

СОДЕРЖАНИЕ

Том 67, номер 3, 2022

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике	
<i>И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, А.С. Бучельников, Ю.Д. Нечипуренко</i>	421
Катионы нитрозония как наиболее эффективные в цитотоксическом отношении и компоненты динитрозильных комплексов железа	
<i>А.Ф. Ванин</i>	434
Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина	
<i>И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, Ю.Д. Нечипуренко</i>	444
Оптимизация вычислений в задаче структурного моделирования уравнениями для биоинформатических приложений	
<i>Г.А. Мещеряков, В. А. Зуев, А.А. Иголкина, М.Г. Самсонова</i>	451
Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микроципах	
<i>Ю.Д. Нечипуренко, А.С. Бучельников</i>	456
Хитозан как фотопротектор для иммобилизованного на его матрице папаина	
<i>М.Г. Холявка, С.М. Панкова, Ю.М. Вышкворкина, А.Н. Лукин, М.С. Кондратьев, В.Г. Артюхов</i>	467
О хиральности лекарственных препаратов и структур биомакромолекул	
<i>Е.В. Белова, Е.В. Семенова, В.А. Твердислов</i>	477
Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров	
<i>К.В. Шайтан</i>	492

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Электронный парамагнитный резонанс: исследование механизмов регуляции и световых стадий фотосинтеза растений	
<i>Э.К. Рууге, А.Н. Тихонов</i>	516
Термолюминесценция и диагностика состояния фотосинтетического аппарата листьев растений	
<i>В. А. Караваяев, О. А. Калмацкая, Б. В. Трубицин, А. Н. Тихонов</i>	524
Механизмы повреждения бактерий <i>Salmonella typhimurium</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> при импульсном фотовозбуждении молекулярных сенсibilизаторов	
<i>С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян, Д.А. Раздобреев, Л.В. Галактионова, Д.В. Дорофеев, Д.Е. Цюрко</i>	531
Стохастичность экспрессии белка р53 в клетках первичных и перевиваемых линий человека	
<i>Р.А. Ковалёв, Н.Д. Федорова, Р.А. Пантина, Е.В. Семенова, М.В. Филатов, Е.Ю. Варфоломеева</i>	540

Включение наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом, в состав липосом на основе соевого лецитина	
<i>Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, С.В. Канныкин, В.Г. Артюхов</i>	549
Измерение адсорбции антител класса IgG на электроформованные мембраны из нейлона-6	
<i>А.М. Сенковенко, А.М. Мойсенович, А.А. Маслакова, Е.Р. Павлова, Д.В. Багров</i>	555
Параметры управления разделением и концентрированием эритроцитов и лимфоцитов крыс, эритроцитов человека в поле стоячей ультразвуковой волны	
<i>Т.Н. Пашовкин, Д.Г. Садикова</i>	562
Сравнительное исследование повреждений днк в лейкоцитах крови мыши и клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в зависимости от концентрации озона, пероксида водорода и гемцитабина	
<i>А.Б. Гапеев, Е.С. Жукова, В.А. Синельникова, Г.Ю. Балакин, М.Ю. Земскова, Г.К. Рысцов, Т.Г. Щербатюк</i>	569
Мионевральная передача в бариевой среде	
<i>С.Н. Гришин, А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, М.А. Мухамедьяров</i>	576

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Действие динитрозильных комплексов железа с лигандом на основе <i>N</i> -ацетил-L-цистеина при сублингвальном введении этих комплексов в организм крыс	
<i>А.А. Тимошин, К.Б. Шумаев, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге</i>	581
Регрессионный анализ и математическое моделирование флуктуаций показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека	
<i>Л.В. Мезенцева</i>	587
Пуринергические механизмы адаптации диафрагмы мыши в условиях аллергической перестройки	
<i>А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганишин</i>	596
Связь моментов восстановления температуры тела у животных в период зимней спячки с интенсивностью флуктуаций вторичного космического излучения	
<i>М.Е. Диатроптов, А.И. Ануфриев, М.В. Рутовская</i>	600
Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии при анализе офтальмологических препаратов Луцентис и Эйлеа, препятствующих новообразованию сосудов	
<i>Л.М. Балашова, Н.А. Бакунина, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Ю.Д. Кузнецова, С.В. Лесовой, Ж.М. Салмаси, С.Н. Удальцов</i>	610
Фотобиомодуляция фиолетово-синим светом динамики опухолевого роста и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей	
<i>Е.С. Жукова, Т.Г. Щербатюк, И.А. Чернигина, В.В. Чернов, А.Б. Гапеев</i>	615

Contents

Vol. 67, No. 3, 2022

Molecular Biophysics

Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin as a General Model in Molecular Biophysics	
<i>I.A. Lavrinenko, G.A. Vashanov, A.S. Buchelnikov, and Yu.D. Nechipurenko</i>	421
Nitrosonium Cations as the Most Effective Cytotoxic Components of Dinitrosyl Iron Complexes	
<i>A.F. Vanin</i>	434
New Mathematical Model Describing Hemoglobin Oxygenation	
<i>I.A. Lavrinenko, G.A. Vashanov, and Yu.D. Nechipurenko</i>	444
Optimization of Computations for Structural Equation Modeling with Applications in Bionformatics	
<i>G.A. Meshcheryakov, V.A. Zuev, A.A. Igolkina, and M.G. Samsonova</i>	451
Ligand Binding to Nucleic Acids in Solution and on Microchips	
<i>Yu.D. Nechipurenko and A.S. Buchelnikov</i>	456
Chitosan as Photoprotector for Papain Immobilized on Its Matrix	
<i>M.G. Holyavka, S.M. Pankova, Yu.M. Vyshkvorkina, A.N. Lukin, M.S. Kondratyev, and V.G. Artyukhov</i>	467
On the Chirality of Drugs and Biomacromolecule Structures	
<i>E.V. Belova, E.V. Semenova, and V.A. Tverdislov</i>	477
Hidden Symmetry Effects in the Dynamics of Linear Polymers and Biopolymers	
<i>K.V. Shaitan</i>	492

Cell Biophysics

Electron Paramagnetic Resonance: Study of the Regulatory Mechanisms of Light Phases of Photosynthesis in Plants	
<i>E.K. Ruuge and A.N. Tikhonov</i>	516
Thermoluminescence and Diagnostics of the Photosynthetic Apparatus in Plant Leaves	
<i>V.A. Karavaev, O.A. Kalmatskaya, B.V. Trubitsin, and A.N. Tikhonov</i>	524
Mechanisms of Damage in <i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> upon Pulse Photoexcitation of Molecular Sensitizers	
<i>S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, A.N. Nikiyan, D. A. Razdobreev, L.V. Galaktionova, D.V. Dorofeev, and D.E. Tsurko</i>	531
Stochasticity in p53 Protein Expression in Human Primary Cells and Overpassaged Cell Lines	
<i>R.A. Kovalev, N.D. Fedorova, R.A. Pantina, E.V. Semenova, M.V. Filatov, and E. Yu. Varfolomeeva</i>	540
Inclusion of Magnetite Nanoparticles Stabilized with Cetyltrimethylammonium Bromide in the Composition of Liposomes Prepared Using Soy Lecithin	
<i>E.V. Shilova, I.A. Koltakov, S.V. Kannykin, and V.G. Artyukhov</i>	549

Measurements of IgG Antibodies Adsorption onto Electrospun Nylon-6 Membranes <i>A.M. Senkovenko, A.M. Moysenovich, A.A. Maslakova, E.R. Pavlova, and D.V. Bagrov</i>	555
Parameters of Control Scheme for Monitoring Separation and Concentration of Murine Erythrocytes and Lymphocytes and Human Erythrocytes in the Field of a Standing Ultrasonic Wave <i>T.N. Pashovkin and D.G. Sadikova</i>	562
Comparative Study of DNA Damage in Mouse Blood Leukocytes and MDA-MB-231 Human Breast Adenocarcinoma Cells Depending on the Concentration of Ozone, Hydrogen Peroxide and Gemcitabine <i>A.B. Gapeyev, E.S. Zhukova, V.A. Sinelnikova, G.Yu. Balakin, M.Yu. Zemskova, G.K. Rystsov, and T.G. Shcherbatyuk</i>	569
Neuromuscular Transmission in a Barium Environment <i>S.N. Grishin, A.E. Khairullin, A.Y. Teplov, and M.A. Mukhamedyarov</i>	576

Complex Systems Biophysics

Action of Dinitrosyl Iron Complexes with <i>N</i> -Acethyl-L-Cysteine-Bearing Ligand after Sublingual Administration in Rats <i>A.A. Timoshin, K.B. Shumaev, V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, and E.K. Ruuge</i>	581
Regression Analysis and Mathematical Modeling of Fluctuations in Microcirculation Parameters of Symmetrical Regions of the Human Upper Limbs <i>L.V. Mezentseva</i>	587
Purinergic Mechanisms in the Adaptation of Mouse Diaphragm to Allergic Disorders <i>A.E. Khairullin, A.Yu. Teplov, S.N. Grishin, and A.U. Ziganshin</i>	600
A Connection between the Episodes of Normothermic Levels of Body Temperature in Animals during Hibernation and Secondary Cosmic Ray Intensity Fluctuations <i>M.E. Diatroptov, A.I. Anufriev, and M.V. Rutovskaya</i>	
Multisensor Stripping Voltammetry in Analysis of Ophthalmic Drugs Lucentis and Eylea Used to Stop Neovascularization <i>L.M. Balashova, N.A. Bakunina, V.A. Namiot, I.I. Kolesnichenko, Yu.D. Kuznetsova, S.V. Lesovoy, G.M. Salmasi, and S.N. Udaltsov</i>	610
Violet-Blue Photobiomodulation of the Dynamics of Tumor Growth and Prooxidant-Antioxidant Balance in the Body of Tumor Carriers <i>E.S. Zhukova, T.G. Shcherbatyuk, I.A. Chernigina, V.V. Chernov, and A.B. Gapeyev</i>	615

КООПЕРАТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ КАК ОДНА ИЗ ОБОБЩАЮЩИХ МОДЕЛЕЙ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКЕ

© 2022 г. И.А. Лавриненко*, Г.А. Вашанов*, А.С. Бучельников**, Ю.Д. Нечипуренко**, ***

*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

**Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, ул. Университетская, 33

***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 07.03.2022 г.

После доработки 07.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Изучение гемоглобина и описание его оксигенации, разработанные для этого термодинамические и математические модели позволили биофизике сделать огромный шаг вперед, а предложенные уравнения, в частности, уравнение Хилла, оказали влияние на развитие науки в самых разных областях. Гемоглобин с его аллостерическим характером регуляции связывания кислорода и других лигандов послужил моделью для огромного числа молекулярно-биологических систем. В обзоре основное внимание уделяется формальному описанию связывания гемоглобином кислорода, рассмотрены основные математические модели, развитые в этой области. Эволюция моделей связывания прослеживается от подходов Хилла и Эдера, Моно–Уаймена–Шанжэ и Кошланда–Немети–Филмера до современных воззрений. Особое внимание уделено разным формальным подходам и представлениям к описанию оксигенации как явлению физической адсорбции.

Ключевые слова: гемоглобин, кооперативность и аллостерия, уравнение Хилла, уравнение Эдера, уравнение Бернарда, модель Моно–Уаймена–Шанжэ, модель Кошланда–Немети–Филмера, симметричная и последовательная модели, модели адсорбции.

DOI: 10.31857/S0006302922030012, EDN: AMUEZH

История описания связывания кислорода гемоглобином представляет общий интерес для биофизиков, так как в ней вырабатывались модели и формировались подходы, которые стали общими для широкого класса задач, описывающих обратимое кооперативное связывание лигандов с макромолекулами [1]. Явление кооперативности пронизывает все уровни живой материи – от молекул до сообществ организмов, и изучение этого явления на молекулярном уровне дает возможность найти ключ к пониманию механизмов, лежащих в основе этого универсального и вместе с тем уникального феномена самосогласованности составных систем (см. работы [2, 3]).

ПРЕДЫСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ: УРАВНЕНИЕ ГЮФНЕРА

Так как оксигенация является обратимой химической реакцией, то историю исследования феномена кооперативности можно вести от идеи К. Бертолле (1803) [4] об обратной реакции и хи-

мическом равновесии. Эти представления были развиты К. Гульдбергом и П. Вааге (1864–1867) [5], а также Я. Вант-Гоффом (1877) [6], сформулировавшими закон действующих масс, являющийся следствием второго начала термодинамики.

Г. Гюфнер (1890) [7], опираясь на этот закон, предложил уравнение, которое хорошо описывает связывание кислорода мономерным белком миоглобином (родственному гемоглобину, но не имеющим четвертичной структуры):

$$y = \frac{kp}{1 + kp}, \quad (1)$$

$$y = \frac{p}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + p} = \frac{p}{k^{-1} + p} = \frac{p}{p_{50} + p}, \quad (2)$$

где y – степень насыщения гембелка кислородом, p – парциальное давление кислорода, k – микроскопическая константа равновесия, k_1, k_{-1} – константы прямой и обратной реакции соответствен-

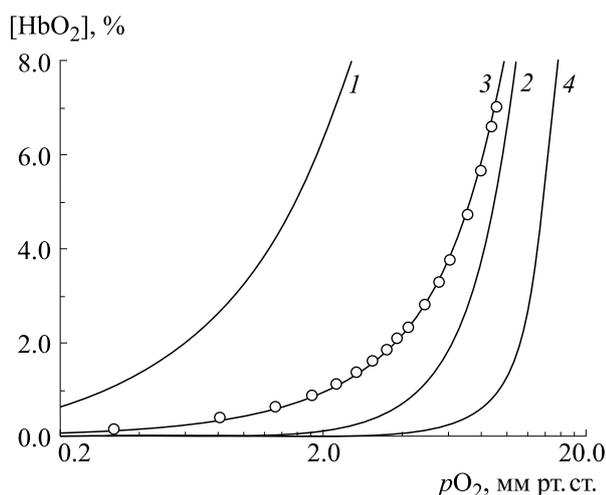


Рис. 1. Аппроксимация экспериментальных точек кривой диссоциации оксигемоглобина (Р. Уинслоу и др. [85]) уравнением Гюфнера (кривая 1), уравнением Хилла с $h = 2.5$ (кривая 2) и $h = 4$ (соответствует числу субъединиц, кривая 4) и уравнением Эдера (кривая 3).

но, p_{50} — давление кислорода, при котором половина макромолекул насыщена лигандом.

С. О’Салливан и Ф. Томпсон (1890) [8], основываясь на работах А. Харкорта (1865–1867) [9] предположили, что скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата и несет в себе экспоненциальную зависимость. Однако в работах Э. Дюкло (1899) [10], В. Анри (1901) [11] и А. Брауна (1902) [12] эта закономерность не подтвердилась. Л. Михаэлис и М. Ментен (1913) [13], используя в качестве теоретической базы закон действующих масс и опираясь на работу Анри, предложили одноименное уравнение (также известное как уравнение Михаэлиса–Анри или Анри–Михаэлиса–Ментен), ставшее основополагающим в ферментативной кинетике:

$$r = \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (3)$$

$$r = \frac{[S]}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + \left(\frac{k_1}{k_{-2}}\right)^{-1} + [S]}, \quad (4)$$

где r — относительная (от максимального значения) скорость ферментативной реакции, $[S]$ — концентрация субстрата, k_1 — константа прямой реакции (образование фермент-субстратного комплекса), k_{-1} — константа обратной реакции (распад комплекса до свободного фермента и субстрата), k_{-2} — константа реакции распада комплекса до свободного фермента и продукта, K_m — константа Михаэлиса.

И. Ленгмюр (1916) [14] разработал модель мономолекулярной адсорбции, исходя из следующих представлений: если физическая (квазихимическая) адсорбция является обратимым процессом, то тогда равновесное состояние определяется отношением констант адсорбции и десорбции. Эта зависимость более известна, как изотерма адсорбции Ленгмюра:

$$\theta = \frac{kc}{1 + kc}, \quad (5)$$

$$\theta = \frac{c}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + c} = \frac{c}{k^{-1} + c} = \frac{c}{K_l + c}, \quad (6)$$

где θ — доля занятых центров адсорбции, c — концентрация адсорбата (или давление газа p над адсорбентом), k — константа равновесия, k_1 , k_{-1} — константы прямой и обратной реакции (адсорбции и десорбции соответственно), K_l — константа Ленгмюра.

Таким образом, уравнения Гюфнера, Михаэлиса–Ментен и Ленгмюра описывают сходные физико-химические процессы, формализация которых укладывается в регрессионную математическую модель с уравнениями вида $y = x/(a + x)$. Следует также отметить, что исследования и описания кислородсвязывающих свойств гемоглобина опережали аналогичные работы в области ферментативной кинетики и химии поверхностных явлений.

Рассмотренная регрессионная модель настолько универсальна, что нашла свое применение и в других областях исследований, в частности, полученной Ж. Моно (1949) эмпирической зависимости скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата и носящей его имя (уравнение Моно) [15]:

$$q = \frac{[S]}{K_s + [S]}, \quad (7)$$

где q — относительная (от максимального значения) скорость роста микроорганизма, $[S]$ — концентрация субстрата, K_s — константа половинной скорости роста (аналогичная K_m).

УСПЕШНАЯ АППРОКСИМАЦИЯ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА: УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА

Предложенное Гюфнером уравнение не могло удовлетворительно описать кривую диссоциации оксигемоглобина (рис. 1, кривая 1). Возникший парадокс несоответствия признанного к тому времени закона действующих масс и эксперимента был разрешен А. Хиллом (1910) [16]. Он предположил, что гемоглобин в растворах существует не только в виде отдельных макромолекул,

но и в значительной степени представлен их агрегатами (ассоциатами). Оксигенация при этом происходит путем одновременного присоединения к агрегату нескольких лигандов. Тогда уравнение Гюфнера, исходя из закона действующих масс, может быть приведено к следующему виду:

$$y = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}, \quad (8)$$

где n – число молекул гемоглобина в его агрегате, K – макроскопическая константа равновесия.

Показатель степени n (который определяли на основании анализа данных) мог принимать нецелочисленные значения и поэтому физический смысл его стал неясен. Хиллом было предложено рациональное объяснение, которое сводилось к тому, что агрегаты гемоглобина имеют переменный состав, а наблюдаемое значение n является статистически усредненным по всем этим формам (рис. 1, кривая 2).

Следует отметить, что приводимые в научной литературе уравнения Гюфнера (1) и Хилла (8) хотя и содержат константы равновесных реакций, имеющие одинаковое обозначение и физический смысл, но, тем не менее, обладают различной размерностью, так как K может быть произведением k_i . Это следует из приведенного уравнения для случая одновременного присоединения n лигандов с одинаковыми равновесными константами:

$$y = \frac{\prod_{i=1}^n k_i p_i}{1 + \prod_{i=1}^n k_i p_i} = \frac{(kp)^n}{1 + (kp)^n} = \frac{p^n}{k^{-1/n} + p^n} = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}. \quad (9)$$

Уравнение Хилла получило признание, однако каким образом молекулы гемоглобина в агрегатах синхронизировали между собой связывание молекул кислорода – оставалось неясным. Вместе с тем предположение об одновременном связывании лигандов подразумевало существование некоторой согласованности этих процессов.

Теоретическое описание подобных процессов появилось в начале XX века в области статистической физики. Исследуя ферромагнитные свойства материалов, В. Ленц предложил модель (1920), позволяющую в общем виде охарактеризовать сильную анизотропию ферромагнетиков. Под руководством Ленца Э. Изинг разработал математическое описание этой модели для одномерного случая [17]. Модель Ленца–Изинга стала одной из наиболее известных моделей статистической физики для систем, где проявляются коллективные эффекты.

Д. Хартри (сотрудничавший в области физиологии с Хиллом) реализовал идею самосогласованного поля применительно к описанию много-

электронных атомов и молекул, как способ приближенного решения уравнения Шредингера (1927–1928) [18]. В это же время Р. Фаулер (ученик Хилла и научный руководитель Хартри) ввел в оборот термин «кооперативные переходы» (1929), который изначально касался фазовых переходов в магнетиках, сплавах и растворах [19]. В дальнейшем понятия «самосогласованности» и «кооперативности» найдут и расширят свое применение в различных научных областях знаний, а модель Ленца–Изинга будет востребована при описании кооперативных эффектов связывания лигандов с макромолекулами [20, 21].

МОЛЕКУЛА ГЕМОГЛОБИНА – ЭТО ТЕТРАМЕР

Г. Эдер (1925) [22] показал, что молекула гемоглобина представляет собой тетрамер. Т. Сведберг (1926) [23], принимая во внимание результаты этого исследования и сопоставляя их с собственными экспериментальными данными (полученными методом аналитического центрифугирования), также пришел к этому выводу.

Хотя открытие олигомерной структуры макромолекулы и не противоречило представлениям Хилла о существовании агрегатов гемоглобина, оно не объясняло, почему показатель степени не соответствует числу субъединиц, меньше их количества и принимает нецелочисленные значения. Это снова привело к затруднениям физической трактовки коэффициента Хилла [24].

Так как показатель степени в уравнении уже не отражал число субъединиц n (но был с ним сопряжен), то, чтобы избежать путаницы в обозначениях, стали использовать для этого коэффициента другие символы или их сочетания: n_H , h , α и т.д. [25–30]:

$$y = \frac{p^h}{p_{50}^h + p^h}, \quad (10)$$

где h – коэффициент Хилла, а p_{50} – величина 50%-го насыщения гемоглобина кислородом (иногда обозначаемая как константа Хилла K_H [31–34], аналогично константе Михаэлиса K_m в одноименном уравнении).

Уравнение Хилла обладает важной особенностью – по его коэффициенту h можно оценить степень кооперативного взаимодействия субъединиц, которую принято характеризовать как отрицательную кооперативность ($h < 1$), положительную кооперативность ($h > 1$) или ее отсутствие ($h = 1$). Этот параметр дает общее представление о кооперативности, согласно которому предполагается, что она постоянна и не зависит от концентрации лиганда. Сопоставление значений величин h оказалось весьма полезным в срав-

нительном анализе олигомерных белков, а также оценки изменений в их структуре при воздействии различных физико-химических агентов [35].

Следует также отметить, что параметр h может быть представлен в виде функции от числа субъединиц, подобно кажущейся молекулярной массе белка или гидродинамическому радиусу макромолекулы, величины которых также сопряжены с массой и геометрией макромолекулы, но весьма опосредованным образом (см. ниже).

Уравнение (10) (также известное как уравнение Хилла—Ленгмюра [36, 37]) получило широкое распространение в силу своей простоты и хорошей аппроксимирующей способности [38–41], несмотря на имеющееся сложности в соотношении коэффициента h с числом субъединиц n , а также недостаточную реалистичность физической модели одновременного присоединения лигандов [42]. Уравнение Хилла нашло свое применение в энзимологии, фармакологии [33, 43], в

задачах моделирования регуляции транскрипции гена [44, 45], а также различных зависимостей типа «доза—эффект» [30, 46].

ОТ ИДЕИ ОДНОВРЕМЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ К ИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОМУ ПРИСОЕДИНЕНИЮ

Уравнение Хилла не может одинаково хорошо аппроксимировать кривую оксигенации во всем диапазоне парциальных давлений кислорода, особенно в области его малых значений (рис. 1, кривая 2). Если предположить, что в границах предложенной модели (и формализации данным уравнением) происходит одновременное присоединение молекул кислорода к тетрамеру с различающимися равновесными константами для каждой из четырех субъединиц, то это также не улучшит качество аппроксимации кривой диссоциации оксигемоглобина:

$$y = \frac{k_1 p \cdot k_2 p \cdot k_3 p \cdot k_4 p}{1 + k_1 p \cdot k_2 p \cdot k_3 p \cdot k_4 p} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4 p^4}{1 + k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4 p^4} = \frac{k^4 p^4}{1 + k^4 p^4} = \frac{K p^4}{1 + K p^4}, \quad (11)$$

где k_1, k_2, k_3 и k_4 — константы равновесных реакций для каждой из субъединиц, k^4 — произведение констант k_1 – k_4 , K — макроскопическая константа.

Следует отметить, что когда константы k_1 – k_4 равны между собой, среднее арифметическое и геометрическое для них совпадают. В противном случае K будет смещено в сторону меньших значений относительно K для равных k_1 – k_4 . Так как в этом случае значения k_1 – k_4 нельзя найти из их произведения, то и определить, равны ли они между собой, соответственно, не представляется возможным.

На этом этапе возможности уравнения Хилла в аппроксимации экспериментальных данных себя исчерпали [47]. Доминирующей версией в описании оксигенации стала идея о последовательном присоединении лигандов.

УРАВНЕНИЕ ЭДЕРА И ЕГО ЭВОЛЮЦИЯ

Опираясь на закон действующих масс и идею о последовательном присоединении молекул кислорода к тетрамеру, Г. Эдер (1925) [22] получил уравнение оксигенации для идеального раствора гемоглобина:

$$y = \frac{0.25 \cdot K_1 p + 0.5 \cdot K_2 p^2 + 0.75 \cdot K_3 p^3 + K_4 p^4}{1 + K_1 p + K_2 p^2 + K_3 p^3 + K_4 p^4}, \quad (12)$$

где K_1 – K_4 — равновесные макроскопические константы.

Для макроскопических констант со значениями $K_1 = 1$, $K_2 = 3/8$, $K_3 = 1/16$ и $K_4 = 1/256$, выведенными из кинетической теории, уравнение (12) сводится к частному случаю уравнения Хилла, т.е. уравнению Гюфнера, применимому для аппроксимации кривой оксигенации одной из субъединиц гемоглобина:

$$y = \frac{0.25 \cdot K_1 p}{1 + 0.25 \cdot K_1 p}. \quad (13)$$

В отличие от уравнения Хилла (8)–(10), где рассматривается одновременное присоединение лигандов, последовательное присоединение лигандов осуществляется в четыре этапа. В последнем случае также могут быть рассмотрены варианты последовательного присоединения лигандов с одинаковой равновесной константой или, как минимум, варианта, где хотя бы одна из равновесных констант отличается от остальных.

Г. Эдер предположил [22], что если четыре атома гемового железа будут расположены достаточно близко друг к другу, то такая система с полностью занятыми местами связывания лигандов станет гораздо стабильней, чем ее промежуточные состояния, выразив это следующей зависимостью:

$$y = \frac{0.25 \cdot Kp + 0.25 \cdot (Kp)^2 + 0.25 \cdot (Kp)^3 + (Kp)^4}{1 + Kp + 0.5 \cdot (Kp)^2 + 0.3 \cdot (Kp)^3 + (Kp)^4} \quad (14)$$

В то время Эдером, вероятно, была предпринята одна из первых попыток связать феноменологическое уравнение с еще неизвестной пространственной структурой данной макромолекулы.

Л. Полинг (1935) [48] переосмыслил уравнение Эдера с позиции биофизической химии. Взяв за основу геометрию макромолекулы в виде вариантов расположения гемов по краям квадрата или в вершинах тетраэдра, предложил свои версии уравнения оксигенации. Уравнение, основанное на предположении о том, что макромолекула представляет собой квадрат, оказалось ошибочным. Близкая к естественной структуре гембелка модель в виде тетраэдра привела к наиболее точному решению этой задачи:

$$y = \frac{K_e p + 3 \cdot \alpha K_e^2 p^2 + 3 \cdot \alpha^3 K_e^3 p^3 + \alpha^6 K_e^4 p^4}{1 + 4 \cdot K_e p + 6 \cdot \alpha K_e^2 p^2 + 4 \cdot \alpha^3 K_e^3 p^3 + \alpha^6 K_e^4 p^4} \quad (15)$$

где K_e – константа связывания лиганда ($RT \cdot \ln K_e$ – в представлениях термодинамики, как изменение свободной энергии, сопровождающее присоединение кислорода к гемму), α – константа (величина $RT \cdot \ln \alpha$ трактуется в термодинамике, как дополнительная свободная энергия, стабилизирующая две взаимодействующие группы «кислород–гем»).

И. Клотц (1946) [49], работая с белком, имеющим множественные центры связывания кальция, рассмотрел возможность применения закона действующих масс к описанию связывания большого количества лигандов с макромолекулой. В частности, он выполнил деконволюцию макроскопических констант до уровня микроскопических констант равновесных реакций и представил модифицированное уравнение Эдера (далее известное как уравнение Эдера–Клотца):

$$y = \frac{k_1 p + 2 \cdot k_1 k_2 p^2 + 3 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + 4 \cdot k_1 k_2 k_3 k_4 p^4}{4 \cdot (1 + k_1 p + k_1 k_2 p^2 + k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4)} \quad (16)$$

или способом, где знаменатель является статистической суммой [50, 51]:

$$y = \frac{k_1 p + 3 \cdot k_1 k_2 p^2 + 3 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4}{1 + 4 \cdot k_1 p + 6 \cdot k_1 k_2 p^2 + 4 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4} \quad (17)$$

Из этого уравнения, зная численные значения макроскопических констант $K_1–K_4$, которые могут быть получены решением обратной задачи (т.е. аппроксимацией данной зависимости к экспериментальным данным), несложно вычислить (кажущиеся) константы равновесных реакций ($k_1–k_4$).

Таким образом, обобщенное уравнение для одинаковых n сайтов связывания лигандов L будет иметь следующий вид:

$$y = \frac{\sum_{i=1}^n i \prod_{i=1}^n k_i [L]^i}{n \left(1 + \sum_{i=1}^n \prod_{i=1}^n k_i [L]^i \right)} \quad (18)$$

Следует отметить, что уравнение Эдера обеспечивает большее согласие с экспериментом не только по причине более реалистичного представления об оксигенации (рис. 1, кривая 3) как ступенчатом процессе связывания лигандов, но и как математическая модель, имеющая четыре подгоночных параметра ($K_1–K_4$) вместо двух (p_{50} и h), как в уравнении Хилла.

Однако нахождение коэффициентов Эдера затруднено подбором исходных значений для этих коэффициентов при их оптимизации. Это зачастую приводит к большим ошибкам при вычислении таких коэффициентов, в том числе, из-за случайных ошибок экспериментальных данных [52, 53].

МИОГЛОБИН И ГЕМОГЛОБИН – ПЕРВЫЕ БЕЛКИ, ДЛЯ КОТОРЫХ ПОЛНОСТЬЮ УСТАНОВЛЕНА ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА

Исследование структуры белков является одним из наиболее значимых направлений биофизики, биохимии, молекулярной биологии, смежных с ними наук и является вполне самостоятельной задачей. Вместе с тем, более точное описание процесса кооперативного связывания кислорода гемоглобином потребовало понимания пространственной организации макромолекулы.

Предложенный М. Перутцем (1953) метод изоморфного замещения позволил вывести рентгеноструктурный анализ на новый уровень, что дало возможность впервые получить проекции распределения электронной плотности для макромолекул миоглобина (Дж. Кендрию) и гемоглобина (М. Перутц). Л. Блюменфельд (1954) обобщил свои исследования по структуре гемоглобина и, предвосхищая результаты Перутца, сделал вывод о существовании конформационных перестроек этой макромолекулы в ходе ее оксигенации [54].

Начатые Перутцем в 1937 году исследования структуры гемоглобина при помощи дифракции рентгеновских лучей привели к определению Кендрию (1957) пространственного расположения полипептидных цепей миоглобина. Стало ясно, что молекулы белков не укладываются в существующие структурные модели, основанные на простом геометрическом порядке. С повышени-

ем разрешающей способности получаемых изображений Кендрю (1958) [55] и Перутц (1959) [56] полностью установили пространственную организацию этих белков.

Дальнейшие исследования Перутца преимущественно были направлены на понимание работы «молекулярной машины» гемоглобина в части стереохимии кооперативных эффектов (1970) [57], а также вопросов регуляции аффинности кислорода к гембелку в контексте структурных перестроек данной макромолекулы (1979) [58].

ГИПОТЕЗА УАЙМЕНА–АЛЛЕНА И УРАВНЕНИЕ БЕРНАРДА

Д. Аллен, К. Гуте и Дж. Уаймен (1950) провели эксперименты по изучению кислородсвязывающих свойств гемоглобина спектрофотометрическим методом, отметив уникальность гемопротидов, как самого разнообразного и красивого класса «молекулярных машин», известных биохимикам [59]. Далее Уаймен и Аллен (1951) предприняли попытку интерпретировать связывание кислорода с гемоглобином, а также некоторые другие родственные реакции в терминах структурных эффектов, отмечая, что этот белок может быть рассмотрен как фермент, расширяя тем самым границы применимости аналитических выводов своей работы [60].

Основываясь на гипотезе Уаймена–Аллена, предполагающей одновременное связывание гембелком двух молекул кислорода, Бернард (1960) предложил следующее уравнение оксигенации [61]:

$$y = 1/4 \frac{2 \cdot \omega(p/p_{50})^2 + 4 \cdot \omega(p/p_{50})^4}{1 + \omega(p/p_{50})^2 + \omega(p/p_{50})^4}. \quad (19)$$

где ω – некоторый постоянный кинетический коэффициент.

Как следует из математических соотношений констант, коэффициентов и переменных в этом уравнении, оно априори будет давать лучшее приближение кривой оксигенации относительно уравнения Хилла. В уравнении Хилла два подгонных параметра – p_{50} и h , а уравнение Бернарда, имеющее то же самое количество параметров (ω и p_{50}), также представлено в числителе суммой двух слагаемых с показателями в степенях 2 и 4 (которые обоснованы как имеющие физический смысл). Однако уравнение Бернарда менее эффективно в аппроксимации, чем уравнение Эдера, так как последнее содержит четыре подгонных параметра $K_1–K_4$, а в числителе представлено суммой четырех слагаемых с показателями в степенях, соответствующих количеству последовательно присоединенных молекул кислорода.

К достоинствам уравнения Бернарда следует отнести простоту вычисления параметров (как и в уравнении Хилла). Однако при помощи этого уравнения невозможно оценить степень кооперативного взаимодействия субъединиц макромолекулы.

НАЧАЛО СИСТЕМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

Исследование кооперативности белков дополнилось изучением этого явления в нуклеиновых кислотах, что приводило к общему пониманию механизмов регуляции синтеза белков и метаболических путей.

Начатые Ф. Жакобом и Ж. Моно совместно с А. Парди (1957–1959) [62] исследования по изучению лактозной системы привели к разработке модели оперона прокариот (1961) [63], где рассматривались регуляторные механизмы синтеза белков. Расширяя область своих исследований в сторону изучения регуляции ферментативной активности белков, Жакоб и Моно (1961–1962) отметили следующее: «может показаться, что некоторые ферменты, действующие на критических стадиях метаболизма, избирательно наделены специфическими функциями регуляции и координации, и с помощью этих белков данная биохимическая реакция, в конечном итоге, контролируется метаболитом, действующим скорее как физиологический «сигнал», чем как химически необходимый компонент самой реакции» [64, 65].

Моно, Жакоб и Ж. Шанжэ (1963) предлагают концепцию «Аллостерические белки и системы клеточного контроля» [66], в рамках которой определены классы аллостерических эффектов и сформулированы общие свойства аллостерических систем.

Основные тезисы концепции таковы:

1) биологическая активность многих белков контролируется специфическими метаболитами, не взаимодействующими непосредственно с субстратами или продуктами реакций;

2) эффект этих регуляторных агентов, по-видимому, является результатом исключительно конформационного изменения (аллостерического перехода), индуцируемого в белке, когда он связывает агент;

3) предполагается, что этот механизм играет существенную роль в регуляции метаболической активности, а также, возможно, специфическом контроле синтеза белка.

СИММЕТРИЧНАЯ (СОГЛАСОВАННАЯ) МОДЕЛЬ МОНО–УАЙМЕНА–ШАНЖЁ

Объединив усилия, Моно, Уаймен и Шанжё, рассматривая кооперативность на примере оксигенации гемоглобина, предлагают модель (модель MWC [67]), объясняющую аллостерические переходы в белках, состоящих из идентичных субъединиц (в оригинале статьи – протомеров).

Модель описывается следующими утверждениями [67]:

1) аллостерические белки представляют собой олигомеры, субъединицы которых связаны таким образом, чтобы все они занимали равнозначные позиции (т.е. макромолекула имеет хотя бы одну ось симметрии);

2) каждому лиганду соответствует один и только один сайт на каждой субъединице (т.е. симметрия каждого набора стереоспецифических рецепторов такая же, как симметрия молекулы);

3) конформация каждой субъединицы ограничена ее ассоциацией с другой субъединицей;

4) по крайней мере два состояния обратимо доступны аллостерическим олигомерам; эти состояния отличаются распределением и/или энергией связей между субъединицами и, следовательно, накладываемыми на них конформационными ограничениями;

5) в результате таких взаимодействий изменяется сродство одного (или нескольких) стереоспецифических сайтов к соответствующему лиганду при переходе из одного состояния в другое;

б) при переходе белка из одного состояния в другое его молекулярная симметрия сохраняется (включая симметрию конформационных ограничений, налагаемых на каждую субъединицу).

С формальной позиции функция состояния равновесия между напряженными (**Tense**) и расслабленными (**Relax**) симметричными по субъединицам конформациям белка (доля *R*-форм) может описана как:

$$R = \frac{(1+z)^n}{L(1+kz)^n + (1+z)^n}, \tag{20}$$

тогда степень насыщения белка лигандом будет описана следующим уравнением:

$$y = \frac{Lkz(1+kz)^{n-1} + z(1+z)^{n-1}}{L(1+kz)^n + (1+z)^n}, \tag{21}$$

где *R* – доля *R*-форм (молекул белка в *R*-состоянии), *L* – равновесная константа (аллостерическая константа) для $[T_0]/[R_0]$, а *T*₀ и *R*₀ – состояния макромолекул свободных от лигандов, *k* – отношение констант диссоциации *K*_T и *K*_R (т.е. констант сродства к лиганду), *z* – нормированная на *K*_R концентрация лиганда, *n* – число лигандов.

При *L* = 0 (одно состояние макромолекулы, *R*) и *k* = 1 отношение принимает вид уравнения Гюфнера (1) или тождественных ему уравнений Ленгмюра (5) и Михаэлиса–Ментен (3):

$$y = \frac{z(1+z)^{n-1}}{(1+z)^n} = \frac{z}{1+z} = \frac{cK_R^{-1}}{1+cK_R^{-1}} = \frac{c}{K_R+c} = \frac{p}{p_{50}+p}. \tag{22}$$

Следует отметить, что в модели MWC (21) также просматриваются уравнения Хилла и Эдера, так как все эти зависимости вытекают из закона действующих масс [68].

Модель симметричного взаимодействия Моно–Уаймена–Шанжё, так же, как и уравнение Хилла, нашла свое широкое применение в энзимологии и фармакологии, хорошо объясняя положительную кооперативность за счет изменения соотношения молекул в *T* и *R* состоянии. Вместе с тем данная модель не позволяет выявить природу отрицательной кооперативности [26].

