис. 4). Особи нормальной жизненности преобладают в ценопопуляциях 4-Т, 5-АЛ и во всех остальных, расположенных в вариантах фитоценотических условий 8–10. В перечисленных ценопопуляциях часть имматурных, большинство виргинильных и молодых генеративных особей имеют нормальную жизненность. В то же время пониженной и низкой жизненностью обладают главным образом имматурные особи. Особи с пониженной жизненностью преобладают в остальных ценопопуляциях дубовых лесов (1-СД, 2-Т, 3-НД, 6-СД) и в двух ценопопуляциях мелколиственных лесов (7-ИЛ и 7-ЛС). В ценопопуляции 1-СД нормальную жизненность имеет большая часть средневозрастных генеративных особей, а к категории пониженной жизненности относятся преимущественно имматурные особи. В свою очередь, в ценопопуляциях 2-Т, 3-НД и 6-СД средневозрастные генеративные особи имеют в основном пониженную жизненность. В ценопопуляциях мелколиственных лесов большинство имматурных и более половины виргинильных особей имеют пониженную жизненность. Особи низкой жизненности ни в одной ценопопуляции не превышают

25 % от общего числа особей. Наиболее значительна их доля в ценопопуляциях 2-Т и 7-АЛ (рис. 4). В первой ценопопуляции низкую жизненность имеют только средневозрастные генеративные особи, а во второй – имматурные особи.

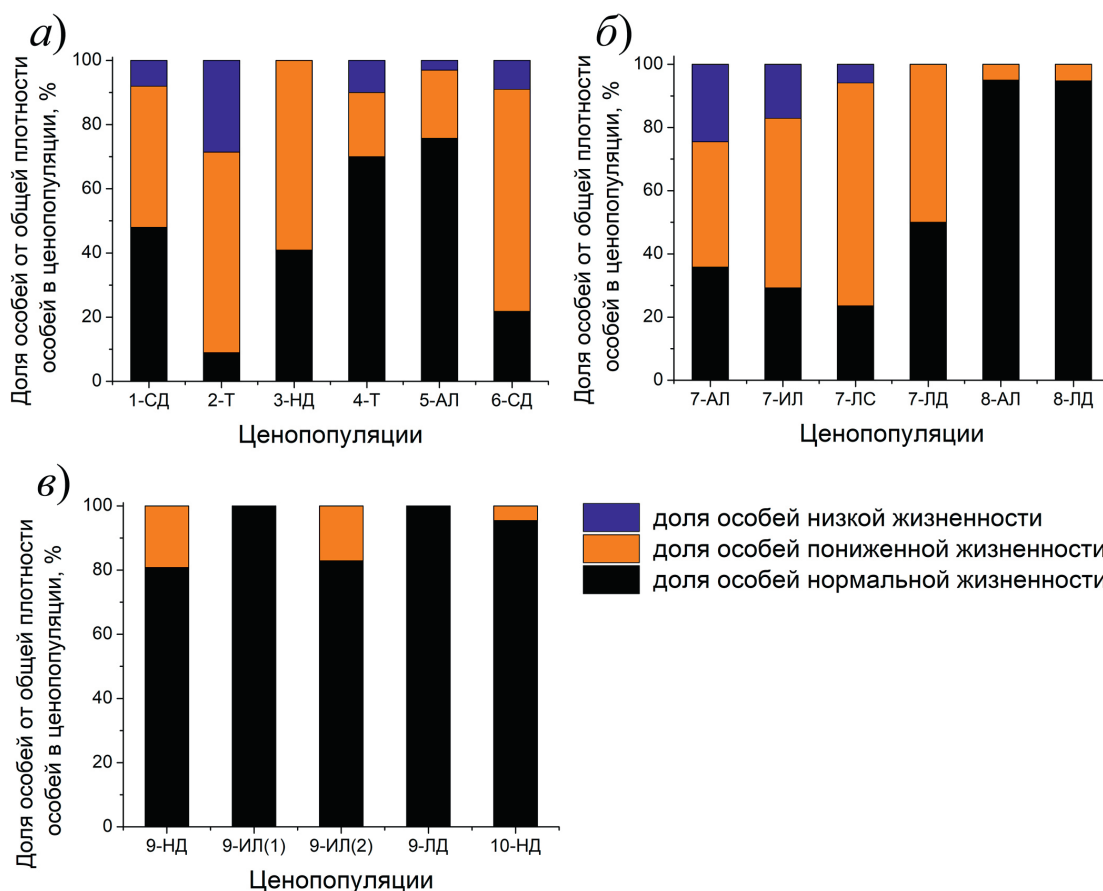


Рис. 4. Жизненность особей *Quercus robur* в ценопопуляциях остепненных дубрав (а), мелколиственных лесов и терновников (б) и луговых степей (в)

Fig. 4. Vitality of *Quercus robur* individuals in the cenopopulations of steppe oak forests (a), small-leaved forests and blackthorn thickets (b), and meadow steppes (c)

Для большинства ценопопуляций характерна неравномерная пространственная структура. Особи сгруппированы в смешанные разновозрастные локусы. Относительно равномерное распределение особей отмечено в ценопопуляции 3-НД. Сосредоточение особей одного онтогенетического состояния в локусе (обычно неправильной формы) выявлено в ценопопуляциях 2-Т и 4-Т. Наконец, наиболее редкий вариант пространственного размещения особей заключается в том, что имматурные особи сконцентрированы в окне древо-стоя, состоящего из средневозрастных генеративных особей, что характерно для ценопопуляции 1-СД.

2. Обсуждение

Рассмотрим перспективы самоподдержания исследованных ЦП *Q. robur* с учетом их демографической, виталитетной и пространственной структуры, а также биоэкологических особенностей вида.

Несмотря на наличие прегенеративной фракции в окнах нагорной дубравы урочища Средний Дубик (ценопопуляция 1-СД), едва ли стоит ожидать достижения имматурными

особями даже виргинильного онтогенетического состояния. Это связано прежде всего с высокой требовательностью подроста *Q. robur* к свету [8], которая не может быть удовлетворена в окнах площадью около 10 м², представленных в данном сообществе. Устойчивое прохождение онтогенеза у данного вида возможно только в окнах, имеющих площадь не менее 2000 м² [27]. Кроме того, в исследованных окнах все имматурные особи имеют пониженную и низкую жизненность. Появление благонадежного подроста *Q. robur* в ценопопуляции данной дубравы можно прогнозировать только в случае искусственного осветления древостоя. О проведении в прошлом таких мероприятий свидетельствуют единичные молодые генеративные особи *Q. robur*, которые могли прижиться только в окнах, образовавшихся при вырубке двух–трех взрослых деревьев полога. В то же время рубки могут стимулировать активный рост поросли как самого *Q. robur*, так и других видов деревьев и кустарников, поэтому массовое приживание новых особей *Q. robur* из семян в данных условиях в любом случае нереалистично.

В ценопопуляции нагорной дубравы урочища Татинки, затронутой пожаром (2-Т), следует ожидать полного распада древостоя в ближайшие десятилетия. Большинство особей *Q. robur* в этой ценопопуляции имеют пониженную и низкую жизненность, что связано с повреждением огнем корневых систем, ствола, а местами и нижней и средней частей крон. По мере выпадения деревьев полога и усыхания крон образующиеся окна будут зарастать быстрорастущим подростом мелколиственных видов деревьев и *A. Platanoides*, что сделает невозможным приживание прегенеративных особей *Q. robur* в ценопопуляции.

В ценопопуляции дубравы на склоне глубокой балки (урочище Нижний Дубик, 3-НД) полностью отсутствуют прегенеративные особи *Q. robur*, что связано с высокой сомкнутостью полога. Как и в случае с нагорной дубравой урочища Средний Дубик, единичное приживание молодых особей в данной балке возможно только при существенном осветлении древостоя. Однако как и в условиях нагорной дубравы Среднего Дубика, любые рубки простимулируют порослеобразование у пней *Q. robur* и других видов деревьев и кустарников, что усложнит развитие особей *Q. robur*.

Ценопопуляция разреженной дубравы на склоне к р. Дон (урочище Татинки, 4-Т), несмотря на хорошие условия освещения и близкое расположение водного зеркала, состоит только из средневозрастных генеративных особей *Q. robur*. Возможно, это связано с комплексным антропогенным воздействием на фитоценозы склона (выпас и весенние палы) в предшествующие годы. Полное отсутствие прегенеративных особей даже низкой жизненности позволяет предполагать, что в дальнейшем на открытых участках данного склона сохранятся неопределенные перспективы возобновления.

В разреженной дубраве на склоне пологой балки с временным водотоком в тальвеге (урочище Афоничев лес, 5-АЛ) складывается достаточно благоприятная ситуация для самоподдержания ценопопуляции *Q. robur*. В ней представлены особи от имматурного до средневозрастного генеративного состояния, что указывает на потенциальную возможность полного прохождения онтогенеза особями *Q. robur*. Кроме того, в балке преобладают особи нормальной жизненности. Такие показатели демографической и виталитетной структуры связаны с оптимальными условиями освещения и увлажнения. В отличие от склона к р. Дон в урочище Татинки, склон балки в урочище Афоничев лес более пологий и примыкает к массиву мелколиственно-широколиственного леса с зарослями кустарников по опушке. Группы кустарников произрастают и на открытых участках склона. Очевидно, небольшая крутизна склона и близость лесного массива с кустарниковым опушечным поясом способ-

ствуется сохранению влаги и препятствует чрезмерному перегреву склона в летние месяцы, что благоприятно сказывается на приживании новых особей *Q. robur*. Кроме того, ценопопуляция *Q. robur* в данной балке не несет видимых следов антропогенного воздействия.

