

УДК 577.344

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ФОТОДЕСТРУКЦИИ БИСРЕТИНОИДОВ ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ ИЗ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА

© 2024 г. М. А. Яковлева^{1*}, А. А. Васин², А. Е. Донцов¹, А. А. Гулин², А. В. Айбуш², А. А. Астафьев², А. М. Шахов², Т. Б. Фельдман^{1,3}, М. А. Островский^{1,3}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

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

Российской академии наук, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: lina.invers@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

В данной работе проведены исследования механизмов образования продуктов окисления бисретиноидов липофусциновых гранул, выделенных из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека. Описаны физико-химические характеристики продуктов фотоокисления бисретиноидов. Для исследования были использованы методы ИК-спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии, сканирующей конфокальной микроскопии, методы времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подробно охарактеризованы свойства продуктов фотоокисления и деградации флуорофоров липофусциновых гранул, в том числе и синтетического *N*-ретинолиден-*N*-ретинолэтаноламина (A2E). Показано, что продукты окислительной деградации липофусциновых гранул аналогичны продуктам фотоокисления основного бисретиноида липофусциновых гранул — A2E. Данные важны как для понимания механизмов образования цитотоксичных продуктов в липофусциновых гранулах, так и установления их химической природы.

Ключевые слова: бисретиноиды, окислительная деградация, флуорофоры, липофусциновые гранулы, ретинальный пигментный эпителий.

DOI: 10.31857/S0207401X24110114

1. ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является ведущей причиной потери зрения в развитых странах и занимает третье место среди причин потери зрения во второй половине жизни после глаукомы и диабетической ретинопатии. От потери центрального зрения страдает более 30% населения старше 75 лет. Терминальная стадия ВМД (слепота) встречается у 1.7% всего населения старше 50 лет и около 18% лиц старше 85 лет [1–3].

Развитие ВМД сопровождается патологическими изменениями в тканях глаза [4], особенно в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и в конечном счете — гибелью фоторецепторных клеток сетчатки. В настоящее время заболевание считается практически неизлечимым, поэтому важной задачей является как можно бо-

лее раннее выявление ВМД с целью принятия своевременных защитно-профилактических мер, позволяющих замедлить развитие этой тяжелой глазной патологии и сохранить хорошее качество жизни пациента на долгие годы.

Существует предположение, что основным триггером развития ВМД является окислительный стресс различной природы [5], который может вызываться синей составляющей солнечного света [6], однако до сих пор механизмы, приводящие к возникновению этой патологии, до конца не изучены. В механизмах старения и дегенерации сетчатки и РПЭ важнейшая роль принадлежит так называемому “пигменту старости” — липофусциновым гранулам (ЛГ), образующимся в клетках РПЭ в результате неполной лизосомальной деградации обломков фоторецепторов [7, 8].

При поглощении видимого света ЛГ способны генерировать активные формы кислорода (АФК), что определяет их фототоксичность [9]. Бисретиноиды (Бис-рет), входящие в состав ЛГ, являются основным источником проявления фототоксичных свойств этим “пигментом старости”. Наиболее изученным Бис-рет ЛГ является *N*-ретинилден-*N*-ретинилэтаноламин (A2E) [10, 11]. При поглощении света в присутствии кислорода бисретиноиды и сами могут окисляться [12–15].

Недавно нами было показано, что при ВМД наблюдается повышенное содержание окисленных форм бисретиноидов (окси-Бис-рет) по сравнению с нормой [16]. Мы предположили, что повышенное содержание окси-Бис-рет может быть биологическим маркером развития патологии даже в отсутствие клинической картины. Однако следует отметить, окисленные формы бисретиноидов изучены недостаточно. Поэтому для лучшего понимания механизмов развития ВМД, а также использования этих знаний для диагностики, требуется детальное рассмотрение физико-химических характеристик этих соединений.

На основе флуоресцентных свойств Бис-рет и окси-Бис-рет в ЛГ разработан и широко внедрен в офтальмологическую практику неинвазивный диагностический метод аутофлуоресценции (АФ) глазного дна. Он позволяет оценить состояние сетчатки и клеток РПЭ у пациентов, избрать тактику лечения и сделать прогноз в отношении развития нейродегенеративного заболевания [17]. В настоящее время предпринимаются попытки усовершенствования метода АФ глазного дна. Перспективной является разработка метода детектирования времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) [18]). В экспериментах *in vivo* было показано, что результаты микроскопии методом FLIM для “нормы” и в случае ВМД различаются [19]. Следует отметить, что до сих пор неизвестно, в результате чего возникает разница в характерных временах жизни флуоресценции для “нормы” и патологии. Возможно, причиной возникновения такой разницы в значениях является обнаруженный нами тот факт того, что при ВМД содержание окси-Бис-рет ЛГ в клетках РПЭ выше по сравнению с нормой [14, 16].

Таким образом, целью данной работы было изучение физико-химических характеристик Бис-рет и окси-Бис-рет, содержащихся в ЛГ из клеток

РПЭ глаза. Исследования проводили с использованием методов ИК-спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии, сканирующей конфокальной микроскопии, времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В качестве объектов исследования использовали суспензию нативных необлученных ЛГ, а также суспензию ЛГ, заранее облученных видимым светом (фотоокисленную) как модель ВМД [14, 16].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использованы реактивы и растворители компаний “Sigma-Aldrich”, “Fluka” и “Компонент-реактив”.

Материал. Кадаверные глаза доноров без клинических признаков патологии сетчатки и РПЭ получены из Глазного тканевого банка МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Фёдорова Минздрава России на основании “Соглашения о научном сотрудничестве между ФГБУ МНТК “Микрохирургия глаза” им. академика С.Н. Фёдорова Минздрава России и Институтом биохимической физики им. Эмануэля РАН от 11 января 2011 года для проведения научных исследований в лаборатории физико-химических основ рецепции”. До начала эксперимента каждый глаз был тщательно осмотрен врачом-офтальмологом в целях выявления наличия или отсутствия клинических признаков патологии на глазном дне.

Получение липофусциновых гранул из клеток РПЭ и хлороформных экстрактов, содержащих бисретиноиды и их производные. Липофусциновые гранулы были выделены из РПЭ 100 кадаверных глаз без признаков патологии доноров разных возрастов (25–70 лет) с помощью метода градиентного центрифугирования по методике, описанной в работе [9], и суспендированы в растворе 0.1 М Калий-фосфатного буфера, pH = 7.3. Концентрацию гранул определяли по стандартной методике в камере Горяева; исходная концентрация гранул составляла $4 \cdot 10^9$ гранул/мл. Для проведения экспериментов суспензия ЛГ была разделена на две равные части: одну часть ЛГ использовали как контроль, вторую — облучали видимым светом (фотоокисление).

Образцы получали путем нанесения суспензии ЛГ на оптическое стекло из CaF_2 и последующего высушивания в атмосфере аргона. Облучение образцов проводили видимым светом (400–700 нм) светодиодной лампы LED 15W-4000K (поверхностная плотность потока световой энергии, падающей на образец, составляла 100 мВт/см²). Бис-рет и окси-Бис-рет ЛГ экстрагировали из клеток РПЭ по методу Фолча (Folch) смесью хлороформ–метанол (2 : 1) [20].