В дальнейшем модель MWC была расширена и обобщена [25, 69, 70]. Рассматриваются более чем два состояния макромолекулы, неидентичные субъединицы и сайты связывания, а также присоединение различных по своему типу лигандов и аллостерических модуляторов [27, 71–73].

МОДЕЛЬ ИНДУЦИРОВАННОГО СООТВЕТСТВИЯ (ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ) КОШЛАНДА–НЕМЕТИ–ФИЛМЕРА

Как уже отмечалось, уравнение Хилла дает разумное приближение к экспериментальным данным и позволяет оценить величину кооперативного взаимодействия субъединиц. Уравнение Эдера не дает теоретического объяснения сущности этого процесса. Переосмыслив данное уравнение, Полинг предпринял первую попытку связать изменение этих констант с геометрией белка, рассматривая одну константу как константу равновесия *K*_e, а вторую – как константу взаимодействия *α*, зависящую от геометрии макромолекулы.

Д. Кошланд, Г. Немети и Д. Филмер (1966), опираясь на данные о структурной перестройке олигомеров, уточнили биохимический концепт механизма связывания лигандов макромолеку-

лой, предложенного Полингом, и разработали свою модель (модель KNF, известная также как модель Полинга/Кошланда–Немети–Филмера) [74, 75]. Модель построена на следующих допущениях и ограничениях:

1) каждая субъединица олигомера может существовать в одной из двух конформаций – неактивной или активной, без сохранения молекулярной симметрии макромолекулы;

2) только активная конформация способна в значительной степени связывать лиганд;

3) связывание лиганда одной из субъединиц должно сопровождаться ее немедленным переходом из неактивной конформации в активную;

4) такой переход реализуется с помощью механизма «индуцированной подгонки» («самосогласованности»);

5) кооперативность должна возникать как следствие взаимодействия между субъединицами;

б) сила такого взаимодействия варьируется и зависит от относительных конформаций вовлеченных в этот процесс субъединиц.

Авторы модели рассмотрели несколько вариантов взаимодействия субъединиц из использованной Полингом номенклатуры геометрических конфигураций: тетраэдр, квадрат, линейная структура и согласованная модель, в которой конформации всех субъединиц меняются одновременно. К этим конфигурациям выведены соответствующие уравнения связывания лигандов.

Уравнение для конфигурации «тетраэдр» имеет следующий вид:

$$y = \frac{K_{AB}^3 (K_C K_t [C]) + 3 \cdot K_{AB}^4 K_{BB} (K_C K_t [C])^2 + 3 \cdot K_{AB}^3 K_{BB}^3 (K_C K_t [C])^3 + K_{BB}^6 (K_C K_t [C])^4}{1 + 4 \cdot K_{AB}^3 (K_C K_t [C]) + 6 \cdot K_{AB}^4 K_{BB} (K_C K_t [C])^2 + 4 \cdot K_{AB}^3 K_{BB}^3 (K_C K_t [C])^3 + K_{BB}^6 (K_C K_t [C])^4}, \quad (23)$$

где y – степень насыщения лигандом в пересчете на одну субъединицу, $[A]$ – концентрация субъединиц с неактивной конформацией, $[B]$ – концентрация субъединиц с активной конформацией, $[C]$ – концентрация лиганда, K_t – константа равновесия $[B]/[A]$, K_C – константа равновесия $[BC]/([B][C])$, K_{AB} – константа равновесия $([AB][A])/([AA][B])$, K_{BB} – константа равновесия $([BB][A][A])/([AA][B][B])$.

При отсутствии взаимодействий между субъединицами уравнение сводится к известной зависимости (1):

$$y = \frac{K_C K_t [C]}{1 + K_C K_t [C]} = \frac{kp}{1 + kp} = \frac{p}{p_{50} + p}. \quad (24)$$

Таким образом, последовательная модель снижает чрезмерное упрощение симметричной модели в представлении кооперативности [76, 77], как синхронной структурной перестройки всей макромолекулы, и учитывает конформационные изменения отдельных сайтов связывания [78].

Тем не менее, А. Корниш-Боуден (2013) отмечает, что обе модели MWC и KNF являются феноменологическими и потому не отвечают на фундаментальный вопрос о том, как связывание лиганда дает наблюдаемый аллостерический эффект. Современные программы расчетов структур белков в сочетании со структурными, термодинамическими и кинетическими исследования-

ми позволяют подойти к решению этого вопроса [79].

УРАВНЕНИЯ, НЕСУЩИЕ В СВОЕЙ ОСНОВЕ ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ

Рассмотренные ранее уравнения, соответствующие моделям MWC и KNF, несут в себе степенную зависимость и являются следствием закона действующих масс. Рядом исследователей были предприняты попытки получить альтернативные модели связывания кислорода гемоглобином, базирующиеся на постулировании переходного процесса, к которому неприменим этот закон. Скорость оксигенации гембелка в таком случае определяется показательной (экспоненциальной) функцией.

Исходя из этих представлений, И. Высочинной (1963) [80] предложено уравнение следующего вида:

$$y = 1 - \left[1 + bp + \frac{(bp)^2}{2} + \frac{(bp)^3}{3} \right] e^{-bp}, \quad (25)$$

где b – переменный кинетический коэффициент.

Опираясь в своей основе на уравнение Гюфнера и предполагая, что константа связывания лиганда является функцией степени деформации макромолекулы белка, экспоненциально зависящей от парциального давления кислорода, П. Подрабинек и И. Каменский (1968) [81] представили свою модель:

$$y = \frac{\gamma p e^{\lambda p}}{1 + \gamma p e^{\lambda p}}, \quad (26)$$

где γ и λ – постоянные положительные кинетические коэффициенты, а $k = \gamma e^{\lambda p}$ – константа равновесия реакции.

Уравнение, представленное Ю. Кисляковым и соавт. (1975) [82], выглядит следующим образом:

$$y = \left[1 - \exp\left(-\frac{bp}{10}\right) \right]^{\frac{1}{b}}, \quad (27)$$

где b – кинетический коэффициент.

Функция, предложенная М. Ханиным (1978) [83], аналогична предыдущим и имеет следующий вид:

$$y = 1 + \delta_1 e^{-\delta_2 p}, \quad (28)$$

где δ_1 и δ_2 – постоянные кинетические коэффициенты.

Таким образом, построение уравнений оксигенации гемоглобина, в принципе, может быть основано как на степенных, так и на экспоненциальных зависимостях.

АНАЛИЗ МОДЕЛЕЙ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ

Как было показано, существует ряд моделей, которые могут быть использованы для аппроксимации экспериментальных данных кривой диссоциации оксигемоглобина. Также аналитически можно выявить взаимосвязь отношений, коэффициентов и констант в приведенных уравнениях оксигенации, что было выполнено ранее, и в определенной степени, нами систематизировано.

Однако системная верификация наиболее известных моделей, описывающих связывание гемоглобина с кислородом, на предмет наилучшего соответствия данным эксперимента не проводилась. Это обстоятельство не позволяет сравнить эффективность их аппроксимации, так как ранее проводившиеся разрозненные вычисления были выполнены на неперекрывающихся наборах данных, имеющих различное количество экспериментальных точек, полученных с той или иной погрешностью измерений.

Для уравнений, соответствующих моделям MWC и KNF, трудно решить обратную задачу (не всегда можно найти значения подгоночных параметров). Вместе с тем уравнения для моделей Моно–Уаймена–Шанжэ и Кошланда–Немети–Филмера имеют общую основу с уравнениями Гюфнера, Хилла, Бернарда и Эдера, несущими в себе степенную зависимость, что позволяет также использовать их в качестве уравнений, определяющих способ присоединения лигандов: одновре-

менно (уравнение Хилла), комбинированно (уравнение Бернарда) или последовательно (уравнение Эдера).

В работе [84] были сопоставлены разные модели оксигенации с целью выяснить, какие из них могут описать реальный эксперимент наилучшим образом. Был использован набор данных, полученных Р. Уинслоу (1977) [85], как одних из наиболее полных и точных известных результатов измерений связывания кислорода гемоглобином.

Результаты проведенных исследований показывают, что близость высоких значений коэффициентов детерминации для моделей Эдера, Бернарда и Хилла в совокупности с общностью в представлении ими процесса оксигенации могут косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы белка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций. При этом используемый в построении альтернативных моделей подход, который основан на экспоненциальной зависимости, в совокупности с высоким разбросом значений более низкого коэффициента детерминации в этой группе уравнений также, на наш взгляд, методом исключения это подтверждает [84].

Кластерный анализ показал общность в семействах уравнений со степенной и экспоненциальной зависимостями (рис. 2). Анализ выявил, что уравнение Эдера и скоррелированная с ним модель Кошланда–Немети–Филмера в рамках формальных критериев наилучшим образом подходят для аппроксимации и описания экспериментальных данных связывания гемоглобином кислорода [84].

Тем не менее, следует подчеркнуть, что уравнение Эдера имеет наибольшее число подгоночных параметров относительно используемых уравнений, а это дает дополнительные преимущества с точки зрения качества аппроксимации модели к экспериментальным данным. То же самое можно сказать и про модели MWC и KNF. Однако если более сложная модель не давала бы преимуществ в описании, точнее, в аппроксимации экспериментальными данными, то следовало бы остановиться на более простой симметричной модели.

В итоге на вопрос, какая из моделей (или базы модели) ближе к реальному процессу оксигенации, можно ответить, оперируя методами квантовой химии, молекулярной динамики или способом, позволяющим оценить изменения на атомарном уровне организации макромолекулы с оценкой энергии взаимодействия ее структурных элементов.



Рис. 2. Дендрограмма (матрица расстояний) распределения некоторых моделей кривой диссоциации оксигемоглобина; коэффициент детерминации (в скобках после автора модели) и дистанция между объектами указаны в миллионных долях.

НОВАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ХИЛЛА

Уравнение Хилла с $h = 4$ позволяет корректно находить величину p_{50} (рис. 1, кривая 4). Однако, как уже отмечалось, наилучшее приближение в описании оксигенации наблюдалось при h меньше, чем число субъединиц n для этой макромолекулы (рис. 1, кривая 2). Так как показатель степени в уравнении однозначно связывали с числом молекул гембелка в его агрегатах, а потом и субъединиц в макромолекуле, то, разумеется, физический смысл величины h стал неочевиден.

Мы предприняли попытку снять это противоречие для h путем «разобщения» параметра, определяющего силу взаимодействия субъединиц и числа этих субъединиц n , которое имеет очевидный физический смысл [86].

В самой простой модели это выглядит следующим образом:

$$h = n - b, \quad (29)$$

где b – разность или «дефицит» между коэффициентом Хилла и числом субъединиц.

Величина b не сопряжена с n , является константой, но, в принципе, должна зависеть от n . Можно ввести коэффициент пропорциональности a для n , который обеспечивает сопряжение h с n .

$$h = an. \quad (30)$$

Однако для $h = 1$ a будет приобретать различные значения в зависимости от n , что затрудняет его интерпретацию.

Поэтому зависимость h от n лучше представить в виде уравнения $y = ax + b$:

$$h = \theta(n)(n - 1) + 1, \quad (31)$$

где $\theta(n)$ – вводимый нами «относительный коэффициент кооперативности» белка, состоящего из n субъединиц. Тогда $\theta(n) = 0$ указывает на отсутствие кооперативности, и коэффициент Хилла будет равен единице при любых n .

Число у коэффициента θ указывает на то, от какого числа субъединиц он был вычислен, что дает возможность легко находить h от $\theta(n)$ и наоборот (см. [86]).

Заметим, что подобный подход позволяет построить новую оценку кооперативности. По-видимому, явление кооперативности можно описывать при помощи разных подходов, и исследование их соотношения и связи с механизмами проявления аллостерии на молекулярном уровне – задача дальнейших исследований [87]. Мы полагаем, что подходы к описанию явления кооперативности и аллостерических эффектов, разработанные в применении к гемоглобину, могут быть использованы и для других адсорбционных систем (см., например, работу [21]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История исследования связывания гемоглобином кислорода с точки зрения теории адсорбции и моделей, которые приводят к различным формальным описаниям этого явления, представляет собой научную ретроспективу, которая может быть полезна для исследователей, работающих в самых разных областях молекулярной биофизики. Здесь мы постарались показать эту историю под углом исследования феномена кооперативности, соединив описание классических

работ с некоторыми из наших исследований и обобщений. Отдельно следует выделить вклад в эту историю Л.А. Блюменфельда: его книга «Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода» стала для нас проводником в мир исследования этой удивительной «молекулярной машины», несущей кислород и дарующей жизнь [54]. Следует также отметить обзорную статью М. Перутца, которая подытожила его исследования оксигенации [88], а также книгу «Мне бы рассердить вас раньше» — эссе о науке, ученых и гуманизме [89].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wyman and S. J. Gill, *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley CA, 1990).
2. A. Y. Ben-Naim, *Cooperativity and regulation in biochemical processes* (Springer, Boston MA, 2001). DOI: 10.1007/978-1-4757-3302-0
3. В. Ф. Левченко, *Биосфера: этапы жизни (эволюция частей и целого)* (Свое издательство, СПб, 2012).
4. С.-L. Berthollet, *Essai de statique chimique* (Chez Firmin Didot, Paris, 1803).
5. P. Waage and C. M. Guldberg, *CM Forhandlinger: Videnskabs-Selskabet i Christiana* **35** (1864). DOI: 10.1021/ED063P1044
6. J. H. van't Hoff, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **10** (1), 669 (1877). DOI: 10.1002/CBER.187701001185
7. G. Hüfner, *Arch. ges. Physiol.* **31**, 28 (1890).
8. C. O'Sullivan and F. W. Tompson, *J. Chem. Society Trans.* **57**, 834 (1890). DOI: 10.1039/CT8905700834
9. A. V. Harcourt, *J. Chem. Society* **20**, 460 (1867). DOI: 10.1039/JS8672000460

10. E. Duclaux, *Traité de microbiologie: Diastases, toxines et venins*, Vol. II (Masson et Cie., Paris, 1899).
11. V. Henri, *Zeitschrift für physikalische Chemie* **39** (1), 194 (1902). DOI: 10.1515/zpch-1902-3912
12. A. J. Brown, *J. Chem. Society Trans.* **81**, 373 (1902). DOI: 10.1039/CT9028100373
13. L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem.* **49** (333–369), 352 (1913).
14. I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2267 (1916). DOI: 10.1021/ja02268a002
15. J. Monod, *Annu. Rev. Microbiol.* **3** (1), 371 (1949). DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
16. A. V. Hill, *J. Physiol.* **40**, i (1910).
17. E. Ising, *Beitrag zur theorie des ferro-und paramagnetismus* (Grefe & Tiedemann, Hamburg, 1924).
18. D. R. Hartree, In *Math. Proc. of the Cambridge Philosophical Society* (Cambridge University Press, Cambridge, 1928), pp. 111–132. DOI: 10.1017/S0305004100011920
19. R. H. Fowler, P. Kapitza, In *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **124** (793), 1 (1929). DOI: 10.1098/rspa.1929.0095
20. Yu. D. Nechipurenko and G. V. Gursky, *Bioph. Chem.* **24**, 195 (1986). DOI: 10.1016/0301-4622(86)85025-6
21. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т комп. исслед. (ИКИ), М. — Ижевск, 2015).
22. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Jr. Field, *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
23. T. Svedberg and R. Fåhræus, *J. Am. Chem. Soc.* **48** (2), 430 (1926). DOI: 10.1021/ja01413a019
24. J. T. Edsall, *J. Hist. Biol.* **5** (2), 205 (1972). DOI: 10.1007/BF00346659
25. A. Horovitz, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **229** (1256), 315 (1986). <https://doi.org/10.1098/rspb.1986.0088>
26. H. Abeliovich, *Biophys. J.* **89** (1), 76 (2005). DOI: 10.1529/biophysj.105.060194
27. O. Rapp and O. Yifrach, *PLoS One* **12** (8), e0182871 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0182871
28. C. F. S. Bonafé, D. F. L. Neto, E. A. Martínez, et al., *Chem. Zvesti.* **74** (9), 2861 (2020). DOI: 10.1007/s11696-020-01125-1
29. R. H. Dahl, S. Taudorf, D. M. Bailey, et al., *Exp. Physiol.* **105** (7), 1063 (2020). DOI: 10.1113/EP088615
30. S. Srinivasan, F. H. Wagh, S. Idicula-Thomas, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes* **1862** (4), 183242 (2020). DOI: 10.1016/j.bbmem.2020.183242
31. A. M. Saleh and D. C. Batlle, *J. Clin. Invest.* **85** (6), 1734 (1990). DOI: 10.1172/JCI114629
32. A. G. Marangoni, *Enzyme kinetics: a modern approach* (John Wiley & Sons, 2003). DOI: 10.1002/0471267295
33. A. K. Bordbar, Z. Saadati, and N. Sohrabi, *Acta Biochim. Pol.* **51** (4), 963 (2004). DOI: 10.18388/abp.2004_3529
34. P. Messina, G. Prieto, V. Dodero, et al., *Biopolymers.* **79** (6), 300 (2005). DOI: 10.1002/bip.20353
35. L. Endrenyi, C. Fajsi, and F. H. Kwong, *Eur. J. Biochem.* **51** (2), 317 (1975). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb03931.x

36. H. P. Rang, Br. J. Pharmacol. **147** (S1), S9 (2006). DOI: 10.1038/sj.bjp.0706457
37. R. Cammack, T. Atwood, P. Campbell, et al., *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (Oxford University Press, 2008). DOI: 10.1093/acref/9780198529170.001.0001
38. A. Karlin, J. Theor. Biol. **16** (2), 306 (1967). DOI: 10.1016/0022-5193(67)90011-2
39. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
40. S. A. Frank, Biol. Direct. **8** (1), 1 (2013). DOI: 10.1186/1745-6150-8-31
41. M. I. Stefan and N. Le Novere, PLoS Comput. Biol. **9** (6), e1003106 (2013). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003106
42. Z. Konkoli, Theor. Biol. Med. Model. **8** (1), 10 (2011). DOI: 10.1186/1742-4682-8-10
43. S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, et al., Fundam. Clin. Pharmacol. **22** (6), 633 (2008). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
44. J. Li, X. Zhu, M. Byrnes, et al., J. Biol. Chem. **268** (33), 24599 (1993). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)74508-6
45. H. Aramaki, H. Kabata, S. Takeda, et al., Genes Cells **16** (12), 1200 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01563.x
46. S. Ding and F. Sachs, J. Gen. Physiol. **113** (5), 695 (1999). DOI: 10.1085/jgp.113.5.695
47. M. L. Coval, J. Biol. Chem. **245** (23), 6335 (1970). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)62614-6
48. L. Pauling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **21** (4), 186 (1935). DOI: 10.1073/pnas.21.4.186
49. I. M. Klotz, Arch. Biochem. Biophys. **9** 109 (1946).
50. I. Tyuma, K. Imai, and K. Shimizu, Biochemistry **12** (8), 1491 (1973). DOI: 10.1021/bi00732a004
51. T. Yonetani, S. I. Park, A. Tsuneshige, et al., J. Biol. Chem. **277** (37), 34508 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M203135200
52. K. Imai, Biophys. Chem. **37** (1), 197 (1990). DOI: 10.1016/0301-4622(90)88019-O
53. J. López Fidalgo and M. M. Rodríguez-Hernández, Chemometr. Intell. Lab. Syst. **138** 133 (2014). DOI: 10.1016/J.CHEMOLAB.2014.07.014
54. Л. А. Блюменфельд, *Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода* (Сов. наука, М., 1957).
55. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, et al., Nature **181** (4610), 662 (1958). DOI: 10.1038/181662a0
56. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, et al., Nature **185** (4711), 416 (1960). DOI: 10.1038/185416A0
57. M. F. Perutz, Nature **228** (5273), 726 (1970). DOI: 10.1038/228726A0
58. M. Perutz, Annu. Rev. Biochem. **48** (1), 327 (1979). DOI: 10.1146/ANNUREV.BI.48.070179.001551
59. D. W. Allen, K. F. Guthe, and J. Wyman Jr, J. Biol. Chem. **187** (1), 393 (1950). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)50965-6
60. J. Wyman Jr and D. W. Allen, J. Polym. Sci. **7** (5), 499 (1951). DOI: 10.1002/POL.1951.120070506
61. S. R. Bernard, Bull. Math. Biophys. **22** (4), 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476569
62. A. V. Pardee, F. Jacob, and J. Monod, J. Mol. Biol. **1** (2), 165 (1959). DOI: 10.1016/S0022-2836(59)80045-0
63. F. Jacob and J. Monod, J. Mol. Biol. **3** (3), 318 (1961). DOI: 10.1016/S0022-2836(61)80072-7
64. J. Monod and F. Jacob, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **26**, 389 (1961). DOI: 10.1101/SQB.1961.026.01.048
65. J. Monod, F. Jacob, and F. Gros, Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.) (21), 104 (1962).
66. J. Monod, J.-P. Changeux, and F. Jacob, J. Mol. Biol. **6** (4), 306 (1963). DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80091-1
67. J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux, J. Mol. Biol. **12** (1), 88 (1965). DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80285-6
68. M. I. Stefan, S. J. Edelstein, and N. Le Novère, BMC Syst. Biol. **3** (1), 68 (2009). DOI: 10.1186/1752-0509-3-68
69. S. J. Edelstein, J. Mol. Biol. **426** (1), 39 (2014). DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.010
70. A. Horovitz and T. Mondal, J. Phys. Chem. B. **125** (1), 70 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09351
71. J.-H. S. Hofmeyr, and H. Cornish-Bowden, Bioinformatics. **13** (4), 377 (1997). DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/13.4.377
72. J. N. Weiss, FASEB J. **11** (11), 835 (1997). DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285481
73. N. Kaihnsa, Y. Ren, M. Safey El Din, et al., J. Math. Biol. **81** (4), 1169 (2020). DOI: 10.1007/s00285-020-01540-8
74. D. E. Koshland Jr, G. Némethy, and D. Filmer, Biochemistry **5** (1), 365 (1966). DOI: 10.1021/BI00865A047
75. W. A. Eaton, E. R. Henry, J. Hofrichter, et al., Nat. Struct. Biol. **6** (4), 351 (1999). DOI: 10.1038/7586
76. G. Weber, Nature **300** (5893), 603 (1982). DOI: 10.1038/300603a0
77. L. Lee, Biophys. Physicobiol. **16**, 490 (2019). DOI: 10.2142/biophysico.16.0_490
78. T. R. Chay and C. Ho, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70** (12), 3914 (1973). DOI: 10.1073/PNAS.70.12.3914
79. A. Cornish-Bowden, FEBS J. **281** (2), 621 (2014). DOI: 10.1111/febs.12469
80. И. В. Высочина, Биофизика. **8**, 361 (1963).
81. П. А. Подрабинек и И. И. Каменский, Молекуляр. биология **2**, 120 (1968).
82. Ю. А. Кисляков, *Математическое моделирование кровообращения и газообмена в мозгу* (Наука. Ленингр. отд-ние, Л., 1975).
83. М. А. Ханин, Н. Л. Дорфман, И. Б. Бухаров и др., *Экстремальные принципы в биологии и физиологии* (Наука, М., 1978).
84. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Ю. Сулин и др., Биофизика **66** (6) 1065 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106003X
85. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., J. Biol. Chem. **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X
86. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и Ю. Д. Нечипуренко, Биофизика **67** (2), 229 (2022). DOI: 10.31857/S000630292202003X
87. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и Ю. Д. Нечипуренко, Биофизика **67** (3), 444 (2022).
88. M. F. Perutz, Q. Rev. Biophys. **22** (2), 139 (1989). DOI: 10.1017/s0033583500003826
89. M. F. Perutz, *I Wish I'd Made You Angry Earlier: Essays on Science, Scientists, and Humanity* (Oxford University Press, Oxford, 2002).

Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin as a General Model in Molecular Biophysics

I.A. Lavrinenko*, G.A. Vashanov*, A.S. Buchelnikov**, and Yu.D. Nechipurenko**, ***

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The study of hemoglobin and the description of its oxygenation, the thermodynamic and mathematical models developed for these purposes represent a very great advance in biophysics, and the proposed equations, in particular the Hill equation, has had an impact on the development of science in different fields. Hemoglobin and its allosteric mechanism of regulation of the binding of oxygen and other ligands served as a model for a huge number of molecular biological systems. The review focuses on the formal description of oxygen binding by hemoglobin and considers the main mathematical models developed in this area. The evolution of binding models can be seen dating from the approaches proposed by Hill, Adair, Monod–Wyman–Changeux and Koshland–Némethy–Filmer to the modern views. Particular attention is paid to different formal approaches and ideas to the description of oxygenation as a phenomenon of physical adsorption.

Keywords: hemoglobin, cooperativity and allostery, Hill equation, Adair equation, Bernard equation, Monod–Wyman–Changeux model, Koshland–Némethy–Filmer model, symmetric and sequential models, adsorption models

УДК 577.3

КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ КАК НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2022 г. А.Ф. Ванин

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 04.03.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Суммированы экспериментальные данные, свидетельствующие о способности динитрозильных комплексов железа выступать в качестве доноров не только молекулярного оксида азота (NO), но и катионов нитрозония (NO⁺). При нейтральных («физиологических») значениях pH в отсутствие тиолов эти катионы превращаются в результате гидролиза в анионы нитрита, тогда в присутствии тиолов — в S-нитрозотиолы. Именно последнее определяет цитотоксическое действие динитрозильных комплексов железа как доноров NO⁺ на живые организмы.

Ключевые слова: катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0006302922030024, EDN: AMYDCZ

КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ — КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

В настоящее время установлено, что один из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксид азота (NO), функционирующий во всех живых организмах, способен оказывать на них не только позитивное, регуляторное, но и негативное, цитотоксическое действие [1]. Последнее в большей степени характерно не для нейтральной, молекулярной формы NO, а для его одноэлектронно-окисленной формы — катиона нитрозония (NO⁺) [2–6]. Сейчас большинством исследователей предполагается, что эта форма появляется в живых организмах в присутствии кислорода, окисляющего NO до диоксида азота (NO₂) с последующим его превращением в триоксид азота (N₂O₃), представляющий собой аддукт диоксида и оксида азота. Реакция диспропорционирования этих компонентов аддукта собственно и приводит к появлению донора катионов нитрозония (NO + NO₂⁻) — соединения, ха-

рактеризующегося сигналом ЭПР с резонансной структурой [5–7].

Вместе с тем были получены данные о том, что катионы нитрозония могут появляться в живых организмах и в отсутствие кислорода, т.е. без участия диоксида азота, в анаэробных условиях в ходе образования в живых организмах динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [8–10]. Есть основание предполагать, что включение NO в эти комплексы сопровождается трансформацией половины его молекул в катионы нитрозония в качестве нитрозильных лигандов в железо-динитрозильном фрагменте ДНКЖ, одна из резонансных структур которого описывается как Fe²⁺(NO)(NO⁺) [11–14].

В основе указанной трансформации лежит реакция диспропорционирования двух молекул NO (их взаимное одноэлектронное окисление-восстановление), чему способствует попарное связывание молекул NO с ионом Fe²⁺ на начальной стадии образования ДНКЖ в присутствии анионных (L⁻) лигандов (схема 1) [13, 14].

Гидролиз аниона нитроксила, образующегося в результате диспропорционирования молекул NO в этих комплексах, приводит к образованию молекулы нитроксила (HNO), выходящей из лигандного окружения железа с последующими включением в освободившееся место третьей молекулы NO, завершающем синтез ДНКЖ — низкоспиновых (с S = 1/2) моноядерных комплексов

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ — моноядерные динитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ — биядерные динитрозильные комплексы железа, МНКЖ — мононитрозильные комплексы железа, СТС — сверхтонкая структура, GSH — глутатион, НАС — N-ацетил-L-цистеин, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат, МС — меркаптосукцинат, ТС — тиосульфат.

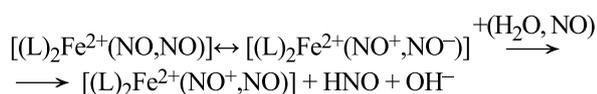


Схема 1. Предполагаемый механизм синтеза М-ДНКЖ.

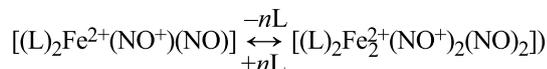


Схема 2. Равновесие между М- и Б-ДНКЖ.

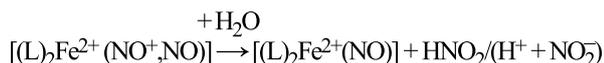


Схема 3. Возникновение моонитрозильных комплексов железа.

(М-ДНКЖ), одна из резонансных структур которых в соответствии со схемой 1 описывается как $[(L)_2Fe^{2+}(NO^+)(NO)]$. Вне зависимости от природы анионных лигандов все эти М-ДНКЖ характеризуются сигналами ЭПР с центром при $g = 2.03$ и полушириной $\sim 6-4$ мТл с двумя (рис. 1в, сигналы 1–5) или тремя различными значениями тензора g -фактора (рис. 1а, сигналы 2'–5') – показателями соответственно аксиальной или более низкой ромбической симметрии ДНКЖ (18, 15).

Согласно работе [19] резонансная структура $[Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$, описывающая состояние железо-динитрозильного фрагмента в М-ДНКЖ, также характерна для тех же фрагментов, включающихся в биядерную форму ДНКЖ (Б-ДНКЖ, формула $[(L)_2Fe_2^{2+}(NO^+)_2(NO)_2]$). Эта форма в соответствии со схемой 2 возникает при недостатке анионных лигандов и обратимо в соответствии с химическим равновесием между Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ переходит в М-ДНКЖ [20].

Анионные лиганды включаются в Б-ДНКЖ в качестве мостиков, связывающих два железо-динитрозильных фрагмента, обеспечивая спаривание спинов этих фрагментов. В результате Б-ДНКЖ становятся диамагнитными и не дают сигнала ЭПР. Основной характеристикой этих комплексов являются спектры оптического поглощения с четко выраженными полосами на 310 и 360 нм [20].

Гидролиз катиона нитрозония в составе М-ДНКЖ (или Б-ДНКЖ) до азотистой кислоты (или анионов нитрита) с последующим их выходом из состава этих комплексов приводит к их превращению в моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с теми же анионными лиганда-

ми, характеризующимися в соответствии со схемой 3 резонансной структурой $[(L)_2Fe^{2+}(NO)]$ [21].

В отличие от М-ДНКЖ, МНКЖ с анионными лигандами нетиоловой природы представляют собой высокоспиновые ($S = 3/2$) комплексы, характеризующиеся существенно более широкими, чем сигналы 2.03, сигналами ЭПР с полушириной ~ 160 мТл и тремя значениями g -фактора – 3.95, 4.00 и 2.00 (рис. 1а, спектры 1–5). В отсутствие тиолсодержащих лигандов эти комплексы, как правило, неустойчивы и при удалении газообразного NO из раствора быстро распадаются. Столь же быстро распадаются и исходные ДНКЖ с теми же лигандами, но уже не в результате высвобождения из них молекул NO, а, как уже было сказано, вследствие гидролиза катионов нитрозония, входящих наряду с молекулами NO в состав ДНКЖ [21].

Столь быстрый распад не характерен для М-ДНКЖ, включающих в себя анионные, ионизованные по тиоловым группам тиолсодержащие лиганды. В этих комплексах из-за высокой электронной π -донорной активности атомов тиоловой серы, передающих часть электронной плотности на катионы нитрозония, положительный заряд на этих лигандах снижается и тем самым предотвращается их связывание с анионами гидроксидов, т. е. гидролиз этих катионов. В результате резко повышается стабильность М-ДНКЖ, так что полностью подавляется их превращение в соответствующие МНКЖ [18, 19].

Последние, т. е. МНКЖ с тиол-содержащими лигандами возникают, но не в ходе распада соответствующих М-ДНКЖ, а на начальной стадии образования этих комплексов в реакции газообразного NO, тиолов и ионов двухвалентного железа, обычно при недостатке NO. Возникающие на этой стадии МНКЖ с тиолсодержащими лигандами [формула $(RS)_2Fe^{2+}(NO)$] представляют собой низкоспиновые ($S = 1/2$) комплексы, характеризующиеся сигналом ЭПР со слабо выраженной анизотропией g -фактора со средним его значением, равным 2.04 (рис. 1б, спектр 2). При регистрации этого сигнала при комнатной температуре регистрируется сигнал ЭПР с триплетной сверхтонкой структурой (СТС) с расщеплением ~ 1.2 мТл, обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота NO-лиганда со спином $I = 1$ (рис. 1б, спектры 1 и 3).

При последующей обработке МНКЖ с тиолсодержащими лигандами газообразным NO они превращаются в соответствующие М-ДНКЖ, характеризующиеся формулой $[(RS)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. Эта формула, а именно наличие в комплексах двух нитрозильных и двух тиолсодержащих лигандов следует из анализа СТС сигнала ЭПР М-ДНКЖ с

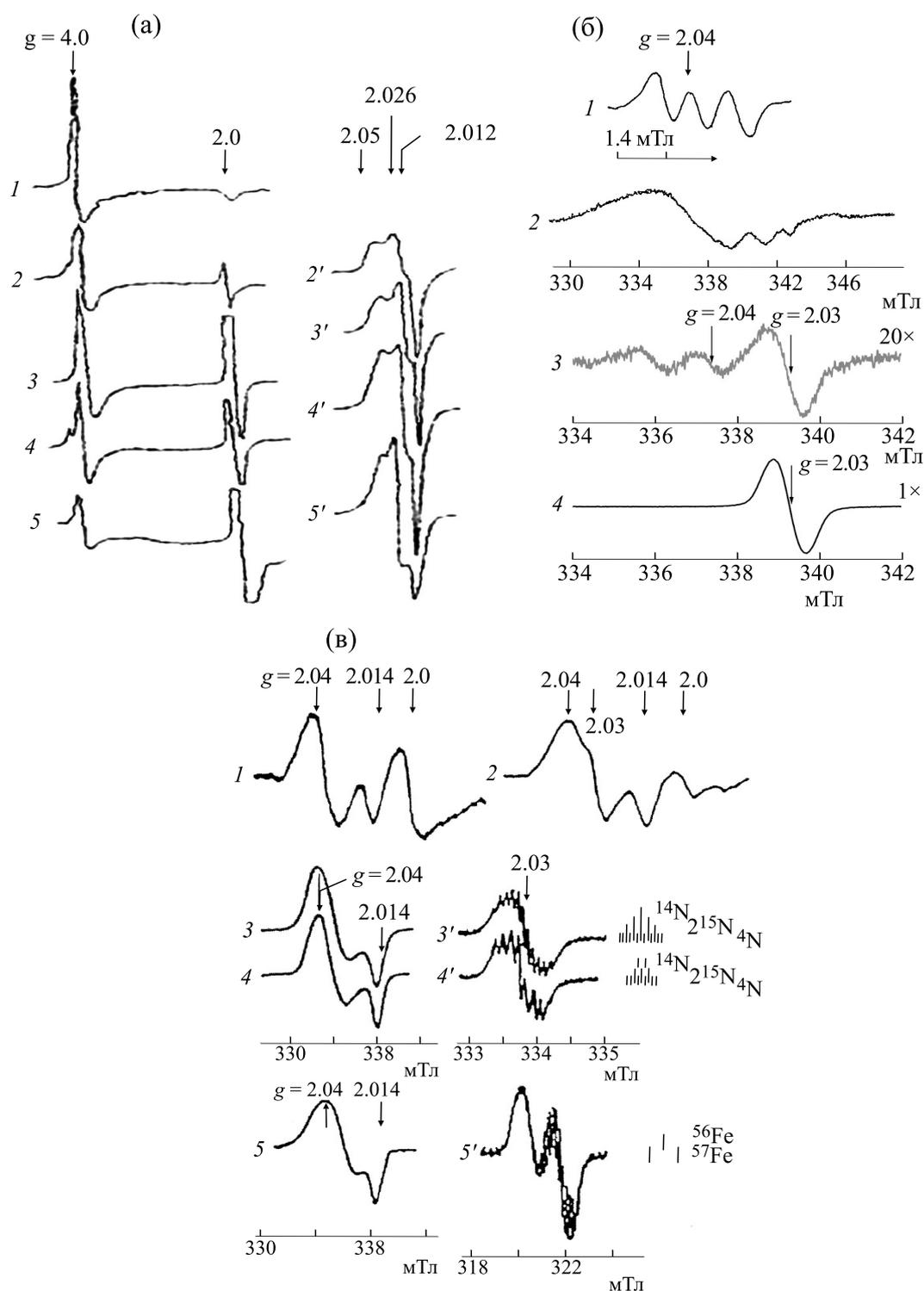


Рис. 1. Сигналы ЭПР М-ДНКЖ и МНКЖ с различными анионными лигандами. (а) – Сигналы ЭПР высокоспиновых МНКЖ (спектры 1–5) и низкоспиновых М-ДНКЖ (спектры 2'–5') соответственно с ЭДТА (спектр 1), цитратом (спектры 2, 2'), аскорбатом (спектры 3, 3'), фосфатом (спектры 4, 4') и водой (спектры 5, 5') Запись при 77 К [15]. (б) – Сигналы ЭПР МНКЖ с цистеином, запись при 293 К (спектр 1) и 77 К (спектр 2) [16]; сумма ЭПР-сигналов МНКЖ и М-ДНКЖ с цистеином (спектр 3) и сигнал ЭПР М-ДНКЖ с цистеином (спектр 4); запись при 290 К [17]. (в) – Сигналы ЭПР эндогенных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при $g = 2.04$ и 2.014 , зарегистрированные при 290 К в печени кролика и дрожжевых клетках (спектры 1, 2); сигналы ЭПР М-ДНКЖ (^{14}N NO) с цистеином (спектры 3, 3'), М-ДНКЖ (^{15}N NO) с цистеином (спектры 4, 4') и М-ДНКЖ (^{57}Fe) с цистеином (спектры 5, 5'), зарегистрированные при 77 К (спектры 1, 3–5) или 290 К (спектры 2, 3'–5'). Сигнал ЭПР при $g = 2.0$ на спектрах 1 и 2 обусловлен эндогенными свободными радикалами [18].

цистеином, зарегистрированного при комнатной температуре (рис. 1в, спектры 3'–5'). Характерная для этого сигнала тринадцатикомпонентная СТС определяется взаимодействием неспаренного электрона с ядрами азота ^{14}N двух нитрозильных лигандов, обеспечивающим появление квинтетной СТС, с дополнительным пятикратным сверхтонким расщеплением на четырех протонах (с $I = 1/2$) метиленовых групп двух цистеиновых (RS-) лигандов. При замене в нитрозильных лигандах ^{14}N на ^{15}N ($I = 1/2$) вместо тринадцатикомпонентной СТС регистрируется девятикомпонентная СТС (рис. 1в, спектры 3' и 4'). Замена в М-ДНКЖ обычного железа ^{56}Fe на его изотоп ^{57}Fe , характеризующийся наличием ядерного спина с $I = 1/2$, вызывает дублетное (~ 1.2 мТл) сверхтонкое расщепление сигнала, свидетельствующее о наличии в этих комплексах только одного атома железа (рис. 1в, спектр 5'). При регистрации сигнала ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при низкой температуре (в замороженных растворах) форма сигнала определяется в основном анизотропией g -фактора ($g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$) (рис. 1в, спектры 3–5).