В ценопопуляции сомкнутой дубравы на крутом склоне широкой слабооблесенной балки урочища Средний Дубик (6-СД) преобладают средневозрастные генеративные особи *Q. robur*. Единичные молодые генеративные особи имеют порослевое происхождение от пней деревьев полого, срубленных при выборочных рубках. Очевидно, что под пологом дубравы семенные особи *Q. robur* прижиться не могут. Преобладание в данной ценопопуляции особей пониженной и низкой жизненности связано с тем, что в балке грунтовые воды залегают достаточно глубоко, а деревья на склоне охлестываются ветром. В то же время урочище редко посещается людьми и расположено в удалении от населенных пунктов, что обуславливает отсутствие существенного антропогенного воздействия. Поэтому в благоприятные по количеству осадков годы на склоне ниже границы дубравы могут приживаться проростки *Q. robur*, которые затем могут достичь имматурного и даже виргинильного состояния. Однако прохождение онтогенеза данными особями будет лимитироваться регулярностью и продолжительностью засух в летний период. Кроме того, в данных экологических условиях прегенеративные особи будут обладать только пониженной и низкой жизненностью.

В мелколиственных лесах (вариант фитоценологических условий 7) ценопопуляции *Q. robur* имеют в основном «классический» спектр, характерный для инвазионных ценопопуляций деревьев [28]. Сообщества мелколиственных лесов вообще зачастую рассматриваются как один из «источников» поддержания потока поколений у *Q. robur* [11, 13]. Несмотря на высокую плотность имматурных особей *Q. robur* в отдельных ценопопуляциях под пологом березняков и осинников, большинство из них имеет пониженную и низкую жизненность. Это связано с сильным затенением, которое создает быстрорастущий подрост *A. platanoides*. Поэтому виргинильного и тем более молодого генеративного состояния достигают только те особи *Q. robur*, которые в имматурном состоянии не затеняются молодыми особями *A. platanoides*. Пригодность участков мелколиственных лесов в качестве «рефугиума» для приживания прегенеративных особей *Q. robur* будет снижаться по мере распада древостоя и выхода особей *A. platanoides* в более высокие ярусы сообщества.

В условиях северной лесостепи терновники (ценопопуляции 8-АЛ, 8-ЛД) можно рассматривать как очень подходящие местообитания для *Q. robur*, поскольку в них особи выходят в генеративный период онтогенеза, при этом большинство из них обладает нормальной жизненностью. Вероятно, кроны кустарников обеспечивают защиту от иссушающих ветров и в целом хорошо сохраняют влагу в корнеобитаемых слоях почвы. В работах по более южным и восточным районам лесостепной зоны [29, 30] также отмечены факты успешного приживания *Q. robur* в зарослях кустарников.

Различные типы лугов, а также открытые пространства вдоль опушек леса являются одним из потенциальных «источников» возникновения дубрав [15, 31]. Фрагменты луговых степей на водораздельных пространствах «Куликова поля» (вариант фитоценологических условий 9) также успешно заселяются особями *Q. robur*, которые в данных местообитаниях устойчиво переходят в генеративный период онтогенеза. Этому способствуют достаточное освещение и некоторое влияние микроклимата лесного массива на полосу окружающего пространства в паре десятков метров от границы леса. В ближайшие десятилетия в отсутствие антропогенного вмешательства луговая степь на расстоянии 20–30 м от границы лес-

ных массивов будет замещаться дубовым древостоем, поскольку молодые генеративные особи перейдут в средневозрастное генеративное состояние. Это будет вызывать постепенное смыкание крон. Соответственно, вдоль опушки вновь формирующихся дубрав будут приживаться новые прегенеративные особи *Q. robur*. Подобный механизм формирования дубрав описан для центральной лесостепи [31].

Наконец, в увлажненной балке урочища Нижний Дубик (ценопопуляция 10-НД) также прослеживаются перспективы постепенного зарастания значительной части открытого лугово-степного склона подростом *Q. robur*, который в дальнейшем выйдет в генеративный период онтогенеза. Это обусловлено световыми и гидрологическими условиями открытой части балки, а также почти полным отсутствием антропогенного пресса.

Таким образом, устойчивое достижение особями *Q. robur* генеративного периода онтогенеза наблюдается только в сукцессионных сообществах с доминированием мелколиственных видов деревьев, в зарослях кустарников и в участках луговых степей. Полученные данные хорошо согласуются с выявленными ранее особенностями демографической структуры ценопопуляций *Q. robur* в сообществах с достаточным уровнем освещенности [12, 13, 15, 32]. В то же время большинство вариантов широколиственных лесов не может выступать надежным «источником» самоподдержания ценопопуляций вида ввиду полного отсутствия в них виргинильных особей *Q. robur*. Следовательно, несмотря на то, что в ценопопуляциях *Q. robur* в большинстве исследованных дубрав «Куликова поля» преобладают средневозрастные генеративные особи и отсутствуют особи постгенеративного периода онтогенеза, эти ценопопуляции характеризуются регрессивным состоянием онтогенетического спектра, по классификации О.В. Смирновой с соавт. [28]. Поскольку за счет наличия в онтогенетическом спектре средневозрастных генеративных особей регрессивное состояние ценопопуляций является обратимым [28], при естественном или искусственном осветлении приживание молодых особей *Q. robur* оказывается потенциально вероятным. Аналогичные закономерности установлены для ценопопуляций *Q. robur* в различных типах широколиственных лесов в других частях ареала вида [6, 33], что подтверждает представление о *Q. robur* как светолюбивом растении. В условиях эрозионно-балочного ландшафта «Куликова поля», климатических особенностей северной лесостепи и высокой степени хозяйственной освоенности территории, на перспективы самоподдержания ценопопуляций *Q. robur* также оказывают влияние приуроченность к элементу рельефа и близость грунтовых вод. В частности, обращает на себя внимание, что в элементах балочного рельефа только на склонах восточной и юго-восточной экспозиций прегенеративные особи *Q. robur* успешно достигают генеративного периода онтогенеза (ценопопуляции 5-АЛ и 10-НД соответственно). В ряде случаев такая приуроченность может быть связана с интенсивным сельскохозяйственным и пирогенным воздействием на склонах иных экспозиций (юго-западный склон в урочище Татинки, ценопопуляция 4-Т). Однако склон северо-западной экспозиции в урочище Нижний Дубик (напротив ценопопуляции 10-НД) и склон западной экспозиции в урочище Афонищев лес (напротив ценопопуляции 5-АЛ) не несут явных следов недавнего антропогенного воздействия. Возможно, на восточных и юго-восточных склонах обеспечивается лучший прогрев почвы и более раннее снеготаяние, что способствует устойчивому развитию молодых особей *Q. robur* в условиях балок северной лесостепи. В любом случае следует отметить, что с учетом высокой многовековой хозяйственной нагрузки на экосистемы региона степень антропогенного влияния на состояние ценопопуляций *Q. robur* в пределах «Куликова поля» требует дальнейших исследований.

Заключение

С учетом особенностей демографической и виталитетной структуры ценопопуляций *Q. robur* на «Куликовом поле» в большинстве вариантов дубрав является вероятным прекращение потока поколений. Это связано прежде всего с тем, что в большей части исследованных дубрав отсутствуют окна, достаточные для достижения молодыми особями *Q. robur* виргинильного онтогенетического состояния, а в спектрах ценопопуляций преобладают средневозрастные генеративные особи. В мелколиственных лесах ценопопуляции *Q. robur* включают почти исключительно прегенеративные особи, однако по мере разрастания подраста *A. platanoides* можно ожидать снижения приживаемости новых особей *Q. robur*. Наиболее благоприятные перспективы самоподдержания ценопопуляций *Q. robur* сложились в разреженной дубраве на пологом склоне увлажненной балки, в зарослях кустарников вдоль опушек лесов и в участках луговых степей. В ценопопуляциях *Q. robur* в данных вариантах фитоценологических условий особи успешно достигают виргинильного и молодого генеративного состояния и имеют преимущественно нормальную жизненность. В дальнейшем целесообразно рассмотреть особенности популяционной организации других видов деревьев как в пределах территории музея-заповедника «Куликово поле», так и в других участках подзоны северной лесостепи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The author declares no conflicts of interest.

Литература

1. Заугольнова Л.Б. Структура популяций семенных растений и проблема их мониторинга: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб, 1994. 72 с.
2. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. Бот. ин-та АН СССР им. В.Л. Комарова. Сер. III (Геоботаника). 1950. Вып. 6. С. 7–204.
3. Уранов А.А., Смирнова О.В. Классификация и основные черты развития популяций многолетних растений // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 1969. Т. 74, Вып. 1. С. 119–134.
4. Тюрин А.В. Дубравы водоохранной зоны и способы их восстановления (общий очерк) / Дубравы СССР // М.: Гослесбумиздат, 1949. Т. 1. С. 5–29.
5. Курнаев С.Ф. Теневые широколиственные леса Русской равнины и Урала. М.: Наука, 1980. 316 с.
6. Рябцев И.С., Тиходеева М.Ю., Рябцева И.М. Подпологовое возобновление лесобразующих пород в широколиственных лесах разного возраста с господством дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) // Вестник СПбГУ. Сер. 3. Биология. 2009. Вып. 2. С. 11–21.
7. Bobiec A., Jaszcz E., Wojtunik K. Oak (*Quercus robur* L.) regeneration as a response to natural dynamics of stands in European hemiboreal zone // Eur. J. For. Res. 2011. V. 130, No 5. P. 785–797. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0471-3>.
8. Евстигнеев О.И. Отношение лиственных деревьев к свету и водообеспеченности в связи со структурой леса // Лесоведение. 1996. № 6. С. 26–35.
9. Оценка и сохранение биоразнообразия лесного покрова в заповедниках Европейской России. М.: Научный мир, 2000. 196 с.
10. Vera F.W.M. Grazing Ecology and Forest History. Wallingford, New York, NY: CABI Publ., 2000. xix, 506 p.
11. Смирнова О.В., Бобровский М.В. Дуб-кочевник // Природа. 2004. № 12. С. 26–30.
12. Евстигнеев О.И., Коротков В.Н. Сукцессии сосновых лесов задровской местности в Неруссо-Деснянском полесье // Бюлл. Брянского отд. РБО. 2013. № 1(1). С. 31–41.