Синтез А2Е. Для использования основного бисретиноида ЛГ, А2Е, в качестве стандарта [21] был проведен его синтез и проверена чистота методом ВЭЖХ.

Измерение спектров флуоресценции. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (“Shimadzu”, Япония). 3D-анализ проводили на флуоресцентной установке FluoroMax (Horiba) с шагом длины волны возбуждения флуоресценции 2 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Хроматографическое разделение Бис-рет и окси-Бис-рет в хлороформных экстрактах из ЛГ было проведено на хроматографе фирмы “Knauer” (Германия) с колонкой “Диасфер 120-С18” (4 · 250 мм, размер сорбента — 5 мкм). Разделение проводилось путем линейного градиентного элюирования в системе: от 80% ацетонитрила +20% воды (+ 0.05% трифторуксусной кислоты) до 100% ацетонитрила за 20 мин; скорость потока — 1.5 мл/мин. Продукты хроматографического разделения были измерены при помощи фотометрического детектора К-2501 (“Knauer”, Германия).

Масс-спектрометрический анализ. Для идентификации продуктов окисления бисретиноидов ЛГ использовали времяпролетный масс-спектрометр вторичных ионов TOF.SIMS 5 (“ION-TOF”, Германия), оснащенный висмут-марганцевым излучателем первичных ионов и вспомогательными источниками ионов Cs^+ и O_2^- для ионного травления. Методом ионного травления ионами (энергия ионов цезия — 500 эВ исследовали распределение окси-Бис-рет по толщине ЛГ. Чтобы учесть снижение интенсивности ионов в связи с травлением, сигнал ионов окисленных бисретиноидов нормировали на сигнал иона (C_2H_5^+), который принимали за маркер общего сигнала органических ионов.

Для проведения статистического анализа образцы ЛГ, экстракты из ЛГ, и синтетический А2Е наносили на очищенное покровное стекло и высушивали на воздухе. Затем покровное стекло помещали во времяпролетный масс-спектрометр и держали под вакуумом в течение суток перед анализом. Для анализа с каждого образца (темного и облученного) накапливали по 12 масс-спектров. Чтобы нивелировать эффекты, связанные с анализом пустых зон, во всех масс-спектрах исключали зоны с высоким сигналом кремния.

Измерение времени жизни флуоресценции. Измерение времени жизни флуоресценции проводили с использованием оборудования ФИЦ ХФ РАН. Кинетику затухания флуоресценции исследуемых объектов регистрировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM 980 (Zeiss, Германия), перестраиваемых фемтосекундных лазеров для возбуждения флуоресценции (“Tsunami”, Spectra-Physics, USA; “Chameleon Discovery NX”, Coherent, USA), а также детекторов микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции — системы для коррелированного по времени счета фотонов (Becker & Hickl, Германия).

Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния). Сравнительный анализ содержания свободных альдегидов и кетонов в исследуемых образцах проводили в ФИЦ ХФ РАН с помощью микроспектрометра широкополосного когерентного антистоксова комбинационного рассеяния света (BCARS), входящего в состав фемтосекундного лазерного комплекса, реализующего двухимпульсную коллинеарную схему генерации CARS-сигнала.

Инфракрасная спектроскопия. Измерения проводили с помощью исследовательского ИК-фурье микроскопа LUMOS II (Bruker, Германия) (комплементарная методика BCARS). В отличие от метода BCARS, ИК-фурье-спектроскопия позволяет получить колебательные спектры в диапазоне от 600 до 3500 см⁻¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что при патологии ВМД наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции ЛГ в коротковолновой области ИК-спектра (в области 550 нм) при возбуждении флуоресценции длиной волны 488 нм [14, 16]. Аналогич-

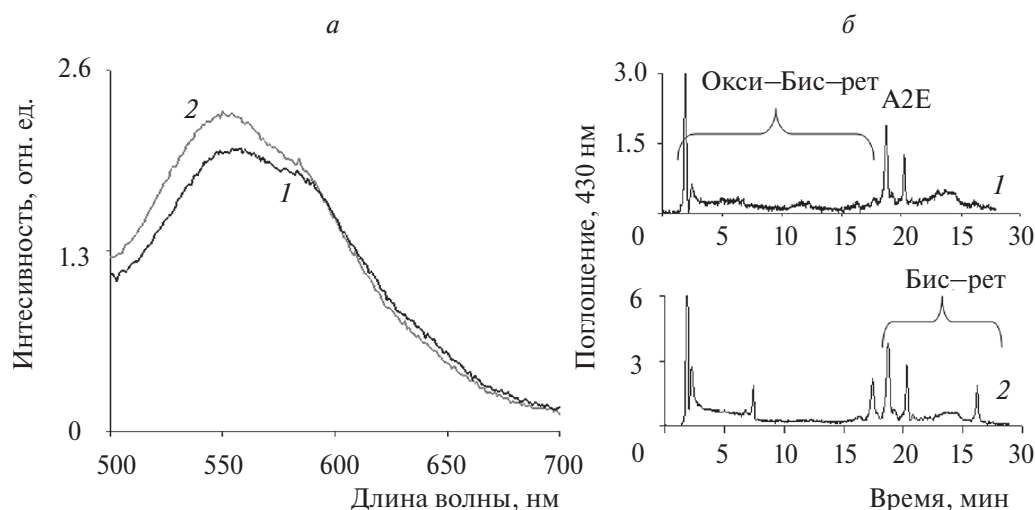


Рис. 1. *a* — Спектры флуоресценции хлороформных экстрактов из суспензий нативных липофусциновых гранул (1) и облученных видимым светом (2) с длиной волны 488 нм; *б* — хроматограммы хлороформного экстракта из суспензии ЛГ: 1 — необлученные ЛГ, 2 — ЛГ после облучения видимым светом. Детектирование — по поглощению на длине волны 430 нм.

ное изменение спектральных свойств ЛГ наблюдается и при их фотоокислении. Анализ ВЭЖХ подтвердил идентичность повышенного содержания окси-Бис-рет в обоих случаях. Таким образом, фотоокисленные ЛГ представляют собой удобную модель для изучения ВМД.

Процесс фотоокисления бисретиноидов ЛГ контролировали по спектрам флуоресценции и данным ВЭЖХ. Были зарегистрированы спектры флуоресценции хлороформных экстрактов из суспензий нативных ЛГ и облученных видимым светом (рис. 1*a*). Из этого рисунка видно, что в случае фотоокисленных ЛГ (рис. 1*a*, кривая 2) наблюдается повышенная интенсивность флуоресценции в области 550 нм по сравнению с необлученной суспензией ЛГ (рис. 1*a*, кривая 1). Хроматографический анализ образца из фотоокисленных ЛГ показывает увеличение содержания начальной группы пиков, относящихся к окси-Бис-рет (рис. 1*б*, кривая 2) по сравнению с образцом из неокисленных ЛГ (рис. 1*б*, кривая 1).