При контакте низкомолекулярных М- и Б-ДНКЖ с внутриклеточными белками железодинитрозильные $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ -фрагменты из этих комплексов переходят на тиоловые группы белков с образованием устойчивых М- и Б-ДНКЖ с белковыми тиолсодержащими лигандами, при этом сохраняется химическое равновесие между низкомолекулярными и белковыми ДНКЖ, как правило, резко сдвинутое в сторону белковых ДНКЖ. В отличие от низкомолекулярных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, дающими при комнатной температуре узкие симметричные сигналы ЭПР с полушириной 0.7 мТл, белковые ДНКЖ характеризуются анизотропным сигналом ЭПР, совпадающим с сигналом ЭПР замороженных растворов М-ДНКЖ с низкомолекулярными тиолсодержащими лигандами. В качестве иллюстрации на рис. 2 приведены сигналы ЭПР М-ДНКЖ, связанные с сывороточным альбумином быка. Точно такой же анизотропный сигнал, обусловленный белок-связанными ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, обнаруженными в печени кролика и дрожжевых клетках [18], приведен на рис. 1в (спектры 1 и 2).

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА КАК ДОНОРЫ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ

Как следует из резонансной структуры $[(\text{L})_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$, характерной для М-ДНКЖ, химическое равновесие между этими комплексами и составляющими их компонентами можно представить в соответствии со схемой 4.

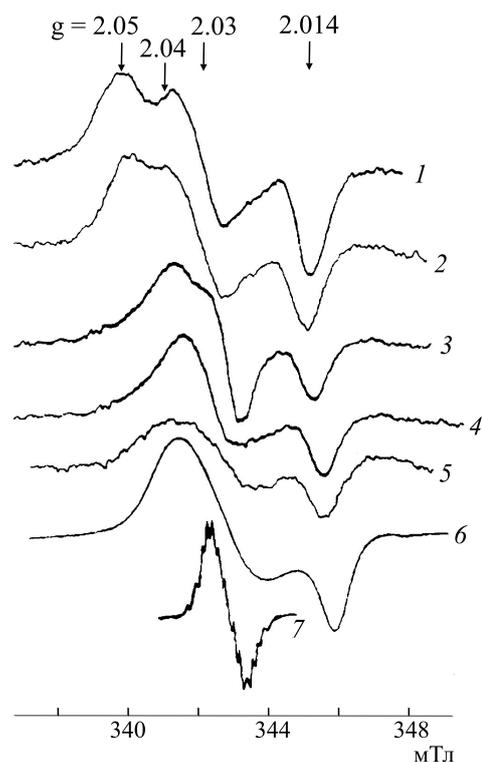


Рис. 2. Сигналы ЭПР растворов БСА, обработанных ДНКЖ с фосфатом (спектр 1); обработанных $\text{Fe}^{2+} + \text{NO}$ (спектр 2); после добавления цистеина к препарату 1 (спектр 3); после вычитания сигнала ЭПР М-ДНКЖ с цистеином (спектр 4) из спектра 3 (спектр 4); после осаждения белка сульфатом аммония (спектр 5); спектры 6 и 7 – сигналы ЭПР М-ДНКЖ с цистеином. Спектры 1–5 и 7 – зарегистрированы при 290 К, спектр 6 – при 77 К [22].

Как указывалось выше, в отсутствие тиолсодержащих лигандов это равновесие неустойчиво из-за быстрого гидролиза катиона нитрозония, превращающегося при сохранении нейтральных значений pH в анион нитрита. Таким образом, инкубация ДНКЖ с анионными лигандами не-тиоловой природы должна приводить к накоплению в растворе анионов нитрита, а также, как уже говорилось выше, к накоплению соответствующих МНКЖ. При включении в М-ДНКЖ тиолсодержащих лигандов, характеризующихся существенно более высоким сродством к катионам нитрозония по сравнению с их сродством к анионам гидроксила [23], катионы нитрозония, высвобождающиеся из М-ДНКЖ, должны связы-



Схема 4. Химическое равновесие между М-ДНКЖ и составляющими их компонентами.

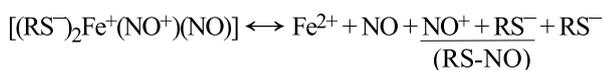


Схема 5. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и составляющими их компонентами.

ваться с тиолсодержащими лигандами с образованием соответствующих устойчивых S-нитрозотиолов (RS-NO) (схема 5). Тем самым должен предотвращаться гидролиз катионов нитрозония.

Таким образом, если схемы 4 и 5, а соответственно и определяющая их схема 1, верны, то опыты, которые продемонстрировали бы появление RS-NO при распаде М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, позволили бы утверждать, что приведенный на схеме 1 механизм образования этих комплексов абсолютно верен.

Такого рода опыты, результаты которых изложены в работах [13, 14, 24, 25], показали, что действительно при кислотном распаде представителей ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами — Б-ДНКЖ с глутатионом (GSH) и Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином (NAC) — обнаруживаются S-нитрозоглутатион или S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеин, причем в количестве, соответствующем включению в эти соединения примерно половины нитрозильных лигандов. Это означает, что в полном соответствии со схемами 4 и 5 половина этих лигандов в Б-ДНКЖ-GSH представлена в форме катионов нитрозония.

Результаты изучения такого рода кислотного распада Б-ДНКЖ-GSH/NAC представлены на рис. 5 и 6. Оказалось, что в отсутствие кислорода в 1.0 мМ растворах Б-ДНКЖ-GSH/NAC при понижении pH этого раствора до 1–2 с последующим прогревом раствора в течение 8–9 мин при 80°C оба Б-ДНКЖ распадались, что сопровождалось появлением нитрозоглутатиона или S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина, в которые включалась примерно половина нитрозильных лигандов комплексов. Такое соотношение количества S-нитрозотиолов и нитрозильных лигандов обнаруживалось при соотношении концентрации свободного (не включенного в Б-ДНКЖ/NAC) глутатиона или NAC и концентрации Б-ДНКЖ, равном 1.5 : 1.

Я подчеркиваю, что этот результат был получен в экспериментах на растворах Б-ДНКЖ-GSH/NAC в анаэробных условиях, исключавших окисление NO, высвобождавшегося из Б-ДНКЖ, до диоксида азота с последующим его превращением в триоксид азота, способным осуществлять реакцию S-нитрозирования.

При повышении этого соотношения Б-ДНКЖ и свободных тиолов в растворе до 2–3 и выше уровень соответствующих S-нитрозотиолов резко снижался. Есть основание предполагать, что это снижение было обусловлено восстановлением до NO катионов нитрозония высвобождающихся из Б-ДНКЖ — предположение, которое в работах [13, 14] подтверждается соответствующими экспериментами. Это восстановление, очевидно, осуществляется свободными тиолами при каталитическом действии ионов железа в растворе.

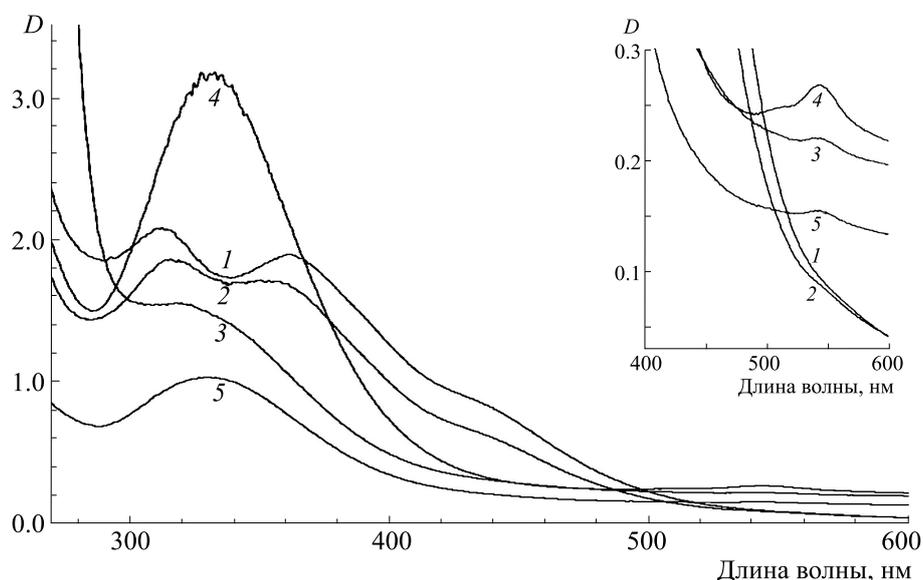


Рис. 3. Спектры поглощения 1 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношениях концентраций NAC и Fe^{2+} , равных 2 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3 и 4 — соответственно спектры поглощения тех же комплексов, подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение 8–9 мин без разбавления [13, 14].

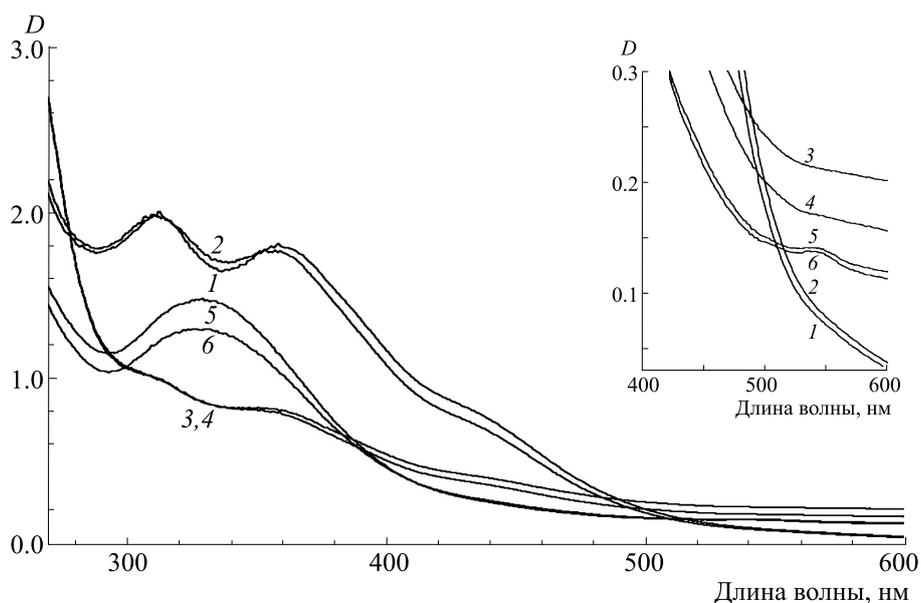


Рис. 4. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ с N-ацетил-L-цистеином, синтезированных при соотношениях концентраций НАС и Fe^{2+} , равных 3 : 1 (кривая 1) или 1.5 : 1 (кривая 2). Кривые 3, 4 и 5, 6 – соответственно спектры поглощения тех же комплексов, разбавленных в два раза [13, 14].

Таким образом, эти результаты однозначно свидетельствуют о наличии в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами катионов нитрозония, высвобождение которых из этих комплексов обнаруживается по их включению в соответствующие S-нитрозотиолы. Иные факты, свидетельствующие об этом, приводятся в наших других работах [26–28].

Как следует из вышесказанного, распад ДНКЖ, не содержащих тиолсодержащих лигандов, должен приводить к накоплению при нейтральных значениях pH анионов нитрита как продуктов гидролиза катионов нитрозония. Это предположение полностью согласуется с результатами опытов, приведенных на рис. 6, на растворах М-ДНКЖ с молекулами воды, полученных

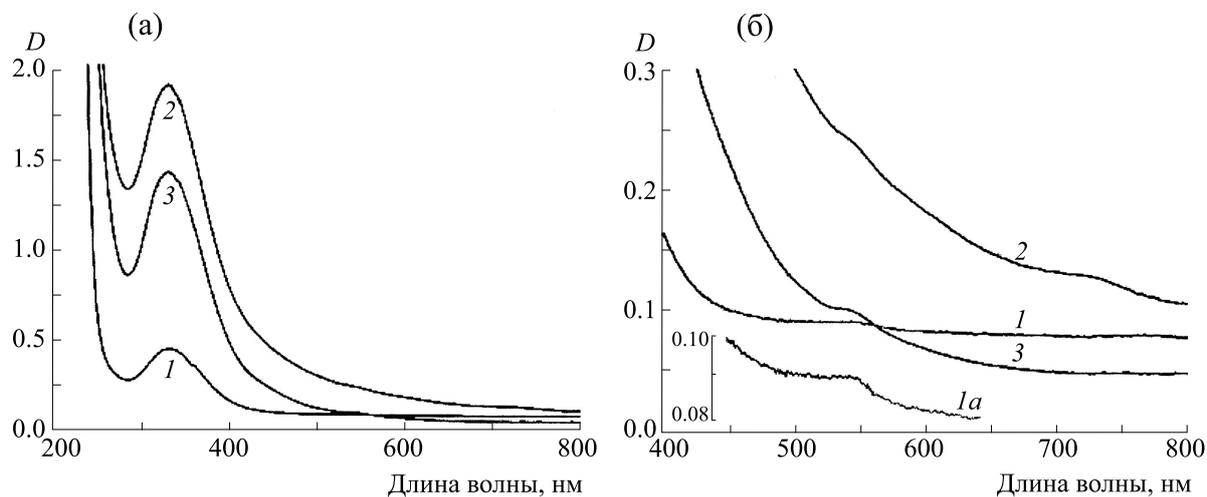


Рис. 5. Образование нитроглютамина как индикатора превращения оксида азота в анионы нитрита, появляющегося при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды. Эти М-ДНКЖ были синтезированы обработкой газообразным NO 30 мМ растворов НЕРЕС-буфера (pH 7.0) с последующим добавлением к ним 20 мМ Fe^{2+} (кривые 2 и 3), затем с откачкой NO и добавлением к растворам 100 мМ глутатиона, резко подкислявшем растворы. Кривая 1 получена аналогичным образом, но при отсутствии Fe^{2+} , (а и б) – запись спектров при разных усилениях спектрофотометра [13, 14, 25].

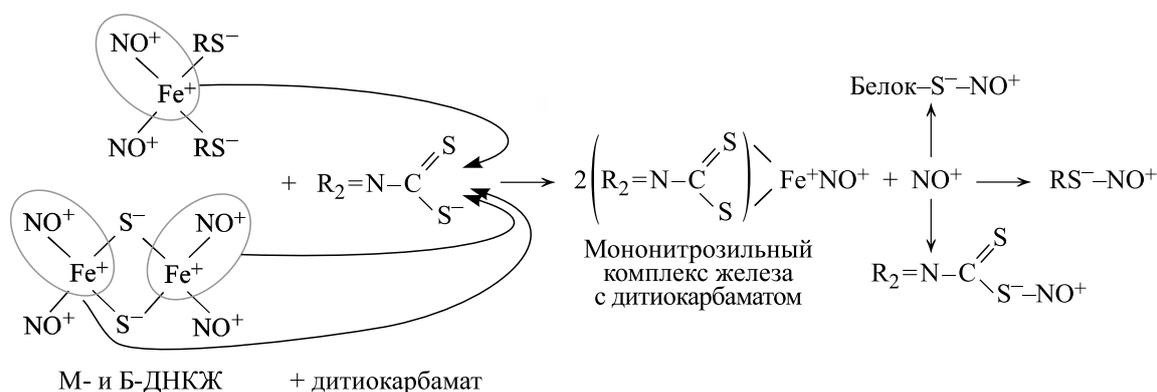


Рис. 6. Механизм превращения Б- и М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД [26–28].

при обработке газообразным NO 20 мМ растворах Fe²⁺ в дистиллированной воде. Эти комплексы полностью распадались в течение 20–30 мин после откачки NO, о чем свидетельствовало исчезновение зеленой окраски раствора и образование выпадающих в осадок гидроокисных комплексов железа. Последующее добавление в этот раствор избытка глутатиона, приводившее к подкислению раствора до pH 1–2, сопровождалось появлением оптического поглощения раствора на 334 нм, характерного для нитрозоглутатиона. Образование последнего, очевидно, было обусловлено связыванием глутатиона с катионами нитрозония, возникавших в качестве компонентов азотистой кислоты, образующейся в результате гидролиза анионов нитрита.

КАТИОНЫ НИТРОЗОНИЯ – НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ КОМПОНЕНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

Как было нами показано, при обработке ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами производными дитиокарбамата – диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глюкаминдитиокарбаматом (МГД) эти агенты перехватывают на себя железо-мононитрозильную [Fe²⁺-NO] группу из железо-динитрозильных [Fe²⁺(NO⁺)(NO)] фрагментов ДНКЖ с образованием сравнительно стойких (не оказывающих биологического действия на клетки и ткани) МНКЖ с ДЭТК или МГД, сопровождающимся, как показано на рис. 6, высвобождением в раствор катионов нитрозония [26–28].

Проведенные нами эксперименты на культуре опухолевых клеток MCF-7 [27] и бактериях *Escherichia coli* [28] показали, что МГД и ДЭТК резко

повышают цитотоксическое действие Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-МС) или Б-ДНКЖ-GSH соответственно на клетки MCF-7 или *E. coli* (рис. 7 и 8). Так, количество клеток MCF-7, подвергшихся апоптозу с последующим летальным исходом, при их контакте с 0.5 мМ М-ДНКЖ-МС возрастало в присутствии 1 мМ МГД с 8 до 80% (рис. 7).

Что же касается бактерий, их интактность, оцениваемая по колониеобразующей активности, снижалась с 50% при введении в культуру 2.5 мМ ДЭТК до 5–10% после добавления 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (рис. 8, столбик 4) [28]. Это снижение, очевидно, было обусловлено высвобождением в культуральную среду только катионов нитрозония. Что касается других потенциально возможных цитотоксических компонентов ДНКЖ – молекул NO и ионов железа, – они оставались прочно связанными с МНКЖ-МГД или МНКЖ-ДЭТК, образующимися при разрушении Б-ДНКЖ-МС или Б-ДНКЖ-GSH соответственно под действием МГД или ДЭТК (рис. 6). Об устойчивости МНКЖ-МГД/ДЭТК свидетельствует тот факт, что они в концентрации 0.5–1.0 мМ не оказывали на клетки никакого цитотоксического действия.

Могли ли молекулы NO и ионы железа, входящие в состав ДНКЖ, оказывать цитотоксическое действие, сопоставимое с цитотоксической активностью катионов нитрозония – на этот вопрос ответ отрицательный. Как было показано в работе [29], оценка цитотоксического действия молекул NO и катионов нитрозония в экспериментах на культуре клеток фибробластов Swiss 3T3 показала, что величина 50%-го цитотоксического действия (IC₅₀) для катионов составила 0.02 мМ против 1.0 мМ для молекул NO. Если же учесть, что в наших опытах на клетках MCF-7 при их обработке смесью Б-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) + МГД (1.0 мМ) (рис. 7б) оба эти агента полностью тра-

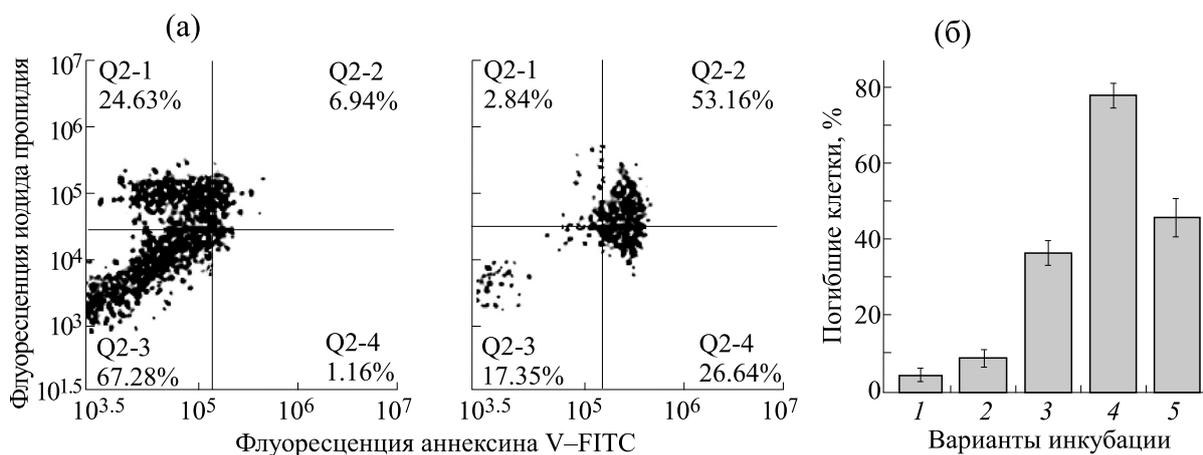


Рис. 7. Гибель клеток MCF-7 при их обработке М-ДНКЖ-МС (0.5 мМ) и МГД (1.0 мМ) (по окрашиванию смеси «аннексин + йодид пропидия»). (а) – 2D-диаграммы, полученные методом флоуцитометрии клеточной культуры. Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ-МС или со смесью Б-ДНКЖ-МС + МГД. (б) – Гибель клеток в процентном отношении: столбик 1 – контроль, столбик 2 – инкубация с Б-ДНКЖ-МС (0.5 мМ), столбик 3 – инкубация с МГД (1.0 мМ), столбик 4 – инкубация со смесью Б-ДНКЖ-МС+МГД, столбик 5 – сумма эффектов Б-ДНКЖ-МС и МГД (столбики 2 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними [27].

тились на образование 0.5 мМ МНКЖ-МГД, то это означает, что гибель 80% клеток была обусловлена 0.5 мМ катионов нитрозония, высвободившихся из 0.5 мМ Б-ДНКЖ-МС.

Что касается цитотоксического действия ионов железа при его высвобождении из ДНКЖ, то, как показали наши исследования такого действия на клетки MCF-7, величина IC_{50} для него составила 2.0 мМ против 0.86 мМ для Б-ДНКЖ-МС (материал готовится к публикации).

Таким образом, есть основание утверждать, что катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, следует рассматривать в качестве наиболее эффективных в цитотоксическом отношении компонентов этих комплексов. Эта активность может быть обусловлена способностью катионов вступать, во-первых, в качестве электрофильных агентов в реакции S- и N-нитрозирования, влияя тем самым на активность тиоловых и аминогрупп в разнообразных белках, а во-вторых, в качестве достаточно сильного окислителя влиять на различные внутриклеточные редокс-процессы [5, 30].

ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ *in vitro* И *in vivo* КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИХСЯ ИЗ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

Группа российских и немецких исследователей из университета г. Майнца (Германия) была первой, кому в экспериментах на культуре опухолевых клеток Jurkat человека, инициирующих лейкемию, удалось продемонстрировать цито-

токсическое действие катионов нитрозония, высвобождавшихся из М-ДНКЖ с тиосульфатом (М-ДНКЖ-ТС) [31]. Как показано на рис. 9а, взятом из их работы, при одновременном введении в культуру клеток 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС и 0.2 мМ МГД количество клеток в состоянии апоптоза достигало 60%. Если же учесть, что все

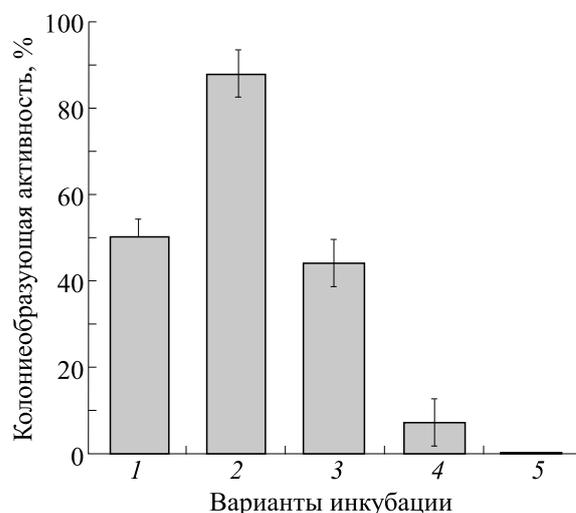


Рис. 8. Влияние на колониобразующую активность бактерий *E. coli* TN530 добавления ДЭТК (2.5 мМ, столбик 1), В-ДНЖ-МС (0.5 мМ, столбик 2), суммарного действия ДЭТК и Б-ДНКЖ-МС при отсутствии взаимодействия между Б-ДНКЖ-МС и ДЭТК (столбик 3), при одновременном введении в культуру Б-ДНКЖ-МС и ДЭТК (столбик 4), при введении Б-ДНКЖ-МС, а через 40 мин – ДЭТК (столбик 5) [28].

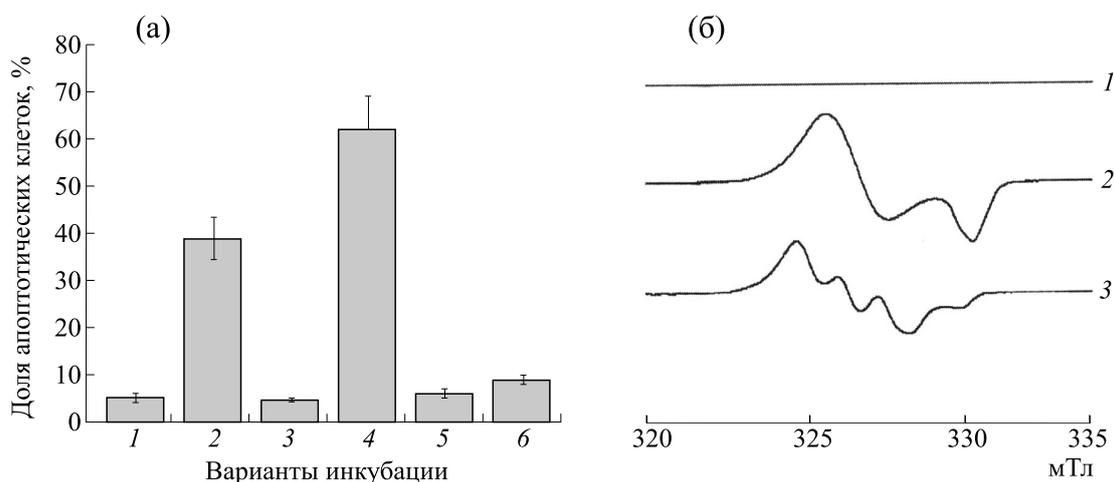


Рис. 9. (а) – Доля (в %) клеток Jurkat в состоянии апоптоза в контроле (столбик 1), после обработки М-ДНКЖ-ТС (столбик 2), М-ДНКЖ+GSH (столбик 3), М-ДНКЖ-ТС + МГД (столбик 4), МГД (столбик 5) и Fe-ТС (столбик 6). (б) – трансформация сигнала ЭПР (сигнал 2), регистрируемого в культуре клеток Jurkat после добавления к ним 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС, в сигнал ЭПР МНКЖ-МГД (сигнал 3) при последующем добавлении к клеткам 0.2 мМ МГД. Сигнал 1 – исходная культура клеток [31].

М-ДНКЖ-ТС при двукратном количестве МГД переходили (как и МГД) в МНКЖ-МГД, 60%-й уровень апоптоза в клеточной культуре был обусловлен только катионами нитрозония, высвободившимися из 0.1 мМ М-ДНКЖ-ТС. ЭПР-измерения показали, что при этом М-ДНКЖ-ТС полностью трансформировались в МНКЖ-МГД (рис. 9б). Эта величина – 60%-й уровень апоптоза, вызванный 0.1 мМ катионов нитрозония, близок к величине IC_{50} , равной 0.02 мМ, полученной в упомянутой выше работе [29], характеризующей цитотоксическую активность NO^+ .

В рассмотренных выше наших публикациях [27, 28] с использованием производных дитиокарбамата для высвобождения катионов нитрозония из ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами мы подчеркивали приоритет авторов работы [31] в таком подходе. Тем не менее, следует подчеркнуть, что эти авторы только показали, что катионы нитрозония могут участвовать в цитотоксическом действии ДНКЖ. Результаты нашего вышеприведенного анализа показывают, что катионы нитрозония могут выступать как наиболее эффективные в цитотоксическом отношении компоненты этих комплексов. Другими словами, в разнообразных проявлениях цитотоксического действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на клетки и ткани определяющим это действие является не NO , а NO^+ -донорная активность этих комплексов.

В свете вышесказанного следует рассматривать и экспериментальные данные, демонстрирующие цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на злокачественные и

незлокачественные опухоли – соответственно перевивные злокачественные опухоли у животных [32–34] и эндометриоидные опухоли у животных при экспериментальном эндометриозе [35–37], полученные в наших работах. Исходя из того, что указанное действие могло быть обусловлено способностью ДНКЖ высвобождать катионы нитрозония, интересными представляются данные о способности ДЭТК самого по себе существенно замедлять развитие одной из перевивных злокачественных опухолей – карциномы легких Льюис. Оказалось, что ДЭТК при пятикратном через каждые трое суток после перевивки опухоли внутрибрюшинном введении в дозе 250 мкМ инициировал почти шестикратное подавление роста опухоли [34]. Не исключено, что этот эффект был обусловлен высвобождением катионов NO^+ из эндогенных ДНКЖ, появляющихся в опухолях при их взаимодействии с активированными макрофагами., способными продуцировать такие комплексы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pathology* (Academic Press, San Diego, USA, 2000).
2. S. A. Lipton, Y.-B. Choi, Z.-H. Pan, et al., *Nature* **364**, 626 (1993).
3. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.* **110**, 2315 (1997).
4. T. K. Watanabe, Y. Ishima, T. Akaike, et al., *FASEB J.* **27**, 391 (2013).
5. Г. И. Бородкин и В. Г. Шубин, *Успехи химии* **86**, 18 (2017).
6. M. N. Hugues, *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 263 (1999).
7. J. S. Stamler, D. J. Singel, and J. Loscalzo, *Science* **258**, 1898 (1992).
8. M. Boese, P. I. Mordvintcev, A. F. Vasnin, et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 2924 (1995).
9. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J. W. Zmiewski, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4671 (2009).
10. M. F. Foster, L. Liu, M. Zhang, et al., *Biochemistry* **48**, 792 (2009).
11. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem.* **5**, 1109 (2018).
12. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
13. А. Ф. Ванин, *Биофизика* **65**, 421 (2020).
14. A. F. Vanin, *Appl. Magnet. Res.* **51**, 851 (2020).
15. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica* **93**, 63 (1983).
16. А. Ф. Ванин, *Биохимия* **60**, 225 (1995).
17. D. R. Truzzi, O. Augusto, and P. C. Ford, *Chem. Comm.* **55**, 9156 (2019).
18. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
19. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 878236 (2011).
20. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2011).
21. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (19), 10356 (2021). DOI: 10.3390/ijms221910356
22. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2**, 224 (1998).
23. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.* **270**, 28158 (1995).
24. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem.* **5**, 1109 (2018).
25. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
26. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
27. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.* **79**, 93 (2021).
28. A. F. Vanin, D. I. Telegina, V. D. Mikoyan, et al., *Cell Biochem. Biophys.* (2022), in press.
29. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.* **111**, 2315 (1997).
30. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
31. A. L. Kleschyov, S. Strand, and S. Schmitt, *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1240 (2006).
32. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65**, 1 (2020).
33. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **66**, 1223 (2021).
34. А. Ф. Ванин, Л. Ф. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **66**, 1217 (2021).
35. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014).
36. A. F. Vanin, E. N. Burgova, and L. V. Adamyan, *Austin J. Reprod. Med. Infertil.* **2**, 1019 (2015).
37. E. N. Burgova, Y. I. Khristidis, A. V. Kurkov, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 69 (2019).

Nitrosonium Cations as the Most Effective Cytotoxic Components of Dinitrosyl Iron Complexes

A.F. Vanin

Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

This work sums up experimental data demonstrating the ability of dinitrosyl iron complexes to donate not only molecular nitric oxide (NO) but also nitrosonium cations (NO^+). These cations are converted via hydrolysis at neutral (physiological) pH values to nitrite anions in the absence of thiol-containing compounds and to S-nitrosothiols in the presence of thiols. The formation of S-nitrosothiols is the very process that determines cytotoxic action of dinitrosyl iron complexes as NO^+ donors in living organisms.

Keywords: nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide

НОВАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ, ОПИСЫВАЮЩАЯ ОКСИГЕНАЦИЮ ГЕМОГЛОБИНА

© 2022 г. И.А. Лавриненко*, Г.А. Вашанов*, Ю.Д. Нечипуренко**, ***

* Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*** Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, ул. Университетская, 33

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 06.04.2022 г.

Принята к публикации 08.04.2022 г.

Предложена модель оксигенации, основанная на уравнении Хилла, где одноименный коэффициент представляет собой функцию от парциального давления кислорода (концентрации лиганда). Показано, что уравнение Хилла с четырьмя параметрами хорошо аппроксимирует экспериментальную кривую диссоциации оксигемоглобина. Данные параметры, а также выводимые из них критерии оценки оксигенации позволяют охарактеризовать положение максимума кооперативности, а также границы минимальных и максимальных значений pO_2 , при котором значение коэффициента Хилла не выходит за установленный предел. Максимумы кооперативности для рассмотренных наборов экспериментальных данных лежат в области больших парциальных давлений кислорода относительно значения p_{50} . Модифицированное уравнение Хилла может быть использовано не только для анализа кислородсвязывающих свойств гемоглобина, но и при решении широкого круга задач, связанных с кооперативностью, в частности, при оценке кинетических кривых ферментативных реакций, различных зависимостях «доза–эффект», а также других приложений.

Ключевые слова: кооперативное связывание лигандов, кривая диссоциации оксигемоглобина, уравнение Хилла, коэффициент Хилла, относительный коэффициент кооперативности.

DOI: 10.31857/S0006302922030036, EDN: AMZWVN

Как известно, функциональная активность белков возникает главным образом с формированием третичной структуры этих биополимеров [1]. Для ферментов, обладающих такой структурой, скорость ферментативной реакции может быть выведена из закона действующих масс и описывается уравнением Михаэлиса–Ментен (1913 г.). Эта скорость характеризуется константой диссоциации фермент-субстратного комплекса (константа Михаэлиса, K_m) [2]. Вместе с тем для миоглобина простетическую группу также можно рассматривать как аналог активного центра фермента, где зависимость степени оксигенации данного гем-белка от парциального давления кислорода (pO_2) определяется уравнением Гюфнера (1890 г.). В этом уравнении величина p_{50} характеризует полунасыщение гембелка кислородом при некотором pO_2 и аналогична K_m [3]. Однако с физиологической точки зрения функционирование ферментов, ограниченных только лишь третичной структурой, не позволяет реализовать более тонкую регуляцию и подстройку с

целью оптимизации согласованного протекания биохимических процессов [4].

Естественный ход эволюции привел к появлению четвертичной структуры ферментов, к которым относится и молекула гемоглобина, обладающая в окисленной форме каталитической активностью [5–11]. Однако уравнения Гюфнера и, в дальнейшем, Михаэлиса–Ментен из-за кооперативного взаимодействия субъединиц не смогли описать оксигенацию или кинетику ферментативной реакции олигомеров. Применительно к гемоглобину Хилл (1910 г.) предложил зависимость, базирующуюся на уравнении Гюфнера, но представляющую оксигенацию как химическую реакцию n -го порядка. Коэффициент Хилла (h), сопряженный с числом субъединиц макромолекулы (n), позволил оценивать степень их кооперативного взаимодействия в составе олигомера [12].

Вместе с тем уравнение Хилла недостаточно хорошо аппроксимирует экспериментальные зависимости, в частности, кривые диссоциации оксигемоглобина, в областях низких и высоких зна-

чений парциального давления кислорода (а в общем случае — концентрации субстрата) [13]. Уравнение Эдера (1925), основанное на идее последовательного присоединения молекул высокой к тетрамеру гемоглобина, обладает высокой аппроксимирующей способностью, в том числе благодаря большому количеству управляющих параметров — четырех равновесных макроскопических констант [14]. Однако это уравнение не дает представление о величине кооперативности, а из его констант неясно, каково при этом значение p_{50} [15]. Полученное Бернардом уравнение оксигенации (1960 г.) [16] основано на представлении об одновременном присоединении двух молекул кислорода и лучше аппроксимирует кривую оксигенации, чем уравнение Хилла. Уравнение имеет два параметра: p_{50} и подгоночный кинетический коэффициент a . Однако и это уравнение не позволяет оценить степень кооперативности молекулы гемоглобина в ходе ее оксигенации.

Хотя уравнение Хилла несколько хуже аппроксимирует экспериментальные данные, чем уравнения Бернарда и Эдера [17], но может характеризовать кооперативность макромолекулы — и потому не утратило своей актуальности. Оно широко используется не только в энзимологии [18], но и в фармакологии [19], задачах моделирования регуляции транскрипции гена [20], а также различных зависимостях типа «доза—эффект» [21].

В настоящей работе предпринята попытка модифицировать уравнение Хилла с целью повышения его аппроксимирующей способности, сохраняя при этом его преимущества в описании кооперативности и простоте вычислений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования была использована модель Хилла и набор экспериментальных данных, полученных Р. Уинслоу с соавт. [22] и Дж. Северингхаусом [23]. Оптимизация параметров моделей проведена методом наименьших квадратов [24]. Оценка степени соответствия модели экспериментальным данным осуществлена через коэффициент детерминации [25]. Необходимые вычисления выполнены в программе MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представление коэффициента Хилла как функции парциального давления кислорода. Как следует из уравнения Хилла:

$$y = \frac{p^h}{p_{50}^h + p^h}, \quad (1)$$

величина h для соответствующей кривой оксигенации имеет постоянное значение и не зависит от степени насыщения гембелка кислородом. В приведенном уравнении: y — степень насыщения гемоглобина кислородом, p — парциальное давление O_2 , p_{50} — давление O_2 , при котором половина макромолекул насыщена лигандом (также известное как константа Хилла K_h [26], аналогично константе Михаэлиса K_m) и h — коэффициент Хилла.

В данной работе мы предлагаем рассматривать коэффициент Хилла как функцию от парциального давления кислорода. Такая зависимость была продемонстрирована авторами работ [27, 28]. Однако функциональная зависимость, позволяющая аппроксимировать эмпирическую кривую, не предлагалась. Следует заметить, что в литературе существует ряд работ, в которых константы связывания макромолекулы рассматриваются как функции от заполнения макромолекулы лигандом [29–31].

Для исходного уравнения Хилла величина h представляется как:

$$h_i = \bar{h} = h_{\max} = \text{const}, \quad (2)$$

где h_{\max} — максимально возможное значение коэффициента Хилла в заданном диапазоне pO_2 , h_i — коэффициент Хилла при определенном pO_2 и \bar{h} — среднее значение коэффициента Хилла.

Мы предлагаем моделировать зависимость коэффициента Хилла от парциального давления кислорода при помощи функции Гаусса:

$$h_i = \frac{h_{\max}}{\exp[(p - p_{50})/s]^2}, \quad (3)$$

где s — параметр масштаба по оси абсцисс.