13. Стаменов М.Н. Структура ценопопуляций *Quercus robur* L. (Fagaceae) в Южном Подмоскowie // Вестник СПбГУ. Сер. 3. Биология. 2016. Вып. 2. С. 87–99. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.206>.
14. Bobiec A., Rief A., Öllerer K. Seeing the oakscape beyond the forest: A landscape approach to the oak regeneration in Europe // Landscape Ecol. 2018. V. 33, No 4. P. 513–528. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0619-y>.
15. Евстигнеев О.И., Короткова Н.В. Онтогенез дуба черешчатого на пойменных лугах Брянского полесья // Russ. J. Ecosyst. Ecol. 2023. V. 8, No 2. Art. 1. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-2-1>.
16. Бугаев В.А., Мусиевский А.Л., Царалунга В.В. Дубравы Европейской части России // Лесной журнал. 2004. № 2. С. 7–13.
17. Здоровцов В.А., Дунаев А.В. К вопросу о состоянии старовозрастных древостоев дуба в фитоценозах лесостепных заповедных дубрав // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. Сер. Естественные науки. 2017. Т. 4 (253), вып. 38. С. 68–75.
18. Курнаев С.Ф. Лесорастительное районирование СССР. М.: Наука, 1973. 203 с.
19. Алексеев Д.А. Эколого-экономическое обоснование создания государственного природного комплексного заказника федерального значения «Куликово поле» на территории Тульской области. Тула, 2006. 62 с.
20. Семенищенков Ю.А., Полуянов А.В. Остепненные широколиственные леса союза *Aceri tatarici–Quercion Zólyomi* 1957 на Среднерусской возвышенности // Растительность России. 2014. № 24. С. 101–123.
21. Семенищенков Ю.А., Волкова Е.М., Бурова О.В. Широколиственные леса юго-востока Тульской области // Ботанический журнал. 2019. Т. 104, № 5. С. 741–765. <https://doi.org/10.1134/S0006813619050119>.
22. Семенищенков Ю.А., Волкова Е.М. Экологические и флористические различия двух типов сообществ широколиственных лесов на Среднерусской возвышенности // Russ. J. Ecosyst. Ecol. 2021. V. 6, No 1. Art. 3. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-1-3>.
23. Диагнозы и ключи возрастных состояний лесных растений. Деревья и кустарники / Под ред. О.В. Смирновой. М.: Прометей, 1989. 102 с.
24. Evstigneev O.I., Korotkov V.N. Ontogenetic stages of trees: An overview // Russ. J. Ecosyst. Ecol. 2016. V. 1, No 2. Art. 1. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2016-2-1>.
25. Животовский Л.А. О типизации ценопопуляций растений по онтогенетическим спектрам // Сибирский экологический журнал. 2023. Т. 30, № 3. С. 227–237. <https://doi.org/10.15372/SEJ20230301>.
26. Животовский Л.А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений // Экология. 2001. Т. 32, № 1. С. 3–7.
27. Смирнова О.В., Чистякова А.А. Сохранить естественные дубравы // Природа. 1988. № 3. С. 40–45.
28. Смирнова О.В., Бобровский М.В., Ханина Л.Г. Оценка и прогноз сукцессионных процессов в лесных ценозах на основе демографических методов // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 2001. Т. 106, Вып. 5. С. 25–33.
29. Харченко Н.А., Харченко Н.Н., Мельников Е.Е. Сукцессионные процессы в дубравах центральной лесостепи как результат их деградации // Лесной вестник. 2009. Т. 68, № 5. С. 192–195.
30. Иванов А.И., Власов А.С., Власова Т.Г., Сашенкова С.А. Древесные растения Пензенской области. Пенза: РИО ПГСХА, 2012. 264 с.
31. Харченко Н.А., Харченко Н.Н. К вопросу о происхождении дубрав в центральной лесостепи // Лесотехнический журнал. 2013. № 3. С. 43–50.

32. Фардеева М.Б., Исламова Г.Р. Особенности популяционной организации древесных видов хвойно-широколиственных лесов // Вестник Татарского гос. гуманитарно-педагогического ун-та. 2007. № 2–3 (9–10). С. 112–121.
33. Грищенко К.Г., Болдырев В.А. Типы возрастной структуры ценопопуляций древесных видов-доминантов в лесах Саратовского правобережья // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2008. Т. 10, № 2. С. 432–437.

References

1. Zaugol'nova L.B. The structure and monitoring of seed plant populations. *Extended Abstract of Dr. Sci. (Biology) Diss.* St. Petersburg, 1994. 72 p. (In Russian)
2. Rabotnov T.A. Life cycle of perennial herbaceous plants in meadow cenoses. *Tr. Bot. Inst. Akad. Nauk SSSR im. V.L. Komarova. Ser. III (Geobot.)*, 1950, no. 6, pp. 7–204. (In Russian)
3. Uranov A.A., Smirnova O.V. Classification and major development features of perennial plant populations. *Byull. MOIP. Otd. Biol.*, 1969, vol. 74, no. 1, pp. 119–134. (In Russian)
4. Tyurin A.V. Oak stands of water protection zones and methods to restore them (a general outline). In: *Dubravyy SSSR [Oak Stands of the Soviet Union]*. Vol. 1. Moscow, Goslesbumizdat, 1949, pp. 5–29. (In Russian)
5. Kurnaev S.F. *Tenevye shirokolistvennye lesa Russkoi ravniny i Urala* [Shaded Broad-Leaved Forests of the Russian Plain and the Urals]. Moscow, Nauka, 1980. 316 p. (In Russian)
6. Ryabtsev I.S., Tikhodeeva M.Yu., Ryabtseva I.M. Understory regeneration of forest-forming species in broad-leaved forests of different ages with the dominance of English oak (*Quercus robur* L.). *Vestn. SPbGU. Ser. 3. Biol.*, 2009, no. 2, pp. 11–21. (In Russian)
7. Bobiec A., Jaszcz E., Wojtunik K. Oak (*Quercus robur* L.) regeneration as a response to natural dynamics of stands in European hemiboreal zone. *Eur. J. For. Res.*, 2011, vol. 130, no. 5. pp. 785–797. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0471-3>.
8. Evstigneev O.I. Light and moisture requirements of deciduous trees in relation to forest structure. *Lesovedenie*, 1996, no. 6. pp. 26–35. (In Russian)
9. *Otsenka i sokhranenie bioraznoobraziya lesnogo pokrova v zapovednikakh Evropeiskoi Rossii* [Biodiversity Assessment and Conservation of Forest Cover in Nature Reserves of European Russia]. Moscow, Nauchn. Mir, 2000. 196 p. (In Russian)
10. Vera F.W.M. *Grazing Ecology and Forest History*. Wallingford, New York, NY, CABI Publ., 2000. xix, 506 p.
11. Smirnova O.V., Bobrovskii M.V. Oak on the move, *Priroda*, 2004, no. 12, pp. 26–30. (In Russian)
12. Evstigneev O.I., Korotkov V.N. Successions of pine forests on outwash plains (sandurs) in the Nerusso-Desna Polesye. *Byull. Bryansk. Otd. RBO*, 2013, no. 1(1), pp. 31–41. (In Russian)
13. Stamenov M.N. Structure of coenopopulations of *Quercus robur* L. (Fagaceae) in Southern Moscow region. *Vestn. SPbGU. Ser. 3. Biol.*, 2016, no. 2, pp. 87–99. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.206>. (In Russian)
14. Bobiec A., Rief A., Öllerer K. Seeing the oakscape beyond the forest: A landscape approach to the oak regeneration in Europe. *Landscape Ecol.*, 2018, vol. 33, no. 4. pp. 513–528. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0619-y>.
15. Evstigneev O.I., Korotkova V.N. Ontogeny of pedunculate oak in flood meadows of the Bryansk Polesye. *Russ. J. Ecosyst. Ecol.*, 2023, vol. 8, no. 2, art. 1. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-2-1> (In Russian)
16. Bugaev V.A., Musievskii A.L., Tsaralunga V.V. Oak forests in the European part of Russia. *Lesn. Zh.*, 2004, no. 2, pp. 7–13. (In Russian)

17. Zdorovtsov V.A., Dunaev A.V. On the status of old-growth oak stands in the phytocenoses of protected forest-steppe oak forests. *Nauchn. Vedomosti Belgorod. Gos. Univ. Ser. Estestv. Nauki*, 2017, vol. 4 (253), no. 38, pp. 68–75. (In Russian)
18. Kurnaev S.F. *Lesorastitel'noe raionirovanie SSSR* [Forest Vegetation Zoning of the USSR]. Moscow, Nauka, 1973, 203 p. (In Russian)
19. Alekseev D.A. *Ekologo-ekonomicheskoe obosnovanie sozdaniya gosudarstvennogo prirodnogo kompleksnogo zakaznika federal'nogo znacheniya "Kulikovo pole" na territorii Tul'skoi oblasti* [Environmental and Economic Justification for Establishing the the Kulikovo Field State Integrated Nature Sanctuary of Federal Significance in the Tula Region]. Tula, 2006. 62 p. (In Russian)
20. Semenishchenkov Yu.A., Poluyanov A.V. Steppified broad-leaved forests of the *Aceri tatarici-Quercion* Zólyomi 1957 alliance on the Central Russian Upland. *Rastit. Ross.*, 2014, no. 24, pp. 101–123. (In Russian)
21. Semenishchenkov Yu.A., Volkova E.M., Burova O.V. Broad-leaved forests of the southeastern Tula region. *Bot. Zh.*, 2019, vol. 104, no. 5, pp. 741–765. <https://doi.org/10.1134/S0006813619050119>. (In Russian)
22. Semenishchenkov Yu.A., Volkova E.M. Ecological and floristic differences between two types of broad-leaved forest communities on the Central Russian Upland. *Russ. J. Ecosyst. Ecol.*, 2021, vol. 6, no. 1, art. 3. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-1-3>. (In Russian)
23. Smirnova O.V. (Ed.) *Diagnozy i klyuchi vozrastnykh sostoyanii lesnykh rastenii. Derev'ya i kustarniki* [Developmental Stage Diagnoses and Keys for Forest Plants. Trees and Shrubs]. Moscow, Prometei, 1989. 102 p. (In Russian)
24. Evstigneev O.I., Korotkov V.N. Ontogenetic stages of trees: An overview. *Russ. J. Ecosyst. Ecol.*, 2016, vol. 1, no. 2, art. 1. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2016-2-1>.
25. Zhivotovsky L.A. Typification of plant populations on the basis of their ontogenetic spectra. *Contemp. Probl. Ecol.*, 2023, vol. 16, no. 3, pp. 265–273. <https://doi.org/10.1134/S1995425523030137>.
26. Zhivotovsky L.A. Ontogenetic states, effective density, and classification of plant populations. *Russ. J. Ecol.*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1023/A:1009536128912>.
27. Smirnova O.V., Chistyakova A.A. Preserving natural oak stands. *Priroda*, 1988, no. 3, pp. 40–45. (In Russian)
28. Smirnova O.V., Bobrovsky M.V., Khanina L.G. Estimating and forecasting the succession dynamics in forest communities using demographic methods. *Byull. MOIP. Otd. Biol.*, 2001, vol. 106, no. 5, pp. 25–33. (In Russian)
29. Kharchenko N.A., Kharchenko N.N., Mel'nikov E.E. Successional processes in oak stands of the Central Forest-Steppe as a result of their degradation. *Lesn. Vestn.*, 2009, vol. 68, no. 5, pp. 192–195. (In Russian)
30. Ivanov A.I., Vlasov A.S., Vlasova T.G., Sashenkova S.A. *Drevesnye rasteniya Penzenskoi oblasti* [Woody Plants of the Penza Region]. Penza, RIO PGSKhA, 2012, 264 p. (In Russian)
31. Kharchenko N.A., Kharchenko N.N. On the origin of oak stands in the Central Forest-Steppe. *Lesotekh. Zh.*, 2013, no. 3, pp. 43–50. (In Russian)
32. Fardeeva M.B., Islamova G.R. Population structure of tree species in coniferous–broad-leaved forests. *Vestn. Tatar. Gos. Gumanit.-Pedagog. Univ.*, 2007, nos. 2–3 (9–10), pp. 112–121. (In Russian)
33. Grishchenko K.G., Boldyrev V.A. Age structure types of dominant tree species cenopopulations in the forests on Saratov's right bank of the Volga River. *Izv. Samar. Nauchn. Tsentra Ross. Akad. Nauk*, 2008, vol. 10, no. 2, pp. 432–437. (In Russian)