Флуоресцентный 3D-анализ. Для более подробного флуоресцентного анализа были получены 3D-спектры флуоресценции всех исследуемых образцов, а также синтетического A2E (рис. 2). На 3D-спектрах синтетического A2E (рис. 2*a* и *б*), суспензии ЛГ (рис. 2*в* и *г*) и хлороформных экстрактов ЛГ (рис. 2*д* и *е*) видно, что при фотоокислении всех образцов наблюдается сдвиг участков эмиссии флуоресценции в синюю область спектра. Для облученного синтетического A2E

(рис. 2*б*) выявлены два таких участка: возбуждение при 270 нм с эмиссией при 470 нм и возбуждение при 370 нм с эмиссией при 460 нм. Профиль флуоресценции показывает, что максимумы эмиссии находятся в области с длиной волны менее 500 нм. Скорее всего, это может быть связано с накоплением продуктов окисления A2E. Можно предположить, что при фотоокислении происходит разрушение исходной структуры сопряжения A2E и накопление продуктов окисления с более короткой структурой сопряжения. Аналогичная тенденция к изменению профилей флуоресценции в результате облучения наблюдается как для суспензии ЛГ (рис. 2*в* и *г*), так и хлороформного экстракта ЛГ (рис. 2*д* и *е*).

Следует отметить, что в ЛГ кроме A2E есть еще группа неокисленных бисретиноидов, различающихся по структуре между собой, но в целом близких по структуре к A2E. Поэтому на спектрах наблюдается небольшое отличие в положении максимумов флуоресценции синтетического A2E и суспензии ЛГ. У синтетического A2E максимум флуоресценции находится в более длинноволновой области, чем у суммарного спектра флуоресценции группы исходных бисретиноидов в суспензии ЛГ (A2E — 630 нм, ЛГ — 590 нм). Сравнительный анализ исследуемых образцов указывает на то, что в фотоокисленных ЛГ накапливаются продукты, аналогичные продуктам фотоокисления и фотодеградации синтетического бисретиноида A2E.

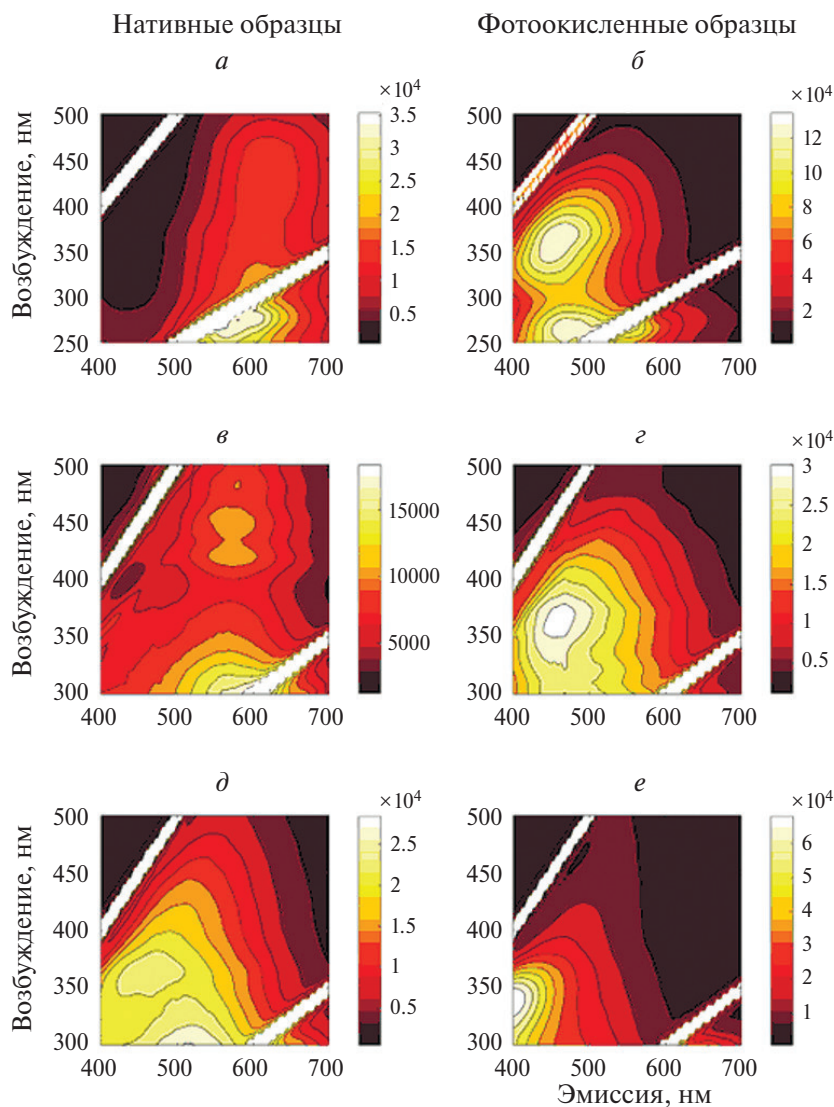


Рис. 2. 3D-спектры флуоресценции: *а* – профили флуоресценции А2Е; *б* – профили флуоресценции А2Е, облученного видимым светом; *в* – профили флуоресценции суспензии ЛГ; *г* – профили флуоресценции суспензии ЛГ, облученной видимым светом; *д* – профили флуоресценции хлороформного экстракта ЛГ; *е* – профили флуоресценции хлороформного экстракта ЛГ, облученного видимым светом.

Динамика гибели флуоресценции бисретиноидов и их окисленных форм. При помощи сканирующего конфокального микроскопа были зарегистрированы кинетические кривые и определены значения времени жизни флуоресценции (τ_1 , τ_2 , τ_3) исследуемых образцов (табл. 1). В результате анализа данных в рамках трехэкспоненциальной модели определены вклады окисленных и неокисленных бисретиноидов в общую интенсивность флуоресценции исследуемых образцов (A_1 , A_2 , A_3) и определена разница вкладами различных групп бисретиноидов.

Как уже было показано (рис. 1а), при облучении ЛГ видимым светом (430–570 нм) происходит увеличение интенсивности их флуоресценции

в более коротковолновой части спектра, из чего можно заключить, что в ЛГ растет содержание окисленных форм бисретиноидов. Как видно из табл. 1, при этом заметно увеличивается среднее значение времени жизни флуоресценции (T_m) – с 711 до 1011 пс. Кроме того, наблюдается увеличение вклада второй (A_2) и третьей (A_3) компонент, которые характеризуют в большей степени флуоресцентные свойства окисленных форм бисретиноидов. При этом вклад компоненты (A_1), которая характеризует флуоресцентные свойства неокисленных бисретиноидов, уменьшается.