Так как в уравнении Хилла одноименный коэффициент в отсутствие кооперативности равен единице, то уравнение (3) можно привести к следующему виду:

$$h_{i(-1)} = \frac{h_{\max(-1)}}{\exp[(p - p_{50})/s]^2 + 1}, \quad (4)$$

тем самым смещая аппроксимирующую функцию на единицу по оси ординат.

Логарифмирование оси абсцисс (рис. 1) представляет кривую диссоциации оксигемоглобина практически симметричной относительно p_{50} . Поэтому в выражении (5) используется логарифм давления O_2 :

$$h_{i(-1)} = \frac{h_{\max(-1)}}{\exp[(\ln(p/p_{50})/s)]^2 + 1}. \quad (5)$$

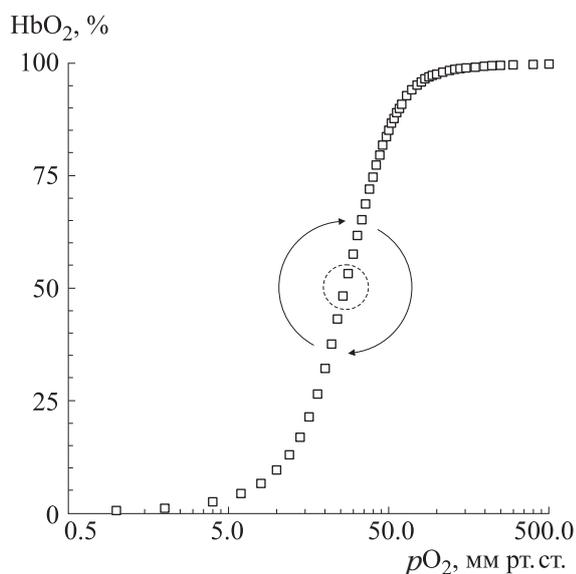


Рис. 1. Экспериментальные точки кривой диссоциации оксигемоглобина по Дж. Северингхаусу [23]: HbO_2 – степень оксигенации гемоглобина, $p\text{O}_2$ – парциальное давление кислорода; стрелками и пунктирным кругом показана точка (p_{50}) центральной симметрии данной кривой.

Таким образом, модифицированное уравнение Хилла имеет три параметра: $h_{\max(-1)}$, $\ln p_{50}$ и s , где $h_{\max} = h_{\max(-1)} + 1$, а $h_i = h_{i(-1)} + 1$.

Принимая во внимание тот факт, что значение давления для h_{\max} не обязано соответствовать величине p_{50} , мы вводим четвертый параметр – $\ln p_{\max}$, парциальное давление кислорода, при котором коэффициент Хилла максимален. При этом выражение (5) трансформируется следующим образом:

$$h_{i(-1)} = \frac{h_{\max(-1)}}{\exp\left[\left(\ln(p/p_{\max})/s\right)^2 + 1\right]}. \quad (6)$$

Оценка эффективности аппроксимации модифицированными уравнениями Хилла. По экспериментальным данным, представленным в работах [22, 23], были получены аппроксимирующие кривые диссоциации оксигемоглобина при помощи уравнений Хилла с двумя (исходное уравнение), тремя и четырьмя параметрами, а также посредством уравнений Бернарда и Эдера.

Для этих уравнений определены коэффициенты детерминации (R^2) (табл. 1 и 2). Ранжирование функций выполнено по степени убывания R^2 . Как следует из представленных данных, уравнение Хилла с четырьмя параметрами ($h_{\max(-1)}$, s , p_{50} и $\ln p_{\max}$) по своим аппроксимирующим свойствам сопоставимо с уравнением Эдера (рис. 2).

Вместе с тем параметры модифицированного уравнения Хилла дают возможность более точно (хотя и формально) описать кооперативность связывания лигандов. Однако и такие общепри-

Таблица 1. Аппроксимирующие кривые диссоциации оксигемоглобина функции, имеющие физический смысл (по экспериментальным данным Р. Уинслоу и др. [22])

№	Уравнение	R^2 , ppm	Число параметров
1	Уравнение Эдера	999953	4
2	Уравнение Хилла (4)	999944	4
3	Уравнение Хилла (3)	999778	3
4	Уравнение Бернарда	999745	2
5	Уравнение Хилла (2)	999603	2

Примечание. Здесь и в табл. 2 значения R^2 приведены в миллионных долях (ppm).

Таблица 2. Аппроксимирующие кривые диссоциации оксигемоглобина функции, имеющие физический смысл (по экспериментальным данным Дж. Северингхауса [23])

№	Уравнение	R^2 , ppm	Число параметров
1	Уравнение Хилла (4)	999943	4
2	Уравнение Эдера	999907	4
3	Уравнение Хилла (2)	999446	2
4	Уравнение Хилла (3)	999377	3
5	Уравнение Бернарда	999376	2

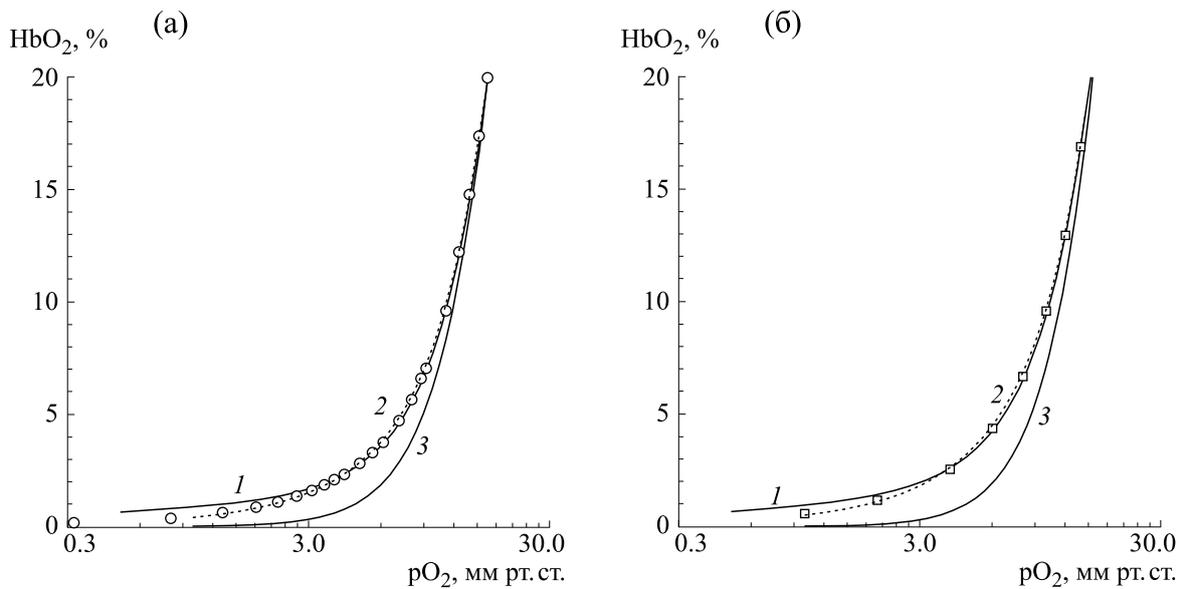


Рис. 2. Аппроксимация экспериментальных точек кривой диссоциации оксигемоглобина: (а) – по Р. Уинслоу и др. [22] уравнением Хилла (4) (кривая 1), уравнением Эдера (кривая 2, пунктирная линия), уравнением Хилла (2) (кривая 3); (б) – по Дж. Северингхаусу [23] уравнением Хилла (4) (кривая 1), уравнением Эдера (кривая 2, пунктирная линия), уравнением Хилла (2) (кривая 3).

нятые константы, как p_{50} (K_h), K_m , EC_{50} [32], IC_{50} [32], являются удобной, но формальной характеристикой оценки полумаксимальной величины соответствующей функции. В принципе, в уравнениях они могут быть заменены на любые константы, выраженные в процентах, например, p_{95} (зарядное напряжение, представленное как константа), или в долях ($1/\exp$, $1/\pi$ и т.д.).

Параметр $h_{\max(-1)}$, переводимый в h_{\max} , позволяет оценить соответственно максимально возможную относительную кооперативность взаимодействия субъединиц, используя уравнение (7) [33]:

$$h_{\max} = \theta(n)(n - 1), \quad (7)$$

где $\theta(n)$ – относительный коэффициент кооперативности, n – число субъединиц олигомера.

Вычисленная разность Δh между h_{\max} и \bar{h} позволяет косвенно охарактеризовать дисперсию кооперативности.

Величина p_{\max} вычисляется экспонированием параметра $\ln p_{\max}$ и отмечает проекцию экстремума на ось абсцисс, для которой по уравнениям (1) и (6) можно найти степень насыщения гемоглобина кислородом. Разность (и ее знак) между p_{\max} и p_{50} указывает на смещение максимума кооперативности и требует физической интерпретации.

При помощи параметра s по формулам (8) и (9) можно оценить минимальное и максимальное

значение диапазона pO_2 (а также его размах ΔpO_2) с заданной долей кооперативности от $h_{\max(-1)}$:

$$pO_{2low} = \exp \left[\ln p_{\max} - s(-\ln \omega)^{1/2} \right], \quad (8)$$

$$pO_{2high} = \exp \left[\ln p_{\max} + s(-\ln \omega)^{1/2} \right], \quad (9)$$

$$\Delta pO_2 = pO_{2high} - pO_{2low}, \quad (10)$$

где pO_{2low} и pO_{2high} – нижняя и верхняя граница значений парциального давления кислорода, за которыми $h_{i(-1)} < \omega h_{\max}$, ω – доля, выражаемая от 0 до 1 (для 0.5 – более известная, как полуширина на полувысоте, *half width at half maximum*).

Приведены параметры уравнений Хилла, характеризующих процесс оксигенации для экспериментальных кривых по данным Р. Уинслоу [22] (табл. 3) и Дж. Северингхауса [23] (табл. 4).

Как следует из табл. 3 и 4, вычисленные параметры и их производные величины дают возможность более детально проводить анализ кислородсвязывающих свойств гембелка. В частности, следует отметить, что положение максимумов кооперативности смещено в сторону более высоких значений парциального давления кислорода. Возможно, это связано с определенной физиологической ролью макромолекулы гемоглобина (это гетеротетрамер, субъединицы которого, несмотря на свою структурную симметрию, обладают функциональной асимметрией). Это предположение подтверждается различием в равновес-

Таблица 3. Значения параметров и их производных, получаемых из уравнений Хилла в различных модификациях (по экспериментальным данным Р. Уинслоу и др. [22])

№	Параметры уравнения	Уравнение Хилла (2)	Уравнение Хилла (3)	Уравнение Хилла (4)
1	p_{50} , мм рт. ст.	28.82*	28.85*	29.08*
2	h (для уравнения Хилла (3) и уравнения Хилла (4): \bar{h})	2.52*	2.26	2.30
3	$h_{\max(-1)}$	—	1.60*	1.66*
4	$h_{\max} (h_{\max(-1)} + 1)$	—	2.60	2.66
5	$\Delta h (h_{\max} - \bar{h})$	—	0.34	0.36
6	p_{\max} , мм рт. ст.	—	—	52.92*
7	s	—	3.11*	3.33*
8	pO_{2low} (для $\omega = 0.99$), мм рт. ст.	—	21.08	37.95
9	pO_{2high} (для $\omega = 0.99$), мм рт. ст.	—	39.32	73.98
10	$\Delta pO_2 (pO_{2high} - pO_{2low})$, мм рт. ст.	—	18.24	36.03
11	HbO ₂ (при p_{\max}), %	—	—	83.10

Примечание. Знаком «*» отмечены подгоночные параметры в соответствующих уравнениях.

Таблица 4. Значения параметров и их производных, получаемых из уравнений Хилла в различных модификациях (по экспериментальным данным Дж. Северингхауса [23])

№	Параметры уравнения	Уравнение Хилла (2)	Уравнение Хилла (3)	Уравнение Хилла (4)
1	p_{50} , мм рт. ст.	26.38*	26.40*	26.82*
2	h (для уравнения Хилла (3) и уравнения Хилла (4): \bar{h})	2.65*	2.60	2.62
3	$h_{\max(-1)}$	—	1.67*	1.82*
4	$h_{\max} (h_{\max(-1)} + 1)$	—	2.67	2.82
5	$\Delta h (h_{\max} - \bar{h})$	—	0.08	0.20
6	p_{\max} , мм рт. ст.	—	—	80.84*
7	s	—	5.94*	3.59*
8	pO_{2low} (для $\omega = 0.99$), мм рт. ст.	—	14.51	56.27
9	pO_{2high} (для $\omega = 0.99$), мм рт. ст.	—	47.73	115.57
10	$\Delta pO_2 (pO_{2high} - pO_{2low})$, мм рт. ст.	—	33.22	59.30
11	HbO ₂ (при p_{\max}), %	—	—	88.16

Примечание. Знаком «*» отмечены подгоночные параметры в соответствующих уравнениях.

ных константах связывания кислорода для этих субъединиц [34].

Видимо, функциональная асимметричность этой макромолекулы не может быть эффективно реализована в случае одинаковых субъединиц (например, в случае гемоглобина H, состоящего только из четырех β -субъединиц) [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена модель оксигенации, основанная на уравнении Хилла, где одноименный коэффициент представляет собой функцию от логарифма парциального давления кислорода (концентрации лиганда). Несмотря на то, что эта функция имеет осевую симметрию относительно миниму-

ма кооперативности, она позволяет улучшить аппроксимирующие свойства базового уравнения Хилла.

Так, уравнение Хилла с четырьмя подгоночными параметрами аппроксимирует экспериментальную кривую диссоциации оксигемоглобина не хуже уравнения Эдера. Данные параметры, а также выводимые из них критерии оценки оксигенации позволяют охарактеризовать положение максимума кооперативности, можно также определить минимальные и максимальные значения pO_2 , для которых значение коэффициента Хилла соответствует заданной доле от его экстремума.

Максимумы кооперативности для рассмотренных наборов экспериментальных данных лежат в области больших парциальных давлений кислорода относительно значения p_{50} . Примечателен тот факт, что степень насыщения гемоглобина кислородом для этих наборов данных сопоставима в максимуме кооперативности.

Таким образом, модифицированное уравнение Хилла может быть использовано не только при анализе кислородсвязывающих свойств гемоглобина, но и при решении широкого круга задач, связанных с кооперативностью [36], в частности, при оценке кинетических кривых ферментативных реакций [37], различных зависимостях «доза—эффект» [38], а также других приложений [39].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. Страйер, *Биохимия* (Мир, М., 1984).
2. L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem. Z.* **49**, 333 (1913).
3. G. Hüfner, *Arch. ges Physiol.* **31**, 28 (1890).
4. П. Хочачка и Д. Сомеро, *Биохимическая адаптация* (Мир, М., 1988).
5. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, et al., *Nature* **185** (4711), 416 (1960). DOI: 10.1038/185416A0
6. M. F. Perutz, *Nature* **228** (5273), 726 (1970). DOI: 10.1038/228726A0
7. R. W. Carrell, C. C. Winterbourn, and J. K. French, *Hemoglobin* **1** (8), 815 (1977). DOI: 10.3109/03630267709003909
8. M. Perutz, *Annu. Rev. Biochem.* **48** (1), 327 (1979). DOI: 10.1146/ANNUREV.BI.48.070179.001551
9. M. F. Perutz, *Quart. Rev. Biophys.* **22** (2), 139 (1989). DOI: 10.1017/s0033583500003826
10. B. Giardina, I. Messana, R. Scatena, et al., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30** (3), 165 (1995). DOI: 10.3109/10409239509085142
11. M. Berenbrink, *Nature* **581** (7809), 388 (2020). DOI: 10.1038/d41586-020-01287-8
12. A. V. Hill, *J. Physiol.* **40**, i (1910).
13. Z. Konkoli, *Theor. Biol. Medical Model.* **8** (1), 10 (2011). DOI: 10.1186/1742-4682-8-10
14. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Jr. Field, *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
15. T. Yonetani, S. I. Park, A. Tsuneshige, et al., *J. Biol. Chem.* **277** (37), 34508 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M203135200
16. S. S. R. Bernard, *Bull. Math. Biophys.* **22**, 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476722
17. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Ю. Сулин и др., *Биофизика* **66** (6) 1065 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106003X
18. A. K. Bordbar, Z. Saadati, and N. Sohrabi, *Acta Biochim. Pol.* **51** (4), 963 (2004). DOI: 10.18388/abp.2004_3529
19. S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, et al., *Fundam. Clin. Pharmacol.* **22** (6), 633 (2008). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
20. H. Aramaki, H. Kabata, S. Takeda, et al., *Genes Cells* **16** (12), 1200 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01563.x
21. S. Srinivasan, F. H. Wagh, S. Idicula-Thomas, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1862** (4), 183242 (2020). DOI: 10.1016/j.bbmem.2020.183242
22. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., *J. Biol. Chem.* **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X
23. J. W. Severinghaus, *J. Appl. Physiol.* **46** (3), 599 (1979). DOI: 10.1152/jappl.1979.46.3.599
24. F. M. Dekking, C. Kraaikamp, H. P. Lopuhaä, et al., *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding Why and How* (Springer-Verlag, Lond., 2005). DOI: 10.1007/1-84628-168-7

25. M. H. Katz, *Multivariable Analysis: A Practical Guide for Clinicians and Public Health Researchers* (Cambridge University Press, Cambridge, 2011). DOI: 10.1017/CBO9780511974175
26. A. G. Marangoni, *Enzyme Kinetics: a Modern Approach* (John Wiley & Sons, New York, 2003).
27. Ч. Кантор и П. Шиммел, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
28. J. Wyman, S. J. Gill, *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley CA, 1990).
29. Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **30**, 231 (1985).
30. А. В. Сиволоб и С. Н. Храпунов, *Биофизика* **34**, 28 (1989).
31. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, А. С. Бучельников и Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **67** (3), 421. (2022).
32. J. B. Chang, K. M. Quinnes, R. Realubit, et al., *Sci. Rep.* **6** (1), 29387 (2016). DOI: 10.1038/srep29387
33. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **67** (2), 229 (2022). DOI: 10.31857/S000630292202003X
34. G. Weber, *Nature* **300** (5893), 603 (1982). DOI: 10.1038/300603a0
35. R. Galanello and A. Cao, *Genet. Med.* **13** (2), 83 (2011). DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468
36. N. Kaihnsa, Y. Ren, M. Safey El Din, et al., *J. Math. Biol.* **81** (4), 1169 (2020). DOI: 10.1007/s00285-020-01540-8
37. J. Ricard and G. Noat, *FEBS J.* **152** (3), 557 (1985). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09231.x
38. T.-C. Chou, *Integr. Biol.* **3** (5), 548 (2011). DOI: 10.1039/c0ib00130a
39. J. J. Maguire, R. E. Kuc, and A. P. Davenport, in *Receptor Binding Techniques*, Ed. by A. P. Davenport (Humana Press, Totowa, NJ, 2012), pp. 31–77. DOI: 10.1007/978-1-61779-909-9_3

New Mathematical Model Describing Hemoglobin Oxygenation

I.A. Lavrinenko*, G.A. Vashanov*, and Yu.D. Nechipurenko**, ***

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

***Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

A model of oxygenation based on the Hill equation is proposed, where the Hill coefficient is a function of the partial pressure of oxygen (ligand binding). It is shown that the Hill equation with four parameters is a reasonable approximation to the experimental curve obtained for oxygen-hemoglobin dissociation. These parameters and the criteria for oxygenation assessment derived from the said parameters make it possible to characterize the maximum cooperativity point, as well as the boundaries of the minimum and maximum pO_2 values at which the values of the Hill coefficient are not outside the limits specified. The maximum cooperativity points for the considered sets of experimental data are in the region of higher oxygen partial pressures relative to the p_{50} value. The modified Hill equation can be used not only for the analysis of the oxygen-binding properties of hemoglobin, but also for carrying out a wide range of tasks that are linked around cooperativity, particularly, for kinetic analysis of enzymatic reactions, various dose-effect relationships, and many others.

Keywords: cooperative ligand binding, oxygen-hemoglobin dissociation curve, Hill equation, Hill coefficient, relative coefficient of cooperativity

УДК 541.11

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫЧИСЛЕНИЙ В ЗАДАЧЕ СТРУКТУРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ УРАВНЕНИЯМИ ДЛЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

© 2022 г. Г.А. Мещеряков*, **, В. А. Зуев*, А.А. Иголкина*, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург,
Политехническая ул., 29

**Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 4

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Структурное моделирование уравнениями — это метод для анализа линейных взаимодействий между наблюдаемыми и латентными переменными, представленными в виде направленного причинно-следственного графа. Он является популярным инструментом в самых различных областях, от гуманитарных до естественно-научных. За последнее десятилетие данный метод стал особенно интересен в областях, находящихся на стыке с биологией. Однако зачастую в биологических данных нарушается распространенное предположение о независимости наблюдений, что необходимо учитывать на этапе построения математической модели. Кроме того, в такой задаче, как, например, полногеномный поиск ассоциаций, время оптимизации параметров модели является особенно критичным фактором. В данной работе предлагается новая модель метода, а также быстрый способ оценки ее параметров.

Ключевые слова: SEM, structural equation modelling, структурное моделирование уравнениями, сетору, квадратуры гаусса, полногеномный поиск ассоциаций.

DOI: 10.31857/S0006302922030048, EDN: ANBULQ

Структурное моделирование уравнениями (Structural Equation Modelling – SEM) — это совокупность подходов к многомерному анализу причинных отношений между наблюдаемыми и латентными переменными. Метод SEM находит применение в широком спектре областей: от психологии и социологии до эконометрики и биологии [1]. Одной из сильных сторон SEM является возможность в явном виде задавать причинно-следственные связи между переменными (или, другими словами, задавать структуру *генеративной модели*), что в случае, если предполагаемые связи соответствуют действительным, увеличивает статистическую мощность модели. Кроме того, зачастую сами причинно-следственные связи являются объектом проверки гипотез, в частности, в гуманитарных исследованиях. Другая сильная сторона SEM — это возможность учитывать в модели латентные переменные. Зачастую, разумное

их добавление позволяет более точно описать процесс *генерации* данных и, как следствие, также повысить статистическую мощность модели.

За последние годы возрос интерес к применению SEM в биоинформатических задачах, от анализа воздействия фотосинтеза в период вегетации на сроки старения листьев [2] до исследования поведения генных сетей у больных шизофренией [3] и применения многоцелевой многолокусной модели, использующей моделирование структурных уравнений для описания сложных ассоциаций между однонуклеотидными полиморфизмами и признаками (multi-trait multi-locus Structural Equation Modelling – mtmlSEM) при полногеномном поиске ассоциаций (Genome-Wide Association Studies – GWAS) [4]. Однако, особенно в последнем случае, применение SEM остается ограниченным ввиду отсутствия возможности учесть общую дисперсию между наблюдениями, т. е. отбросить предположение о независимости наблюдений, свойственное большинству линейных моделей (и являющимся одним из условий теоремы

Сокращения: SEM — структурное моделирование уравнениями, GWAS — полногеномный поиск ассоциаций, LMM — смешанная линейная модель, GP — гауссов процесс.

Гаусса–Маркова о независимости ошибок). Взаимозависимость в данных может быть обусловлена либо наличием генетического родства между образцами и/или их географической близостью. В первом случае, применительно к GWAS, существуют известные подходы на основе смешанной линейной модели (Linear Mixed Model – LMM) [5], а во втором – более общие методы на основе гауссовых процессов (Gaussian Process – GP). Тем не менее, ни LMM, ни GP не обобщены на случай SEM и работают лишь с простейшими линейными моделями.

Такие задачи, как GWAS, требуют высокую скорость работы программ ввиду необходимости обработки больших массивов данных (десятки и сотни тысяч однонуклеотидных полиморфизмов,

сотни образцов). В настоящей работе показано, что в общем случае сложность работы алгоритма оптимизации зависит кубически от количества образцов и использование алгоритма в такой форме представляется долгим процессом. Таким образом, целью данной работы являлось: 1) разработать SEM-модель, способную работать с зависимыми данными подобно LMM/GP; 2) добиться меньшей асимптотической сложности, нежели $O(n^3)$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Была взята модель из программного обеспечения **semopy** [6]:

$$\begin{cases} H = BH + RG + E, E \sim MN(0, \Psi, I_n) \\ P = \Lambda H + \Pi G + \Delta + U, \Delta \sim MN(0, \Theta, I_n), U \sim MN(0, D, J + K) \end{cases} \quad (1)$$

где P – матрица фенотипов; H – матрица латентных переменных; G – матрица генотипов/однонуклеотидных полиморфизмов; B, Λ, Π, R и Θ, Ψ, D, K – параметризованные матрицы загрузок и ковариаций соответственно (подробнее см. в исходной работе по mtmlSEM [4]), а MN – матрично-нормальное распределение [7]. В отличие от оригинальной модели **semopy** мы, во-первых, перешли от векторной нотации к матричной, а во-вторых, ввели слагаемое U , названное матрицей *случайных эффектов* (англ. *random effects*), контролирующей общую дисперсию между наблюдениями (таким образом, после вычета U из P можно сказать, что наблюдения становятся независимыми). P как сумма линейных трансформаций матрично-нормальных случайных величин также будет матрично-нормальной случайной величиной, и для оценки параметров в матрицах $B, \Lambda, \Theta, \Psi, K$

можно воспользоваться методом максимального правдоподобия.

Опуская прочие выкладки и выразив P из модели (1):

$$P = \Lambda C(RG + E) + \Pi G + \Delta + U, \quad (2)$$

где $C = (I - B)^{-1}$, посчитав $M = E[P]$:

$$M = (\Lambda CR + \Pi)G, \quad (3)$$

$V = \text{cov}[P]$:

$$V = \text{tr}\{\Sigma\} I_n + \text{tr}\{D\}K, \quad (4)$$

где $\Sigma = \Lambda C \Psi C^T \Lambda^T + \Theta$, и $T = \text{cov}[P^T]$:

$$T = n\Sigma + \text{tr}\{K\}D, \quad (5)$$

а затем подставив выражения (3)–(5) в логарифм функции плотности матрично-нормального распределения и помножив на -1 , получим следующую функцию цели:

$$L(.) = \text{tr}\{V^{-1}(Z - M)^T T^{-1}(Z - M)\} + m \ln|V| + n \ln|T|, \quad (6)$$

где m – число фенотипов. Минимизация выражения (6) дает оценку параметров модели методом максимального правдоподобия. Однако, как видно из выражения, при каждом вызове целевой функции n необходимо считать V^{-1} (размерность $V - n \cdot n$, где n – число наблюдений), а операция

обращения матрицы занимает $O(n^3)$ операций в общем случае.

Прежде всего заметим, что на практике очень важно найти правильную форму матрицы K , так как она определяет поведение слагаемого U . Ясно, что в общем случае K не может быть полно-

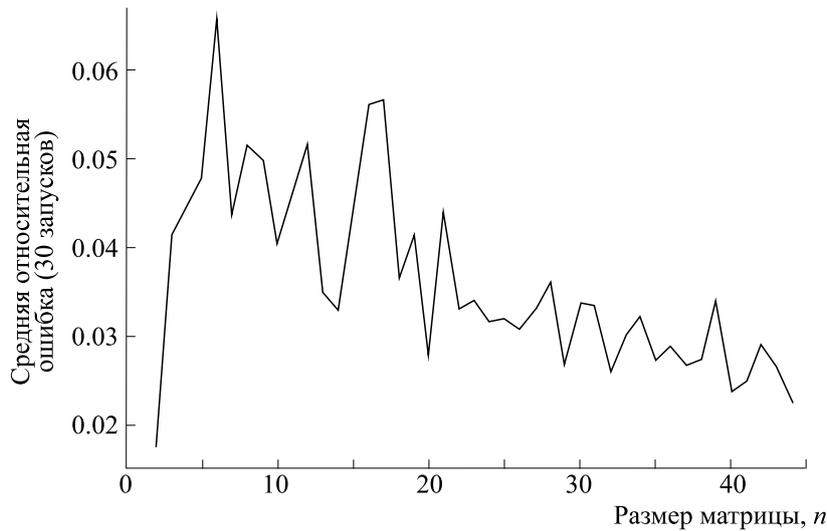


Рис. 1. Зависимость средней относительной точности от размера матрицы n .

стью параметризованной (так как в таком случае число параметров будет порядка n^2 , что намного больше, чем число имеющихся наблюдений), и мы вынуждены ограничены в свободе выбора K . Иногда мы можем работать с полностью определенной K . В частности, так делают при необходимости учета генетического родства, когда в наличии имеется матрица генотипов G , а K считается как ковариационная матрица по G [8]. Тогда, используя спектральное разложение K , имеем:

$$K = QSQ^T. \tag{7}$$

После этого, повернув данные на Q , при подсчете выражения (4) видим, что от K остается только S , и V приобретает диагональную форму, обращение которой занимает $O(n)$ операций. Схожий подход использует инструмент для GWAS FastLMM [5].

Однако зачастую мы не можем знать K точно. Например, если мы хотим учесть сродство, обусловленное географическим положением образцов, то, подобно тому, как это часто делают в GP [9], применяют ядро Матерна для подсчета ковариации между различными географическими точками:

$$cov(i, j) = \frac{2^{1-\nu}}{\Gamma(\nu)} \left(\sqrt{2} \frac{d_{ij}}{\rho} \right)^\nu K_\nu \left(\sqrt{2} \frac{d_{ij}}{\rho} \right), \tag{8}$$

где ν и ρ – параметры, которые необходимо оценить, а d_{ij} – расстояние между двумя точками. Так, учитывая то, что ν и ρ различны на каждом шаге оптимизационного алгоритма, разложение (7) необходимо делать каждый раз, равно как и поворот данных на новое Q , что делает данный подход полностью бессмысленным. К сожалению, в общем случае, невозможно обрабатывать K быстрее чем за $O(n^3)$, но возможно считать «сложные» члены выражения (6) приближенно. В основе вычислительной схемы лежит процедура Гаусса–Ланшоца [10], ранее адаптированная к LMM [11, 12] и находящая применение у GP в рамках программного обеспечения LanczOs Variance Estimates [13]. Процедура Гаусса–Ланшоца позволяет приблизительно оценить квадратичную форму матрицы $f(A)$, где f – любая матричная аналитическая функция, без подсчета f (так, например, $f(A) = A^{-1}$). Отбрасывая выкладки и детали, укажем, что процедура основана на стохастической оценке следа (так называемый трюк Хатчинсона):

$$\forall x : E[x] = 0, E[x^T x] = 1 : E[x^T f(A) x] = tr\{f(A)\} \approx \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L x_i^T f(A) x_i, \tag{9}$$

и представлении его через интеграл Римана-Стилтьеса:

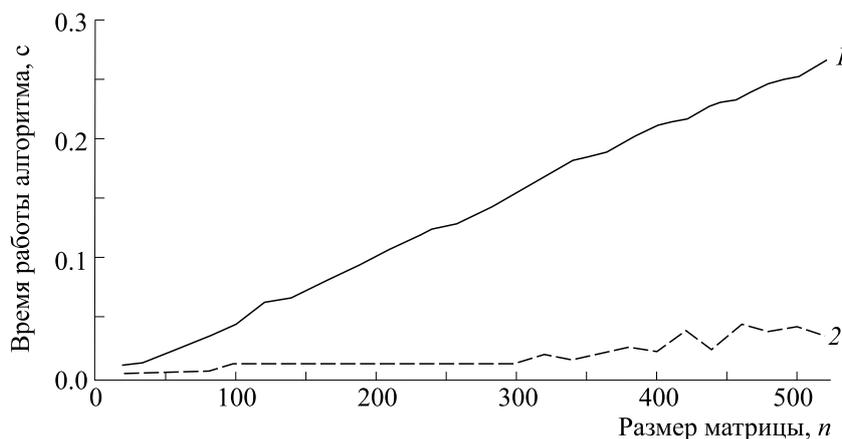


Рис. 2. Зависимость времени работы алгоритма в секундах от размера матрицы n : 1 – подсчет по модели (1), 2 – подсчет по предложенному авторами методу.

$$x^T f(A)x = x^T f(Q^T S Q)x = x^T Q^T f(s) Qx = \sum_{i=1}^n f(s_i) \mu_i^2 = \int_{s-n}^{s-1} f(t) d\mu(t) \approx \sum_{i=1}^v w_i f(b_i). \quad (10)$$

Выражение (10) считается приближенно квадратурами посредством ортогональных полиномов Гаусса–Ланшоца. Чем выше L в выражении (9), тем больше точность алгоритма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенная модель (1) была успешно реализована и интегрирована в программное обеспечение **semory** (см. сайт semory.com). Используемая вычислительная схема дает приемлемую точность (средняя относительная ошибка не превышает 1% уже при $L = 3$, см. рис. 1) при значительно меньшем времени работы (см. рис. 2). Кроме того, предложенная модель легко расширяется на случай нескольких случайных эффектов с различными K , что дает возможность одновременно учитывать генетическую и географическую родственность образцов данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-13033).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. А. Иголкина и М. Г. Самсонова, *Биофизика* **63** (2), 139 (2018).
2. X. Lu and T. F. Keenan, *Global Change Biology* **28** (9), 3083 (2022).
3. A. A. Igolkina, C. Armoskus, J. R. Newman, et al., *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 00192 (2018).
4. A. A. Igolkina, G. Meshcheryakov, M. V. Gretsova, et al., *BMC Genomics* **21**, 490 (2020).
5. C. Lippert, J. Listgarten, Y. Liu, et al., *Nat. Methods* **8**, 833 (2011).
6. A. A. Igolkina and G. Meshcheryakov, *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal*, **27** (6), 952 (2020).
7. A. K. Gupta and D. K. Nagar, *Matrix Variate Distributions* (Routledge, 1999).
8. J. Goudet, T. Kay, and B. S. Weir, *Mol. Ecol.* **27** (20), 4121 (2018).
9. C. E. Rasmussen, *Gaussian Processes in Machine Learning* (Springer, Berlin, 2003).
10. S. Ubaru, J. Chen, and Y. Saad, *SIAM J. Matrix Analysis and Applications* **38**, 1075 (2017).
11. R. Border and S. Becker, *BMC Bioinformatics* **20**, 411 (2019).
12. Г. А. Мещеряков, в сб. *Тезисы XXI Всерос. конф. молодых ученых по математич. моделированию и информационным технологиям* (2020), сс. 27–28.
13. G. Pleiss, J. Gardner, K. Weinberger, and A. Willson, In *Proc. Int. Conf. Machine Learn.* (2018). DOI: 10.48550/arXiv.1803.06058

Optimization of Computations for Structural Equation Modeling with Applications in Bionformatics

G.A. Meshcheryakov*, **, V.A. Zuev*, A.A. Igolkina*, and M.G. Samsonova*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Structural Equation Modeling (SEM) is a technique for analysis of linear relations represented as the causal and correlational relationships between observed and latent variables. SEM is a popular tool in a wide range of fields, from the humanities to the natural sciences. Over the past decade, this method has become especially interesting in areas that are at the interface with biology. However, a common assumption that observations are independent is often violated in biological data; it should be taken into account at the stage of constructing a mathematical model. In addition, in genome-wide association studies, the time of optimization of model parameters is a particularly critical factor. In this paper, we propose a new SEM model, as well as a fast way to estimate its parameters.

Keywords: SEM, structural equation modeling, semopy, Gauss quadrature, genome-wide association studies

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В РАСТВОРЕ И НА МИКРОЧИПАХ

© 2022 г. Ю.Д. Нечипуренко*, **, А.С. Бучельников**

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: nech99@mail.ru

**Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, ул. Университетская, 33

Поступила в редакцию 02.04.2022 г.

После доработки 02.04.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Многие процессы в живой клетке включают в себя равновесное связывание лигандов (белков, биологически активных соединений и олигонуклеотидов) с нуклеиновыми кислотами. Модели и методы теории физической адсорбции позволяют количественно описать такое связывание в случае, когда лиганд занимает протяженный участок на ДНК и когда существуют кооперативные взаимодействия между адсорбированными молекулами лиганда. Применение модели Изинга позволяет построить решение уравнений адсорбции в самом общем виде, для широкого класса систем. Физико-химические эксперименты в модельных системах *in vitro*, где присутствуют, с одной стороны, такие биологические макромолекулы как белки, сложные белковые комплексы, полимеры РНК и ДНК, а с другой — малые молекулы лигандов, позволили пролить свет на множество механизмов, лежащих в основании клеточных процессов. Диаграммы футпринтинга или данные, полученные на микрочипах, позволяют получить детальную информацию о системе, где происходит связывание лигандов с ДНК. Краткий обзор теоретических исследований в этой области содержится в данной работе. Описано, как можно использовать расчеты энтропии адсорбционной системы, чтобы представить происходящие в ней процессы кооперативного связывания. В приложении дана методика анализа связывания на микрочипах.

Ключевые слова: связывание белков с ДНК, кооперативные взаимодействия, изотермы адсорбции, модели адсорбции, модель Изинга, микрочип.

DOI: 10.31857/S000630292203005X, EDN: ANDOHM

Развитие экспериментальных методов анализа связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами после открытия структуры ДНК привело к появлению сотен теоретических работ, в которых рассматривалось связывание лигандов с линейными полимерами. Подходы статистической термодинамики к данным системам были применены впервые в работах Д. Брэдли и С. Лифсона [1] и С. Латта и Х. Собера [2]. Уравнения адсорбции, описывающие связывание лигандов, получили широкое распространение после работы Д. Крозерса [3] (следует заметить, что с точки зрения статистической термодинамики задача адсорбции протяженного лиганда на линейном полимере принадлежит классу решеточных моделей, и здесь впервые решение получено Л. Тонксом еще в 1936 г. [4]).

Важный этап развития теории адсорбции связан с учетом кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами. Кооперативность может быть обусловлена, например, контактными взаимодействиями между лиганда-

ми, которые занимают на полимере соседние центры связывания. Лиганды при связывании на макромолекуле могут как способствовать связыванию, так и препятствовать ему, в первом случае говорят о положительной кооперативности, во втором — об отрицательной кооперативности или антикооперативности взаимодействия. Описание систем, в которых наблюдаются кооперативные взаимодействия, было проведено впервые в работах [5, 6]. Г.В. Гурский, А.С. Заседателёв и М.В. Волькенштейн решили ряд теоретических задач, которые позволили описывать связывание биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами при помощи систем алгебраических уравнений и рекуррентных соотношений. Описанию кооперативного связывания лигандов с ДНК была посвящена также работа Дж. МакГи и П. фон Хиппеля [7]. В этой работе были наглядно истолкованы полученные Заседателевым с соавторами уравнения для простейшего случая контактных кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами.

В конце 70-х годов XX века двумя группами исследователей был обнаружен аллостерический эффект ДНК — возможность распространения вдоль ДНК кооперативных взаимодействий между адсорбированными лигандами. В работах отечественных исследователей этот эффект называли дальнедействием и описывали при помощи потенциала кооперативных взаимодействий [8, 9]. Аллостерические взаимодействия лежат в основании механизмов регуляции генов (см., например, работы [10–13]).