Информация об авторах

Мирослав Найчев Стаменов, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН

E-mail: mslv-eiksb@inbox.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2500-7925>

Author Information

Miroslav N. Stamenov, Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher, Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS

E-mail: mslv-eiksb@inbox.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2500-7925>

Поступила в редакцию 03.10.2024

Принята к публикации 15.01.2025

Received October 3, 2024

Accepted January 15, 2025

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.353-366>

The effect of terrestrial weathering on the magnetic properties of meteorites from the Atacama Desert

D. Kuzina¹✉, J. Gattacceca², H. Gouilloux², H. Mertens², R. Lacube², F. Demory², C. Lorenz³

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE, Aix-en-Provence, France

³Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉di.kuzina@gmail.com

Abstract

Once ordinary chondrites fall on Earth, Fe–Ni minerals and troilite they contain oxidize and transform into iron oxyhydroxides and/or iron oxides, which is expected to modify their magnetic properties. In this study, the effect of long-term terrestrial weathering on the magnetic properties (magnetic susceptibility and hysteresis parameters) of 117 H and L ordinary chondrites from the Atacama Desert (Chile), a region hosting the oldest meteorite collection in the world, was investigated. The measurements revealed a consistent weathering-induced decrease in the saturation magnetization and magnetic susceptibility of both H and L chondrites. The observed trends indicate a faster initial weathering of Fe–Ni minerals compared to troilite, their transformation into mostly paramagnetic iron oxyhydroxides, as well as the formation of magnetite in the later weathering stages.

Keywords: ordinary chondrites, terrestrial weathering, magnetic properties, magnetic susceptibility, hysteresis, Atacama Desert

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 24-27-00388, <https://rscf.ru/project/24-27-00388/>).

For citation: Kuzina D., Gattacceca J., Gouilloux H., Mertens H., Lacube R., Demory F., Lorenz C. The effect of terrestrial weathering on the magnetic properties of meteorites from the Atacama Desert. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 353–366. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.353-366>.

Оригинальная статья

УДК 523.681:537.621

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.353-366>**Влияние земного выветривания на магнитные свойства метеоритов из пустыни Атакама****Д. Кузина¹✉, Ж. Гаттачека², У. Гуйе², У. Мертенс², Р. Лакюб², Ф. Демори², К. Лоренц³**¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия*²*Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук,**Национальный центр научных исследований, Университет Экс-Марсель,**Научно-исследовательский институт развития, Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований, Экс-ан-Прованс, Франция*³*Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского**Российской академии наук, Москва, Россия*✉ di.kuzina@gmail.com**Аннотация**

После падения на Землю обыкновенных хондритов, содержащиеся в них минералы Fe и Ni, а также троилит подвергаются окислению и преобразуются в оксигидроксиды и/или оксиды железа. Предполагается, что эти изменения влияют на их магнитные свойства. В работе представлены результаты изучения воздействия длительного выветривания на магнитные свойства (магнитную восприимчивость и гистерезисные параметры) 117 обыкновенных хондритов групп H и L, собранных в пустыне Атакама (Чили), на территории которой сосредоточено одно из древнейших в мире скоплений метеоритов. Установлено, что намагниченность насыщения и магнитная восприимчивость метеоритов обеих групп уменьшаются с увеличением степени выветривания. Выявленные зависимости указывают на то, что минералы Fe и Ni более подвержены выветриванию, по сравнению с троилитом. При этом они в основном превращаются в парамагнитные оксигидроксиды железа, а магнетит образуется на более поздних стадиях выветривания.

Ключевые слова: обыкновенные хондриты, земное выветривание, магнитные свойства, магнитная восприимчивость, гистерезис, пустыня Атакама.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 24-27-00388, <https://rscf.ru/project/24-27-00388/>.

Для цитирования: Кузина Д., Гаттачека Ж., Гуйе У., Мертенс У., Лакюб Р., Демори Ф., Лоренц К. Влияние земного выветривания на магнитные свойства метеоритов из пустыни Атакама // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 353–366. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.353-366>.

Introduction

Meteorites are asteroid fragments, with only a small fraction coming from the Moon and Mars. The most abundant type of meteorites falling on Earth are ordinary chondrites originating from different parent bodies and divided into three groups (H, L, and LL) based on variations in chemical composition [1]. They normally contain silicate minerals (olivine, pyroxene, plagioclase), Fe–Ni minerals (kamacite, taenite, tetrataenite), and iron sulfides (troilite). Silicate minerals are resistant to chemical alternation in terrestrial settings. Fe–Ni minerals and troilite oxidize while the meteorite sits on the surface of Earth, and, before it is collected and properly stored in a dry place, this process leads to the formation of iron oxyhydroxides (lepidocrocite, akaganeite, goethite) and/or iron oxides (magnetite and maghemite) [2, 3].

Most meteorites have been recovered from Antarctica or hot deserts. Antarctic meteorites are relatively well preserved from terrestrial weathering because they spend most of their time on Earth embedded in the ice, which limits their interaction with liquid water. In contrast, hot desert meteorites are often strongly weathered due to moisture effects and terrestrial processes like rain [e.g., 4, 5]. The Atacama Desert, in Chile, stands out among other hot deserts for its exceptionally stable and extreme hyperaridity [6]. It hosts the oldest meteorite collection in the world. In the El Médano dense collection area, the average terrestrial age of meteorites is 710 k.y. [7]. Broadly similar terrestrial ages have been reported for the Catalina, Calama, Chug Chug, and Sierra Gorda dense collection areas [8].

The magnetic properties of ordinary chondrites are defined by the abundance and nature of Fe–Ni minerals. Their magnetic susceptibility [9] and hysteresis characteristics [10] have been extensively studied for classification [9, 11], as well as for reconstructing thermal and shock history [10]. However, both are also sensitive to weathering and associated oxidation of metallic minerals [9, 12].

In this article, the magnetic properties of meteorites from the Atacama Desert are examined in connection with long-term weathering.

1. Material and Methods

A total of 117 Atacama meteorites, all H and L ordinary chondrites, from the meteorite collections of the European Center for Research and Teaching in Environmental Geosciences (Centre de recherche et d'enseignement des géosciences de l'environnement, CEREGE) and the Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences were studied. The samples (selected randomly) originate from four different dense collection areas (DCAs) in the Atacama Desert: the El Médano area, which includes meteorite finds from the El Médano and the Caleta el Cobre DCAs [13]; the San Juan DCA [14]; the Catalina DCA [8]; and the Calama area, a region comprising Calama, Chug Chug, and Sierra Gorda DCAs [8].

Hysteresis measurements were performed on samples in the range of 74–1357 mg, with an average mass of 435 mg (s.d. 256 mg, $n = 117$). The samples were broken from the type meteorite specimen using a rock trimmer. For comparison with unweathered meteorites, a 784 mg sample of the Tamdakht H5 chondrite and a 975 mg sample of the Sueilila 004 L6 chondrite, both from the CEREGE meteorite collection, were studied.

Hysteresis properties of the samples were measured at CEREGE and Kazan Federal University (KFU). At CEREGE, two vibrating sample magnetometers (VSM) were used, a Princeton Micromag VSM and a Lakeshore 8600 VSM (LakeShore Cryotronics, Inc., USA), to obtain hysteresis loops with a maximum field of 1 and 1.5 T, respectively, and a field step of 10 mT in both cases. At KFU,

hysteresis parameters were determined using a J_meter coercive spectrometer [15, 16] with a field step of 1 mT and a maximum field of 1.5 T.

From the hysteresis loops, the following parameters were deduced: saturation magnetization (M_s), saturation remanence (M_{rs}), and coercivity (B_c). To isolate the ferromagnetic part of the hysteresis loops, the paramagnetic and diamagnetic contributions to magnetic susceptibility (estimated by a linear fit over the 0.9–1 T and 1.4–1.5 T intervals for the measurements performed with a Princeton VSM and a LakeShore 8600 VSM, respectively) were removed. Because the approach to saturation [e.g., 17] is not negligible for Fe–Ni minerals, the M_s values were corrected. For the M_s values fitted over the 0.9–1 T interval, a +19 % correction factor was applied, as outlined by Gattacceca et al. [10]. For those obtained using a linear fit over the 1.4–1.5 T interval, a +5.2 % correction factor was used. The coercivity of remanence (B_{cr}) was determined from the back-field demagnetization experiments.