В хлороформных экстрактах ЛГ (табл. 1) при фотоокислении наблюдается такая же динамика изменения времен жизни флуоресценции, как и в

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции и их вклад в общую флуоресценцию образцов до и после их фотоокисления

Образец	T_m , пс (среднее время)	τ_1 ,	τ_2 ,	τ_3 ,	A_1	A_2	A_3	$(A_2+A_3)/A_1$
Необлученные ЛГ	711.1	289.8	1367.5	4930.6	72.5	23.9	3.4	0.37
Облученные ЛГ	1010.9	398.8	1632.5	5092.8	63.2	32.2	4.5	0.58
Хлороформный экстракт из необлученных ЛГ	680.54	214.02	1194.35	4788.72	72.65	21.83	5.52	0.37
Хлороформный экстракт из облученных ЛГ	1583.00	328.47	2183.30	6706.91	56.24	33.97	9.79	0.78
Синтетический А2Е	99.35	80.97	591.01	2889.80	98.25	1.34	0.41	—

Примечание. Для суспензии ЛГ длина волны возбуждения флуоресценции 515 нм, детектирование эмиссии — при 580 нм; для хлороформного экстракта из ЛГ и синтетического А2Е длина волны возбуждения флуоресценции — 488 нм, детектирование — при 570 нм.

суспензии ЛГ. При этом увеличение среднего времени жизни флуоресценции (T_m) более выражено: после фотоокисления оно выросло в 2.5 раза. Следует отметить, что характерные времена жизни флуоресценции и среднее время для образца суспензии необлученных ЛГ и хлороформного экстракта из необлученных ЛГ очень близки. Это может свидетельствовать о том, что большая часть флуорофоров ЛГ переходит в экстракт.

Также была исследована кинетика гибели флуоресценции А2Е — основного бисретиноида ЛГ (табл. 1). Измерение кинетики гибели флуоресценции А2Е показало, что время жизни флуоресценции неокисленного А2Е составляет 80 пс. Небольшие компоненты с большими временами жизни, вероятно, связаны с присутствием окисленного А2Е в образце. Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что при увеличении содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов в составе ЛГ происходят изменения как характеристик спектра флуоресценции ЛГ (рис. 1а), так и параметров кинетических кривых затухания флуоресценции (табл. 1).

Сравнительный анализ спектров комбинационного рассеяния и ИК-спектров бисретиноидов и их окисленных форм. Были проведены сравнительные исследования методами комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопии по идентификации соединений, содержащих карбонильные группы, в образцах суспензии ЛГ, хлороформных экстрактах ЛГ и синтетического А2Е как до облучения, так и после него всех образцов видимым светом.

На спектрах комбинационного рассеяния хлороформных экстрактов видны явные отличия, возникающие в результате фотоокисления ЛГ

(рис. 3б). Наименьшим изменениям подверглись пики при 1347 и 1440 см^{-1} , которые, скорее всего, относятся к крутильным и ножничным колебаниям групп атомов CH_3 и CH_2 соответственно. Это подтверждает тот факт, что фотоокисление ЛГ никак не воздействует на насыщенные связи в экстрактах. Заметно смещение полос вблизи 1050 и 940 см^{-1} . Пики при 1050 см^{-1} в основном относятся к валентным колебаниям C—C связей. Смещение данных полос говорит о скелетных изменениях в молекулах, содержащихся в составе экстрактов. Кроме того, полоса при 1090 см^{-1} вероятно относится к колебаниям C—O связи первичного спирта. Виден рост интенсивности этой полосы в облученных образцах. Полоса при 1775 см^{-1} , относящаяся к карбонильному колебанию, заметно выше в образце, который был подвергнут фотоокислению. Увеличение сигнала при 1270 см^{-1} свидетельствует об увеличении количества эпоксидов в системе. Таким образом, в хлороформных экстрактах наблюдаются заметные изменения в скелетной структуре молекул, а также увеличение продуктов окисления — эпоксидов и карбониллов.

Анализ ИК-спектров хлороформных экстрактов до и после облучения также подтвердил наблюдаемые изменения (рис. 4б). С одной стороны, виден значительный рост интенсивности полосы при 1630 см^{-1} , которая связана с колебаниями C=O -связи. С другой стороны, в необлученных экстрактах наблюдается интенсивная полоса при 1376 см^{-1} , относящаяся к деформационному колебанию O—H -связи. По-видимому, изменения, происходящие в процессе окисления, сильно затрагивают спиртовые группы в составе хлороформных экстрактов. Были выявлены изменения в

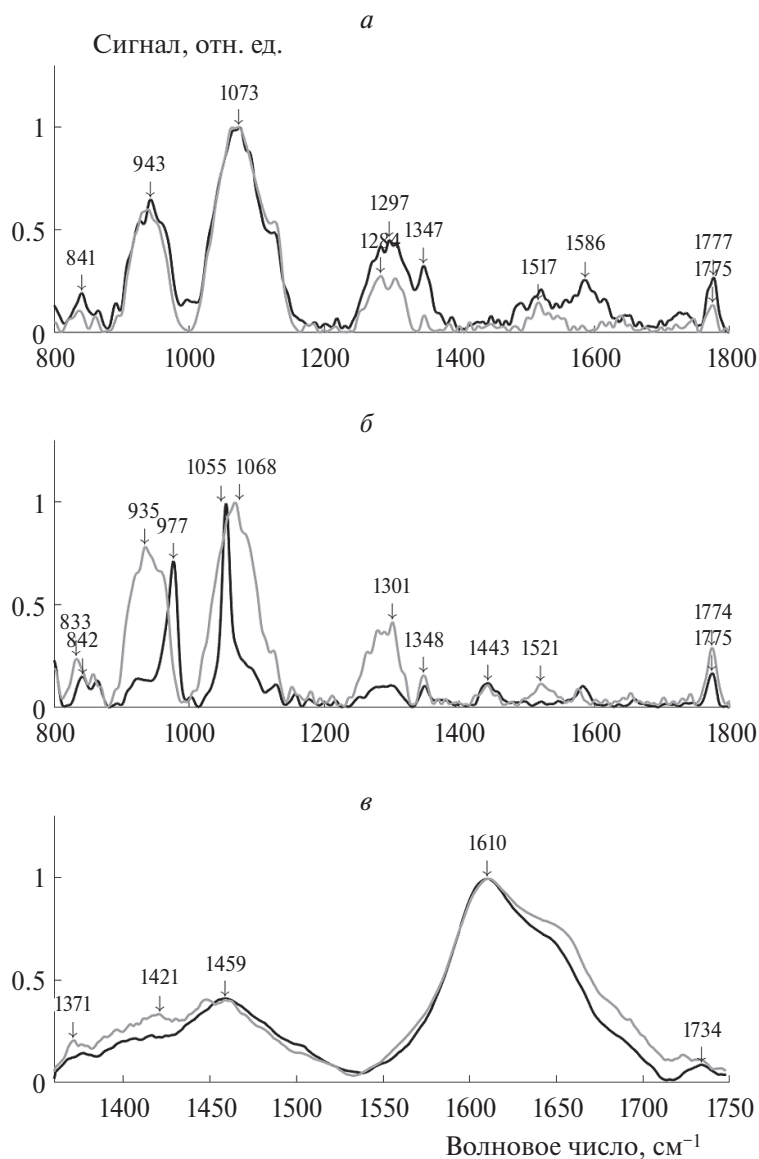


Рис. 3. Спектры комбинационного рассеяния образцов до (черный спектр) и после воздействия видимого света (серый спектр): *а* – суспензия липофусциновых гранул, *б* – хлороформные экстракты из ЛГ, *в* – синтетический А2Е.