Дальнейшее развитие теории адсорбции в применении к связыванию лигандов с нуклеиновыми кислотами позволило учесть ситуации, когда лиганды образуют различные типы комплекса или связываются на ДНК в различных ориентациях [14, 15]. В русле этого подхода для широкого класса адсорбционных задач применялась одномерная модель Изинга [16]. Заметим, что эта модель для описания ферромагнетизма была предложена в 1920 г. В. Ленцем [17]. Э. Изинг смог найти решение уравнений, которые возникают в соответствующей этой модели математической задаче (поэтому в ряде источников используется название «модель Ленца–Изинга») [18]. Использование математического решения задачи адсорбции для этой модели позволило получить систему уравнений адсорбции в самом общем виде [16, 19, 20].

Заседателев, Гурский и Волькенштейн получили уравнения, описывающие кооперативное связывание протяженного лиганда на полимере, однако они не рассматривали дисперсию адсорбции (так как воспользовались приближением «бесконечного полимера»). Позже И. Эпштейн показал, что приближение бесконечного полимера хорошо описывает ситуацию, когда длина полимера уже в десяток раз превышает длину лиганда [21]. В ряде работ было показано, что дисперсия адсорбции может быть весьма информативной характеристикой системы [22–25].

При связывании на матрицах нуклеиновых кислот может быть задействовано одновременно несколько систем реакционных центров: в живой клетке с одноплетевыми и двуплетевыми участками молекул ДНК и РНК связывается большое число различных соединений. В монографии [26] рассматривается как конкуренция лигандов за одни и те же связывающие места, так и координация при связывании лигандов на одной или двух системах реакционных центров. Эта работа в некотором смысле содержит итог развития теории адсорбции в применении к описанию связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами с 70-х годов прошлого века, в нее вошли как оригинальные работы, так и ряд обзоров [27, 28].

СВЯЗЫВАНИЕ ПРОТЯЖЕННЫХ ЛИГАНДОВ НА ПОЛИМЕРЕ

Пусть в растворе при постоянной температуре и постоянном давлении находятся молекулы лиганда и молекулы полимера с адсорбированными лигандами. С точки зрения физики процесс обратимого связывания лигандов на поверхности макромолекулы представляет собой явление физической адсорбции и относится к классу решеточных моделей: решетка-полимер состоит из реакционных центров (сайтов), которые могут связывать лиганд [26, 29].

Обозначим число лигандов, адсорбированных на полимере в равновесии, как q , а длину полимера — N . Предположим, что лиганд протяженный, то есть он при связывании закрывает L звеньев полимера, делая их недоступными для связывания других молекул лиганда.

В случае $L \ll N$ заполнение полимера лигандом r (которое определяется как q/N) и концентрация свободного лиганда в растворе x связаны следующим соотношением [5]:

$$\frac{r}{Kx} = \left(\frac{1-rL}{1-rL+r} \right)^L (1-rL+r), \quad (1)$$

где K — равновесная константа связывания лиганда с одним связывающим местом на полимере.

Модель, описывающая связывание протяженного лиганда на полимере, рассматривалась и до работ Заседателева с соавторами, соответствующие уравнения были получены ранее в работах [1–3], однако эти уравнения имели другую, параметрическую форму записи. Уравнение (1) можно назвать центральным уравнением в теории адсорбции протяженных лигандов. В англоязычной литературе за ним закреплено имя «уравнение МакГи–фон Хиппеля», так как эти авторы объяснили смысл данного уравнения при помощи условных вероятностей. Однако первыми в таком виде уравнения записали отечественные исследователи (как и уравнения, описывающие кооперативные взаимодействия [5]). Позже было показано, что уравнение (1) может быть использовано для построения асимптотического метода анализа изотерм адсорбции и для классификации моделей адсорбции [26, 30].

Интерпретировать уравнения адсорбции в рамках вероятностного подхода можно следующим образом (см., например, работу [26]). Рассмотрим полимер с адсорбированными лигандами как результат проведения схемы испытаний Бернулли с двумя исходами. Введем в рассмотрение вероятность встретить в последовательности из свободных звеньев полимера и адсорбированных лигандов свободное звено (не закрытое лигандом):

$$P = \frac{1 - rL}{1 - rL + r}. \quad (2)$$

Тогда уравнение (1) можно записать в следующем виде:

$$\frac{1}{Kx} = \frac{P^L}{1 - P}. \quad (3)$$

Параметр P изменяется от 0 до 1, и если задать значение этого параметра, то можно из уравнений (2) и (3) легко найти значения x и r и построить изотерму адсорбции.

Вероятностная интерпретация уравнения (1) заключается в том, что правая часть уравнения соответствует относительному числу свободных связывающих мест на полимере с адсорбированными лигандами (одно место составляют L расположенных подряд не закрытых лигандом звеньев полимера). Величина r дает относительное число адсорбированных лигандов. В таком случае уравнение (1) можно рассматривать как уравнение химического равновесия для лиганда длины L .

В реальной ситуации полимер имеет не бесконечную длину, благодаря этому в системе наблюдается дисперсия: разные полимеры в растворе несут разное число адсорбированных лигандов. Ранее было показано, как построить схему испытаний Бернулли и оценить сходимость величины q/N к значению r . Эту величину можно интерпретировать как вероятность события, что определенное звено полимера занято лигандом [26].

Заметим, что уравнения (1)–(3) являются довольно простыми алгебраическими уравнениями, и при усложнении моделей адсорбции — учете образования разных типов комплекса и кооперативных взаимодействий — вместо уравнений (1)–(3) появляется более сложная система уравнений (см., например, работы [19, 26, 31, 32]).

Отдельно следует упомянуть об избирательном связывании лигандов с ДНК, когда разным связывающим местам соответствуют разные энергии связывания. В этом случае принято говорить о связывании на гетерополимере. Для описания такого связывания вместо одной константы химического равновесия K , описывающей связывание лиганда с единичным связывающим местом на ДНК, вводят в рассмотрение набор констант $\{K_i\}$ и набор соответствующих изменений свободной энергии Гиббса $\{\Delta G_i\}$, которые связаны соотношением $K_i = \exp(-\Delta G_i/RT)$. Анализ связывания и расчет уравнений адсорбции в этом случае удобно проводить при помощи построения большой статистической суммы адсорбционной системы или с использованием метода рекуррентных соотношений [6]. Пример применения модели адсорбции лигандов на гетерополимере приведен в «Приложении».

Наиболее полную информацию об избирательном связывании лигандов на разных местах ДНК дают диаграммы футпринтинга, на которых представлены данные о том, как связанный лиганд закрывает отдельные межуэотидные связи в ДНК от расщепления разного рода агентами. Ранее в работах [33, 34] было показано, как можно рассчитывать такие диаграммы и сравнивать результаты с экспериментальными данными в работах (см. также монографию [26], где данному анализу посвящена отдельная глава).

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕОРИИ АДсорбЦИИ ДЛЯ ОПИСАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Математические модели позволяют количественно описать процессы, происходящие в живой клетке и в модельных системах при связывании лигандов с ДНК. Кооперативные взаимодействия между лигандами были обнаружены и описаны в работах [9, 10, 26, 35]. Позже были получены данные, подтверждающие участие таких взаимодействий в процессах генетической регуляции, и Д. Крозерс уделил этому особое внимание [36] (см. также специальный номер журнала «Biopolymers», посвященный его памяти [37]).

Методы статистической термодинамики применялись для анализа широкого класса систем: рассматривалось связывание белков и антибиотиков с ДНК [38], проводился анализ расположения нуклеосом на сателлитной ДНК [39], было описано связывание матричной РНК с рибосомальными РНК в составе рибосомы [40]. Также эти методы были использованы для анализа кооперативных взаимодействий лигандов с рибосомой [41, 42], для описания шума экспрессии генов [25, 43], для анализа вхождения малых РНК в комплекс РНК-индуцированного сайленсинга генов RISC [44] и анализа данных по связыванию олигонуклеотидов на микрочипах [29, 45–49].

Множество работ в области применения теории адсорбции к описанию связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами контрастирует с отсутствием обобщающих монографий в этой области. Хотелось бы видеть современные труды, где были бы описаны разные аспекты такого связывания, подобно тому, как описано связывание лигандов с белками в монографии Дж. Ваймана и С. Гилла [29]. В одной из глав монографии Г. Стормо рассматриваются термодинамические аспекты связывания белков с ДНК [50], однако в ней нет систематического изложения методов анализа такого связывания.

Заметим, что относительно недавно вышел ряд работ, в которых содержится описание систем, где связывание лигандов с матрицами нуклеиновых кислот происходит по новым схемам

(см., например, работы [51, 52]). Развита новая модель адсорбции, получены уравнения связывания. В монографии [26] такие модели впервые изложены системно: с единой точки зрения впервые описана совокупность методов и подходов статистической термодинамики, позволяющих анализировать системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами *in vitro*. На ряде примеров показано, как такие подходы работают, какие параметры связывания они позволяют оценить.

Методы анализа данных в области теории адсорбции дают в руки исследователя разнообразный теоретический «инструментарий», позволяющий анализировать как реальные биологические системы, так и модельные системы, в которых изучается связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами. Примером такого инструментария является модель Изинга, которая хорошо известна в самых разных приложениях статистической физики. Любопытно, что развитие теории связывания лигандов с двумерными платформами микрочипов закономерно привело к применению двумерной модели Э. Изинга [29, 45–49].

Детальный анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами содержится в работах М.П. Евстигнеева с соавторами [53–55], отдельно следует упомянуть оригинальную концепцию интерцепторно-протекторного действия ДНК-связывающих лигандов [53], развиваемую этими авторами.

Обширный класс фундаментальных и прикладных задач молекулярной биофизики можно решать при помощи теории адсорбции. Любопытны новые подходы, которые позволяют связать адсорбцию с конденсацией ДНК [56–60] и с плавлением ДНК (см., например, работу [61]), исследовать противовирусную активность лигандов (см., например, работу [62]), связывание лигандов с квадруплексами [63–65]. Особый интерес представляют работы, в которых изучается кооперативное связывание белков с ДНК (см., например, работу [66]).

Статистическая термодинамика, описывающая связывания лигандов с ДНК и РНК, находится на переднем крае науки, в области развития новых технологий постгеномной эры. Модели адсорбции оказываются необходимыми и востребованными в анализе экспериментов по футпринтингу [33, 34], в объяснении экспериментов по гибридизации геномных ДНК и РНК на микрочипах [67], в описании регуляции экспрессии генов при помощи малых РНК (см., например, работу [44]), при конструировании новых лекарственных соединений и создании биосенсоров [47, 51] — т. е. во многих областях молекулярной биологии и биотехнологии. В связи с развитием

новых методов и технологий в молекулярной биологии появилась надежда решить и фундаментальные задачи: разобраться в том, как работают факторы транскрипции, малые РНК и лекарственные соединения, которые регулируют процессы экспрессии генов. Теоретические и экспериментальные методы, разработанные за последние годы, дают возможность вплотную подойти к решению этих задач. Заметим, что концептуально молекулярная биология уже созрела для количественного подхода к описанию регуляции генов (см., например, работу [68]) и, как мы отмечали во «Введении», аллостерические взаимодействия между лигандами могут играть важнейшую роль в такой регуляции [69].

Для строгого термодинамического описания кооперативного связывания необходимо понимание того, как изменяются функции состояния адсорбционной системы, среди которых ключевую роль, по нашему мнению, играет статистическая, или конфигурационная, энтропия. Рассмотрим далее, как описанный формализм можно применить для расчетов энтропии на примере простейшей модельной системы, в которой существуют кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЭНТРОПИЯ ПРИ ОПИСАНИИ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Ниже мы постараемся изучить поведение статистической энтропии на простом примере адсорбции малых молекул на линейном полимере и показать, что расчеты энтропии позволяют пролить свет на происходящие в системе процессы. Заметим, что данный обзор концептуально связан с работой [70], вышедшей пять лет назад. В настоящей публикации мы расширили и обновили список литературы, а также включили расчеты конфигурационной энтропии [71].

В дополнение к величинам K и x , введенным выше при рассмотрении модели адсорбции лигандов на гомополимере, обозначим через ω параметр кооперативности. Значения $\omega < 1$ соответствуют отрицательной кооперативности, или антикооперативности; при $\omega = 1$ адсорбция некооперативна, параметр $\omega > 1$ соответствует положительной кооперативности [72].

Все термодинамические параметры системы, в том числе статистическую энтропию, можно рассчитать, зная большую статистическую сумму системы Ξ_N . Существует несколько методов нахождения большой статистической суммы системы, в которой происходит адсорбция лигандов на полимерной решетке. Среди них матричный [18] и комбинаторный [73] методы являются наиболее известными.

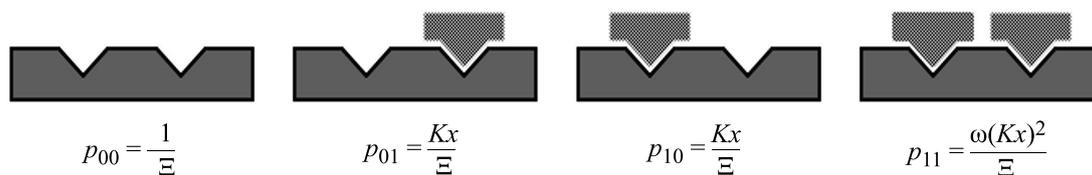


Рис. 1. Показаны разные состояния простейшей решетки и соответствующие им вероятности.

Рассмотрим простейшую систему с полимером, имеющим только два центра связывания ($N = 2$). Большая статистическая сумма такой системы может быть записана следующим образом:

$$\Xi = 1 + 2Kx + \omega(Kx)^2.$$

Определим статистическую, или конфигурационную энтропию исследуемой системы как меру неопределенности, возникающую при адсорбции лигандов на решетке. Действительно, если известно, что на одной решетке связан один лиганд, существует неопределенность: какой именно из двух реакционных центров занят лигандом, а какой свободен? Из статистической термодинамики известно, что такая энтропия S в расчете на моль решеточного полимера равна:

$$S = -R \sum_{i=0}^1 \sum_{j=0}^1 p_{ij} \ln p_{ij}, \quad (4)$$

где R – универсальная газовая постоянная, p_{ij} – вероятность пребывания системы в одном из четырех возможных состояний. Всего в рассматриваемой системе возможны четыре состояния, укажем для каждого из них свою вероятность (см. рис. 1).

Найдем энтропию системы в явном виде на основании формулы (4):

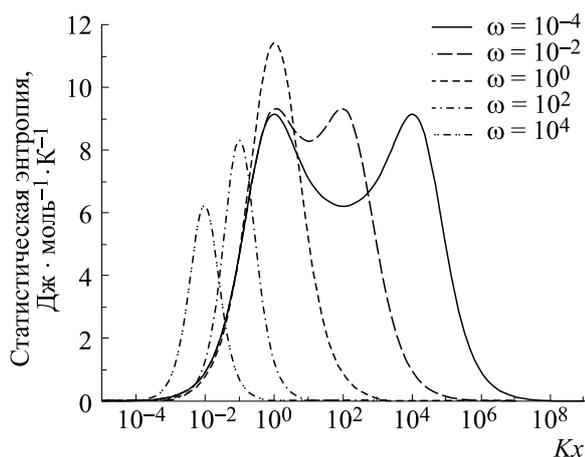


Рис. 2. Зависимость статистической энтропии от произведения Kx при различных значениях параметра кооперативности ω .

$$S = -R(p_{00} \ln p_{00} + p_{01} \ln p_{01} + p_{10} \ln p_{10} + p_{11} \ln p_{11})S,$$

или

$$S = -R \left[\frac{Kx}{\Xi} (2(1 + \omega Kx) \ln Kx + \omega Kx \ln \omega) - \ln \Xi \right]. \quad (5)$$

Формула (5) позволяет представить статистическую энтропию как функцию двух независимых переменных – $S(Kx, \omega)$. Зависимость энтропии от величины Kx при разных значениях ω показана на рис. 2.

Мы видим, что зависимость энтропии от концентрации лиганда в растворе и от заполнения матрицы лигандом оказывается нетривиальной: при значениях параметра кооперативности $\omega < 1$ график имеет два максимума.

На рис. 3 показаны зависимости плотности вероятности состояний решетки от Kx . При малом параметре кооперативности ($\omega \ll 1$) три состояния последовательно сменяют друг друга. По мере увеличения концентрации лиганда начинает снижаться вероятность того, что решетка полностью пуста, и увеличиваться вероятность того, что хотя бы один центр связывания решетки занят. С дальнейшим ростом концентрации лиганда увеличивается вероятность полностью занятой решетки. В пределе, при $\omega \rightarrow 0$, можно ожидать, что последнее событие наступит при бесконечно большой концентрации лиганда, что невозможно, и это вполне отвечает нашим представлениям. Действительно, при бесконечно антикооперативном процессе существует запрет на существование двух соседних занятых сайтов – модель «исключенного соседа» [74]. Эта модель может служить переходом к решеточной модели «газа твердых стержней», в которой один лиганд при связывании занимает сразу несколько реакционных центров [2–4].

При увеличении параметра кооперативности вероятность полного заполнения решетки лигандами наступает уже при меньших концентрациях. При этом состояние решетки с одним занятым сайтом становится все менее вероятным. При дальнейшем увеличении параметра кооперативности вероятность встретить в растворе наполовину заполненную решетку падает практически до нуля. В пределе, при $\omega \rightarrow \infty$ состояние системы определяется двумя возможными конфигурациями: полностью пустая либо полностью заполнен-

ная решетка, причем смена конфигураций, т. е. кооперативный переход, происходит при бесконечно малой концентрации лиганда.

Из сопоставления рис. 2 и 3 следует важный вывод: энтропия системы максимальна в месте пересечения плотностей вероятности, т.е. когда соответствующие события равновероятны. Равная вероятность наступления событий означает отсутствие преимущественного состояния решетки и приводит к неопределенности, количественной мерой которой является статистическая энтропия. При отрицательной или положительной кооперативности процессы связывания лигандов с решеткой зависят друг от друга, в то время как при некооперативном связывании эти процессы протекают независимо. По этой причине наибольшее значение энтропии в максимуме (см. рис. 2 и 3) наблюдается именно для некооперативного процесса ($\omega = 1$).

Интересно рассмотреть зависимость максимальных значений энтропии S_{\max} , т.е. значений энтропии в пике каждого графика на рис. 2, от параметра кооперативности ω . Можно показать, что

$$S_{\max}(Kx, \omega) = \begin{cases} S\left(\frac{1}{\omega}, \omega\right) & \text{при } \omega \leq 1, Kx = 1 \\ S\left(\frac{1}{\sqrt{\omega}}, \omega\right) & \text{при } \omega \geq 1 \end{cases}$$

График зависимости максимальных значений энтропии с точностью до универсальной газовой постоянной от параметра кооперативности изображен на рис. 4.

Из рисунка видно, что максимальная статистическая энтропия соответствует системе с некооперативными взаимодействиями ($\omega = 1$), в которой равновероятны все четыре состояния системы. По мере уменьшения параметра кооперативности ($\omega \ll 1$) состояние с полностью заполненной решеткой становится все менее вероятным, а при увеличении параметра кооперативности ($\omega \gg 1$) все менее вероятными становятся состояния с наполовину заполненной решеткой.

Как видно из рис. 4, максимальная энтропия системы с одним молекул решеточных полимеров с точностью до постоянной Авогадро находится в полном согласии с уравнением Больцмана:

$$S = R \ln \Omega = N_A k \ln \Omega,$$

где Ω — термодинамическая вероятность, т. е. число микроскопических состояний системы, которым можно реализовать данное макроскопическое состояние, в нашем случае — число конфигураций адсорбционной системы при данном значении параметра кооперативности.

Заметим, что в реальных системах, т.е. при связывании лигандов с рецепторами, субстратов с рибосомами и др., связывание лигандов с пер-

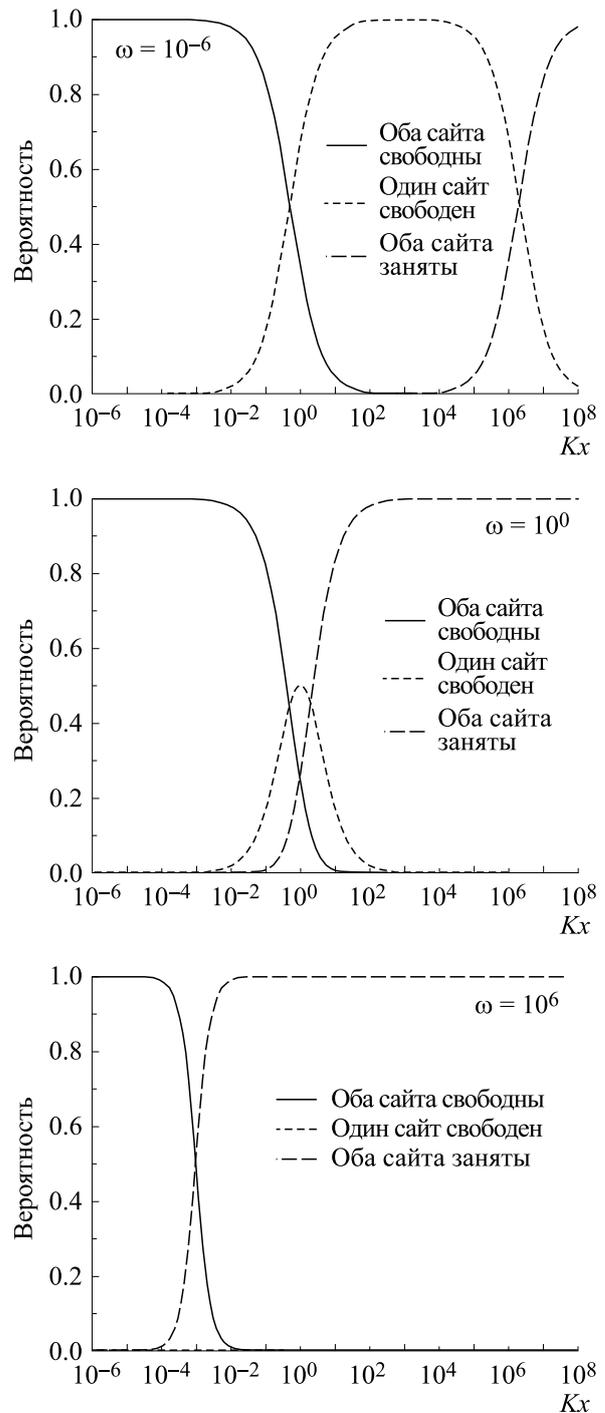


Рис. 3. Зависимости плотностей вероятности состояний решетки от концентрации лиганда.

вым и вторым центрами может происходить с разными константами. Пример такого случая мы рассмотрели в работах [41, 42].

При анализе экспериментальных данных исследователю необходимо решать так называемую обратную задачу: восстановить параметры моде-

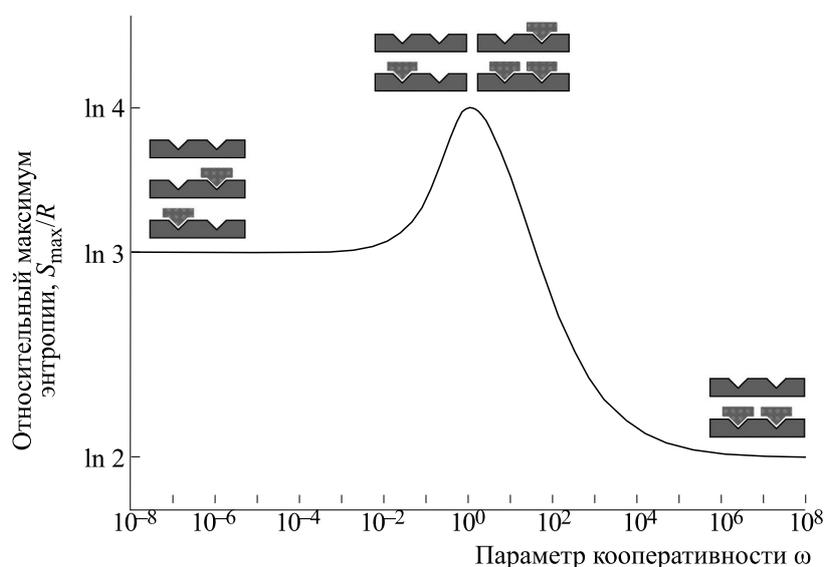


Рис. 4. Зависимость максимума энтропии от параметра кооперативности.

ли на основании кривых связывания. В этом случае возникает неопределенность, и параметр кооперативности можно определить только при определенных допущениях. Существует также известная проблема, связанная с тем, что результаты расчета кривых в модели, в которой существуют антикооперативные взаимодействия между лигандами, совпадают с результатами расчетов в случае, если есть гетерогенное связывание, но нет кооперативности. В этом случае на помощь исследователю могут прийти эксперименты по кинетике связывания [75].

Ниже, в «Приложении», мы продемонстрируем применение методов статистической термодинамики к анализу связывания на платформах микрочипов молекул матричных РНК в ситуации, когда необходимо провести различие между высокоспецифичным связыванием (сигналом) и низкоспецифичным (шумом). Заметим, что данное «Приложение» может иметь большое практическое значение для анализа данных по связыванию мишеней на биочипах. Кроме известных зарубежных работ в этой области и работ, которые мы используем для развития методов анализа данных [67, 76–78], следует упомянуть примеры успешного применения биочипов в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (см., например, работы [79–83]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение теории адсорбции для описания биологических систем обусловлено участием специалистов в области статистической физики в решении задач, связанных с биополимерами. В настоящее время необходимо привлечь внимание

молекулярных биологов и биофизиков к теории адсорбции: по сути, она помогает решать множество актуальных задач, о чем мы писали выше. В отечественной и мировой литературе почти не существует крупных обзорных работ, в которых с единой точки зрения рассматривались бы сотни примеров успешного применения теории адсорбции к описанию взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами. Наша работа продолжает серию обзоров и глав в монографиях, в которых мы ставим перед собой цель заполнить лакуны в описании применения теории адсорбции к связыванию лигандов с нуклеиновыми кислотами [26, 28, 70].

Теория адсорбции применялась к биологическим системам на протяжении всего XX века и накопила уже достаточно опыта, чтобы выступить в этой области в роли научной дисциплины. Эта дисциплина выработала свой язык, который позволил сформулировать взгляд на такую фундаментальную проблему биологии, как регуляция генетической экспрессии, в рамках представлений статистической физики (см., например, работы [25, 36, 37, 43]). С другой стороны, применение теории адсорбции к анализу экспериментальных данных позволяет связать наблюдаемые величины с модельными свойствами молекулярно-биологических систем: определять энергии взаимодействия лигандов с нуклеиновыми кислотами, энергии взаимодействия между адсорбированными лигандами и т.п. Описание реальных систем при помощи теории адсорбции дает возможность как предсказывать их поведение при изменении внешних условий, так и уточнять черты моделей связывания лигандов с ДНК. Без применения теории адсорбции невозможно сейчас

представить эффективное решение и таких прикладных задач, как анализ связывания биологически активных соединений на микрочипах и создание биосенсоров.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Сравнение кросс-гибридизации со специфической гибрилизацией. Рассмотрим экспериментальную систему, в которой происходит гибрилизация — связывание молекул-мишеней из раствора с олигонуклеотидами-зондами, расположенными на платформе микрочипа [67] (см. также работу [76]). Заметим, что под терминами микрочип и биочип мы понимаем здесь одно и то же: матрицы ячеек на плоской поверхности, в каждой из которых иммобилизованы молекулярные зонды определенного типа.

Для оценки специфичности гибрилизации здесь мы будем использовать две базы данных, полученных в двух эквивалентных экспериментальных системах, представляющих микрочипы с одними и теми же пробами [67]. В первой системе к микрочипу добавляются мишени, которые имеют специфические места связывания для проб, во второй — те же самые мишени, только без специфических мест связывания (что можно считать контролем). Соответственно, в первой базе представлены данные для проб, каждая из которых может находиться в одном из трех состояний: быть свободной (не связанной с мишенью) (I), быть связанной специфично (II) и связанной неспецифично (III). Во второй базе представлены данные для проб, для которых нет специфических мишеней — и для них возможны только состояния (I) и (III).

Рассмотрим связывание одной молекулы зонда с мишенью для первой экспериментальной системы. Будем считать, что это связывание проходит в равновесных условиях. Для того, чтобы оценить вероятность связывания зонда на мишени по специфическому механизму, с образованием совершенного дуплекса, по сравнению с вероятностями связывания на всех неспецифических местах (приводящего к кросс-гибридизации), применим следующий прием.

Предположим, что каждая длинная молекула мишени связывается только с одним зондом. В этом случае мы можем представить, что молекула зонда равновесно связывается с набором молекул-мишеней, каждая из которых имеет свой номер $i = 1, \dots, N$. Таким образом, мы заменяем реальную молекулу мишени на набор коротких молекул, каждая из которых соответствует одному месту связывания с молекулой зонда. Подобную схему связывания рассматривали ранее авторы работы [77]. Однако в отличие от этой работы, где оценивалось связывание только зондов с мише-

нями, которые не содержали мест специфического связывания, в нашей системе будет присутствовать мишень со специфичным местом $i = s$.

Молекула зонда может пребывать в $N + 1$ состоянии: либо она будет свободна, либо связана с одной мишенью из набора N типов (на который мы разбили реальную мишень). Методы статистической термодинамики позволяют оценить вероятность того, что зонд будет связан с i -й мишенью. Связывание зонда с i -й мишенью характеризуется равновесной константой K_i .

Воспользуемся формализмом статистических сумм. Представим большую статистическую сумму системы в виде:

$$\Xi_N = 1 + \sum_i K_i x,$$

где x — концентрация свободных молекул мишеней в растворе, статистический вес 1 соответствует ситуации, когда мишень не связана с зондом. Тогда вероятность обнаружить зонд связанным с i -й мишенью равна

$$P_i = \frac{d \ln \Xi_N}{d \ln K_i} = \frac{K_i x}{1 + \sum_i K_i x}.$$

Если рассматривается связывание со специфичной матрицей $i = s$, то

$$P_s = \frac{K_s x}{1 + \sum_i K_i x}.$$

Здесь в знаменателе в общей сумме есть член, соответствующий $j = s$, то есть $K_s x$.

Вероятность кросс-гибридизации равна:

$$P_{\text{cross}} = \frac{\sum_{j \neq s} K_j x}{1 + \sum_i K_i x}. \quad (\text{A1})$$

Если мы сигналом будем называть вероятность связывания зонда на специфическом месте, а шумом — вероятность кросс-гибридизации, то оценку величины отношения «сигнал—шум» дает отношение соответствующих вероятностей:

$$R_{SN} = \frac{P_s}{P_{\text{cross}}} = \frac{K_s x}{\sum_{j \neq s} K_j x}.$$

Для интерпретации экспериментальных данных, полученных в двух описанных выше системах, то есть на двух микрочипах, применим наш подход.

Вероятность кросс-гибридизации P_{cross} мы можем оценить на основании данных из эксперимента во второй системе, где зонды связываются с мишенями, в которых нет специфического места. Если предположить, что в этой системе экс-

перимент проводится при аналогичных условиях, то весь сигнал гибридизации в этом эксперименте будет равен сигналу кросс-гибридизации:

$$P'_{\text{cross}} = \frac{\sum_{j \neq s} K_j x'}{1 + \sum_{i \neq s} K_i x'}$$

где x' — концентрация свободных мишеней во второй системе. Если предположить, что концентрации мишеней в этих системах мало отличаются, т. е. что $x' \sim x$, то, используя соотношение (A1), можно показать, что отношение сигнала кросс-гибридизации в первой системе к сигналу кросс-гибридизации во второй системе равно:

$$\frac{P_{\text{cross}}}{P'_{\text{cross}}} = \frac{1 + \sum_{j \neq s} K_j x}{1 + \sum_i K_i x} \quad (\text{A2})$$

Перейдем к экспериментальным оценкам. В первой системе зонд может находиться в трех состояниях: он может быть не связан с мишенью (обозначим вероятность этого состояния как P_0), быть связанным со специфичным местом (соответствующая вероятность равна P_s) и быть связанным неспецифично (соответствующая вероятность равна P_{cross}):

$$P_0 + P_s + P_{\text{cross}} = 1.$$

Сигнал от общей гибридизации в первой системе пропорционален величине $P_s + P_{\text{cross}}$. Вычитая из этого сигнала P'_{cross} , мы получаем некоторую оценку для P_s , которая в соответствии с соотношением (A2) оказывается тем точнее, чем меньше отношение сигнала к шуму R_{SN} . По сути, тогда будет сделано следующее приближение: мы считаем полный набор состояний в первой системе для эксперимента с микрочипом, когда в мишени есть специфические места. Потом сигнал кросс-гибридизации на этом чипе (его оценивает формула (A1)) мы заменяем на сигнал кросс-гибридизации, полученный в эксперименте, где нет специфического места [67]. Уточнить оценки параметров мы сможем, если учтем детали эксперимента. Следует оценить отличие x' и x в этих системах, которое обусловлено двумя факторами: во-первых, зонды, специфично связанные с мишенями, выключают из реакции протяженные участки ДНК, которые прилегают к специфическому месту связывания и тем самым уменьшают эффективное значение x , во-вторых, в системе, где нет участков ДНК со специфичными местами связывания, вообще уменьшается общая концентрация мишеней в растворе, которая равна сумме концентраций мишеней, связанных на зондах и свободных мишеней в растворе. Учет двух этих

факторов может позволить уточнить оценки отношения «сигнал—шум» в рассматриваемой системе.

Заметим, что оценка специфического и неспецифического связывания была проведена в работе [78], авторы которой развивали модель, сходную с нашей. Однако в этой работе сумму констант, соответствующих неспецифическому связыванию, заменяли на одну константу с усредненной энергией.

Мы описали здесь модель, в которой молекула зонда может находиться в одном из трех состояний: быть свободной (I), связываться со специфическими мишенями (II), либо с неспецифическими (III), и эта модель применялась для анализа данных в работе [67].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить А.С. Заседателя, Н.Г. Есипову и В.В. Аристову за полезные дискуссии, А. Анашкину и О. Матвееву — за ценные замечания и обсуждение.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. F. Bradley and S. Lifson, in *Molecular Associations in Biology*, Ed. by B. Pullman (Acad. Press, London, New York, 1968), pp. 261–270.
2. S. A. Latt and H. A. Sober, *Biochemistry* **6** (10), 3293 (1967).
3. D. M. Crothers, *Biopolymers* **6** (4), 575 (1968).
4. L. Tonks, *Phys. Rev.* **50** (10), 955 (1936).
5. А. С. Заседатель, Г. В. Гурский и М. В. Волькенштейн, *Молекуляр. биология* **5** (20), 245 (1971).
6. Г. В. Гурский, А. С. Заседатель и М. В. Волькенштейн, *Молекуляр. биология* **6**, 479 (1972).
7. J. D. McGhee and P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86** (2), 469 (1974).

8. A. S. Krylov, S. L. Grokhovsky, A. S. Zasedatelev et al., *Nucl. Acids Res.* **6** (1), 289 (1979).
9. M. Hogan, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, *Nature* **278**, 521 (1979).
10. X. Qu, J. O. Trent, I. Fokt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12032 (2000).
11. D. M. Chenoweth and P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13175 (2009).
12. A. Balaceanu, A. Pérez, P. D. Dans et al. *Nucl. Acids Res.* **46** (15), 7554 (2018).
13. J. Dale, C. P. Howe, H. Toncova, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23** (28), 15352 (2021).
14. Г. В. Гурский и А. С. Заседателев, *Биофизика* **23**, 932 (1978).
15. G. V. Gursky and A. S. Zasedatelev, *Sov. Sci. Rev. D, Physicochem. Biol.* **5**, 53 (1984).
16. Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Заседателев и Г. В. Гурский, *Биофизика* **24**, 351 (1979).
17. W. Lenz, *Z. Phys.* **21**, 613 (1920).
18. E. Ising, *Z. Phys.* **31**, 253 (1925).
19. Ю. Д. Нечипуренко и др., *Молекуляр. биология* **18**, 332 (1984).
20. Yu. D. Nechipurenko and G. V. Gursky, *Biophys. Chem.* **24** (3), 195 (1986).
21. I. R. Epstein, *Biophys. Chem.* **8** (4), 327 (1978).
22. Б. Йованович и Ю. Д. Нечипуренко, *Молекуляр. биология* **24**, 478 (1990).
23. V. Arakelyan, Yu. Babayan, and G. Potikyan, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**, 231 (2000).
24. Ю. Д. Нечипуренко, А. М. Вольф и Ю. М. Евдокимов, *Биофизика* **48** (5), 802 (2003).
25. Ю. Д. Нечипуренко, А. М. Вольф и Г. В. Гурский, *Биофизика* **48** (6), 986 (2003).
26. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т компл. исслед., М.—Ижевск, 2015).
27. Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **27**, 391 (1982).
28. Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Биофизика* **48** (5), 773 (2003).
29. J. Wyman and S. J. Gill, *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley CA, 1990).
30. Ю. Д. Нечипуренко, *Молекуляр. биология* **18**, 1066 (1984).
31. A. R. Wolfe and T. Meehan, *J. Mol. Biol.* **223** (4), 1063 (1992).
32. D. Yu. Lando and Yu. D. Nechipurenko, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **26**, 187 (2008).
33. В. Ф. Рябоконь, Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Докл. РАН* **398**, 832 (2004).
34. Yu. D. Nechipurenko, B. Jovanovic, V. F. Riabokon, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **15**, 660 (2005).
35. Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Крылов, А. С. Заседателев и др., *Молекуляр. биология* **18**, 332 (1984).
36. D. M. Crothers, *Science* **339** (6121), 766 (2013).
37. J. V. Chaires and S. D. Levene, *Biopolymers* **103**, 469 (2015).
38. Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *ДАН СССР* **281**, 213 (1985).
39. Ю. Д. Нечипуренко и М. В. Волькенштейн, *ДАН СССР* **286**, 216 (1986).
40. Ю. Д. Нечипуренко, Н. В. Попов, М. А. Исаев и др., *Биофизика* **40** (6), 1208 (1995).
41. S. B. Bourd, M. K. Kukhanova, B. P. Gottikh, et al., *Eur. J. Biochem.* **135** (3), 465 (1983).
42. М. К. Куханова, С. Б. Бурд, Л. С. Викторова и др., *Молекуляр. биология* **18** (3), 691 (1984).
43. М. В. Головкин, Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Биофизика* **54** (4), 581 (2009).
44. O. Matveeva, Yu. Nechipurenko, L. Rossi, et al., *Nucl. Acids Res.* **35** (8), e63 (2007).
45. М. В. Головкин, О. В. Матвеева и Ю. Д. Нечипуренко, *Биофизика* **54** (5), 820 (2009).
46. М. В. Ходыков, А. А. Анашкина, М. В. Головкин и др., *Биофизика* **56** (6), 1053 (2011).
47. Я. В. Стирманов, М. В. Ходыков, О. В. Матвеева и др., *Биофизика* **58** (6), 981 (2013).
48. Ya. V. Stirmanov, O. V. Matveeva, and Yu. D. Nechipurenko, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **37** (12), 3103 (2019).
49. Yu. D. Nechipurenko, in *Advances in Medicine and Biology*, Ed. by L. V. Berhardt (Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, 2019), vol. 136, pp. 193–206.
50. G. D. Stormo, *Introduction to protein-DNA interactions: Structure, thermodynamics, and bioinformatics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 2013).
51. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, Yu. D. Nechipurenko, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 103 (2005).
52. V. B. Teif, N. Kepper, K. Yserentant, et al., *J. Phys.: Condens. Matter* **27**, 064110 (2015).
53. M. P. Evstigneev, A. S. Buchelnikov, and V. P. Evstigneev, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **149**, 131 (2019).
54. С. Ф. Барановский, Д. Н. Чернышев, А. С. Бучельников и др., *Биофизика* **56** (2), 235 (2011).
55. M. P. Evstigneev and A. V. Shestopalova, in *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, Ed. by L. Gorb, V. Kuz'min, and E. Muratov (Springer, Dordrecht, 2014), vol. 17, pp. 21–57.
56. D. Yu. Lando and V. B. Teif, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**, 903 (2000).
57. В. Б. Тейф и Д. Ю. Ландо, *Молекуляр. биология* **35**, 117 (2001).
58. Ю. Д. Нечипуренко, А. М. Вольф, В. И. Саянов и др., *Журн. эксперим. и теорет. физики* **125** (1), 103 (2004).
59. Е. А. Воробьев, Ю. Д. Нечипуренко, В. И. Саянов и др., *Биофизика* **52** (4), 636 (2007).
60. V. B. Teif and K. Bohinc, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **105**, 208 (2011).
61. E. Bereznyak, N. Gladkovskaya, E. Dukhopelnykov, et al., *AIMS Biophysics* **2**, 423 (2015).
62. А. Н. Суровая, Н. П. Бажулина, С. Ю. Лепехина и др., *Биофизика* **61** (2), 270 (2016).
63. A. G. Kudrev, *Talanta* **116**, 541 (2013).
64. Н. С. Ильинский, А. М. Варижук, А. Д. Вениаминов и др., *Молекуляр. биология* **48** (6), 891 (2014).
65. A. Beniaminov, G. Chashchina, A. Shchyolkina, et al., *Biochimie* **191**, 33 (2021).
66. M. Melikishvili and M. G. Fried, *Biopolymers* **103** (9), 509 (2015).
67. O. Matveeva, Yu. Nechipurenko, N. Nazipova, et al., *Bioinformatics* **32** (17), i552 (2016).
68. E. Segal and J. Widom, *Nat. Rev. Genet.* **10** (7), 443 (2009).