The low-field magnetic susceptibility (noted χ) of a bulk meteorite sample was measured at CEREGE with a Kappabridge KLY2 (AGICO, Czech Republic) operating at 300 A/m and 920 Hz and equipped with a large coil (nominal sample volume 65 cm³). The samples too large for this device were measured using a SM30 magnetic susceptibility meter (ZHInstruments, Czech Republic) calibrated according to Gattacceca et al. [18]. Whenever possible, the magnetic susceptibility was measured along three orthogonal axes to take into account the magnetic anisotropy of ordinary chondrites [19]. Some small samples were measured using a Multifunction Kappabridge MFK1-FA (AGICO, Czech Republic) at KFU. The measurements were carried out at a standard frequency of 976 Hz.

2. Results

The obtained hysteresis loops are of excellent quality (Fig. 1) because H and L chondrites are characterized by a high average content of Fe–Ni minerals (18.2 wt% in fresh H chondrites and 8.45 wt% in fresh L chondrites [10]).

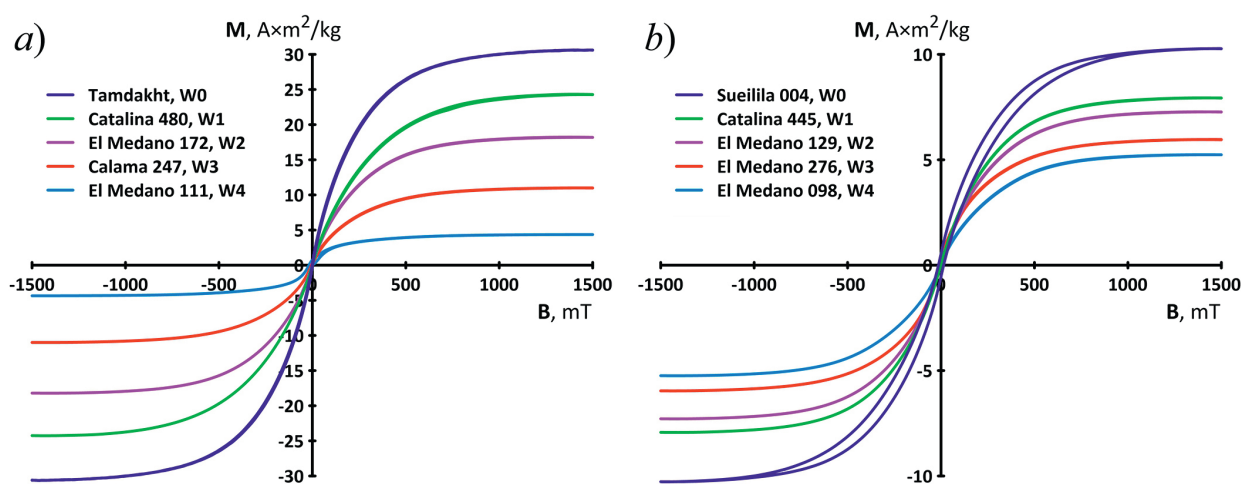


Fig. 1. Hysteresis loops for a) H group W0-1-2-3-4, b) L group W0-1-2-3-4

For 28 meteorites, two different samples were measured at CEREGE (average sample mass 244 mg) and KFU (average sample mass 493 mg). The resulting two sets of measurements show an excellent overall agreement, with the coefficient of correlation (R^2) for linear fits between the M_s , M_{rs} , B_c , and B_{cr} datasets of 0.96, 0.96, 0.93, and 0.94, respectively. The corresponding slopes are 1.06, 0.96, 0.93, and 0.94, thus indicating a proper cross-calibration of the instruments used

at both laboratories. However, when considering each pair of samples from individual meteorites, the average deviations from the mean value are 17, 22, 25, and 23 % for M_s , M_{rs} , B_c , and B_{cr} , respectively. They can be attributed to the moderate variations observed in the amount and/or nature of ferromagnetic minerals contained by the samples weighing 200–500 mg and must be considered while interpreting the full dataset. When multiple samples from the same meteorite were measured, the results were combined into a single value (mass-weighted average).

The full hysteresis database is given in Table, which also includes the susceptibility values for the same samples that were used in the hysteresis measurements (average mass 435 mg, median mass 448 mg), as well as for the main mass of the meteorite (average mass 548 g, median mass 171 g).

Table. Magnetic parameters, group, weathering grade, and mass of the studied meteorites (* – collection from Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences. The rest of the meteorites – CEREGE collection)

Meteorite	Group	W	Studied mass, mg	M_s , A×m ² /kg	M_{rs} , A×m ² /kg	B_c , mT	B_{cr} , mT	χ , m ³ /kg small piece	χ , m ³ /kg large piece
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Calama 027*	H5	3	525	16.02	1.14	9.15	30.10		8.91E-05
Calama 153*	H5	2	186	18.28	0.45	4.09	26.20		9.55E-05
Calama 159*	H5	2	104	31.97	0.36	2.89	78.60		1.20E-04
Calama 247*	H4	3	492	12.31	0.34	4.99	30.20	6.49E-05	8.13E-05
Calama 279*	H5	1	705	28.57	0.24	1.81	90.30	1.63E-04	1.62E-04
Calama 310*	H5	3	168	8.56	0.48	8.88	35.00		6.92E-05
Caleta el Cobre 003	H5	2	222	6.91	0.34	7.48	28.71	3.38E-05	
Caleta el Cobre 020	H5	3	498	0.00	0.87	16.22	41.00	4.22E-05	5.37E-05
Catalina 146	H5	1	448	30.61	0.16	1.38	21.90	1.48E-04	1.35E-04
Catalina 229	H5	1	464	27.82	0.28	2.09	46.90	1.48E-04	1.78E-04
Catalina 474	H5	3	1279	13.00	0.55	9.16	35.20		6.03E-05
Catalina 476	H5	1	922	34.86	0.24	1.27	24.50	1.69E-04	1.70E-04
Catalina 477	H5	1	893	29.13	0.33	2.41	68.30	1.61E-04	1.26E-04
Catalina 478	H5	1	442	32.76	0.31	2.57	24.20	1.43E-04	1.26E-04
Catalina 480	H5	1	1060	25.81	0.13	1.33	24.10	1.45E-04	1.51E-04
Catalina 517	H5	1	862	26.39	0.29	1.92	32.90	1.78E-04	1.58E-04
Catalina 524	H6	3	553	15.68	0.49	4.91	22.20	8.17E-05	1.00E-04
Catalina 535	H5	1	615	20.23	0.21	2.22	57.00	1.20E-04	1.41E-04
Catalina 538	H5	1	757	27.16	0.27	2.24	27.50	1.60E-04	1.55E-04
Catalina 548	H6	1	1083	17.28	0.38	4.95	103.50		1.29E-04
Catalina 555	H5	2	546	14.03	0.26	4.86	42.00	5.10E-05	5.50E-05
Catalina 572	H5	1	594	28.33	0.28	2.19	103.40	2.15E-04	1.62E-04
Chug Chug 002*	H5	1	321	29.37	0.17	1.04	40.90		2.24E-04
Chug Chug 045*	H6	1	147	18.61	0.69	7.05	52.40		1.29E-04
Chug Chug 065*	H5	1	96	22.94	0.36	2.98	59.20		1.55E-04

Table (continued)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chug Chug 067*	H5	1	100	24.63	0.65	4.91	34.50		1.15E-04
Chug Chug 097*	H5	3	876	18.68	0.82	8.95	34.10	1.05E-04	1.17E-04
Chug Chug 146*	H5	2	115	23.32	0.23	1.99	44.90		1.00E-04
El Médano 004	H4	1	290	31.12	0.31	1.85	70.04	1.90E-04	
El Médano 010	H4	4	149	11.26	0.31	5.94	32.21	5.17E-05	
El Médano 011	H6	3	281	12.94	0.31	4.85	35.16	7.37E-05	
El Médano 012	H6	3	230	14.95	0.43	4.54	33.58	1.03E-04	
El Médano 014	H4	2	134	14.20	0.40	4.44	30.59	7.61E-05	
El Médano 021	H6	3	210	9.07	1.00	14.59	34.07	5.17E-05	
El Médano 025	H6	3	621	13.86	0.49	7.15	38.20	7.52E-05	8.13E-05
El Médano 027	H5	3	612	13.19	0.30	5.64	34.80	6.10E-05	8.51E-05
El Médano 030	H6	3	90	13.07	0.26	3.77	35.93	6.62E-05	
El Médano 032	H6	2	449	6.85	0.38	9.03	40.23	5.25E-05	
El Médano 033	H5	4	335	4.43	0.54	14.22	32.61	2.78E-05	
El Médano 036	H5	3	212	6.14	0.76	12.04	24.89	4.56E-05	
El Médano 049	H4	3	398	7.93	0.48	11.36	37.70	3.70E-05	6.46E-05
El Médano 055	H6	2	540	16.27	0.49	5.76	46.30	1.05E-04	1.51E-04
El Médano 071	H5	2	529	28.30	0.51	3.39	36.20	1.58E-04	1.55E-04
El Médano 079	H5	2	450	20.30	0.88	10.88	46.70	8.88E-05	1.35E-04
El Médano 086	H4	1	517	29.49	0.25	1.54	33.90	1.76E-04	1.32E-04
El Médano 092	H6	3	466	9.40	0.68	12.81	44.00	5.68E-05	6.92E-05
El Médano 099	H5	3	466	9.44	0.29	5.84	31.50	5.37E-05	5.37E-05
El Médano 111	H5	4	386	4.45	0.76	18.17	36.50	2.36E-05	2.45E-05
El Médano 115	H5	1	575	34.59	0.19	1.26	24.90	1.63E-04	1.51E-04
El Médano 118	H5	3	452	18.94	0.26	2.70	40.50	1.38E-04	9.77E-05
El Médano 126	H5	3	493	7.52	0.44	10.14	38.90	3.80E-05	7.41E-05
El Médano 172	H5	2	414	18.53	0.25	2.62	30.70	1.05E-04	1.58E-04
El Médano 191	H5	2	530	20.49	0.49	5.66	40.70	9.72E-05	1.12E-04
El Médano 199	H6	1	547	28.79	0.37	2.50	37.50	1.63E-04	1.55E-04
El Médano 231	H4	2	278	27.18	0.34	2.58	141.20	1.93E-04	2.00E-04
El Médano 236	H5	1	494	17.97	0.55	6.59	34.60	8.02E-05	1.55E-04
El Médano 245	H5-6	1	476	27.62	0.29	2.31	105.90	1.34E-04	1.91E-04
El Médano 257	H3	2	540	12.15	0.42	9.32	60.00	4.67E-05	4.90E-05
El Médano 261	H3	2	449	20.91	0.15	2.03	41.40	1.01E-04	8.71E-05
El Médano 278	H5	2	468	9.44	0.24	8.69	78.70	3.78E-05	1.15E-04
El Médano 304	H5	1	438	29.02	0.30	1.93	41.70	1.71E-04	1.86E-04
El Médano 309	H5	3	422	20.81	0.22	2.00	28.90	1.39E-04	8.71E-05
San Juan 011	H4	2	210	16.84	0.31	4.01	33.08	8.41E-05	