области $1050\text{--}1100\text{ см}^{-1}$, которые, вероятно, связаны с колебаниями С–О–С-связей в эфирах.

В случае суспензии ЛГ изменения в ИК-спектрах были не столь значительными (рис. 4*а*) по сравнению с хлороформными экстрактами из ЛГ. Наблюдали увеличение интенсивности и смещение полосы при 1070 см^{-1} , а полоса при 1630 см^{-1} изменениям практически не подвергалась. Вероятно, менее выраженные изменения в ИК-спектрах ЛГ, по сравнению с экстрактами, связаны с тем, что наибольшее число продуктов окисления переходит в экстракт.

В спектрах комбинационного рассеяния суспензии ЛГ (рис. 3*а*) изменения были также менее

выраженными. Отмечено увеличение интенсивности плеча полосы при 1730 см^{-1} , связанного с появлением альдегидов в процессе облучения. Появлялись полосы вблизи 1240 см^{-1} , которые могут быть приписаны эпоксидным соединениям. В спектрах комбинационного рассеяния наблюдается нарастание колебания полос при 1065 и 1113 см^{-1} в процессе окисления ЛГ.

Сравнение спектров комбинационного рассеяния суспензии ЛГ и хлороформных экстрактов из ЛГ позволяет предположить, что в экстракт переходят соединения, вносящие наибольший вклад в полосы при 1350 и 1050 см^{-1} . Данные полосы могут быть отнесены как к липидам, так и к бисретиноидам. Таким образом, видно, что наи-

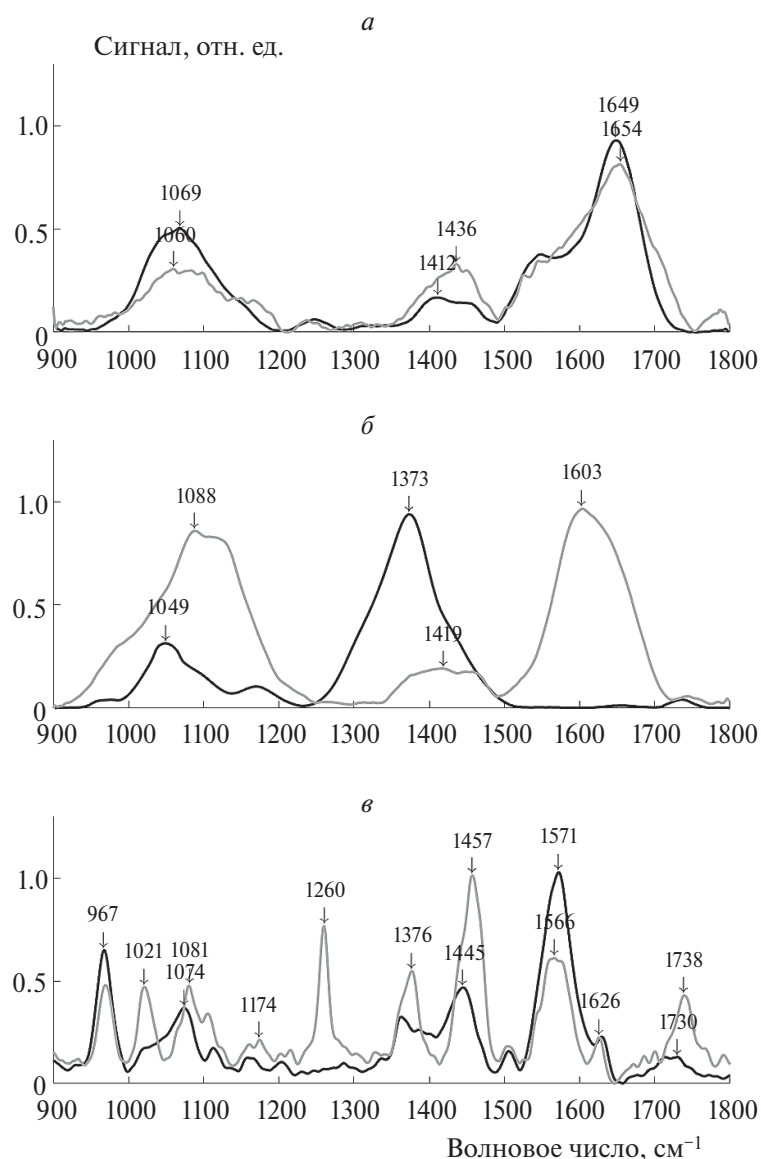


Рис. 4. ИК-спектры образцов до (черный спектр) и после воздействия видимого света (серый спектр): а – суспензия липофусциновых гранул, б – хлороформные экстракты из ЛГ, в – синтетический А2Е.

большим изменениям в процессе окисления подверглись бисретиноиды и липиды.

В спектре А2Е при окислении под воздействием света мы наблюдаем наиболее четкие изменения, так как в исходном образце было одно соединение, а в процессе окисления образовались соединения, представленные другими характерными полосами на ИК-спектрах и комбинационного рассеяния (рис. 4в, 3в), которых не было в исходном образце. На ИК-спектрах обнаружено увеличение интенсивности карбонильных полос (1750, 1450, 1350 cm^{-1}) в окисленных образцах (рис. 4в). Полосу при 1740 cm^{-1} можно отнести к валентным колебаниям карбонильной группы. Полосы вблизи 1375 и 1450 cm^{-1} , вероятно, являются деформационными

полосами соединений $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ соответственно. Полоса около 1625 cm^{-1} , вероятно, связана с наличием пиридинового кольца. Полоса при 1260 cm^{-1} принадлежит эпоксидной группе. Более широкая полоса при 1740 cm^{-1} для облученного образца указывает на присутствие ненасыщенного сопряженного альдегида вследствие окисления образца. Значительное увеличение интенсивности для ИК-диапазона при 1260 cm^{-1} после окисления образца может быть результатом накопления эпоксидов в процессе фотоокисления. Таким образом, было продемонстрировано образование как продуктов окисления эпоксидов и фураноидов А2Е, так и продуктов их дальнейшего разрушения – альдегидов и кетонов.