69. S. Kim, E. Broströmer, D. Xing, et al., *Science* **339** (6121), 816 (2013).
70. Ю. Д. Нечипуренко, в кн. *Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах*, под ред. Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубина (Ин-т компл. исслед., М.–Ижевск, 2017), сс. 102–125.
71. V. V. Aristov, A. S. Buchelnikov, and Yu. D. Nechipurenko, *Entropy* **24** (2), 172 (2022).
72. S. H. Na and J. E. Ferrell, *Science* **352** (6288), 990 (2016).
73. G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51** (4), 660 (1949).
74. M. S. Rocha, *Biopolymers* **93** (1), 1 (2010).
75. F. Sevlever, J. P. Di Bella, and A. C. Ventura, *PLoS Comput. Biol.* **16** (6), e1007929 (2020).
76. J. Hooyberghs, P. Van Hummelen, and E. Carlon, *Nucl. Acids Res.* **37**, 53 (2009).
77. C. Furusawa, N. Оно, S. Suzuki, et al., *Bioinformatics* **25** (1), 36 (2009).
78. L. Zhang, M. F. Miles, and K. D. Aldape, *Nat. Biotechnol.* **21**, 818 (2003).
79. Д. А. Грядунов, Б. Л. Шаскольский, Т. В. Наседкина и др., *Acta Naturae* **10** (4), 4 (2018).
80. С. А. Лапа, Р. А. Мифтахов, Е. С. Клочихина и др., *Молекуляр. биология* **55** (6), 944 (2021).
81. Д. О. Фесенко, И. С. Абрамов, В. Е. Шершов и др., *Молекуляр. биология* **52** (6), 997 (2018).
82. Д. О. Фесенко, Т. О. Гусейнов, С. А. Лапа и др., *Молекуляр. биология* **52** (3), 533 (2018).
83. D. O. Fesenko, A. V. Chudinov, S. A. Surzhikov, et al., *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **20** (4), 208 (2016).

Ligand Binding to Nucleic Acids in Solution and on Microchips

Yu.D. Nechipurenko*, ** and A.S. Buchelnikov**

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia*

The equilibrium binding of ligands (proteins, biologically active compounds, and oligonucleotides) to nucleic acids underlies many processes in the living cell. Model study and physical adsorption theory methods can be used to give quantitative description of this binding in cases when the ligand occupies an extended region on DNA and when cooperative interactions occur between adsorbed ligand molecules. With the Ising model it is possible to find an analytical solution to the equations of adsorption in the most general form for a wide range of models. Physico-chemical experiments in *in vitro* model systems containing biological macromolecules such as proteins, the complex web of protein interactions, RNA and DNA polymers, on the one hand, and small molecule ligands on the other hand, shed light on many mechanisms underlying cellular processes. Footprinting diagrams or microchip data sheet provide the detailed information on the system where ligands bind to DNA. This article presents a brief overview of theoretical research in this area. How to use entropy formula for the adsorption system is shown to learn more about the cooperative binding processes occurring in this system. An approach for the analysis of binding on microchips is described in the Appendix.

Keywords: DNA-protein binding, cooperative interactions, binding curve, adsorption model, Ising model, microchip

ХИТОЗАН КАК ФОТОПРОТЕКТОР ДЛЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ЕГО МАТРИЦЕ ПАПАИНА

© 2022 г. М.Г. Холявка*, **, С.М. Панкова*, ***, Ю.М. Вышкворкина****, А.Н. Лукин*, М.С. Кондратьев*****, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1
E-mail: holyavka@rambler.ru

**Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, Университетская ул., 33

***Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, 394036, Воронеж, Студенческая ул., 10

****Московский физико-технический институт, 117303, Москва, Керченская ул., 1а/1
E-mail: yuliya.vyshkvorkina@phystech.edu

***** Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3
E-mail: ma-ko@bk.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 04.02.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Установлено, что при действии УФ-излучения в дозах 453–6040 Дж/м² наблюдается снижение каталитической активности папаина. Иммобилизация на матрице хитозана приводит к повышению стабильности молекул папаина по отношению к УФ-облучению в диапазоне доз от 151 до 6040 Дж/м² по сравнению со свободным ферментом. Модификации в ИК-спектрах иммобилизованного папаина практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы – амид I, амид II и амид III. Поэтому можно постулировать, что матрица хитозана выступает в качестве фотопротектора для иммобилизованного на ней папаина. Полученные результаты могут быть полезны при разработке путей комплексного применения УФ-излучения, папаина и производных хитозана для сокращения сроков заживления кожных покровов, а также при подборе условий стерилизации УФ-светом лекарственных препаратов, содержащих папаин.

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

DOI: 10.31857/S0006302922030061, EDN: ANESYX

УФ-излучение – один из общепризнанных факторов, оказывающих многостороннее воздействие на организмы как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Особый интерес представляет изучение биофизических механизмов фототерапии, являющейся высокоэффективным вариантом для профилактики и терапии кожных заболеваний. При лечении ожоговых ран использование ультрафиолетового света коротковолнового спектра является эффективным способом благодаря его выраженному антибактериальному эффекту, отсутствию микроабсцессов и клеточной инфильтрации [1, 2]. Кроме того, влияние УФ-излучения на биоматериалы необходимо исследовать еще и потому, что оно часто используется при стерилизации препаратов для их последующего применения в медицинской практике [3, 4].

Папаин (КФ 3.4.22.2) относится к монотиоловым цистеиновым эндопротеазам, обладает противовоспалительными и антиоксидантными эффектами, бактерицидной, бактериостатической и дезинфицирующей активностями, способностью к гидролизу многих белков, в том числе коллагена. Фермент ускоряет заживление ран, трофических язв, пролежней, способствуя их очищению от некротических масс и патогенной микрофлоры. В последнее время папаин признан перспективным для косметического лечения шрамов и рубцов [5–9].

Основным недостатком растворимой формы протеолитических ферментов является их быстрая инактивация за счет протеолиза [10, 11]. Одним из способов повышения стабильности ферментов может служить их иммобилизация на полимерных носителях [12, 13]. Было предпринято множество попыток стабилизации структуры па-

паина, таких как ковалентная иммобилизация, взаимодействие с ионным металлом, сополимеризация с помощью глутарового альдегида, иммобилизация в агарозе, ковалентное связывание с полиэфирсульфоном, модификация янтарным ангидридом, простая адсорбция в Celite®, ионная адсорбция в КМ-целлюлозе (катионит) и QAE-Sephadex® (анионит) [14–16], включение в гель на основе крахмала [17]; включение в нитриловое волокно, обогащенное аминокеттогруппами [18]; иммобилизация на поверхность хлопчатобумажной ткани [19], сефарозы [20], наночастиц [21–23]; включение в нисомы, наносферы, липосомы [24–26]. Существуют и другие стратегии иммобилизации папаина – синтез пористых сшитых ферментных агрегатов [27], инкапсулирование в кремниевую матрицу [28], включение в состав магнитных золотых наноконструкций, модифицированных 3-(меркаптопропил)триметоксисиланом [29].

Разработаны глазные лекарственные пленки совместно иммобилизованными в поливиниловый спирт папаином и мочевиной с высокой протеолитической активностью, стабильные при хранении (полтора года) и стерилизации γ -облучением (15 кГр), предназначенные для ферментативной терапии роговицы ожогов глаз [30].

Перспективными носителями для иммобилизации лекарственных средств белковой природы являются хитозаны и их производные, которые обладают антибактериальной активностью, низкой аллергенностью и относительно низкой стоимостью. Хитозан является сополимером 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкозамина и 2-ацетиламино-2-дезоксид- β -D-глюкозамина, связанных $\beta(1\rightarrow4)$ -связями. Полимер проявляет слабоосновные свойства: pK_a 6.5, что близко к значению pK_a остатков D-глюкозамина [31–37]. Кроме того, были попытки протестировать хитозан в качестве носителя для фотосенсибилизаторов типа порфираза. Хитозан эффективно предотвращал фотодegradацию их макроциклов [38]. Из хитозана получают пористые структуры и тонкие пленки для использования при трансплантации клеток и регенерации тканей. В медицине и фармации хитозан применяется в составе бинтов, губок, мембран, искусственной кожи, контактных линз, средств для лечения заболеваний костей и хирургических швов [39–41]. Свойства хитозана могут быть модифицированы при воздействии ультрафиолетового облучения, несмотря на то, что сам хитозан не имеет полос поглощения в области 220–500 нм [42].

В связи с появлением и усиленным размножением бактерий, устойчивых к антибиотикам, эффекты УФ-облучения во взаимосвязи с терапией протеиназами следует исследовать как альтернативный подход к лечению инфекций. Комплекс-

ное использование действия УФ-излучения, протеаз и производных хитозана, возможно, будет способствовать более быстрому восстановлению раны или ожога и сокращению сроков заживления кожных покровов, поэтому целью нашей работы было изучить особенности воздействия УФ-излучения на процессы фотомодуляции свободного и иммобилизованного на матрице хитозана папаина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран папаин фирмы Sigma-Aldrich (США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин фирмы Sigma-Aldrich, носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Щелково, Московская обл.): хитозан пищевой кислоторастворимый среднемoleкулярный ($M_r = 200$ кДа), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа).

Иммобилизацию папаина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента в концентрации 1 мг/мл в 0.05 М глициновом буфере (рН 9.0), инкубировали в течение 4 ч с периодическим перемешиванием для среднемoleкулярного хитозана, а при использовании высокомолекулярного хитозана время сорбции составляло 5 ч. Суспензию центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 0.05 М трис-НСl-буфером (рН 7.5) до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург) при $\lambda = 280$ нм). Полученные образцы высушивали при комнатной температуре. Определение количества белка в препаратах и активности фермента проводили модифицированным методом Лоури [43].

Перед облучением к образцам фермента добавляли 0.05 М фосфатный буфер с рН 6.8 в соотношении 1 мг/мл для свободного и 50 мг/мл (что эквивалентно 1 мг/мл по белковой составляющей) для иммобилизованного на хитозане папаина. Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании соответственно раствора и суспензии в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30 и 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли на ИК-Фурье-спектрометре Vertex-70 (Bruker, Германия). Спектры снимали с неориентированных порошковых образцов, которые получали после УФ-облучения иммобилизованного папаина путем высушивания препаратов при комнатной температуре и измельчения до состояния пудры.

Диаметр молекул папаина измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173° при температуре 25°C .

Подготовку структуры папаина для докинга выполняли по стандартной для пакета программ автоматизированного молекулярного докинга Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белков с помощью MGLTools. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модель структуры хитозана была нарисована в молекулярном конструкторе NupurChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на молекуле хитозана и ее протонирование/депротонирование осуществляли автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При УФ-облучении раствора папаина в дозе 453 Дж/м^2 наблюдалось уменьшение его каталитической активности на 32% по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При дальнейшем повышении дозы облучения фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне.

Известно, что за функционально активное поглощение УФ-света белковыми молекулами ответственны хромофорные группы, представляющие собой остаток ароматических аминокислот: прежде всего триптофана, в значительно меньшей степени тирозина и фенилаланина, а также цистина [44]. Механизм действия УФ-излучения на молекулу папаина достаточно сложный. По

данным работы [45] не очевидна простая корреляция между потерей активности фермента и разрушением любого аминокислотного остатка-хромофора для трех длин волн – 254, 280 и 313 нм. Установлено, что относительно низкая реакционная способность трех остатков цистина обусловлена сильным стабилизирующим действием нековалентных связей, а не маскированием остатков цистина другими группами.

После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов при воздействии доз в диапазоне от 151 до 6040 Дж/м^2 не выявлено изменений в каталитической способности фермента.

Изменение размера молекул папаина при действии УФ-излучения не было детектировано во всем диапазоне используемых нами доз, однако, при облучении УФ-светом в дозе 755 Дж/м^2 была выявлена тенденция к увеличению диаметра белковой глобулы при существенном расширении значений доверительных интервалов в данной точке, что косвенно может свидетельствовать о наличии в облучаемой системе одновременно нескольких конформационных форм фермента с различным размером молекулы (рис. 1).

В активный центр папаина входит цистеин (Cys25) – аминокислота, являющаяся хромофором для УФ-света, поэтому ниже мы приводим описание механизма каталитического действия этого фермента для понимания причин снижения его протеолитической активности после УФ-облучения. Для цистеиновых протеаз характерна консервативная структура гидрофобного ядра, состоящая из двух доменов – α -спирального и β -складчатого типа, которые были названы L- и R-доменами [46]. Активный центр папаина расположен на границе L- и R-доменов в V-образной расщелине и образован цистеином (Cys25), гистидином (His159), аспарагином (Asn175) и остатком глутамина (Gln19), которые консервативны для всех папаин-подобных протеаз. Cys25 и His159 образуют карман для связывания с ионной парой (рис. 2), стабилизированный Asn175. Сульфгидрильная группа Cys25 выполняет функцию нуклеофильной атаки на карбонильный углерод пептидной связи субстрата, что приводит к образованию нестабильного тетраэдрического промежуточного соединения, которое разрушается, образуя свободный фермент и N-концевую часть субстрата. Другим важным остатком является Gln19, который, вероятно, помогает в образовании оксианионной дыры путем стабилизации тетраэдрического промежуточного продукта. Asn175 образует водородную связь с His159, но не является необходимым для катализа [47]. Trp177, который наряду с Cys25 является хромофором для УФ-света, хотя и не входит в состав активного центра папаина, но участвует в генерации нук-

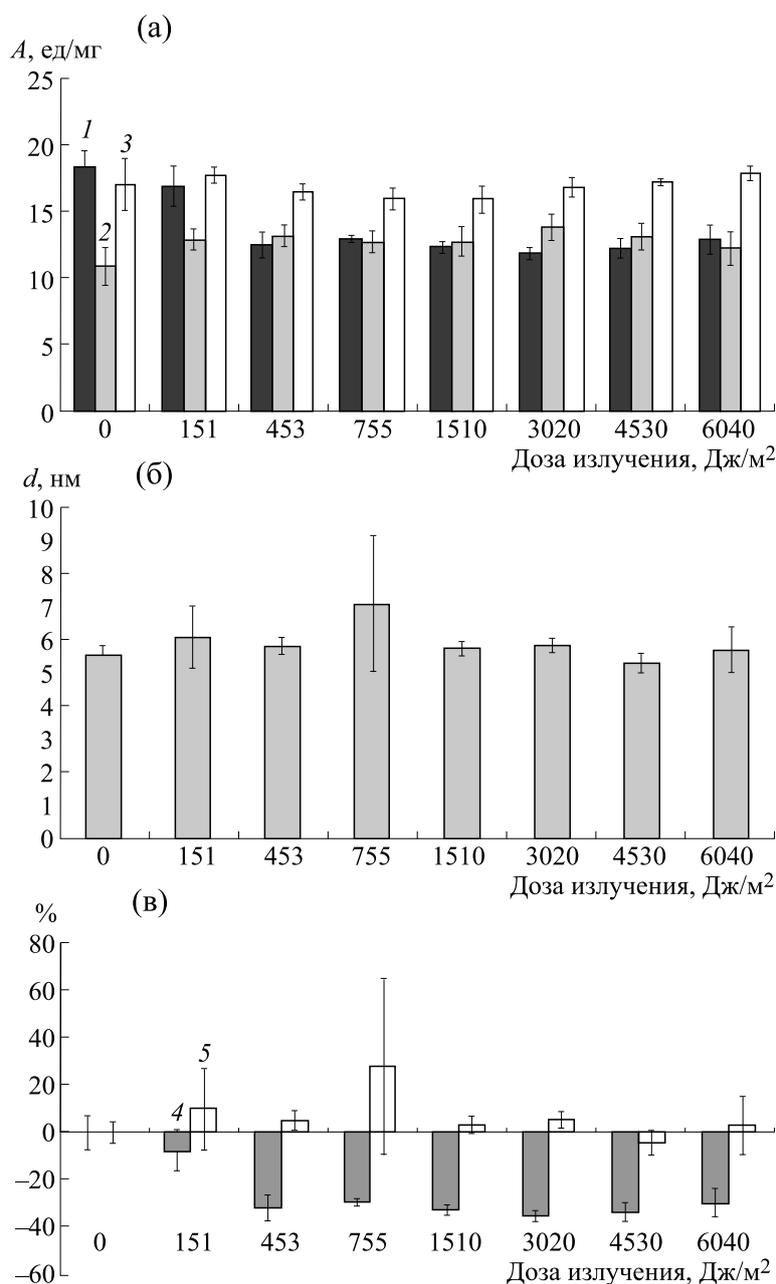


Рис. 1. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (а), диаметр молекул папаина (б) и их изменение в процентах (в). На рис. (а) свободный фермент обозначен цифрой 1, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане – 2, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане – 3. На рис. (в) изменение (в %) удельной каталитической активности папаина обозначено цифрой 4, изменение (в %) диаметра молекул фермента – 5.

леофильного характера ионной пары Cys25/His159 [48]. В работе [49] был показан существенный вклад фотоионизации остатка Trp 177 в процессы инактивации папаина.

На рис. 3 отражены связи и взаимодействия между молекулой папаина (PDB ID: 9PAP) и матрицей хитозана, возникающие в ходе иммобили-

зации фермента. Более высокую устойчивость к действию УФ-излучения иммобилизованного на хитозане папаина можно объяснить следующим образом: в процессе его адсорбции на матрице носителя принимают участие три аминокислотных остатка – хромофора для УФ-света: Trp61, Cys63 и Trp67. Кроме того, два остатка из активно-

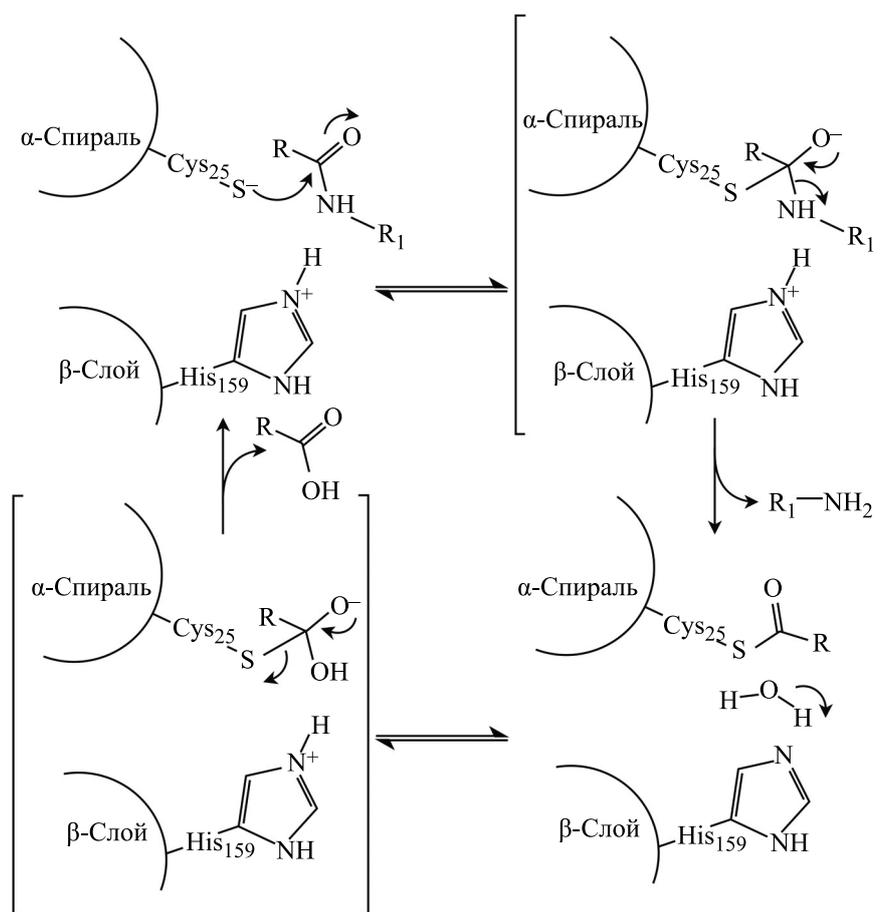


Рис. 2. Механизм разрыва пептидной связи под действием папаина по данным работы [48].

го центра папаина Cys25 и His159 также задействованы в процессах иммобилизации фермента на хитозане, что объясняет снижение его каталитической активности после адсорбции на поверхности носителя и повышение его устойчивости к действию УФ-излучения.

На рис. 4 показана ориентация хромофоров для УФ-света в молекуле папаина по отношению к его активному центру и аминокислотным остаткам, принимающим участие в образовании связей и осуществлении взаимодействий с матрицей хитозана. Из рисунка отчетливо видно, что, кроме перечисленных выше аминокислот, остатки Asn64, Val133, Asp158, Val157 и Ala160, которые образуют связи и взаимодействия с матрицей хитозана в ходе иммобилизации, находятся в непосредственной близости от активного центра фермента. Таким образом, адсорбция папаина на матрице хитозана оказывает значительное влияние на устойчивость иммобилизованного фермента к УФ-излучению, вероятно, за счет повышения жесткости структуры его активного цен-

тра, а также за счет возможного экранирования УФ-лучей от остатков Tyr61, Cys63 и Tyr67.

Для более полного обсуждения наблюдаемых эффектов мы зарегистрировали ИК-спектры папаина, свободного и иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов, до и после облучения образцов УФ-светом в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м² (рис. 5 и 6).

ИК-спектр папаина имеет одну преобладающую над другими полосу при 3450–3225 см⁻¹ с максимумом при 3300 см⁻¹, обусловленную растяжением связи N–H вторичного N-замещенного амида; пик 2981 см⁻¹, связанный с растяжением связи C–H; максимум 1650 см⁻¹, вызванный C=O-растяжением карбоксильной группы; полосу значительной интенсивности в области 1600–1500 см⁻¹, обусловленную наличием C–C-связей; максимумы 1429 и 1321 см⁻¹, вызванные деформацией C–H в алкильных радикалах аминокислотных остатков; пики 868 и 850 см⁻¹, связанные

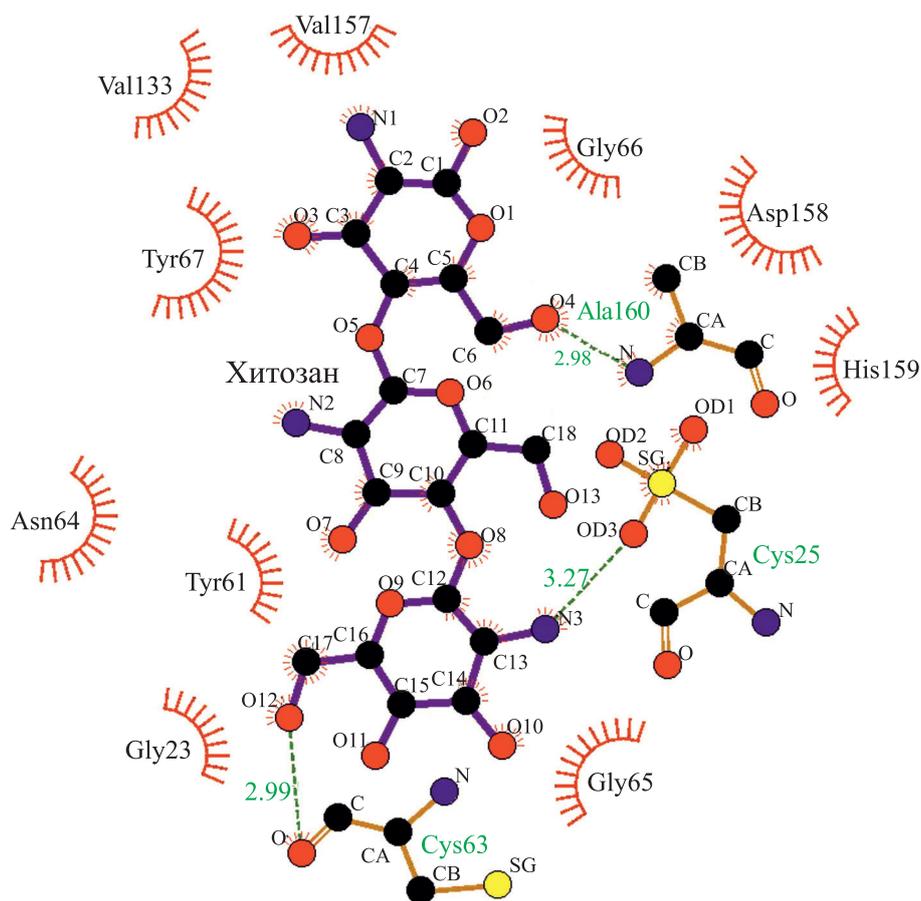


Рис. 3. Связи (обозначены пунктирными линиями с указанием длины в Å) и взаимодействия между молекулой папаина и матрицей хитозана, возникающие в ходе адсорбции фермента на носителе.

с процессами деформации ароматического кольца остатков триптофана и тирозина; максимумы при $1150\text{--}1050$ и $705\text{--}570\text{ см}^{-1}$, обусловленные наличием C–S-связей [50, 51].

Для хитозанов характерны следующие пики на ИК-спектрах: $3600\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ (N–H, O–H), $3100\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ (растяжение C–H), $1635\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ (C–N, N–H), $1558\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ (C–N, N–H), двойной пик при $1409\text{--}1406$ и $1379\text{--}1316\text{ см}^{-1}$ (деформационные колебания O–H и C–H в пиранозном кольце), $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ (растяжение C–O–C) [52, 53]. Среднемолекулярный хитозан под воздействием УФ-света претерпевает более существенные структурные модификации, чем высокомолекулярный хитозан: изменения в его ИК-спектре более выражены. В частности, наблюдается снижение интенсивности пика в области $2880\text{--}2875\text{ см}^{-1}$ и смещение его максимума в сторону увеличения значений волновых чисел, что, вероятно, связано с модификацией некоторых –CN– и –CH связей.

После иммобилизации папаина на матрице среднемалекулярного хитозана существенных изменений максимумов и интенсивности полос амид I ($1690\text{--}1630\text{ см}^{-1}$), амид II ($1560\text{--}1520\text{ см}^{-1}$) и амид III ($1250\text{--}1200\text{ см}^{-1}$) при УФ-облучении образцов во всем диапазоне используемых нами доз не происходит (рис. 5).

После УФ-облучения в ИК-спектрах папаина, иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане, наблюдаются следующие модификации: смещение пика от 1649 см^{-1} (необлученный образец) в сторону уменьшения значений волновых чисел до 1644 см^{-1} (после воздействия дозы 6040 Дж/м^2) и небольшое снижение интенсивности полосы амид I (рис. 6).

Как видно из рис. 5 и 6, изменения в ИК-спектрах иммобилизованного папаина практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы: амид I, амид II и амид III. Поэтому можно констатировать, что матрица хитозана выступает в качестве фотопр-

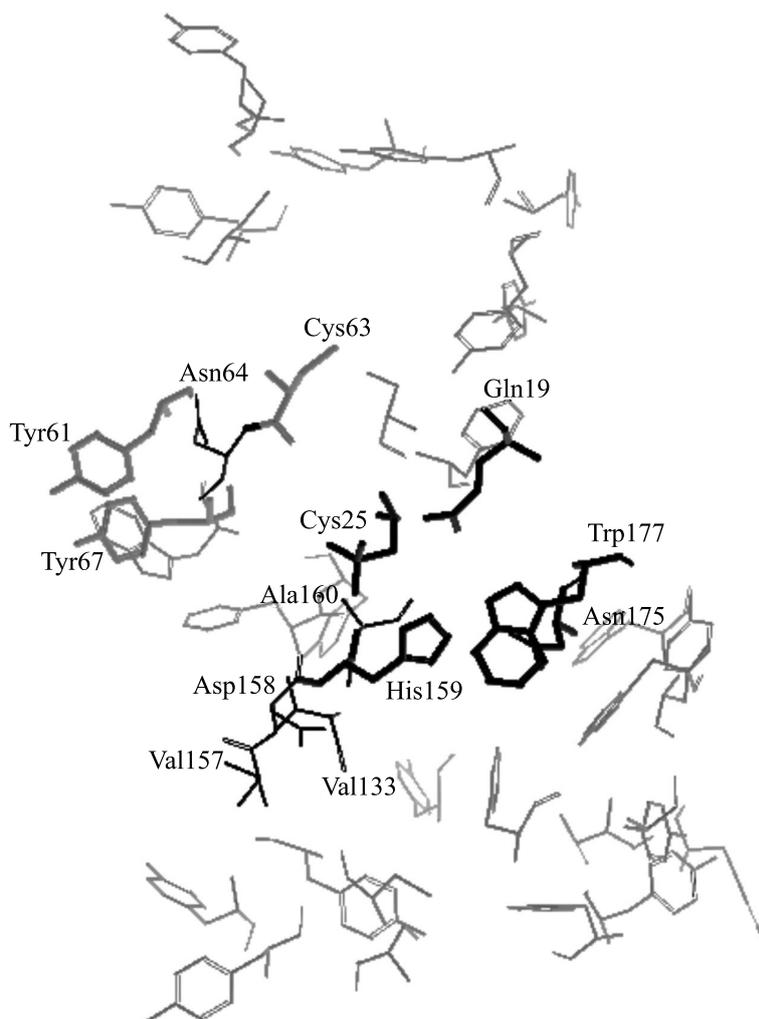


Рис. 4. Хромофоры для УФ-излучения в молекуле папаина (PDB ID: 9PAP) (серые линии) по отношению к его активному центру (черные жирные линии) и аминокислотным остаткам, принимающим участие в образовании связей и осуществлении взаимодействий с матрицей хитозана (черные линии). Tyr 61, Cys 63 и Tyr 67 (серые жирные линии) одновременно являются хромофорами для УФ-света и принимают участие в процессе адсорбции фермента на носителе.

тектора для иммобилизованного на ней фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При действии УФ-излучения в дозе 453 Дж/м² нами зарегистрировано снижение каталитической активности папаина, которая сохранялась на относительно постоянном уровне при дальнейшем облучении образцов фермента. Тенденция к увеличению диаметра молекулы папаина выявлялась после воздействия дозой 755 Дж/м², при облучении в диапазоне доз 1510–6040 Дж/м² размеры молекул облученного и необлученного фермента практически совпадали.

Иммобилизация приводит к повышению стабильности структуры молекул гетерогенного биокатализатора по отношению к УФ-облучению по сравнению с его свободными молекулами. Матрица хитозана, вероятно, играет роль фотопротектора для иммобилизованного на ней фермента.

Полученные результаты следует учитывать при разработке препаратов антибактериального назначения, расширения и совершенствовании способов терапии гнойных ран путем сочетанного действия иммобилизованного папаина и УФ-облучения в терапевтических дозах.

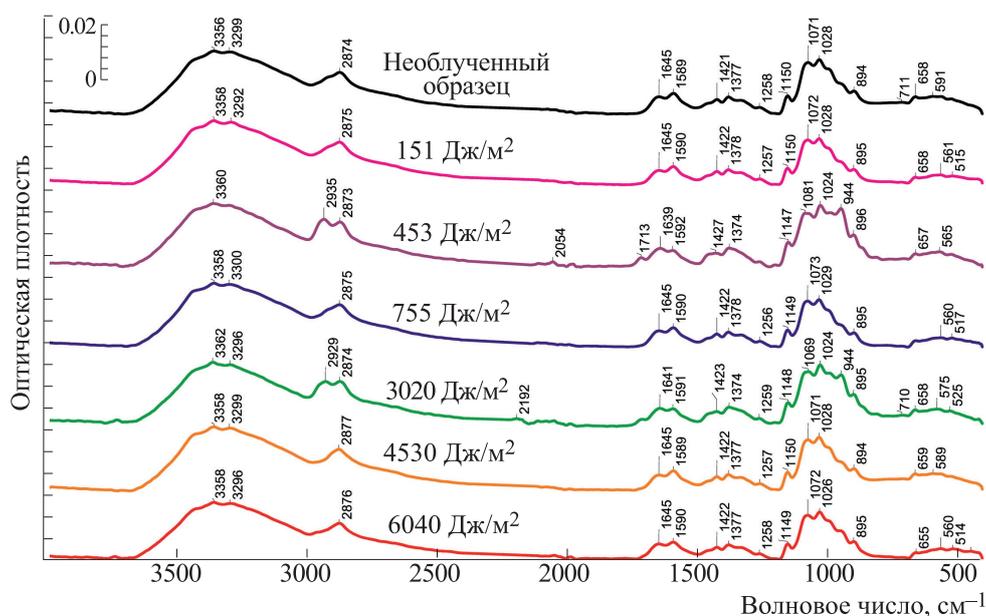


Рис. 5. ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м².

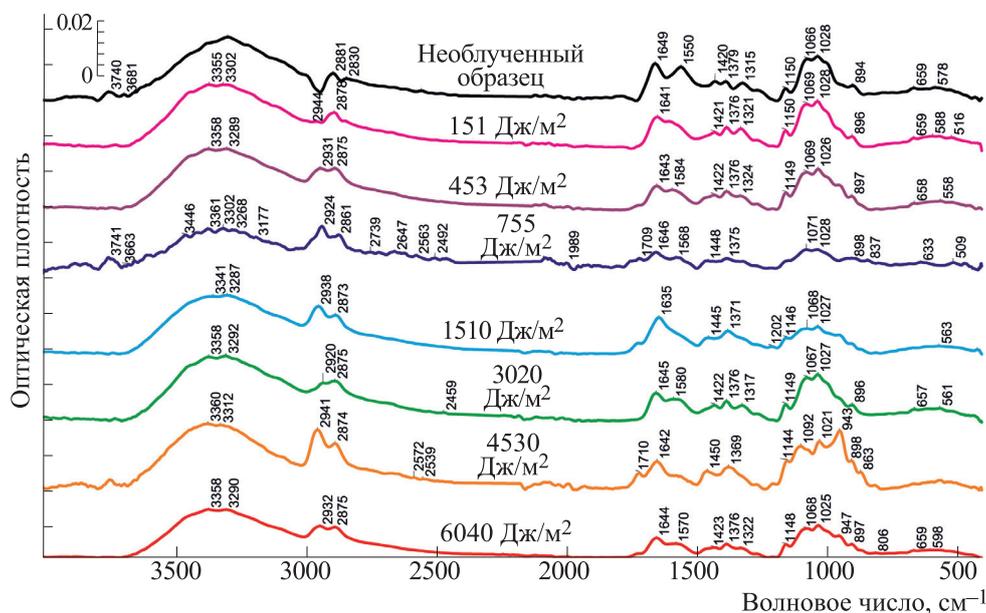


Рис. 6. ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице высокомолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м².