Table (continued)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
San Juan 003	H5	2	188	21.17	0.21	2.10	54.83	1.21E-04	
San Juan 012	H5	2	74	12.66	0.75	7.95	20.33	8.62E-05	
San Juan 020	H5	3	175	14.63	0.59	5.35	18.72	8.99E-05	
San Juan 025	H5	2	193	7.20	0.47	11.43	34.07	4.66E-05	
Sierra Gorda 007*	H5	3	935	19.36	0.42	3.89	25.90		8.91E-05
Sierra Gorda 026*	H4	2	134	26.92	0.24	1.98	15.40		1.20E-04
Sierra Gorda 033*	H5	2	76	29.69	0.33	1.73	65.20		1.70E-04
Calama 003*	L5	2	740	9.68	0.17	3.60	266.40	6.07E-05	4.37E-05
Calama 273*	L6	1	139	6.36	0.15	5.06	106.00		2.04E-05
Caleta el Cobre 006	L6	3	463	3.70	0.14	6.82	35.60	1.97E-05	1.45E-05
Caleta el cobre 009	L4	1	234	6.43	0.13	3.80	36.04	4.57E-05	
Caleta el Cobre 010	L4	1	266	24.48	0.25	2.30	61.27	1.52E-04	
Caleta el Cobre 012	L4	1	238	15.30	0.55	6.77	39.70	7.97E-05	
Caleta el Cobre 015	L6	3	310	3.90	0.12	5.80	36.30	2.10E-05	2.19E-05
Catalina 445	L6	1	641	9.27	0.06	1.65	29.70	4.17E-05	3.98E-05
Catalina 475	L6	2	264	6.28	0.28	13.32	264.30	1.56E-05	2.40E-05
Catalina 479	L6	2	226	4.50	0.22	12.20	82.40		1.82E-05
Catalina 556	L6	2	412	4.70	0.14	6.34	39.40	2.73E-05	4.27E-05
Catalina 562	L6	2	765	9.73	0.09	2.02	27.00	4.07E-05	4.90E-05
Catalina 563	L6	2	494	10.63	0.06	1.37	24.20	5.48E-05	5.25E-05
Chug Chug 011*	L6	1	189	4.05	0.25	14.80	67.30		1.32E-05
Chug Chug 016*	L5	3	340	4.29	0.24	12.50	70.60	1.96E-05	2.00E-05
Chug Chug 066*	L6	2	426	11.50	0.30	4.84	30.20	8.30E-05	4.17E-05
Chug Chug 084*	L6	1	144	8.55	0.20	5.61	31.60		3.98E-05
El Médano 008	L6	3	134	5.65	0.18	8.62	55.00	2.24E-05	
El Médano 016	L6	4	104	1.66	0.14	11.16	25.50	9.31E-06	
El Médano 020	L6	3	187	5.97	0.21	9.83	43.63		1.91E-05
El Médano 021	L5	3	164	9.98	0.06	1.54	27.14	4.54E-05	
El Médano 023	L6	3	631	8.86	0.25	8.89	253.20	3.27E-05	2.34E-05
El Médano 026	L6	3	143	13.51	0.21	3.90	35.32	1.04E-04	
El Médano 029	L5	1	1357	15.45	0.05	0.78	21.87		7.94E-05
El Médano 037	L6	3	320	7.10	0.30	10.65	150.60	3.61E-05	3.47E-05
El Médano 042	L6	3	457	5.23	0.43	15.40	44.90	2.42E-05	2.24E-05
El Médano 070	L6	3	734	10.28	0.24	4.42	83.50	5.26E-05	3.72E-05
El Médano 075	L4	3	1023	9.25	0.24	5.59	120.80	3.85E-05	3.55E-05
El Médano 078	L6	3	312	6.76	0.14	4.86	40.30	3.17E-05	2.95E-05
El Médano 089	L6	4	449	5.96	0.23	7.18	53.90		1.78E-05
El Médano 097	L5-6	3	633	5.53	0.18	6.61	47.40	3.06E-05	2.09E-05
El Médano 098	L6	4	516	5.34	0.09	3.37	42.50	3.55E-05	1.51E-05

End of Table

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
El Médano 113	L6	3	393	5.45	0.21	10.82	232.90	2.19E-05	1.48E-05
El Médano 128	L6	2	474	5.46	0.30	10.27	45.70	2.62E-05	3.55E-05
El Médano 129	L6	2	436	7.41	0.16	5.46	42.60	3.09E-05	3.02E-05
El Médano 135	L6	3	467	6.26	0.37	13.62	47.60	3.35E-05	3.02E-05
El Médano 170	L4	2	556	10.27	0.13	2.40	48.90	3.71E-05	6.31E-05
El Médano 173	L6	2	570	9.77	0.31	7.50	42.90	4.86E-05	4.07E-05
El Médano 253	L6	2	539	9.48	0.10	2.71	34.50		4.47E-05
El Médano 263	L6	3	439	5.12	0.18	8.92	55.80	2.09E-05	2.29E-05
El Médano 276	L6	3	600	6.04	0.33	10.78	43.90	3.35E-05	3.09E-05
El Médano 286	L6	3	536	2.69	0.10	10.49	122.70	9.93E-06	1.82E-05
Sierra Gorda 042*	L6	1	232	10.95	0.12	2.87	30.50		5.01E-05
Sierra Gorda 047*	L5	1	429	7.99	0.24	6.25	43.90	4.62E-05	3.98E-05
Sierra Gorda 088*	L5	1	159	2.94	0.04	3.32	31.20		4.37E-05
Sierra Gorda 090*	L5	2	500	4.51	0.25	13.70	120.80	1.77E-05	2.63E-05
Tamdakht	H5	0	784	30,61	0,24	1.58	74.8		2.00 E-04
Sueilila 004	L6	0	975	10.26	0,54	13,75	399		7.41 E-05

The degree of weathering in ordinary chondrites is traditionally expressed using a scale of weathering grades (from W0 to W6) [20]. The grades are determined in polished meteorite sections from the percentage of oxidized metal and troilite. W1, W2, W3, and W4 correspond to the oxidation of up to 20, 20–60, 60–95, and 95–100 %, respectively. W0 indicates no visible oxidation, but such meteorites are not present in the studied meteorite collection. Similarly, no meteorites with the weathering grades W5 and W6 (weathering of silicates) were found. The weathering grades of the analyzed meteorites are provided in line with the Meteoritical Bulletin Database (<https://www.lpi.usra.edu/meteor/>) and listed in Table.

3. Discussion

The results presented above were used to quantify the effect of weathering on the magnetic properties of ordinary chondrites. Figs. 3 and 4 show the magnetic parameters M_s , χ , M_{rs}/M_s , and B_{cr}/B_c as a function of the weathering grades in H and L chondrites.

In H chondrites, an increase in the weathering degree is accompanied with a clear decrease of M_s (Fig. 2, *a*). This decrease can be compared to a theoretical trend based on the percentages of oxidized metal in the meteorite, as defined by Wlotzka's weathering scale [20], and assuming that weathered Fe–Ni metal transforms only into paramagnetic minerals (such as akaganeite) or ferromagnetic minerals like goethite that do not add much to magnetism compared to kamacite ($M_s = 224 \text{ A} \times \text{m}^2/\text{kg}$), the main magnetic mineral of both H and L chondrites (89 and 83 % of the total M_s , respectively) [10]. The M_s and χ values of W0 chondrites were retrieved from Gattacceca et al. [10] and Rochette et al. [9], respectively. The observed decrease is broadly consistent with the theoretical trend (Fig. 2, *a*), which suggests that magnetite or maghemite are present only in minor amounts during weathering. In fact, the formation of magnetite ($M_s = 92 \text{ A} \times \text{m}^2/\text{kg}$) or maghemite ($M_s = 75 \text{ A} \times \text{m}^2/\text{kg}$) would move the M_s values above the theoretical trend. This is in good agreement with other studies using Mössbauer spectroscopy and showing that akaganeite

(weakly magnetic phase) is the main mineral formed in the early stages of meteorite weathering [21, 22]. Specifically, M_s is slightly below the theoretical trend for W1, which can be interpreted as a fast initial weathering of Fe–Ni metal compared to troilite. Earlier experiments with ordinary chondrites have also shown that Fe–Ni metal tends to weather faster than troilite [23]. In the later stages of weathering, M_s is either at the upper limit of the theoretical value (W3) or slightly above the theoretical trend (W4). This suggests that magnetite and/or maghemite are formed in small amounts during the advanced stages of weathering and has been confirmed by Mössbauer spectroscopy [21]. The above observations and conclusions apply to the changes in magnetic susceptibility of the large meteorite samples with an increase in weathering intensity: overall fit with the theoretical values for transformation of kamacite into non- or weakly magnetic species, fast initial weathering of metal compared to troilite, and formation of magnetite starting from W3 (Fig. 2, b). The same trends are also reflected in the magnetic susceptibility measurements of the small meteorite samples (Fig. 2, c).