Таблица 2. Предполагаемые молекулярные формулы изменяющихся ионов в образцах ЛГ, хлороформных экстрактах из ЛГ и синтетическом А2Е при их фотоокислении

Образец	Значения m/z	Предполагаемые химические формулы ионов
Суспензия ЛГ	524.3	$C_{29}H_{40}N_4O_5^+$, $C_{28}H_{34}N_{11}^+$, $C_{14}H_{36}N_{16}O_6^+$
	385.3	$C_{25}H_{39}NO_2^+$, $C_{23}H_{37}N_4O^+$
	369.3	$C_{26}H_{27}NO^+$, $C_{22}H_{41}O_4^+$, $C_{25}H_{39}NO^+$, $C_{24}H_{37}N_2O^+$
	367.2	$C_{27}H_{27}O^+$, $C_{26}H_{25}NO^+$
	313.3	$C_{19}H_{39}NO_2^+$, $C_{23}H_{37}^+$, $C_{20}H_{41}O_2^+$
	226.1	$C_{15}H_{14}O_2^+$
Хлороформный экстракт из ЛГ	264.3	$C_{19}H_{36}^+$
	478.6	$C_{34}H_{70}^+$
	550.3	$C_{34}H_{46}O_6^+$, $C_{35}H_{42}N_4O_2^+$, $C_{37}H_{44}NO_3^+$, $C_{30}H_{42}N_6O_4^+$
Синтетический А2Е	281.1	$C_{17}H_{15}NO_3^+$, $C_{20}H_{13}N_2^+$, $C_{14}H_{17}O_6^+$, $C_{21}H_{13}O^+$
	282.1	$C_{13}H_{18}N_2O_5^+$, $C_{20}H_{14}N_2^+$, $C_{18}H_{18}O_3^+$, $C_{17}H_{16}NO_3^+$
	323.1	$C_{13}H_{23}O_9^+$, $C_{16}H_{21}NO_6^+$, $C_{11}H_{21}N_3O_8^+$, $C_{23}H_{17}NO^+$
	325.1	$C_{17}H_{15}N_3O_4^+$, $C_{19}H_{17}O_5^+$, $C_{22}H_{15}NO_2^+$, $C_{26}H_{13}^+$
	341.3	$C_{19}H_{41}N_4O^+$, $C_{21}H_{43}NO_2^+$, $C_{25}H_{41}^+$, $C_{20}H_{41}N_2O_2^+$
	399.1	$C_{28}H_{17}NO_2^+$, $C_{26}H_{15}N_4O^+$, $C_{18}H_{23}O_{10}^+$, $C_{25}H_{19}O_5^+$

Сравнительный анализ данных спектроскопии комбинационного рассеяния (рис. 3) и ИК-спектроскопии для ЛГ и А2Е (рис. 4) показал, что для суспензии ЛГ и А2Е наблюдаются схожие тенденции к увеличению сигнала карбонильных полос при 1750, 1450 и 1350 см^{-1} при фотоокислении образцов. Этот факт дает основание предполагать, что в ЛГ детектируются продукты фотоокисления, содержащие альдегиды в свободном состоянии, аналогичные продуктам фотоокисления А2Е.

Масс-спектрометрический анализ. Для анализа продуктов окисления бисретиноидов ЛГ был применен метод времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов. Проведен сравнительный масс-спектрометрический анализ необлученных и облученных видимым светом суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов ЛГ и синтетического А2Е (рис. 5).

Для выявления достоверности отличий в результатах анализа образцов ЛГ, до и после окисления был проведен статистический анализ методом главных компонент. Этот метод позволяет выявить пики, вносящие наибольший вклад в различие между масс-спектрами. Анализ проводили по наиболее интенсивным пикам в диапазоне 0–500 Да. Было установлено, что статистически образцы достоверно различались, следовательно, отличия в масс-спектрах между окисленными и нативными образцами статистически достоверны.

Из этого следует, что облучение светом приводит к значительным изменениям в химическом составе ЛГ. Из данных графика нагрузок (loadings) мы получили перечень масс ионов, которые определяли наибольшую вариацию данных (отвечали за отличия в масс-спектрах) для темновых и облученных образцов. На рис. 5 представлены данные масс-спектромерии — ионы, содержание которых нарастало во всех образцах при фотоокислении.

В табл. 2 приведены предполагаемые химические формулы этих соединений. Изменения сигнала данных соединений, может указывать на то, что они имеют схожую природу, либо являются разными фрагментами одного соединения.

Из рис. 5 видно, что в хлороформном экстракте из ЛГ есть ионы с массами (например, 367.2, 369.3), которые присутствовали и в самих ЛГ. Другими словами, эти соединения являются жирорастворимыми. На рис. 5б (хлороформный экстракт) приведена диаграмма сравнения интенсивностей некоторых ионов с относительно высокой молекулярной массой. Обнаружено значительное снижение интенсивностей для ионов 264.3, 478.6 и 550.3. В табл. 2 по точной массе предложены структуры данных ионов.

Исходя из этого можно сделать вывод, что многие соединения продуктов фотоокисления в ЛГ переходят в хлороформный экстракт. Чтобы доказать, что источником этих ионов являются про-

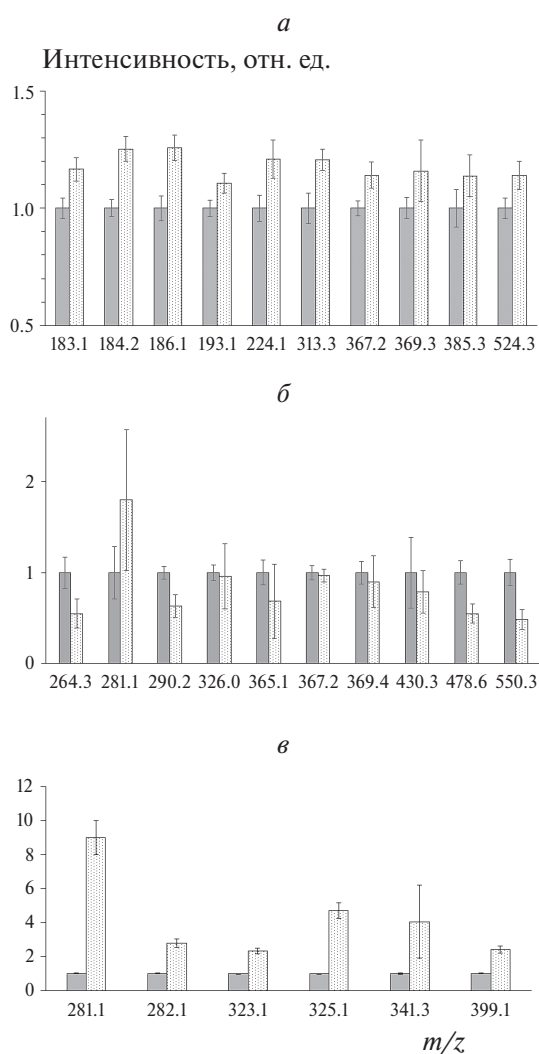


Рис. 5. Гистограммы масс-спектрометрических данных до (темные столбцы) и после воздействия светом (светлые столбцы) на исследуемые образцы: а – суспензия ЛГ, б – хлороформные экстракты из ЛГ, в – синтетический А2Е. Для наглядности интенсивности ионов нормировались на соответствующую среднюю интенсивность иона темнового образца.

дукты фотоокисления бисретиноидов, массы этих ионов сравнивались с массами продуктов фотоокисления синтетического А2Е.

Был проведен сравнительный анализ масс фотоокисленного А2Е, которые по своему составу наиболее близки к продуктам фотодегградации бисретиноидов в образце ЛГ. Из рис. 5в видно, что “нарастающие” ионы имеют предполагаемые формулы, похожие на формулы фрагментов бисретиноидов и их производных в ЛГ [12, 13, 22]. Таким образом, можно утверждать, что в процессе фотоокисления ЛГ, действительно, происходит окисление бисретиноидов ЛГ.