БЛАГОДАРНОСТИ

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Кисткин, Дис. ... канд. мед. наук (ГОУВПО «Мордовский государственный университет», 2009).
2. Н. В. Алипов, Саратовский науч.-мед. журн. **11** (3), 431 (2015).
3. T. Bintsis, E. Litopoulou-Tzanetaki, and R. K. Robinson, *J. Sci. Food Agric.* **80**, 637 (2000).
4. H. Mohr, U. Gravemann, A. Bayer, and T. H. Müller, *Transfusion* **49**, 1956 (2009).
5. T. Vij and Y. Prashar, *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **5** (1), 1 (2015).
6. G. Aravind, B. Debjit, S. Duraiavel, and G. Harish, *J. Med. Plants Studies* **1** (1), 7 (2013).
7. A. Manosroi, C. Chankhampan, K. Pattamapun, et al., *Chiang Mai J. Sci.* **41** (3), 635 (2014).
8. S. A. Ajlia, F. A. Majid, A. Suvik, et al., *Pak. J. Biol. Sci.* **13** (12), 596 (2010).
9. K. M. Pratap, K. Nandakumar, P. Sambashivarao, and P. S. Sandhya, *Ind. J. Dent. Adv.* **4**, 668 (2013).
10. H. J. Klasen, *Burns* **26**, 207 (2000).
11. B. Thallinger, E. N. Prasetyo, G. S. Nyanhongo, and G. M. Guebitz, *Biotechnology* **8**, 97 (2013).
12. G. D. Mogosanu and A. M. Grumezescu, *Int. J. Pharmaceut.* **463**, 127 (2014).
13. I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, et al., *J. Food Sci. Technol.* **23**, 1 (2015).
14. Y. C. Sim, S. G. Lee, D. C. Lee, et al., *Biotechnol. Lett.* **22**, 137 (2000).
15. M. Li, E. Su, P. You, et al., *PLoS One* **5** (12), e15168 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0015168
16. C. A. S. O. Pinto, P. S. Lopes, F. D. Sarruf, et al., *Braz. J. Pharmaceut. Sci.* **47**(4), 751 (2011).
17. K. Sangeetha and T. E. Abraham, *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **38**, 171 (2006).
18. F. Y. Li, Y. J. Xing, and X. Ding, *Enzyme & Microb. Technol.* **40**, 1692 (2007).
19. Y. Xue, H. Nie, L. Zhu, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 109 (2010).
20. A. A. Homaei, R. H. Sajedi, R. Sariri, et al., *Amino Acids* **38**, 937 (2010).
21. I. E. Moreno-Cortez, J. Romero-Garda, V. Gonzalez-Gonzalez, et al., *Mater. Sci. Engineer. C* **52**, 306 (2015).
22. B. J. Xin, S. F. Si, and G. W. Xing, *Chemistry – An Asian Journal* **5**, 1389 (2010).
23. C. Muller, G. Perera, V. Konig, and A. Bernkop-Schnurch, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* **87**, 125 (2014).
24. A. Manosroi, C. Chankhampan, W. Manosroi, and J. Manosroi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **48** (3), 474 (2013).
25. A. Manosroi, C. Chankhampan, W. Manosroi, and J. Manosroi, *J. Biomed. Nanotechnol.* **8** (5), 720 (2012).
26. Y. Y. Chen, Y. H. Lu, C. H. Ma, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy* **87**, 82 (2017).
27. M. Wang, C. Jia, W. Qi, et al., *Bioresource Technol.* **102**, 3541 (2011).
28. L. Zhou, C. Wang, Y. Jiang, and J. Gao, *Chinese J. Chem. Engineer.* **21**, 670 (2013).
29. B. Sahoo, S. K. Sahu, D. Bhattacharya, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **101**, 280 (2013).
30. И. И. Романовская, С. С. Декина, Р. И. Чаланова и Е. П. Сотникова, *Хим.-фармацевт. журн.* **46** (3), 37 (2012).
31. A. Khalil, C. K. Saurabha, A. S. Adnan, et al., *Carbohydr. Polym.* **5**, 216 (2016).
32. R. L. Kumar, A. K. Narayan, S. Dhivya, et al., *Carbohydr. Polym.* **20**, 172 (2016).
33. A. Sionkowska, *Progr. Polym. Sci.* **36**, 1254 (2011).
34. J. Ji, S. Hao, D. Wu, et al., *Carbohydr. Polym.* **85**, 803 (2011).
35. A. Dincer, S. Becerik, and T. Aydemir, *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 815 (2012).
36. V. Zargar, M. Asghari, and M. Dashti, *Chem. Bio. Eng.* **2**, 204 (2015).
37. A. Sionkowska, A. Planecka, K. Lewandowska, and M. Michalska, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **140**, 301 (2014).
38. D. Chelminiak-Dudkiewicz, M. Ziegler-Borowska, M. Stolarska, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **181**, 1 (2018).
39. D. L. Nettles, S. H. Elder, and J. A. Gilbert, *Tissue Eng.* **8** (6), 1009 (2002).
40. M. H. Struszczyk, *Polymer* **47**, 396 (2002).
41. E. Marsano, E. Bianchi, S. Vicini, et al., *Polymery* **46**, 595 (2005).
42. A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, A. Planecka, and J. Kozłowska, *Polymer Degradation and Stability* **95**, 2486 (2010).
43. M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov, S. M. Sazykina, and M. A. Nakvasina, *Pharmaceut. Chem. J.* **51** (8), 702 (2017).
44. В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, М. А. Наквасина и др., *Биофизика* (Академический проект, М., 2009).
45. K. Dose and S. Risi, *Photochem. Photobiol.* **15**, 43 (1972).
46. M. Novinec and B. Lenardc, *Biomol. Concepts* **4**, 287 (2013).
47. T. Vernet, D. C. Tessier, J. Chatellier, et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 16645 (1995).
48. J. Fernandez-Lucas, D. Castaneda, D. Hormigo, *Trends in Food Science & Technology* **68**, 91 (2017).
49. J.F. Baugher, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* **22**, 163 (1975).
50. M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, et al., *Pharmaceut. Soc. Japan* **131** (5), 697 (2011).
51. M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, and D. K. Majumdar, *Int. J. Nanomed.* **6**, 2097 (2011).
52. A. Sionkowska, B. Kaczmarek, M. Gnatowska, and J. Kowalonek, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **148**, 333 (2015).
53. A. P. P. Praxedes, A. J. C. da Silva, R. C. da Silva, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **376**, 255 (2012).

Chitosan as Photoprotector for Papain Immobilized on Its Matrix

M.G. Holyavka*, **, S.M. Pankova*, ***, Yu.M. Vyshkvorkina****, A.N. Lukin*,
M.S. Kondratyev*****, and V.G. Artyukhov*

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

** Sevastopol State University, Russian Federation, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

*** Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394036 Russia

**** Moscow Institute of Physics and Technology, Kerchenskaya ul. 1a/1, Moscow, 117303 Russia

***** Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

It has been demonstrated that exposure to 453–6040 J/m² of UV radiation results in a decrease in the catalytic activity of papain. Immobilization on chitosan matrix leads to the improved stability of papain molecules irradiated with doses of UV light ranging from 151 to 6040 J/m² compared to that of the free enzyme. Modifications in the IR spectra of immobilized papain practically do not affect the bands caused by the protein component of the system: amide I, amide II, and amide III. Therefore, it is hypothesized that the chitosan matrix acts as a photoprotector for papain immobilized on it. The results can help in developing approaches for the use of UV radiation, papain and chitosan derivatives in combination to speed up the healing process of the skin as well as in finding out the conditions for UV light sterilization of drugs containing papain.

Keywords: UV radiation, adsorption immobilization, papain, chitosan

О ХИРАЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И СТРУКТУР БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

© 2022 г. Е.В. Белова, Е.В. Семенова, В.А. Твердислов

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.

После доработки 07.12.2021 г.

Принята к публикации 20.12.2021 г.

Представлено развитие концепции о роли хиральности в структурообразовании биомакромолекул на примере корреляций во взаимосвязи между хиральной формой лекарственного средства и ее биоактивностью. Выяснение природы хирально-иерархической структуры биомакромолекул-мишеней и симметричной структуры лекарственных препаратов направлено на установление возможной системности хиральных соответствий лекарств и мишеней. Стереоспецифичность взаимодействия лекарства и молекулы-мишени важно учитывать при создании лекарственных препаратов, так как одна хиральная форма лекарственного препарата может обладать терапевтическим эффектом, а другая не усваиваться, быть менее активной или даже вызывать серьезные осложнения, являясь токсичной. Обсуждается биоактивность хиральных лекарств и высказываются предположения о возможной взаимосвязи между знаком хиральной формы лекарственного препарата и его воздействием на конкретную хиральную молекулярную мишень.

Ключевые слова: хиральность, энантиомеры, хиральные лекарства, стереоспецифичность, структурные иерархии.

DOI: 10.31857/S0006302922030073, EDN: ANMONX

Важной структурной особенностью многих биологических молекул и лекарственных веществ является хиральность – способность объекта не совпадать со своим зеркальным отражением при любых комбинациях перемещений и вращений в трехмерном пространстве. Две хиральные молекулы, являющиеся зеркальным отображением друг друга, называются энантиомерами, а две молекулярные структуры более высокого уровня – энантиоморфами. Энантиомеры обладают одинаковыми физико-химическими свойствами (температурами кипения и плавления, плотностью и пр.), но отличаются по своей оптической активности, характеризуемой величиной и знаком вращения плоскости поляризации. Однако энантиомеры, в том числе среди лекарственных препаратов, могут проявлять совершенно разную химическую специфичность в процессах с участием хиральных соединений, так же как и неодинаковую биологическую активность. При создании и использовании лекарственных средств крайне важно учитывать хиральность препарата, так как один энантиомер лекарства может проявлять терапевтическое действие, но его противоположный энантиомер может быть менее активным или полностью неактивным, а в некоторых случаях даже вызывать серьезные побочные эф-

фекты. Это явление в течение многих лет привлекает внимание научного сообщества [1–4]. Широко известным примером лекарственного средства, иллюстрирующим важность роли хиральности в создании лекарственных препаратов, является талидомид [5–8]. С 1957 г. этот препарат использовали как транквилизатор и снотворное, а также назначали беременным женщинам для борьбы с утренними недомоганиями. Однако уже в 1959 г. стали появляться сообщения о случаях периферической нейропатии у пациентов, длительно принимавших талидомид. Вскоре после этого было установлено, что у принимающих это лекарственное средство беременных женщин резко возрастает вероятность рождения детей с врожденными дефектами конечностей и внутренних органов. Талидомид поступил в продажу как рацемат, и позднее было установлено, что терапевтическим эффектом обладает только R-изомер талидомида, в то время как S-изомер оказывает тератогенное действие [5, 8].

Среди используемых в настоящее время лекарственных средств больше половины составляют хиральные препараты, в свою очередь, большая часть этих хиральных лекарств представляет собой рацемат [3]. Более половины разрабатываемых за последние годы лекарств также состоит из

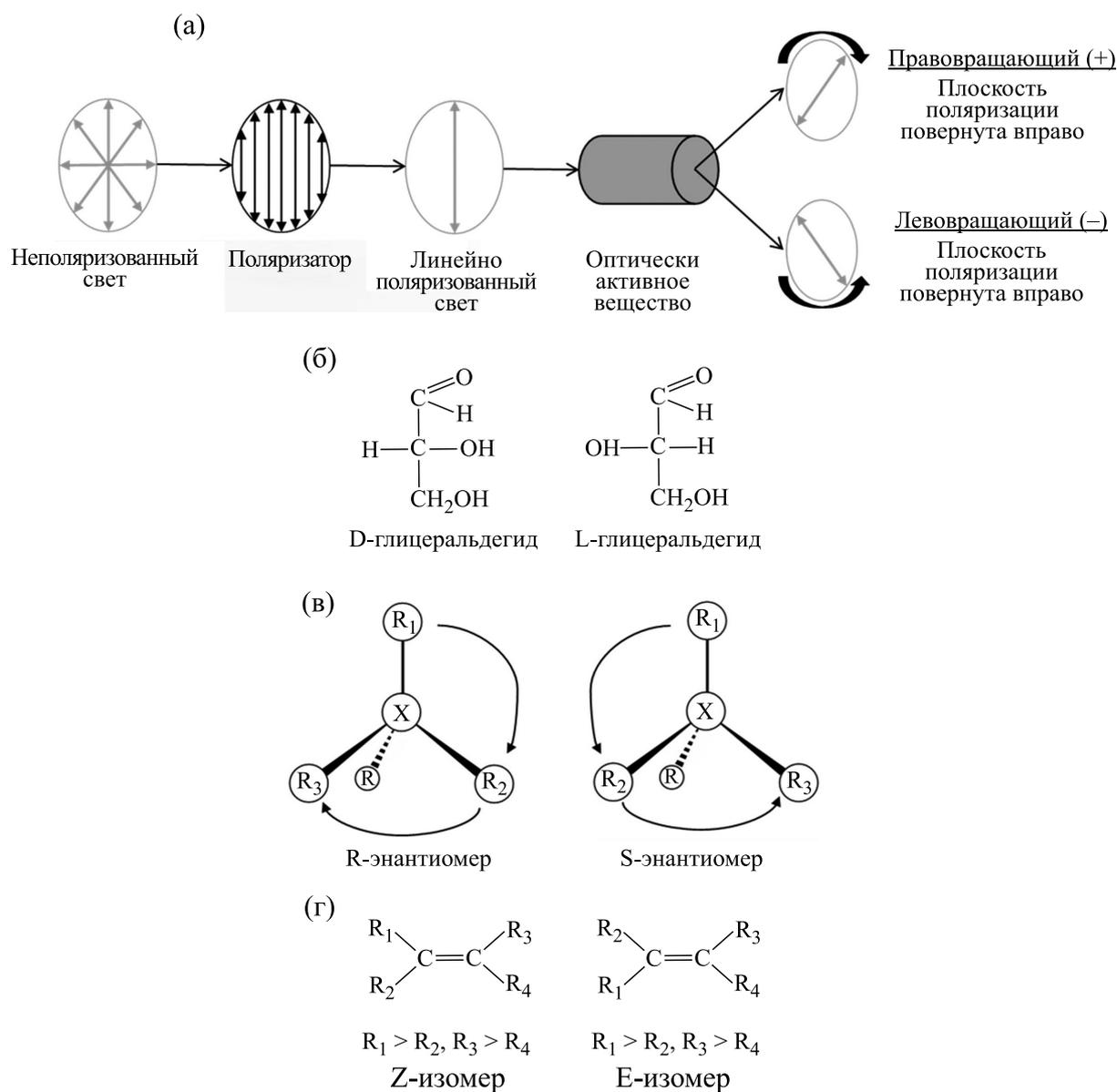


Рис. 1. Правила наименования стереоизомеров: (а) – в соответствии с оптической активностью, (б) – L/D-номенклатура, (в) – R/S-номенклатура, (г) – E/Z-номенклатура.

хиральных молекул. Хиральные препараты используют в лечении широкого спектра заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных. Получение оптически чистых форм вещества является сложной и дорогостоящей задачей, однако их использование во многих случаях могло бы уменьшить дозировку и количество побочных действий препарата.

Биоактивность энантиомеров, их фармакодинамика и фармакокинетика, процесс хиральной инверсии оптических изомеров в живых системах интенсивно исследуются в настоящее время [9–12]. Возможно, выявленная ранее нами системная тенденция чередования знака хиральности

структурных и функциональных уровней для белков и ДНК поможет сделать шаг к лучшему пониманию взаимодействия хирального лекарственного средства с хиральной мишенью [13–15].

НОМЕНКЛАТУРА

Существует несколько вариантов номенклатуры для обозначения энантиомеров (рис. 1). Энантиомеры различают по их оптической активности ((+)/(–)-номенклатура), а также по принятой их абсолютной конфигурации (L/D- и R/S-номенклатуры). В связи с многочисленностью вариан-

тов наименований может наблюдаться некоторая путаница.

В 1848 г. Л. Пастер сделал первое открытие, связанное с оптической активностью молекул. Он получил из раствора кислой натриевой соли виноградной кислоты асимметричные кристаллы тетрагидрата натриево-аммониевой соли [16, 17]. Оказалось, что растворы двух типов кристаллов обладали противоположным оптическим вращением. После осаждения свинцовой или бариевой соли из каждого раствора и вытеснения слабой органической кислоты в результате воздействия на эти соли сильной серной кислотой образовались два энантиомера винной кислоты: правовращающий (вращающий плоскость поляризации линейно-поляризованного света в правую сторону, по часовой стрелке) из одного раствора и левовращающий (вращающий плоскость поляризации линейно-поляризованного света в левую сторону, против часовой стрелки) из другого. Правовращающую разновидность назвали *d*-винной кислотой (от лат. *dexter* – правый, обозначается также «+»), левовращающую – *l*-винной (от лат. *laevus* – левый, обозначается также «–»). Оказалось, что неактивная виноградная кислота представляет собой смесь известной «правой» винной кислоты и ранее не известной «левой» в равных количествах. Такую смесь стали называть рацематом (от лат. *racemus* – виноград). Кроме того, вскоре была получена оптически неактивная ахиральная мезовинная кислота.

Раньше определить истинную пространственную конфигурацию молекул оптически активного вещества не представлялось возможным, но можно было выявить аналогичность конфигураций разных веществ. В 1891 г. Э.Г. Фишер предложил определенное изображение структур органических молекул – проекции Фишера, в том числе для глицеринового альдегида [18]. В 1906 г. М.А. Розанов предложил выбрать глицериновый альдегид как стандарт для установления относительной конфигурации оптически активных молекул [19]. Стереохимически аналогичные правовращающему глицериновому альдегиду вещества относят к *D*-ряду, а родственные его оптическому антиподу – левовращающему глицериновому альдегиду – относят к *L*-ряду. Относительная конфигурация энантиомеров в системе Фишера определялась путем перехода от данной молекулы к *D*- или *L*-глицериновому альдегиду через последовательность химических реакций, которые не затрагивают асимметрический атом углерода [18]. Вместе с тем скоррелировать с конфигурацией глицеринового альдегида конфигурацию молекулы, сильно отличающейся по структуре, химическим путем бывает достаточно затруднительно.

В 1966 г. была опубликована система универсального описания стереоизомеров – *R/S*-номенклатура Кана–Ингольда–Прелога [20]. Для установления абсолютной конфигурации соединения проводится нумерация заместителей у асимметрического центра соединения по правилам последовательного старшинства. Заместители рассматриваются наблюдателем с наиболее удаленной от самого младшего заместителя стороны. Если направление убывания старшинства совпадает с движением по часовой стрелке, то конфигурацию данного асимметрического центра обозначают символом *R* (от лат. *rectus* – правый), а если против часовой стрелки – символом *S* (от лат. *sinister* – левый). Правила последовательного старшинства были специально задуманы так, чтобы оказаться в максимально близком соответствии с ранней систематикой Фишера. В результате большинство *D*-стереоизомеров и, что очень важно, сам глицериновый альдегид имеют *R*-конфигурацию, а *L*-стереоизомеры часто принадлежат к *S*-ряду. Для описания конфигураций молекул с двойными связями также используют правила Кана–Ингольда–Прелога (*E/Z*-номенклатура).

Важно отметить, что правое или левое вращение энантиомера не имеет однозначной корреляции с фактическим взаимным расположением атомов в пространстве и, следовательно, не имеет прямого отношения к правилам назначения наименований *D/L* или *R/S*. Обладающие одинаковым знаком вращения сходные соединения могут иметь противоположные абсолютные конфигурации. Поэтому рядом с *D/L*- или *R/S*-наименованиями может указываться оптическая активность соединения.

ХИРАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА И ФАРМАКОЛОГИЯ

Известно, что противоположные энантиомеры лекарственных препаратов при взаимодействии с хиральными соединениями организма могут проявлять разную биологическую активность, несмотря на одинаковые физико-химические свойства. Данную особенность необходимо учитывать при использовании и разработке лекарственных средств, так как может оказаться, что лишь один энантиомер препарата является терапевтически эффективным, в то время как противоположный является менее активным, полностью неактивным, или вызывает серьезные побочные действия.

На основании литературных источников в данной работе нами была сформирована подборка из 100 хиральных лекарственных средств. Отобранные препараты были классифицированы по биоактивности *R/S*-энантиомеров и (+)/(-)-изомеров. Также были определены мишени воздей-



Рис. 2. Три группы лекарственных препаратов, выделенные согласно знаку хиральности биоактивного энантиомера: с биоактивным «левым» S-энантиомером, с биоактивным «правым» R-энантиомером и с двумя биоактивными энантиомерами.

ствия рассматриваемых препаратов. На основании получившихся классификаций лекарственных средства были разделены на три группы: лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами (рис. 2). В первой группе были дополнительно выделены две подгруппы: препараты, у которых R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и препараты, у которых R-энантиомер менее активен или неактивен. Аналогичные подгруппы были выделены среди «правых» лекарственных средств.

Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером. Большую часть препаратов, представленных в выборке, составляют лекарственные средства с биоактивным «левым» S-энантиомером. Данная группа лекарств была дополнительно разделена на две подгруппы: лекарственные препараты, у которых «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и лекарственные препараты, у которых «правый» R-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или терапевтический эффект не наблюдается.

Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, у которых «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты. Предста-

вителем данной группы является дропропизин – противокашлевое средство. Данный препарат долгое время использовали в терапии в виде рацемата, однако было установлено, что S-энантиомер дропропизина обладает той же противокашлевой активностью, что и рацемическая смесь, но в то же время меньше действует на центральную нервную систему [21]. В настоящее время существует мало безопасных и эффективных препаратов для лечения кашля, часто плохая переносимость противокашлевых лекарственных средств как раз связана с побочными эффектами со стороны центральной нервной системы. Поэтому использование в терапии S-дропропизина из-за меньшего действия на центральную нервную систему является более безопасным и хорошо переносимым методом лечения кашля [22].

Прилокаин – местный анестетик, часто используемый для проводниковой и местной анестезии. Оба энантиомера имеют одинаковую биологическую активность, но S-энантиомер гидролизует медленно, а R-энантиомер гидролизует быстро с образованием толуидина, который вызывает метгемоглобинемию [23].

Напроксен – нестероидное противовоспалительное средство. Данный препарат выпускается в энантимерно чистой форме, представленной только S-изомером. Это связано с тем, что R-энантиомер, во-первых, проявляет в 28 раз

меньшую противовоспалительную активность, во-вторых, является токсичным для печени [24, 25].

К «левым» лекарственным препаратам, у которых «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, также можно отнести такие препараты, как бупивакаин [26], галотан [27], галофантрин [28], кетопрофен [29], клопидогрел [30], метопролол [31], пеницилламин [32], фенфлурамин [33], этамбутол [34].

Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, у которых «правый» R-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается. К лекарствам данной подгруппы в нашей выборке относятся следующие: амлодипин [35, 36], атенолол [37], атропин [38], бензеприл [39], бензетимид [40], бисопролол [41], бунолол [10, 42], валсартан [3], варфарин [43, 44], верапамил [45], вигабатрин [46], допамин [47], дулоксетин [48], зопиклон [49, 50], ибупрофен [51], карведилол [52], кетамин [53], кеторолак [54], клиданак [55], мелфалан [56], мепивакаин [57, 58], метотрексат [59], мопролол [10, 60], оксазепам [3, 61], омепразол [62], офлоксацин [63], пантопризол [64], пенбутолол [10], пиндолол [65], прагабалин [66, 67], пропранолол [68, 69], ропивакаин [70], тетрализол [71], тиамилал [72], тимолол [73], тиопентал [74, 75], фенпрофен [76], фенпрокумон [43], хлорфенирамин [77], ципролол [10, 78], циталопрам [51, 79], эналаприл [80], эсмолол [81].

Оба энантиомера дулоксетина являются ингибиторами обратного захвата норэпинефрина и серотонина. Однако было обнаружено, что S-энантиомер дулоксетина является в два раза более активным, чем R-энантиомер, поэтому впоследствии данный препарат стал вводиться в терапию как энантиомер одной формы [48].

Пенбутолол стал первым β -блокатором, применяемым в клинике как энантиомерно чистый S-изомер. Он был в 200 раз более активен как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с R-энантиомером, и в пять раз более активен, чем пропранолол, используемый в качестве стандарта [10].

Атропин, оказывающий холинолитическое действие, является M-холиноблокатором. Препарат представляет собой рацемическую смесь R- и S-гиосциамина, причем S-гиосциамин обладает более мощным антиму斯卡риновым действием по сравнению с R-гиосциамином или рацематом [38]. Атропин использовался (в форме рацемата) в качестве противоядия при отравлении заринном, но его эффективность часто подвергалась сомнению. Считается, что эффективность препарата может быть повышена при использовании либо S-гиосциамина, либо образца атропина, обога-

щенного S-гиосциамином, поскольку последний обладает большинством физиологических и фармакологических свойств, а R-гиосциамин относительно неэффективен.

Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером. Лекарственные средства данной группы были дополнительно разделены на две подгруппы: лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер отвечает за побочные эффекты; лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или терапевтический эффект не наблюдается.

Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер отвечает за побочные эффекты. Самым ярким и общеизвестным примером биоактивного «правого» лекарственного препарата, у которого «левый» энантиомер отвечает за побочные эффекты, является талидомид. Этот препарат был представлен на рынке в виде рацемата. За время продажи талидомида около 10000 детей во всем мире родились с фокомелией или пороком развития конечностей, из них выжила только половина младенцев [5]. Через несколько лет после начала использования препарата было установлено, что только R-талидомид обладает терапевтическим эффектом, в то время как S-талидомид является тератогенным для организма [5–8]. Согласно недавним исследованиям, S-энантиомер талидомида демонстрирует в десять раз более сильное связывание с цереблном (CRBN) и ингибирование самоубиквитинирования по сравнению с R-изомером [8]. Это подтверждает тот факт, что именно S-талидомид индуцирует тератогенные эффекты.

Другим представителем данной группы является тербуталин. Он оказывает бронхолитическое действие и используется для облегчения астмы. Препарат представлен в виде рацемата, где R-изомер тербуталина избирательно возбуждает β_2 -адренорецепторы, в то время как S-изомер практически не имеет сродства к β_2 -адренорецепторам и вызывает такие побочные эффекты, как гиперреактивность дыхательных путей и сердечные расстройства [82]. Такие побочные эффекты связаны со способностью S-тербуталина активировать мускариновые рецепторы, которые могут генерировать гиперреактивность дыхательных путей при приеме рацемического тербуталина.

Сальбутамол – селективный агонист β_2 -адренорецепторов короткого действия, который используется для лечения астмы и хронического обструктивного заболевания легких. Как правило, препарат представлен в виде рацемической смеси, хотя известно, что R-изомер сальбутамола

имеет в 150 раз большее сродство к β_2 -рецептору по сравнению с S-изомером [83]. Кроме того, S-сальбутамол ассоциируется с токсичностью, так как он косвенно антагонизирует положительные эффекты R-сальбутамола и может давать воспалительные эффекты.

Препарат соталол обладает бета-блокирующей активностью и используется в лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний. Бета-блокирующая активность в основном обеспечивается R-соталолом: данный энантиомер препарата в 14–50 раз эффективнее блокирует рецепторы, чем рацемический соталол, в то время как его S-энантиомер практически неактивен [10, 84]. В то же время оба энантиомера соталола одинаково эффективны в блокировании калиевых каналов. Однако известно, что применение S-энантиомера соталола влечет повышение смертности пациентов с нарушением функции желудочков и последующим инфарктом миокарда [85].

Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, у которых «левый» S-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается. К лекарствам данной подгруппы в нашей выборке можно отнести следующие: атрвастатин [86, 87], аценокумарол [88, 89], ацетилкарнитин [90], баклофен [91, 92], бикалутамид [93], буфуранол [94], генаконазол [95], депренил [96, 97], изопреналин [98], лансопризол [62, 99], локсиглумид [100], мексилетин [101, 102], метадон [43, 103], метилфенидат [104], миконазол [71, 105], никардипин [106–108], оксипутинин [109, 110], пронеталол [111], рабепразол [112], ролипрам [113, 114], сертаконазол [105], сибутрамин [115], фенибут [116], формотерол [117], цетиризин [118, 119], эпинефрин [120], этомидат [75, 121].

Декстроцетиризин – S-энантиомер цетиризина – по-видимому, в десять раз менее эффективен, чем левоцетиризин – R-энантиомер цетиризина [118, 119].

Этомидат уникален среди внутривенных анестетиков, потому что его вводят в виде оптически чистого R-изомера, который является активным компонентом. Анестезирующий эффект проявляется преимущественно у R-энантиомера, он примерно в пять раз сильнее, чем у S-энантиомера этоמידата [75, 121].

Бикалутамид является нестероидным антиандрогеном, который используется при лечении рака предстательной железы. R-энантиомер обладает большей антиандрогенной активностью, а антиандрогенная активность S-энантиомера значительно меньше, если вообще имеется [93].

Лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами. К этой группе в нашей выборке относятся следующие лекарственные препараты: алпренолол [122], венлафаксин [123], инда-

кринон [73, 124], меторфан [125], мirtазапин [126], нимодипин [127], оксапротилил [128], пропafenон [129, 130], тироксин [131], флекаинид [132], флуоксетин [133], циклофосфамид [3, 73], эконазол [105], этодолак [134].

Примером лекарственного средства данной группы является алпренолол. Данный препарат применяется при лечении артериальной гипертензии, стенокардии и аритмии. S-изомер алпренолола имеет примерно в 100 раз большее сродство к β -адренорецепторам, чем R-изомер, но в то же время оба изомера обладают равной эффективностью в стабилизации мембран [122]. Из-за этого действия оба энантиомера алпренолола могут оказывать прямое кардиодепрессивное действие, включая антиаритмическое, не связанное с их блокирующей активностью β -адренорецепторов.

Оба энантиомера флекаинида оказывают сходные электрофизиологические эффекты [132]. Введение одного энантиомера, по-видимому, не дает преимуществ по сравнению с рацемической смесью.

Венлафаксин используется для лечения психических заболеваний, включая депрессию, и доступен для клинического применения в виде рацемической смеси S- и R-энантиомеров [123]. Энантиомеры данного препарата проявляют различные фармакологические свойства: S-венлафаксин избирательно ингибирует обратный захват серотонина, тогда как R-венлафаксин ингибирует поглощение как серотонина, так и норадреналина.

Кроме того, произведена схожая классификация данных лекарственных средств по биоактивности их (+)- и (-)-изомеров (за исключением энантиомеров бензаеприла, валсартана, фенибутата и эналаприла).

Анализ данных по биоактивности энантиомеров лекарств. Приведенные данные по клинической эффективности энантиомеров лекарственных препаратов суммированы в таблице.

Как можно заметить, большая часть лекарственных средств (55 препаратов из 100) из нашей выборки – это лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером. В свою очередь, терапевтически активным «правым» R-энантиомером обладает 31 лекарственное средство, 14 лекарственных препаратов имеют два биоактивных энантиомера.

При рассмотрении биоактивности каждого энантиомера было обнаружено, что среди «правых» R-энантиомеров лекарственных средств 45 препаратов из 100 проявляют терапевтическое действие, и почти такое же количество (43 препарата из 100) являются неактивными или менее активными. В свою очередь, большинство «левых» S-энантиомеров лекарств (69 из 100) являются

Клиническая эффективность энантиомеров лекарственных препаратов

	Лекарственное средство	Биоактивный энантиомер	Энантиомер, отвечающий за побочные эффекты	Энантиомер с меньшим эффектом или отсутствием эффекта
1	Алпренолол	Оба изомера		
2	Амлодипин	S(-)		R(+)
3	Атенолол	S(-)		R(+)
4	Аторвастатин	R,R(+)		S,S(-)
5	Атропин	S(-)		R(+)
6	Аценокумарол	R(+)		S(-)
7	Ацетилкарнитин	R(-)		S(+)
8	Баклофен	R(-)		S(+)
9	Беназеприл	S,S		R,R
10	Бензетимид	S(+)		R(-)
11	Бикалутамид	R(-)		S(+)
12	Бисопролол	S(-)		R(+)
13	Бунолол	S(-)		R(+)
14	Бупивакаин	S(-)	R(+)	
15	Буфуранол	R(-)		S(+)
16	Валсартан	S		R
17	Варфарин	S(-)		R(+)
18	Венлафаксин	Оба изомера		
19	Верапамил	S(-)		R(+)
20	Вигабатрин	S(+)		R(-)
21	Галотан	S(+)	R(-)	
22	Галофантрин	S(-)	R(+)	
23	Генаконазол	R,R(-)		S,S(+)
24	Депренил	R(-)		S(+)
25	Допамин	S(-)		R(+)
26	Дропропизин	S(-)	R(+)	
27	Дулоксетин	S(+)		R(-)
28	Зопиклон	S(+)		R(-)

29	Ибупрофен	S(+)		R(-)
30	Изопреналин	R(-)		S(+)
31	Индакринон	Оба изомера		
32	Карведилол	S(-)		R(+)
33	Кетамин	S(+)		R(-)
34	Кетопрофен	S(+)	R(-)	
35	Кеторолак	S(-)		R(+)
36	Клиданак	S(+)		R(-)
37	Клопидогрел	S(+)	R(-)	
38	Лансопризол	R(+)		S(-)
39	Локсиглумид	R(+)		S(-)
40	Мексилетин	R(-)		S(+)
41	Мелфалан	S(-)		R(+)
42	Мепивакаин	S(+)		R(-)
43	Метадон	R(-)		S(+)
44	Метилфенидат	R,R(-)		S,S(+)
45	Метопролол	S(-)	R(+)	
46	Меторфан	Оба изомера		
47	Метотрексат	S(-)		R(+)
48	Миконазол	R(-)		S(+)
49	Миртазапин	Оба изомера		
50	Мопролол	S(-)		R(+)
51	Напроксен	S(+)	R(-)	
52	Никардипин	R(+)		S(-)
53	Нимодипин	Оба изомера		
54	Оксазепам	S(+)		R(-)
55	Оксапротилин	Оба изомера		
56	Оксибутинин	R(-)		S(+)
57	Омепразол	S(-)		R(+)
58	Офлоксацин	S(-)		R(+)
59	Пантопризол	S(-)		R(+)
60	Пенбутолол	S(-)		R(+)

61	Пеницилламин	S(-)	R(+)	
62	Пиндолол	S(-)		R(+)
63	Прегабалин	S(+)		R(-)
64	Прилокаин	S(+)	R(-)	
65	Пронеталол	R(-)		S(+)
66	Пропафенон	Оба изомера		
67	Пропранолол	S(-)		R(+)
68	Рабепразол	R(+)		S(-)
69	Ролипрам	R(-)		S(+)
70	Ропивакаин	S(-)		R(+)
71	Сальбутамол	R(-)	S(+)	
72	Сергаконазол	R(-)		S(+)
73	Сибутрамин	R(+)		S(-)
74	Соталол	R(-)	S(+)	
75	Талидомид	R(+)	S(-)	
76	Тербуталин	R(-)	S(+)	
77	Тетрамизол	S(-)		R(+)
78	Тиамилал	S(-)		R(+)
79	Тимолол	S(-)		R(+)
80	Тиопентал	S(-)		R(+)
81	Тироксин	Оба изомера		
82	Фенибут	R		S
83	Фенопрофен	S(+)		R(-)
84	Фенпрокумон	S(-)		R(+)
85	Фенфлурамин	S(+)	R(-)	
86	Флекаинид	Оба изомера		
87	Флуоксетин	Оба изомера		
88	Формотерол	R,R(-)		S,S(+)
89	Хлорфенирамин	S(+)		R(-)
90	Целипролол	S(-)		R(+)
91	Цетиризин	R(-)		S(+)
92	Циклофосфамид	Оба изомера		

93	Циталопрам	S(+)		R(-)
94	Эконазол	Оба изомера		
95	Эналаприл	S		R
96	Эпинефрин	R(-)		S(+)
97	Эсмолол	S(-)		R(+)
98	Этамбутол	S,S(+)	R,R(-)	
99	Этодолак	Оба изомера		
100	Этомидат	R(+)		S(-)

биоактивными и демонстрируют терапевтический эффект. К изомерам, вызывающим побочные действия, чаще относятся R-энантиомеры препаратов (12 из 100 «правых» энантиомеров по сравнению с 4 из 100 «левых»).

При анализе классификации биоактивности (+)/(-)-изомеров были получены похожие соотношения. Стоит обратить внимание на то, что среди изомеров, вызывающих побочные действия, в равных долях встречаются (+)- и (-)-изомеры (по 8 изомеров из 96). Исходя из полученных данных, можно было бы предположить, что большинство S-энантиомеров рассматриваемых препаратов обладают левовращающей оптической активностью, а большинство R-энантиомеров – правовращающей. Однако в нашей подборке чаще встречаются S(+)- и R(-)-энантиомеры, то есть корреляция между оптической активностью и расположением заместителей в пространстве не наблюдается, что согласуется со сведениями из литературы.

Подготовленная нами выборка хиральных лекарственных препаратов также была классифицирована по типу лекарственного средства. Препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером чаще проявляют гипотензивное, антиангинальное, антиаритмическое и анальгезирующее действие, в то время как препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером чаще являются бронхолитическими и противогрибковыми средствами.

С помощью баз данных лекарственных препаратов [135–137] были установлены мишени воздействия для большинства рассмотренных лекарств. Белки являются мишенями для 94 лекарственных средств, для трех препаратов мишенью является молекула ДНК, для двух лекарственных средств мишенями воздействия являются такие небольшие молекулы, как протопорфирин IX и ион меди. К сожалению, в использованных в данной работе базах данных нет информации о ми-

шенях воздействия индакринона. Данное лекарственное средство относится к классу петлевых диуретиков [124]. Препарат используется в виде рацемата, где R-энантиомер проявляет мочегонную активность, а S-энантиомер индуцирует секрецию мочевой кислоты [73].

ЗНАКОПЕРЕМЕННЫЕ ХИРАЛЬНЫЕ ИЕРАРХИИ СТРУКТУР В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Явление хиральности (гомохиральности) – важнейший признак биологических молекул: белки сформированы из «левых» (L) аминокислотных остатков, нуклеиновые кислоты содержат «правые» (D)-сахара – рибозу и дезоксирибозу [138]. В перспективе нам предстоит выяснить соответствие между активными формами хиральных лекарств и знаками хиральности структур разного уровня биомолекул, являющихся непосредственными мишенями препаратов.

Ранее нами впервые были выделены как хиральные инварианты знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» асимметричного атома углерода в sp^3 -гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур в макромолекулярных системах – от энантиомеров к энантиоморфам, где проявлениями хиральности выступают спиральность и суперспиральность [13–15]. Отмечено чередование знака хиральности при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК в А- и В-форме (рис. 3).

Следует отметить, что ранжирование структур через знакопеременную хиральность не всегда буквально совпадает с традиционным их описанием, выявляя «тонкую структуру» уровней иерархической организации. Возвращаясь к белкам, заметим, что тривиальное «право-левое» чередование знака хиральности в иерархиях их

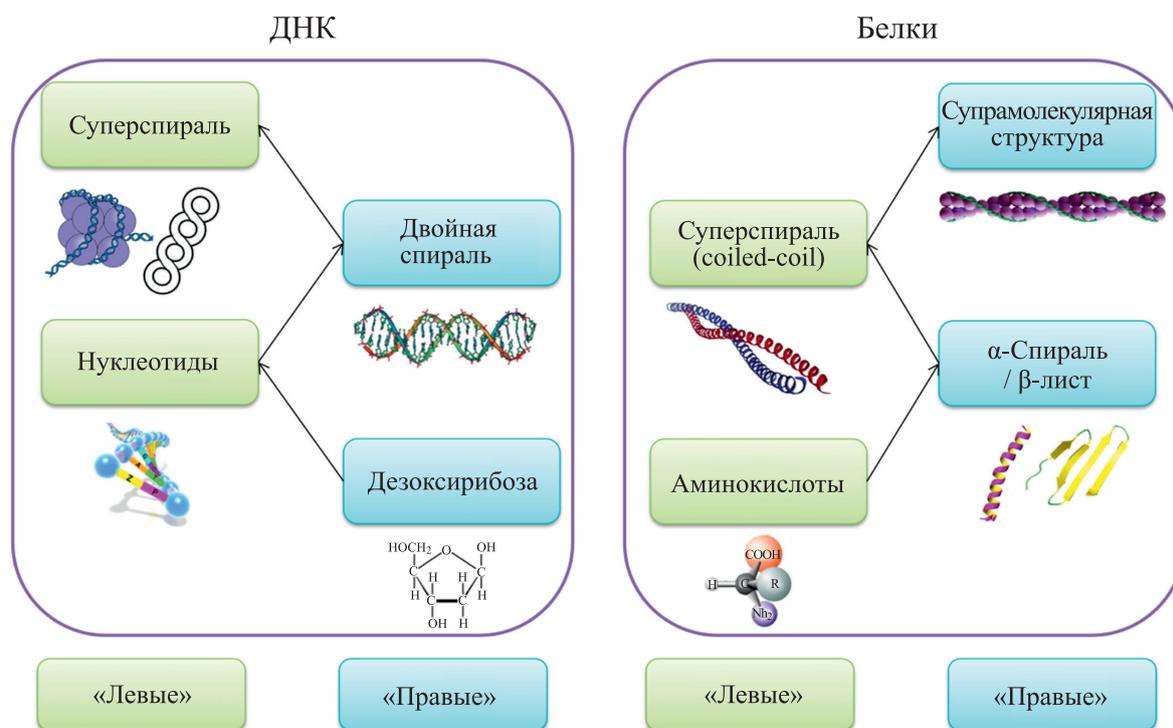


Рис. 3. Чередование знака хиральности при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК и белков.