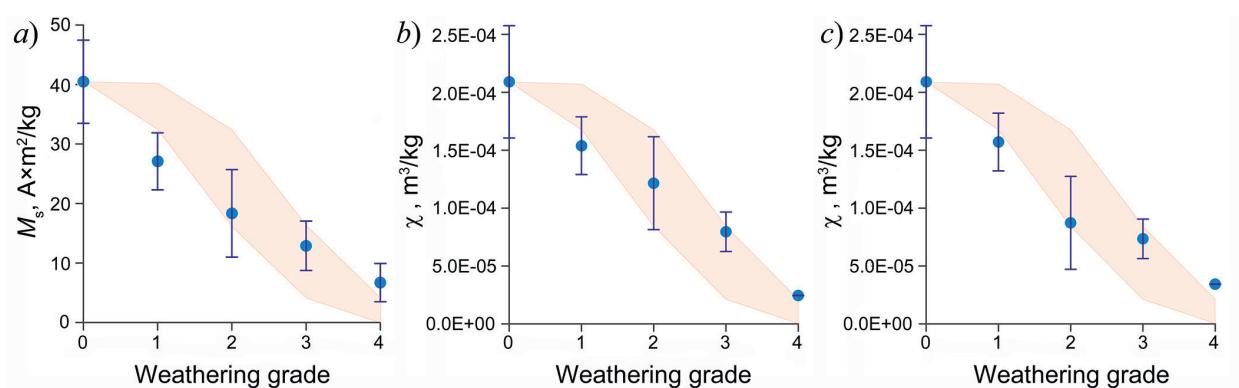


Fig. 2. Magnetic properties of the H chondrites: (a) M_s vs. weathering grade. Shaded areas indicate the theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals; (b) Magnetic susceptibility of the large samples vs. weathering grade. Shaded area indicates the theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals; (c) Magnetic susceptibility of the small samples vs. weathering grade. Shaded area indicates the theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals

Variations were also revealed in the hysteresis parameters, which are not directly linked to the amount of magnetic minerals and rather depend on their nature. The ratios of M_{rs}/M_s and B_{cr}/B_c that are commonly used to investigate the nature of ferromagnetic minerals changed in a consistent way as the meteorite weathered, with an increase of M_{rs}/M_s and a decrease of B_{cr}/B_c (Fig. 3). A similar trend was observed by Uehara et al. using a more limited dataset [12] and can be attributed to the formation of fine-grained goethite and/or magnetite driven by the weathering-induced transformation of Fe–Ni minerals.

The exact same trends hold for L chondrites: M_s and magnetic susceptibility decrease with weathering grade as paramagnetic minerals begin to form, M_{rs}/M_s increases with weathering grade, and B_{cr}/B_c decreases with weathering grade (Figs. 4 and 5).

The magnetic trends in L chondrites are not as strong as in H chondrites because kamacite contributes less to the total M_s in L chondrites (83 %) than in H chondrites (89 %, [10]), and the weathering rate of Ni-rich taenite and tetrataenite is notably slower than that of Ni-poor kamacite. Fig. 5 shows that in L chondrites, just like in H chondrites, the metal begins to weather faster than troilite, and magnetite and/or maghemite formation occurs when the weathering process reaches grade W3.

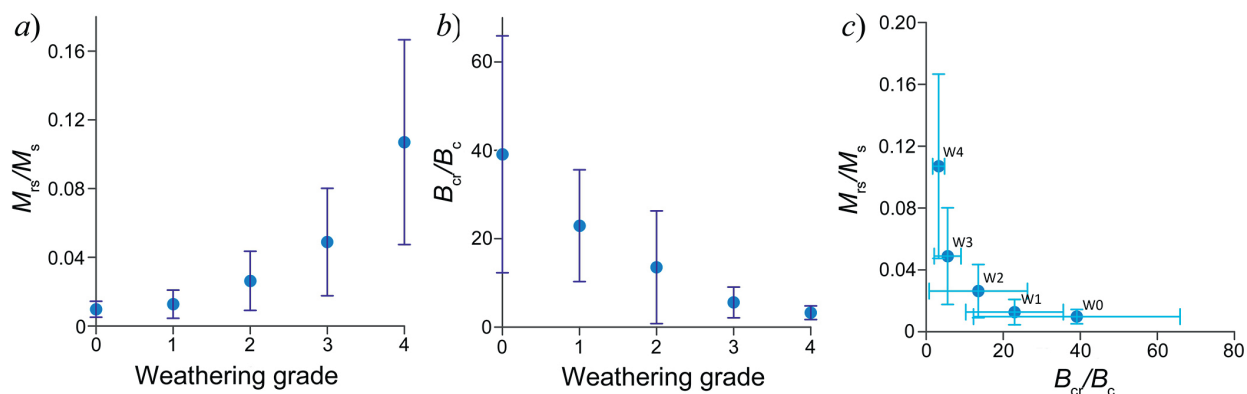


Fig. 3. Hysteresis parameters of the H chondrites: (a) M_{rs}/M_s vs. weathering grade; (b) B_{cr}/B_c vs. weathering grade; (c) M_{rs}/M_s vs. B_{cr}/B_c

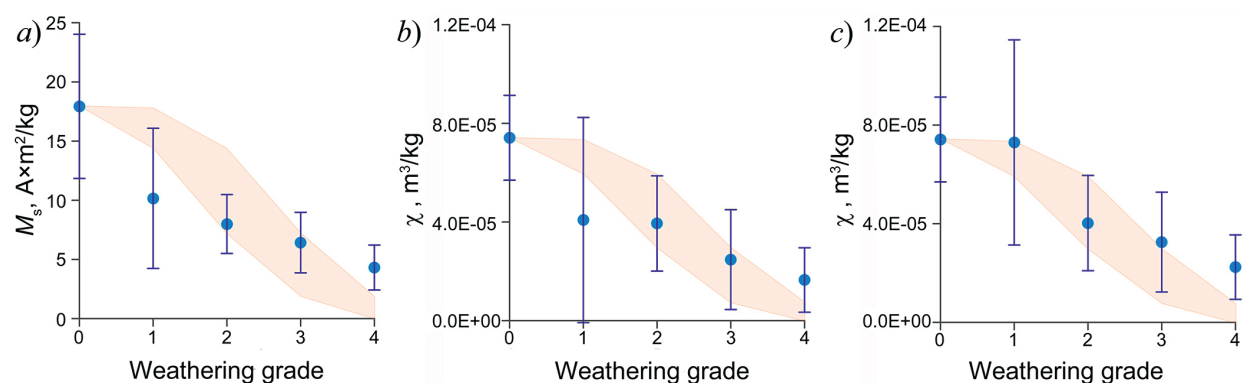


Fig. 4. Magnetic properties of the L chondrites: (a) M_s vs. weathering grade. Shaded area indicates the theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals; (b) Susceptibility of the large samples vs. weathering grade. Shaded area indicates the theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals; (c) Susceptibility of the small samples vs. weathering grade. Shaded area indicates theoretical range if all metal is replaced by paramagnetic minerals

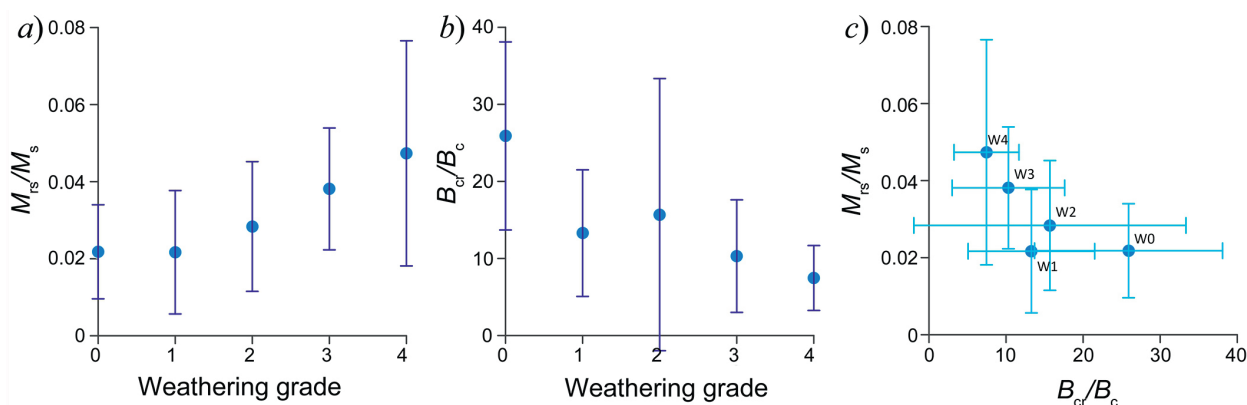


Fig. 5. Hysteresis parameters of the L chondrites: (a) M_{rs}/M_s vs. weathering grade; (b) B_{cr}/B_c vs. weathering grade; (c) M_{rs}/M_s vs. B_{cr}/B_c

Conclusions

Under the effect of terrestrial weathering, the magnetic properties of all H and L ordinary chondrites from this study changed in a predictable way. The saturation magnetization and magnetic susceptibility decreased with an increase of weathering intensity. In the initial

stages of weathering, Fe–Ni metal broke down faster than troilite and transformed into mostly paramagnetic iron oxyhydroxides, mainly akaganeite, as indicated by earlier studies using Mössbauer spectroscopy. During the later stages of weathering, small amounts of ferromagnetic minerals with relatively high M_s (magnetite and/or maghemite) were formed, which also aligns with Mössbauer spectroscopy data.