Кроме того, анализ образцов методом TOF-SIMS выявил пики с $m/z = 29$ (ион CHO^+), 43 (ион $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$), 60 (ион $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2^+$) и 69 (ион $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$), соответствующие фрагментам карбонильных соединений, которые демонстрировали заметный рост после фотоокисления, как синтетического А2Е, так и самих ЛГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было обнаружено, что при ВМД наблюдается повышенное содержание окисленных форм бисретиноидов ЛГ в клетках РПЭ [14, 16]. Аналогичные изменения спектральных и хроматографических характеристик ЛГ наблюдаются и при их фотоокислении *in vitro*. Поэтому фотоокисление ЛГ представляет собой удобную модель для изучения механизмов развития ВМД [23]. В данной работе была использована эта модель, чтобы доказать ранее выдвинутое предположение о том, что одним из источников образующихся при фотоокислении ЛГ цитотоксичных карбонильных соединений являются бисретиноиды [24].

Проведен сравнительный физико-химический анализ продуктов фотоокисления ЛГ и синтетического А2Е. Для контроля процесса фотоокисления [25] зарегистрированы спектры флуоресценции суспензии нативных и облученных видимым светом ЛГ, также проведен ВЭЖХ анализ хлороформных экстрактов из образцов суспензии ЛГ. В спектрах фотоокисленных ЛГ наблюдается повышенная интенсивность флуоресценции в области 550 нм по сравнению с необлученной суспензией ЛГ. ВЭЖХ анализ подтвердил повышенное содержание окси-Бис-рет при фотоокислении ЛГ.

Для большей детализации их спектральных свойств проведен флуоресцентный 3D-анализ были получены спектры флуоресценции для всех исследуемых образцов: суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов из суспензий ЛГ и синтетического А2Е до и после фотоокисления (рис. 2). Выявлена идентичная тенденция к изменению профилей флуоресценции после облучения как для суспензии ЛГ и хлороформного экстракта из ЛГ, так и для синтетического А2Е. Тем самым, сравнительный анализ исследуемых образцов указывает на то, что в фотоокисленных ЛГ накапливаются продукты, аналогичные продуктам фотоокисления и фотодегградации бисретиноида А2Е.

Сравнительный анализ кривых затухания флуоресценции позволил сделать вывод о том, что при увеличении содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов в составе ЛГ происходит изменение параметров кинетических кривых затухания флуоресценции. При увеличении содержания окси-Бис-рет в составе ЛГ происходит увеличение среднего значения времени жизни флуоресценции по сравнению с контролем и увеличение вклада в суммарную флуоресценцию продуктов фотоокисления [26]. Аналогичные данные получены и для хлороформного экстракта из ЛГ. Кроме того, получено дополнительное подтверждение того, что исходные неокисленные бисретиноиды характеризуются минимальным временем жизни флуоресценции в составе ЛГ (0.1 нс для А2Е). На основании полученных результатов можно также сделать вывод о том, что наблюдаемое увеличение среднего времени жизни флуоресценции при патологии ВМД относительно “нормы” [19, 27] вызвано увеличением в составе ЛГ окисленных бисретиноидов.

В данном исследовании была сделана попытка охарактеризовать химические свойства продуктов окислительной деструкции бисретиноидов ЛГ, чтобы понять их природу. Ранее было сделано предположение, что эти продукты могут содержать альдегидные группы [15]. Для подтверждения этого предположения проведен сравнительный анализ всех исследуемых образцов с использованием методов комбинационного рассеяния, ИК-спектроскопии и времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов. Проведены исследования по обнаружению и идентификации соединений, содержащих карбонильные группы, в суспензии нативных ЛГ и облученных видимым светом (модель ВМД), а также в хлороформных экстрактах из этих образцов и фотоокисленного синтетического А2Е, основного бисретиноида ЛГ. Сравнительный анализ результатов исследования показал, что для суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов из них и синтетического А2Е в спектрах комбинационного рассеяния наблюдаются схожие тенденции к увеличению сигнала карбонильных полос при 1750, 1450 и 1350 см^{-1} при фотоокислении образцов. Можно предположить, что в ЛГ детектируются продукты фотоокисления, содержащие альдегиды в свободном состоянии, аналогичные продуктам фотоокисления А2Е. Это говорит о том, что химически ак-

тивные карбонильные группы в ЛГ образуются за счет фотоокисления бисретиноидов, одним из которых является бисретиноид А2Е.

Анализ продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов методом времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов также подтвердил наличие соединений, содержащих химически активные карбонильные группы. Обнаружены соединения, близкие по массовому числу, количество которых увеличивается при фотоокислении как ЛГ, так и синтетического А2Е. Предложены химические формулы для этих соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе подробно охарактеризованы физико-химические свойства окисленных бисретиноидов ЛГ. Показано, что именно их активное накопление при окислении приводит к увеличению среднего времени жизни флуоресценции, что важно для понимания механизмов развития патогенеза, а также интерпретации данных методами FLIM и АФ. Кроме того, показано, что источником продуктов альдегидной природы, накапливающихся при окислении ЛГ, являются в основном бисретиноиды. Полученные данные важны как для дальнейшего усовершенствования методов ранней диагностики ВДМ, так и для понимания механизмов развития патологии.

Мы благодарим сотрудников Федерального государственного учреждения «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова д-ра мед.наук С.А. Борзенка и к.м.н. М.Х. Хубецову за возможность проведения исследований с использованием кадаверных глаз человека.

Работа выполнена при поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 122041400102-9), а также при поддержке Программы развития Московского государственного университета (проект № 23-Ш06-20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zetterberg M. // *Maturitas*. 2016. V. 83. P. 19.
2. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M. et al. // *Optom. Vis. Sci.* 2014. V. 91. № 8. P. 832.
3. Fisher C.R., Ferrington D.A. // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2018. V. 59. № 4. P. 41.
4. Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Зак П.П. и др. // *Хим. физика*. 2022. Т. 41. № 2. С. 27.
5. Ruan Y., Jiang S., Gericke A. // *Intern. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 3. P. 1296.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031296>

6. Ларин И. К. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 84.
7. Holz F.G., Schütt F., Kopitz J. et al. // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 1999. V. 40. P. 737.
8. Adler IV L., Chen C., Koutalos Y. // Exp. Eye Res. 2017. V. 155. P. 121.
9. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. V. 19. № 3. P. 201; [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
10. Lamb L.E., Simon J.D. // Photochem. Photobiol. 2004. V. 79. № 3. P. 127.
11. Recent Advances in Retinal Degeneration (Advances in Experimental Medicine and Biology, 613) NY: Springer, 2008. P. 393; https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4_46
12. Wu Y., Yanase E., Feng X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 7275.
13. Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockusch S. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 814.
14. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. P. 1075.
15. Yakovleva M.A., Dontsov A.E., Trofimova N.N., Sakina N.L., Kononikhin A.S., Aybush A.V., Feldman T.B., Ostrovsky M.A. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 1. P. 222; <https://doi.org/10.3390/ijms23010222>
16. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.Sh., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. // Eye. 2018. V. 32. P. 144; <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0109-0>
17. Holz F.G., Schmitz-Valckenberg S., Spaide R.F. et al. // Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2007. P. 342.
18. Schweitzer D., Gaillard E.R., Dillon J. et al. // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 2012. V. 53. № 7. P. 3376; <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8970>
19. Schweitzer D., Quick S., Schenke S. et al. // Ophthalmology. 2009. V. 106. № 8. P. 714; <https://doi.org/10.1007/s00347-009-1975-4>
20. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497.
21. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14609.
22. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulin A., Aybush A., Gostev F., Vasin A., Feldman T., Ostrovsky M. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 3. P. 1534; <https://doi.org/10.3390/ijms23031534>
23. Wang Z., Keller L.M.M., Dillon J. et al. // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 1251.
24. Feldman T., Ostrovskiy D., Yakovleva M., Dontsov A., Borzenok S., Ostrovsky M. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 20. P. 12234; <https://doi.org/10.3390/ijms232012234>
25. Разумов В.Ф. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 2. С. 14.
26. Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 20.
27. Yakovleva M.A., Radchenko A.Sh., Feldman T.B., Kostyukov A.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. // Photochem. Photobiol. Sci. 2020. V. 19. P. 920; <https://doi.org/10.1039/C9PP00406H>

PHYSICAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF THE LIPOFUSCIN GRANULE BISRETINOID PHOTODESTRUCTION PRODUCTS FROM RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELLS OF THE EYE

M. A. Yakovleva^{1*}, A. A. Vasin², A. E. Dontsov¹, A. A. Gulin², A. V. Aybush²,
A. A. Astafiev², A. M. Shakhov², T. B. Feldman^{1,3}, M. A. Ostrovsky^{1,3}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*E-mail: lina.invers@gmail.com

In this work, the mechanisms of formation of the bisretinoid oxidation products in lipofuscin granules isolated from the retinal pigment epithelium cells of the human eye have been studied. The physico-chemical characteristics of the bisretinoid photooxidation products are described. The methods of IR spectroscopy, Raman spectroscopy, fluorescence spectroscopy, scanning confocal microscopy, time-of-flight mass spectrometry of secondary ions (TOF-SIMS) and HPLC were used for the study. The properties of the products of photooxidation and degradation of the fluorophore of lipofuscin granules, including synthetic N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E), are described in detail. It has been shown that the products of oxidative degradation of lipofuscin granules are similar to the products of photooxidation of the main bisretinoid of lipofuscin granules – A2E. These data are important both for understanding the mechanisms of formation of cytotoxic products in lipofuscin granules and for establishing their chemical nature.

Keywords: bisretinoids, oxidative degradation, fluorophores, lipofuscin granules, retinal pigment epithelium of the human eye.

REFERENCES

1. M. Zetterberg, *Maturitas*. **83**, 19 (2016).
2. L. Nivison-Smith, R. Milston, M. Madigan, M. Kalloniatis, *Optom. Vis. Sci.* **91**, 832 (2014).
3. C.R. Fisher, D.A. Ferrington, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **59**, 41 (2018).
4. Yu.S. Petronyuk, N. N. Trofimova, P.P. Zak et al., *Russian Journal of Phys. Chem. B*. **16**(1), 97–102 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010249>
5. Y. Ruan, S. Jiang, A. Gericke, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 1296 (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms22031296>
6. I.K. Larin, *Russian Journal of Physical Chemistry B*. **17**, 244–250 (2023).
<https://doi.org/10.1134/s1990793123010074>
7. F.G. Holz, F. Schütt, J. Kopitz, G.E. Eldred, F.E. Kruse, H.E. Völcker, M. Cantz, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **40**, 737 (1999).
8. L. Adler IV, C. Chen, Y. Koutalos, *Exp. Eye Res.* **155**, 121 (2017).
9. M. Boulton, A. Dontsov, J. Jarvis-Evans, M. Ostrovsky, D. Svistunenko, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **19**, 201 (1993).
[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
10. L.E. Lamb, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.* **79**, 127 (2004).
11. J.R. Sparrow, S.R. Kim, A.M. Cuervo, U. Bandhyopadhyay, *Adv. Exp. Med. Biol.* **613**, 393 (2008).
https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4_46
12. Y. Wu, E. Yanase, X. Feng, M.M. Siegel, J.R. Sparrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 7275 (2010).
13. S. Ben-Shabat, Y. Itagaki, S. Jockusch, J.R. Sparrow, N.J. Turro, K. Nakanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 814 (2002).
14. T.B. Feldman, M.A. Yakovleva, P.M. Arbukhanova, S.A. Borzenok, A.S. Kononikhin, I.A. Popov, E.N. Nikolaev, M.A. Ostrovsky, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 1075 (2015).
15. M.A. Yakovleva, A.E. Dontsov, N.N. Trofimova, N.L. Sakina, A.S. Kononikhin, A.V. Aybush, T.B. Feldman, M.A. Ostrovsky, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (1), 222 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms23010222>
16. T.B. Feldman, M.A. Yakovleva, A.V. Larichev, P.M. Arbukhanova, A.Sh. Radchenko, S.A. Borzenok, V.A. Kuzmin, M.A. Ostrovsky, *Eye*. **32**, 1440 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41433-018-0109-0>
17. F.G. Holz, S. Schmitz-Valckenberg, R.F. Spaide, A.C. Bird, *Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 342.
18. D. Schweitzer, E.R. Gaillard, J. Dillon, R.F. Mullins, S. Russell, B. Hoffmann, S. Peters, M. Hammer, C. Biskup, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **53** (7), 3376 (2012).
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-8970>
19. D. Schweitzer, S. Quick, S. Schenke, M. Klemm, S. Gehlert, M. Hammer, S. Jentsch, J. Fischer, *Ophthalmology*. **106**, 714 (2009).
<https://doi.org/10.1007/s00347-009-1975-4>
20. J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).

21. C.A. Parish, M. Hashimoto, K. Nakanishi, J. Dillon, J. Sparrow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**, 14609 (1998).
22. Z. Wang, L.M.M. Keller, J. Dillon, E.R. Gaillard, Photochem. Photobiol. **82**, 1251 (2006).
23. T. Feldman, D. Ostrovskiy, M. Yakovleva, A. Dontsov, S. Borzenok, M. Ostrovsky, Int. J. Mol. Sci. **23**, 12234 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms232012234>
24. A. Dontsov, M. Yakovleva, N. Trofimova, N. Sakina, A. Gulin, A. Aybush, F. Gostev, A. Vasin, T. Feldman, M. Ostrovsky, Int. J. Mol. Sci. **23** (3), 1534 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms23031534>
25. W.F. Razumov, Russian Journal of Physical Chemistry B. **17(1)**, 36 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S199079312301027X>
26. M.A. Yakovleva, A.Sh. Radchenko, A.A. Kostyukov et al., Russian Journal of Physical Chemistry B. **16(1)**, 90-96 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S199079312201033X>
26. M.A. Yakovleva, A.Sh. Radchenko, T.B. Feldman, A.A. Kostyukov, P.M. Arbukhanova, S.A. Borzenok, V.A. Kuzmin, M.A. Ostrovsky, Photochem. Photobiol. Sci. **19**, 920 (2020).
<https://doi.org/10.1039/C9PP00406H>