Similarly to magnetic susceptibility, the hysteresis properties of the relatively small H and L ordinary chondrite samples (average mass 435 mg in this study) turned out to be very sensitive proxies to the degree of terrestrial weathering of these meteorites. This is especially true for certain magnetic parameters (M_{rs}/M_s and B_{cr}/B_c) that depend on the mineralogy of magnetic minerals rather than on their concentration. Even at low weathering grades, these parameters changed significantly. Thus, any paleomagnetic study on these meteorites should preferentially focus on meteorites with no signs of weathering, i.e., on fresh meteorite falls.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Weisberg M.K., McCoy T.J., Krot A.N. Systematics and evaluation of meteorite classification. In: Lauretta D.S., McSween H.Y. (Eds.) *Meteorites and the Early Solar System II*. Space Science Ser. Tucson, AZ, Univ. of Arizona Press, 2006, pp. 19–52. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1v7zdmm.8>.
2. Gooding J.L. Weathering of stony meteorites in Antarctica. *Proc. Int. Workshop Antarct. Meteorites*. LPI Tech. Rep. 86–01. Annexstad J.O., Schultz L., Wänke H. (Eds.). Houston, TX, Lunar Planet. Inst., 1986, pp. 48–54.
3. Bland P.A., Zolensky M.E., Benedix G.K., Sephton M.A. Weathering of chondritic meteorites. In: Lauretta D.S., McSween H.Y. (Eds.) *Meteorites and the Early Solar System II*. Space Science Ser. Tucson, AZ, Univ. of Arizona Press, 2006, pp. 853–867. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1v7zdmm.45>.
4. Al-Kathiri A., Hofmann B.A., Jull A.J.T., Gnoss E. Weathering of meteorites from Oman: Correlation of chemical and mineralogical weathering proxies with ^{14}C terrestrial ages and the influence of soil chemistry. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2005, vol. 40, no. 8, pp. 1215–1239. <https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2005.tb00185.x>.
5. Pourkhorsandi H., Debaille V., Armytage R.M.G., van Ginneken M., Rochette P., Gattacceca J. The effects of terrestrial weathering on samarium-neodymium isotopic composition of ordinary chondrites. *Chem. Geol.*, 2021, vol. 562, art. 120056. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.120056>.
6. Pinto G.A., Tavernier A., Gattacceca J., Corgne A., Valenzuela M., Luais B., Flores L., Olivares F., Marrocchi Y. Dense collection areas and terrestrial alteration of meteorites in the Atacama Desert. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2024, vol. 59, no. 2, pp. 351–367. <https://doi.org/10.1111/maps.14125>.
7. Drouard A., Gattacceca J., Hutzler A., Rochette P., Braucher R., Bourlès D., ASTER Team, Gounelle M., Morbidelli A., Debaille V., Van Ginneken M., Valenzuela M., Quesnel Y., Martinez R. The meteorite flux of the past 2 m.y. recorded in the Atacama Desert. *Geology*, 2019, vol. 47, no. 7, pp. 673–676. <https://doi.org/10.1130/G45831.1>.
8. Sadaka C., Jr., Gattacceca J., Dumas F., Kuzina D., Braucher R., Gounelle M. Constraining the meteorite flux on Earth during the last 2 Ma. *Goldschmidt 2023 Abstr.*, 2023. <https://doi.org/10.7185/gold2023.19263>.
9. Rochette P., Sagnotti L., Bourot-Denise M., Consolmagno G., Folco L., Gattacceca J., Osete M.L., Pesonen L. Magnetic classification of stony meteorites: 1. Ordinary chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2003, vol. 38, no. 2, pp. 251–268. <https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2003.tb00263.x>.

10. Gattacceca J., Suavet C., Rochette P., Weiss B.P., Winklhofer M., Uehara M., Friedrich J.M. Metal phases in ordinary chondrites: Magnetic hysteresis properties and implications for thermal history. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2014, vol. 49, no. 4, pp. 652–676. <https://doi.org/10.1111/maps.12268>.
11. Folco L., Rochette P., Gattacceca J., Perchiazzi N. In situ identification, pairing and classification of meteorites from Antarctica through magnetic susceptibility measurements. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2006, vol. 41, no. 3, pp. 343–353. <https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2006.tb00467.x>.
12. Uehara M., Gattacceca J., Rochette P., Demory F., Valenzuela E.M. Magnetic study of meteorites recovered in the Atacama desert (Chile): Implications for meteorite paleomagnetism and the stability of hot desert surfaces. *Phys. Earth Planet. Inter.*, 2012, vols. 200–201, pp. 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.pepi.2012.04.007>.
13. Hutzler A., Gattacceca J., Rochette P., Braucher R., Carro B., Christensen E.J., Cournede C., Gounelle M., Ouazaa N. L., Martinez R., Valenzuela M., Warner M., Bourles D. Description of a very dense meteorite collection area in western Atacama: Insight into the long-term composition of the meteorite flux to Earth. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2016, vol. 51, no. 3, pp. 468–482. <https://doi.org/10.1111/maps.12607>.
14. Gattacceca J., Valenzuela M., Uehara M., Jull A.J.T., Giscard M., Rochette P., Braucher R., Suavet C., Gounelle M., Morata D., Munayco P., Bourot-Denise M., Bourles D., Demory F. The densest meteorite collection area in hot deserts: The San Juan meteorite field (Atacama Desert, Chile). *Meteorit. Planet. Sci.*, 2011, vol. 46, no. 9, pp. 1276–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2011.01229.x>.
15. Буров В.В., Нургалиев Д.К., Ясенов П.Г. *Paleomagnitnyi analiz* [Paleomagnetic Analysis]. Kazan, Izd. Kazan. Univ., 1986. 167 p. (In Russian)
16. Нургалиев Д.К., Ясенов П.Г. Coercivity spectrometer. Utility Model Patent RF no. 81805. *FIPS Byull.*, 2009, no. 9. (In Russian)
17. Fabian K. Approach to saturation analysis of hysteresis measurements in rock magnetism and evidence for stress dominated magnetic anisotropy in young mid-ocean ridge basalt. *Phys. Earth Planet. Inter.*, 2006, vol. 154, nos. 3–4, pp. 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.pepi.2005.06.016>.
18. Gattacceca J., Eisenlohr P., Rochette P. Calibration of *in situ* magnetic susceptibility measurements. *Geophys. J. Int.*, 2004, vol. 158, no. 1, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.2004.02297.x>.
19. Gattacceca J., Rochette P., Denise M., Consolmagno G., Folco L. An impact origin for the foliation of chondrites. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2005, vol. 234, nos. 3–4, pp. 351–368. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2005.03.002>.
20. Wlotzka F. A weathering scale for the ordinary chondrites. *Meteoritics*, 1993, vol. 28, no. 3, p. 460.
21. Bland P.A., Smith T.B., Jull A.J.T., Berry F.J., Bevan A.W.R., Cloudt S., Pillinger C.T. The flux of meteorites to the Earth over the last 50 000 years. *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, 1996, vol. 283, no. 2, pp. 551–565. <https://doi.org/10.1093/mnras/283.2.551>.
22. Munayco P., Munayco J., de Avellez R.R., Valenzuela M., Rochette P., Gattacceca J., Scorzelli R.B. Weathering of ordinary chondrites from the Atacama Desert, Chile, by Mössbauer spectroscopy and synchrotron radiation X-ray diffraction. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2013, vol. 48, no. 3, pp. 457–473. <https://doi.org/10.1111/maps.12067>.
23. Van Ginneken M., Debaille V., Decrée S., Goderis S., Woodland A.B., Wozniakiewicz P., De Ceukelaire M., Leduc T., Claeys P. Artificial weathering of an ordinary chondrite: Recommendations for the curation of Antarctic meteorites. *Meteorit. Planet. Sci.*, 2022, vol. 57, no. 6, pp. 1247–1266. <https://doi.org/10.1111/maps.13818>.

Author Information

Dilyara Kuzina, Cand. Sci. (Geology and Mineralogy), Senior Researcher, Laboratory of Paleoclimatology, Paleoeology, Paleomagnetism, Institute of Geology and Petroleum Technologies, Kazan Federal University

E-mail: di.kuzina@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1626-4636>

Jérôme Gattacceca, PhD, Senior Researcher, CEREGE – Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE

E-mail: gattacceca@cerege.fr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1639-7140>

Hugo Gouilloux, Master's Student, CEREGE – Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE

E-mail: hugo.gouilloux@etu.univ-amu.fr

Hugo Mertens, Master's Student, CEREGE – Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE

E-mail: hugo.mertens@etu.univ-amu.fr

Romain Lacube, Master's Student, CEREGE – Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE

E-mail: lacube.romain@etu.univ-amu.fr

Francois Demory, PhD, Research Engineer, CEREGE – Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement, CNRS, Aix-Marseille University, IRD, INRAE

E-mail: demory@cerege.fr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7526-9886>

Cyril Lorenz, Cand. Sci. (Geology and Mineralogy), Senior Researcher, Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences

E-mail: c-lorenz@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-3287>

Информация об авторах

Диляра Кузина, кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник НИИ палеоклиматологии, палеоэкологии, палеомагнетизма Института геологии и нефтегазовых технологий Казанского (Приволжского) федерального университета

E-mail: di.kuzina@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1626-4636>

Жером Гаттачека, PhD, старший научный сотрудник, Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук (CEREGE) Национального центра научных исследований (CNRS), Университет Экс-Марсель, Научно-исследовательский институт развития (IRD), Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований (INRAE)

E-mail: gattacceca@cerege.fr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1639-7140>

Уго Гуйе, магистрант, Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук (CEREGE) Национального центра научных исследований (CNRS), Университет Экс-Марсель, Научно-исследовательский институт развития (IRD), Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований (INRAE)

E-mail: hugo.gouilloux@etu.univ-amu.fr

Уго Мертенс, магистрант, Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук (CEREGE) Национального центра научных исследований (CNRS), Университет Экс-Марсель, Научно-исследовательский институт развития (IRD), Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований (INRAE)

E-mail: hugo.mertens@etu.univ-amu.fr

Ромен Лакюб, магистрант, Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук (CEREGE) Национального центра научных исследований (CNRS), Университет Экс-Марсель, Научно-исследовательский институт развития (IRD), Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований (INRAE)

E-mail: lacube.romain@etu.univ-amu.fr

Франсуа Демори, PhD, инженер-исследователь, Европейский центр исследований и преподавания в области геоэкологических наук (CEREGE) Национального центра научных исследований (CNRS), Университет Экс-Марсель, Научно-исследовательский институт развития (IRD), Национальный институт сельскохозяйственных и природоохранных исследований (INRAE)

E-mail: demory@cerege.fr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7526-9886>

Кирилл Лоренц, кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник, Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук

E-mail: c-lorenz@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-3287>

Received November 29, 2024

Accepted January 9, 2025

Поступила в редакцию 29.11.2024

Принята к публикации 09.01.2025