структур не является абсолютным, но всегда имеет разумное объяснение.

Кроме того, в процессе хиральной систематизации молекулярной биологии проявляется и другая тенденция – межмолекулярные взаимодействия макромолекул одного и разных классов, по-видимому, зависят не только от непосредственного комплементарного соответствия в зоне их контакта, но и от симметричных (хиральных) соответствий, вовлеченных во взаимодействие энантиоморфов – крупномасштабных внутримолекулярных и надмолекулярных структур. Так, правозакрученные микрофиламенты ориентированы на взаимодействие с левыми фосфолипидами мембраны клетки. Левозакрученные ламины и микротрубочки направлены на взаимодействие с ДНК – правыми двойными спиралью. При взаимодействии между однотипными макромолекулами на разных структурных уровнях, как мы предполагаем, сродство характеризуется одинаковым знаком хиральности (белок–белок – «левый»–«левый», нуклеиновые кислоты – ДНК, РНК – «правый»–«правый»).

Вслед за тем, как нами были выявлены и систематизированы определенные закономерности в структурообразовании и взаимодействиях важнейших хиральных биомолекулярных структур, представляется логичным рассмотреть также и

систему соответствий хиральных лекарств и хиральных молекулярно-биологических структур.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стереоспецифические взаимодействия противоположных энантиомеров с хиральными биомолекулами определяют различия в фармакодинамических и фармакокинетических свойствах энантиомеров. Рассмотреть связь данных свойств энантиомеров с их хиральными характеристиками можно на примере одной из групп наиболее тщательно исследованных в этом отношении фармакологических препаратов – β-адреноблокаторов. По химическому строению эти препараты можно разделить на две группы: арил-аминоэтанола и арилоксиаминопропанола [10]. В обеих группах (–)-изомеры проявляют большую β-адренолитическую активность, при этом в ариламиноэтанольную группу входят энантиомеры с абсолютной R-конфигурацией (например, соталол), а в арилоксиаминопропанольную группу – с S-конфигурацией (например, метопролол, пенбутолол, пропранолол, тимолол и др.).

Считается, что более активный энантиомер β-адреноблокатора более эффективно связывается с рецептором в строго определенных стереохимических условиях. Кроме того, полагают, что решающую роль в связывании с рецептором иг-

рают специфические функциональные группы, присутствующие в молекуле блокатора. Мы считаем, что в дополнение в этом рассмотрении нужно учитывать хиральность как самого лиганда, так и рецептора.

β -адренорецепторы относятся к рецепторам, сопряженным с G-белком, - интегральным мембранным белкам, которые содержат семь доменов, пронизывающих мембрану (трансмембранных спиралей). У β -адренорецепторов наблюдается преимущественно α -спиральная (т.е. правозакрученная) конформация [139]. Аминокислотные остатки обеспечивают специфические взаимодействия с молекулами β -адреноблокатора, но, на наш взгляд, важна и хиральность структур самого рецептора. Пока не представляется однозначно понятным, важно ли соответствие знаков хиральности абсолютных конфигураций или оптической активности (правозакрученных α -спиралей и «левоповорачивающих» R-энантиомеров ариламиноэтанольной группы или более активных S-энантиомеров арилоксиаминопропанольной группы). Этот подход к рассмотрению взаимодействия хирального препарата и мишени поможет усовершенствовать подходы к открытию и разработке лекарств с заданным знаком хиральности.

Полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы для выработки системы корреляций во взаимосвязи между хиральной формой лекарственного средства и ее воздействием на конкретную молекулярную мишень. В дальнейшем настоящая работа может помочь в установлении природы различий в воздействии противоположных энантиомеров на живой организм, что, в свою очередь, может быть использовано при разработке лекарственных средств.

Настоящая работа является поисковой, феноменологический уровень исследования предполагает дальнейшее понимание симметричных основ специфического взаимодействия биомолекул. В перспективе нам предстоит выяснить соответствие между активными формами хиральных лекарств и знаками хиральности структур разного уровня биомолекул, являющихся непосредственными мишенями препаратов или же элементами конструкций этих биомолекул-машин. Систематизированные в данной статье по знаку хиральности данные по сотне лекарств дают возможность развить данное направление биофизической фармакологии для более целенаправленного и успешного конструирования лекарственных препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Междисциплинарной научно-образо-

вательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса» и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» в рамках гранта № 21-2-9-42-1 (стипендиат Е.В. Семенова).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. H. Brooks, W. C. Guida, and K. G. Daniel, *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 760 (2011).
2. R. L. Nation, *Clin. Pharmacokinet.* **27**, 249 (1994).
3. L. A. Nguyen, H. He, and C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* **2**, 85 (2006).
4. S. W. Smith, *Toxicol. Sci.* **110**, 4 (2009).
5. M. E. Franks, G. R. Macpherson, and W. D. Figg, *Lancet* **363**, 1802 (2004).
6. J. Knobloch, D. Jungck, and A. Koch, *Curr. Mol. Med.* **17**, 108 (2017).
7. E. Tokunaga, T. Yamamoto, E. Ito, and N. Shibata, *Sci. Rep.* **8**, 17131 (2018).
8. T. Mori, T. Ito, S. Liu, et al., *Sci. Rep.* **8**, 1294 (2018).
9. M. Budău, G. Hancu, A. Rusu, et al., *Adv. Pharm. Bull.* **7**, 495 (2017).
10. R. Čížmáriková, L. Habala, J. Valentová, and M. Markuliak, *Appl. Sci.* **9**, 625 (2019).
11. P. Raikar, B. Gurupadayya, and V. S. Koganti, *Curr. Drug Deliv.* **15**, 1393 (2018).
12. F. Qin, X. Wang, L. Jing, et al., *Chirality* **25**, 934 (2013).
13. V. A. Tverdislov, *Biophysics* **58**, 128 (2013).
14. V. A. Tverdislov and E. V. Malyshko, *Physics Uspekhi* **62**, 354 (2019).
15. V. A. Tverdislov and E. V. Malyshko, *Symmetry* **12**, 587 (2020).
16. D. E. Drayer, in *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 3rd Edition, Ed. by K. Jozwiak, W. J. Lough, and I. W. Wainer (CRC Press, New York, 2012), pp. 1–17.
17. L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.* **24**, 442 (1848).
18. K. Jozwiak, in *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 3rd Edition, Ed. by K. Jozwiak, W. J. Lough, and I. W. Wainer (CRC Press, New York, 2012), pp. 17–29.
19. M. A. Rosanoff, *J. Am. Chem. Soc.* **28**, 114 (1906).
20. L. C. Cross and W. Klyne, *Pure Appl. Chem.* **45**, 11 (1976).

21. M. M. Salunkhe and R. V. Nair, *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 333 (2001).
22. S. Birring, F. de Blasio, P. V. Dicipinigitis, et al., *Pulm. Pharmacol. Ther.* **56**, 79 (2019).
23. M. Siluveru and J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 389 (1996).
24. H. S. Smith, in *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2nd Edition, Ed. by M. J. Aminoff and R. B. Daroff (Acad. Press, London, Waltham, San Diego, 2014), pp. 610–613.
25. B. Petrie and D. Camacho-Muñoz, *Environ. Chem. Lett.* **19**, 43 (2021).
26. M. Souza, M. P. Marques, G. Duarte, and V. L. Lanchote, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **164**, 268 (2019).
27. R. D. Miller, L. I. Eriksson, L. A. Fleisher, et al., in *Miller's Textbook of Anesthesia*, 7th edition (Elsevier, Philadelphia, 2009).
28. J. M. Karle, *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 791 (1997).
29. F. Główska, M. Karaźniewicz-Łada, E. Grześkowiak, et al., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **36**, 167 (2011).
30. R. Vardanyan and V. Hruby, in *Synthesis of Best-Seller Drugs*, Ed. by R. Vardanyan and V. Hruby (Acad. Press, Amsterdam, 2016), pp. 383–412.
31. A. Mozayani, P. Singer, and G. Jones, *J. Anal. Toxicol.* **19**, 519 (1995).
32. Y. Wang, J. Zhou, Q. Han, et al., *Electroanalysis* **24**, 1561 (2012).
33. R. Pool, in *Fat: Fighting the Obesity Epidemic* (Oxford University Press, Oxford, 2001), pp. 183–212.
34. N. Chhabra, M. L. Aseri, and D. Padmanabhan, *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **3**, 16 (2013).
35. G. Hancu, M. Budău, L. K. Kántor, and A. Cârje, *Adv. Pharm. Bull.* **5**, 35 (2015).
36. J. Dalal, J. C. Mohan, S. S. Iyengar, et al., *Int. J. Hypertens.* **2018**, 8681792 (2018).
37. R. Mehvar, M. E. Gross, and R. N. Creamer, *J. Pharm. Sci.* **79**, 881 (1990).
38. R. Kumar, J. Martens, and R. Bhushan, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **38**, 111 (2015).
39. E. Kublin, K. Czerwińska, E. Wyszomirska, et al., *Acta Pol. Pharm.* **72**, 219 (2015).
40. J. J. Li, in *Imides: Medicinal, Agricultural, Synthetic Applications and Natural Products Chemistry*, Ed. by F. A. Luzzio (Elsevier, Amsterdam, 2019), pp. 353–366.
41. Y. Horikiri, T. Suzuki, and M. Mizobe, *J. Pharm. Sci.* **87**, 289 (1998).
42. J. P. Gonzalez and S. P. Clissold, *Drugs* **34**, 648 (1987).
43. K. M. Rentsch, *J. Biochem. Biophys. Methods* **54**, 1 (2002).
44. D. S. Hewick and J. McEwen, *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 458 (1973).
45. K. Häussermann, B. Benz, V. Gekeler, et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **40**, 53 (1991).
46. E. Ben-Menachem, in *Antiepileptic Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 138, Ed. by M. J. Eadie and F. J. E. Vajda (Springer, Berlin, Heidelberg, 1999), pp. 375–394.
47. O. Hornykiewicz, *Amino Acids* **23**, 65 (2002).
48. F. A. Larik, A. Saeed, P. A. Channar, and H. Mehfooz, *Tetrahedron Asymmetry* **27**, 1101 (2016).
49. N. N. Salama, H. E. Zaazaa, L. M. Abd El Halim, et al., *J. Planar. Chromat.* **27**, 166 (2014).
50. S. Sangaraju, M. Lakshmi Kanth, B. M. Rao, and N. Someswararao, *Die Pharmazie* **64**, 717 (2009).
51. C. Sánchez, K. P. Bøgesø, B. Ebert, et al., *Psychopharmacology* **174**, 163 (2004).
52. P. A. van Zwieten, *Cardiology* **82** (Suppl. 3), 19 (1993).
53. J. Muller, S. Pentylala, J. Dilger, and S. Pentylala, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **6**, 185 (2016).
54. A. Kulo, A. Smits, S. Maleškić, et al., *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **17**, 54 (2017).
55. S. Tamura, S. Kuzuna, and K. Kawai, *J. Pharm. Pharmacol.* **33**, 29 (1981).
56. J. Brook, J. R. Bateman, and J. L. Steinfeld, *Cancer Chemother. Rep.* **36**, 25 (1964).
57. W. M. Goebel and D. F. Mitchell, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **40**, 471 (1975).
58. B. F. Tullar, *J. Med. Chem.* **14**, 891 (1971).
59. S. M. Cramer, J. H. Schornagel, K. K. Kalghatgi, et al., *Cancer Res.* **44**, 1843 (1984).
60. I. K. Morton and J. M. Hall, in *Concise Dictionary of Pharmacological Agents* (Springer, Netherlands, Heidelberg, 1999), pp. 185.
61. G. Hancu, A. Gáspár, and A. Gyéresi, *Farmacia* **56**, 381 (2008).
62. A. Novotna, A. Srovnalova, M. Svecarova, et al., *PLoS One* **9**, e98711 (2014).
63. L. Rabbaa, S. Dautrey, N. Colas-Linhart, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2274 (1977).
64. Y. K. Cho, M. G. Choi, Y. T. Bak, et al., *Dig. Dis. Sci.* **57**, 3189 (2012).
65. H. Wang and Z. Shen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 291 (2006).
66. X. Chen, D. Zhang, J. Deng, and X. Fu, *J. Chromatogr. Sci.* **46**, 42 (2008).
67. L. N. Chennuru, T. Choppari, R. P. Nandula, et al., *Molecules* **21**, 1578 (2016).
68. A. M. Barrett and V. A. Cullum, *Br. J. Pharmacol.* **34**, 43 (1968).
69. K. Stoschitzky, W. Lindner, and W. Kiowski, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 268 (1995).
70. J. H. McClure, *Br. J. Anaesth.* **76**, 300 (1996).
71. X. J. Cai, X. Z. Xu, and C. X. Pan, *Anal. Lett.* **38**, 1149 (2005).
72. M. Sueyasu, K. Fujito, K. Makino, et al., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **723**, 307 (1999).
73. N. M. Davies and X. W. Teng, *Adv. Pharm.* **1**, 242 (2003).
74. D. L. Downie, N. P. Franks, and W. R. Lieb, *Anesthesiology* **93**, 774 (2000).
75. S. Mitra and P. Chopra, *Ind. J. Anaesth.* **55**, 556 (2011).

76. A. M. Evans, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 237 (1992).
77. H. Alkadi and R. Jbeily, *Infect. Disord. Drug Targets* **18**, 88 (2018).
78. M. H. Perrone and J. A. Barrett, *Am. Heart J.* **121**, 677 (1991).
79. C. Sánchez, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **99**, 91 (2006).
80. R. I. Stefan, H. Y. Aboul-Enein, and G. L. Radu, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **28**, 305 (1998).
81. R. Gorczynski, C. Quon, R. Krasula, and W. Matier, *Cardiovasc. Drug Rev.* **3**, 99 (2007).
82. H. Beng, H. Zhang, R. Jayachandra, et al., *Chirality* **30**, 759 (2018).
83. G. A. Jacobson, S. Raidal, K. Robson, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**, 1436 (2017).
84. C. Funck-Brentano, *Eur. Heart J.* **14**, 30 (1993).
85. A. L. Waldo, A. J. Camm, H. deRuyter, et al., *Lancet* **348**, 7 (1996).
86. M. Korhonova, A. Doricakova, and Z. Dvorak, *PLoS One* **10**, e0137720 (2015).
87. B. D. Roth, *Prog. Med. Chem.* **40**, 1 (2002).
88. J. Godbillon, J. Richard, A. Gerardin, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **12**, 621 (1981).
89. T. Meinertz, W. Kasper, C. Kahl, and E. Jähnchen, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **5**, 187 (1978).
90. M. Kagawa, Y. Machida, and H. Nishi, *J. Chromatogr. A* **857**, 127 (1999).
91. H. Müller, J. Zierski, D. Dralle, et al., in: *Local-spinal Therapy of Spasticity*, Ed. by H. Müller, J. Zierski, and R.D. Penn (Springer, Berlin, Heidelberg, 1988), pp. 223–226.
92. M. Singh, P. Malik, and R. Bhushan, *J. Chromatogr. Sci.* **54**, 842 (2016).
93. I. D. Cockshott, S. D. Oliver, J. J. Young, et al., *Bio-pharm. Drug Dispos.* **18**, 499 (1997).
94. B. Nagy, N. Dima, C. Paizs, et al., *Tetrahedron Asymmetry* **25**, 1316 (2014).
95. H. Kim, E. Radwanski, R. Lovey, et al., *Chirality* **14**, 436 (2002).
96. K. Magyar, B. Szende, V. Jenei, et al., *Neurochem. Res.* **35**, 1922 (2010).
97. E. Szökő, H. Kalász, and K. Magyar, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 315 (1999).
98. J. Pagadala, K. Williams-Guy, M. M. Nooh, et al., *Med. Chem. Commun.* **2**, 726 (2011).
99. H. Katsuki, H. Yagi, K. Arimori, et al., *Pharm. Res.* **13**, 611 (1996).
100. G. Varga, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**, 621 (2002).
101. A. De Luca, F. Natuzzi, G. Lentini, et al., *Arch. Pharmacol.* **352**, 653 (1995).
102. Z. Gurabi, B. Patocskai, B. Györe, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **95**, 830 (2017).
103. K. Kristensen, C. B. Christensen, and L. L. Christrup, *Life Sci.* **56**, PL45 (1995).
104. D. J. Heal and D. M. Pierce, *CNS Drugs* **20**, 713 (2006).
105. J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández, et al., *J. Org. Chem.* **76**, 2115 (2011).
106. M. Lin, O. Aladejebi, and G. H. Hockerman, *Eur. J. Pharmacol.* **670**, 105 (2011).
107. I. Mak, J. Kramer, and W. Weglicki, *Coronary Artery Disease* **3**, 1095 (1992).
108. T. Takenaka, I. Miyazaki, M. Asano, et al., *Jpn. J. Pharmacol.* **32**, 665 (1982).
109. M. J. Kennelly, *Rev. Urol.* **12**, 12 (2010).
110. L. Noronha-Blob and J. F. Kachur, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 562 (1991).
111. R. Howe and B. S. Rao, *J. Med. Chem.* **11**, 1118 (1968).
112. T. Andersson and L. Weidolf, *Clin. Drug Investig.* **28**, 263 (2008).
113. D. R. Brocks, M. Vakily, and R. Mehvar, in *Chirality in drug design and development*, Ed. by I. K. Reddy and R. Mehvar (Marcel Dekker, New York, 2004), pp. 191–280.
114. H. Wachtel, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 440 (1983).
115. M. Link, R. Novotná, B. Suchanova, et al., *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 405 (2005).
116. M. Dambrova, L. Zvejniece, E. Liepinsh, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **583**, 128 (2008).
117. D. Schmidt, B. L. Källström, B. Waldeck, et al., *Arch. Pharmacol.* **361**, 405 (2000).
118. M. S. Benedetti, M. Plisnier, J. Kaise, et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 571 (2001).
119. K. Blake and H. Raissy, *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* **26**, 157 (2013).
120. D. Kirkpatrick, J. Yang, and M. Trehy, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **40**, 556 (2017).
121. S. L. Tomlin, A. Jenkins, W. R. Lieb, and N. P. Franks, *Anesthesiology* **88**, 708 (1998).
122. M. Ebadi, in *CRC Desk reference of clinical pharmacology* (CRC Press, Boca Raton, 1997), pp. 37–38.
123. A. L. P. C. Godoy, A. Rocha, C. da Silva Souza, and V. L. Lanchote, *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 567 (2016).
124. P. H. Vlasses, H. H. Rotmensch, B. N. Swanson, et al., *Pharmacotherapy* **4**, 272 (1984).
125. D. Tedesco, A. Pietra, F. Rossi, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **81–82**, 76 (2013).
126. S. A. Anttila and E. V. Leinonen, *CNS Drug Rev.* **7**, 249 (2001).
127. H. Wanner-Olsen, F. B. Gaarskaer, E. O. Mikkelsen, et al., *Chirality* **12**, 660 (2000).
128. R. J. Crossley, in *Chirality and Biological Activity of Drugs* (CRC Press, Boca Roca, 1995).
129. H. K. Kroemer, C. Funck-Brentano, D. J. Silberstein, et al., *Circulation* **79**, 1068 (1989).
130. Q. Zhou, T. W. Yao, and S. Zeng, *World J. Gastroenterol.* **7**, 830 (2001).
131. D. Jin, A. P. Kumar, G. Song, and Y. Lee, *Microchem J.* **88**, 62 (2008).
132. H. K. Kroemer, J. Turgeon, R. A. Parker, and D. M. Roden, *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 584 (1989).
133. M. Cărcu-Dobrin, M. Budău, G. Hancu, et al., *Saudi Pharm. J.* **25**, 397 (2017).
134. N. Inoue, M. Nogawa, S. Ito, et al., *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 655 (2011).

135. D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. C. Guo, et al., *Nucl. Acids Res.* **46**, D1074 (2017).
136. J. Tang, Z. U. Tanoli, B. Ravikumar, et al., *Cell Chem. Biol.*, **25**, 224 (2018).
137. Y. Wang, S. Zhang, F. Li, et al., *Nucl. Acids Res.* **48**, D1031 (2020).
138. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition (Garland Science, New York, 2002).
139. H. Jung, R. Windhaber, D. Palm, and K. D. Schnackerz, *Biochemistry* **35**, 6399 (1996).

On the Chirality of Drugs and Biomacromolecule Structures

E.V. Belova, E.V. Semenova, and V.A. Tverdislov

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The development of the concept of a role of chirality in the structure formation of biomacromolecules is demonstrated using correlations between the chiral form of a drug and its bioactivity as an example. Understanding the nature of the chiral-hierarchical structure of biomacromolecules as targets and the symmetry structure of drugs is of great importance for establishing the possible systematic character of chiral correspondences between drugs and targets. It is crucial to take the stereoselectivity of drug-target molecule interactions into account when creating drugs, since one chiral form of the drug may have a therapeutic effect but the other one may be non-digestible, weakly active, or even cause severe side effects, and be toxic. The bioactivity of chiral drugs is discussed and assumptions about the possible relationship between the drug chirality and the drug effect on a specific chiral molecular target are made.

Keywords: chirality, enantiomers, chiral drugs, stereoselectivity, structure hierarchies

УДК 577.3

ЭФФЕКТЫ СКРЫТОЙ СИММЕТРИИ В ДИНАМИКЕ ЛИНЕЙНЫХ ПОЛИМЕРОВ И БИОПОЛИМЕРОВ

© 2022 г. К.В. Шайтан*, **

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/1

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: shaytan49@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Рассмотрены эффекты двух типов симметрии для линейных полимеров: пространственной симметрии относительно трансляций и вращения макромолекулы как целого в однородной вязкой среде и симметрии относительно перестановки в цепи одинаковых мономерных звеньев (или одинаковых по химическому строению участков полимерной цепи). Показано, что в однородной вязкой среде для макромолекулы с жесткими связями при релаксационном фолдинге выполняется закон сохранения — сумма векторов поворотов по торсионным углам равна нулю. Симметрия относительно перестановок в полимерной цепи одинаковых мономерных звеньев при определенных условиях приводит к образованию энергетических воронок, удовлетворяющих принципу минимальной фрустрации, которые соответствуют спиральным или мультиспиральным пространственным структурам. При этом имеется самая глубокая центральная воронка и менее глубокие сателлитные воронки, отделенные друг от друга энергетическими барьерами. Такая топография энергетической воронки соответствует целому ряду эффектов, которые наблюдаются в кинетике фолдинга белков (вулканообразный профиль поверхности свободной энергии, чувствительность рефолдинга белков к способу денатурации и др.). При вычислении топографии поверхности свободной энергии возникает параметр характеристической температуры T_0 , который определяется как выигрыш в энергии при сворачивании цепи в расчете на одну конформационную степень свободы. Показано, что при температуре $T > 0.26T_0$ происходит разрушение пространственной структуры свернутого полимера. Параметр T_0 и температура денатурации в рассматриваемой системе возникают из базовых математических принципов устройства энергетических ландшафтов в конфигурационном пространстве торсионных углов с топологией многомерного тора и соображений симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев. Например, при температурах денатурации биополимеров порядка 60°C это соотношение приводит к оценке энергии невалентных связей мономеров порядка 2.5 ккал/моль, приходящихся на одну конформационную степень свободы, что очень похоже на водородные связи в водной среде. Два типа обсуждаемых симметрий и их влияние на динамику макромолекул и топографию энергетических ландшафтов линейных полимеров при определенных условиях могут действовать совместно. Возникающие при этом эффекты могут оказаться интересными с точки зрения добиологической физико-химической эволюции макромолекул в направлении формирования пула линейных полимеров с уникальными пространственными структурами.

Ключевые слова: закономерности динамики линейных полимеров в вязкой среде, энергетические ландшафты линейных полимеров и биополимеров, пространственная структура биополимеров, динамика фолдинга, принцип минимальной фрустрации для энергетической воронки, проблема калибровки силовых полей, многомерные ряды Фурье, свободная энергия биополимера, критическая температура денатурации, физико-химическая молекулярная эволюция.

DOI: 10.31857/S0006302922030085, EDN: ANNCQS

Проблемы формирования пространственной структуры и динамики полимеров и биополиме-

ров находятся в фокусе внимания в течение многих лет и изучаются различными экспериментальными и теоретическими методами (см., например, работы [1–13]). Прогресс в понимании фундаментальных закономерностей, лежащих в основе принципов формирования простран-

Сокращения: ППЭ — поверхность потенциальной энергии, ИППЭ — идеальная поверхность потенциальной энергии, ПСЭ — поверхность свободной энергии.

ственной структуры и динамического поведения биополимеров, в настоящее время ограничен достаточно простыми феноменологическими представлениями (см., например, работы [3–5, 7–10, 12]) и результатами компьютерного молекулярного моделирования отдельных биополимерных структур с использованием различных силовых полей и протоколов [15–18]. Накоплен огромный объем численных экспериментов по моделированию различных биополимеров, критическое осмысление которого в направлении фундаментальных физических закономерностей, лежащих в основе структурной и динамической организации биополимерных систем, невозможно без дальнейшей разработки общих теоретических представлений о динамике такого рода объектов и соответствующих математических инструментов. Заметим также, что до настоящего времени отсутствует и физически осмысленная постановка задачи для ряда принципиальных вопросов, лежащих в основе возникновения и функционирования живых систем. Так, не очень понятными являются физические принципы, которые лежат в основе формирования строго определенных (уникальных) пространственных структур линейных полимеров, в частности, биополимеров. Являются ли, например, наблюдаемые пространственные структуры белков игрой случая, когда некие аминокислотные последовательности имеют единственный глобальный минимум свободной энергии и возможность его достижения за разумное время. Или имеются некие физические закономерности, которые определяют и регулируют это явление? Около 30 лет назад возникла гипотеза или принцип минимальной фрустрации энергетической воронки [14] в применении к топографии многомерной энергетической поверхности полипептидов, которые формируют пространственные белковые структуры. Однако до настоящего времени не было никаких физических или математических аргументов в пользу именно такого устройства энергетической поверхности, в частности, белков. Более того, в варианте полностью случайного формирования достаточно сложных макромолекул, которые могут сформировать уникальные пространственные структуры, становится практически неразрешимой проблема их первоначального возникновения в неживой природе. Имеющаяся неясность в самых фундаментальных вопросах, касающихся физических механизмов образования прототипов биополимеров на добиологическом этапе эволюции и в физических основах формиро-

вания уникальных пространственных структур конформационно лабильных биомacroмолекул в живых системах заставляет нас искать и анализировать самые базовые принципы, которые могут быть использованы Природой для решения таких структурных задач.

Ранее в серии работ мы обсуждали закономерности, вызванные влиянием вязкости среды на динамику линейных полимеров [19], а также роль топологии конфигурационного пространства линейных полимеров при формировании поверхности потенциальной энергии и поверхности свободной энергии макромолекул [20–22]. Ниже мы рассматриваем эти проблемы с точки зрения симметрии полимера (биополимера) относительно трансляций и поворотов макромолекулы как целого в однородной вязкой среде и симметрии относительно перестановок одинаковых звеньев в линейной полимерной цепи. Различного рода симметрии являются одними из наиболее фундаментальных характеристик для понимания свойств и физического устройства самых разных объектов [23]. Обсуждаемые в статье эффекты симметрии, насколько нам известно, ранее не рассматривались. Как мы увидим, две столь различные по своей природе симметрии при определенных условиях могут действовать вместе и оказаться важным фактором в молекулярной физико-химической эволюции в направлении формирования линейных полимеров с уникальной пространственной структурой.

ЭФФЕКТЫ СИММЕТРИИ ОТНОСИТЕЛЬНО ТРАНСЛЯЦИЙ И ПОВОРОТОВ МАКРОМОЛЕКУЛЫ КАК ЦЕЛОГО В ОДНОРОДНОЙ ВЯЗКОЙ СРЕДЕ

Как известно, система уравнений движения атомов в линейной полимерной цепи (как и практически любой системы взаимодействующих материальных точек) в однородной вязкой среде может быть записана в следующем виде [24]:

$$\dot{p}_i + \Gamma_i p_i = F_i, \quad (1)$$

где p_i – компонента импульса i -го атома в цепи, Γ_i – затухание, равное отношению коэффициента γ_i вязкого трения i -го атома к его массе m_i , F_i – компонента суммы сил, которые действуют на i -й атом. Точка над переменной означает взятие полной производной по времени. Решение уравнений (1) можно представить в общем виде

$$\begin{aligned} p_i(t) &= p_i(0)e^{-\Gamma_i t} + e^{-\Gamma_i t} \int_0^t F_i(\tau) e^{\Gamma_i \tau} d\tau = \\ &= \frac{1}{\Gamma_i} F_i(t) + [p_i(0) - \frac{1}{\Gamma_i} F_i(0)] e^{-\Gamma_i t} - \frac{1}{\Gamma_i} e^{-\Gamma_i t} \int_0^t \dot{F}_i(\tau) e^{\Gamma_i \tau} d\tau. \end{aligned} \quad (2)$$

Зависимость компонент сил от времени в уравнении (2) нужно понимать таким образом, что в функции F_i , которая определяет зависимости сил от координат атомов мы подставляем реальные траектории или зависимости координат от времени из решения системы уравнений (1). Производная силы по времени под интегралом в правой части формулы (2) имеет порядок отношения величины силы к характерному времени изменения силы или характерному времени изменения межатомных расстояний τ . Для конформационных движений в водной среде это время лежит в наносекундном и более длительных временных диапазонах [2–8]. Время затухания $1/\Gamma_i$, как это видно из первого слагаемого в формуле (2), есть характерное время релаксации скорости частиц, которое в жидкости (воде) лежит в субпикосекундном диапазоне [25]. Поэтому порядок величины отношения последнего и первого слагаемых во второй части формулы (2) составит $1/(\tau\Gamma_i) \sim 10^{-4}$. Тем самым, на временах $t > 1/\Gamma_i \sim 10^{-13}$ с с высокой точностью решение системы уравнений (1) становится эквивалентным решению этой системы уравнений без первого (инерциального) члена. Заметим, что за время порядка $1/\Gamma_i \sim 10^{-13}$ с стартовая конформация макромолекулы практически не изменяется. С точностью до членов порядка $1/(\tau\Gamma_i)$ при временах $t \gg 1/\Gamma_i \sim 10^{-13}$ с получаем уравнения движения в привычной форме:

$$\gamma_i \dot{\vec{r}}_i = -\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i}, \quad (3)$$

где U – потенциальная энергия, зависящая от расстояний между частицами и их взаимодействия с окружающей средой, \vec{r}_i – радиусы-вектора положений частиц в пространстве. Уравнение (3) для движения в сильно вязкой среде используют обычно без указания асимптотических условий его применимости. Однако эти условия необходимо иметь в виду при выводе различных соотношений с использованием решений (3), принимая во внимание, что получаемые при этом формулы работают с точностью порядка $1/(\tau\Gamma_i)$.

Ранее мы обсуждали эффекты, связанные с добавлением к уравнениям типа (3) стохастической силы (теплового шума) и жестких связей [19]. Эти дополнительные факторы не сказываются принципиально на основных выводах, и мы в данной работе не будем усложнять проводимые ниже выкладки.

Если среда, в которой находится макромолекула, однородна, то потенциальная энергия и система уравнений (3) инвариантны относительно перемещения всей системы как целого на некий вектор \vec{d} . Полагая вектор \vec{d} малым, запишем

изменение потенциальной энергии при трансляции системы как целого

$$\delta U = \vec{d} \sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} = 0,$$

или

$$\sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} = 0. \quad (4)$$

Формула (4) отражает тот факт, что сумма всех сил внутри макромолекулы равна 0. Следовательно, из инвариантности системы относительно трансляций как целого в однородной вязкой среде получаем закон сохранения

$$\sum_i \gamma_i \dot{\vec{r}}_i = 0, \quad (5)$$

или

$$\sum_i \gamma_i \vec{r}_i = c\vec{R} = const, \quad (6)$$

где c – некоторое число размерности коэффициента трения. Физический смысл этой величины можно определить из следующих соображений. Приложим к каждой частице постоянную внешнюю силу \vec{f}_i . Тогда в правой части (5) будет стоять сумма внешних сил \vec{f} , приложенных к системе частиц, и уравнение для движения всей системы в вязкой среде будет иметь вид

$$c\dot{\vec{R}} = \vec{f}. \quad (7)$$

Из уравнения (7) понятно, что коэффициент c есть суммарный коэффициент трения:

$$c = \sum_i \gamma_i. \quad (8)$$

Другими словами, при конформационных движениях в отсутствие внешних сил точка \vec{R} (условно – динамический центр молекулы) не смещается. Положение этой точки определяется начальной конфигурацией системы. Физически это может быть понято как невозможность придания молекуле направленного движения только за счет сил вязкого трения. Если все коэффициенты трения одинаковы, то эта точка имеет тот же смысл, что и центр масс системы частиц с одинаковой массой. В случае одинаковых значений $\Gamma_i = \Gamma$ из системы уравнений (1) также наглядно получаем уравнение для изменения полного импульса макромолекулы в вязкой среде

$$\vec{P}(t) = \sum_i \vec{p}_i(t) = \vec{P}(0)e^{-\Gamma t}. \quad (9)$$

Иначе говоря, на временах, существенно больших времени релаксации скорости частиц, поступательное движение молекулы как целого прекращается.

Умножим далее векторно правую и левую часть уравнений (3) на соответствующие радиус-вектора и просуммируем уравнения:

$$\sum_i \gamma_i [\dot{\vec{r}}_i \times \vec{r}_i] = - \sum_i \left[\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \times \vec{r}_i \right]. \quad (10)$$

Принимая во внимание, что в однородной среде потенциальная энергия инвариантна относительно поворотов молекулы как целого и вводя вектор поворота вокруг некоторой оси $\delta\phi$ таким образом, что направление вектора совпадает с направлением оси, а длина вектора равна углу поворота [24], получаем для малых углов изменение радиусов-векторов частиц:

$$\delta\vec{r} = [\delta\phi \times \vec{r}]. \quad (11)$$

где мы воспользовались правилом циклической перестановки векторов в смешанном произведении. Так как вектор $\delta\phi$ произволен, то получаем из уравнений (10) и (12), что сумма моментов сил трения (так же как и сумма внутренних моментов сил в макромолекуле) равна 0:

$$\sum_i \gamma_i [\dot{\vec{r}}_i \times \vec{r}_i] = 0. \quad (13)$$

Физически это означает, что за счет сил трения нельзя закрутить молекулу как целое. В простейшем случае одинаковых значений Γ_i из системы уравнений (1) получаем для полного момента импульса системы:

$$\vec{M}(t) = \sum_i [\vec{p}_i(t) \times \vec{r}_i(t)] = \vec{M}(0) e^{-\Gamma t}, \quad (14)$$

то есть за время, большее времени релаксации скорости частиц, вращение молекулы как целого прекращается.

Соотношения (5) и (13) являются вполне очевидными, но на их основе можно получить и другой интересный интеграл движения для линейной полимерной цепи с жесткими связями в вязкой среде.

Рассмотрим линейную полимерную цепь (рис. 1), в которой длины валентных связей и валентные углы практически не изменяются при движении. Заметим, что добавление в уравнение (1) жестких связей, которые фиксируют

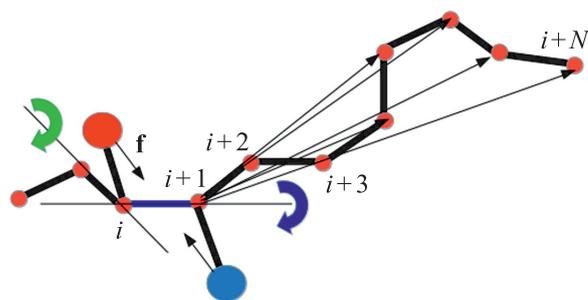


Рис. 1. Повороты вокруг связей в полимерной цепи в результате действия силы притяжения f боковых групп. В вязкой среде при заданной угловой скорости поворота вокруг связи между узлами i и $i + 1$ силы трения будут возрастать по мере увеличения расстояния узлов цепи от оси поворота. Тем самым силы трения узлов цепи будут вызывать также и повороты по другим связям.

Тогда для изменения потенциальной энергии при повороте получаем:

$$\delta U = \sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \delta \vec{r}_i = \sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} [\delta \phi \times \vec{r}_i] = - \delta \phi \sum_i \left[\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \times \vec{r}_i \right] = 0, \quad (12)$$

геометрические параметры химических связей не влияет на суммы соотношений (5) или (13). При фиксированных длинах связей и валентных углах суммарное смещение произвольного i -го узла происходит в соответствии с уравнениями (3) только за счет поворотов вокруг связей между узлами цепи.

Введем вектора угловых скоростей поворота по торсионному углу ϕ_i , которые направлены вдоль связи от i -го узла цепи к $(i + 1)$ -му узлу:

$$\dot{\phi}_i = \frac{\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i}{|\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i|} \frac{d\phi_i}{dt}.$$

Линейная скорость движения i -го узла определяется как сумма вкладов от поворотов вокруг всех связей в соответствии с формулой (11):

$$\dot{\vec{r}}_i = \sum_{k=1}^N [\dot{\phi}_k \times (\vec{r}_i - \vec{r}_k)]. \quad (15)$$

Заметим, что при рассмотрении мгновенных значений скоростей у нас не возникает проблем, связанных с некоммутативностью поворотов вокруг связей. Повороты вокруг первой и последней связи в случае линейной цепи приводят к поворотам макромолекулы как целого вокруг соответствующих осей. За исключением концевых атомов, минимум два члена в сумме (15), связан-

ные с поворотами по смежным к i -му узлу связям, равны 0.

Воспользуемся далее инвариантностью системы относительно трансляций в однородной вязкой среде. Подставляя выражение (15) в соотношения (5), получим

$$\begin{aligned} \sum_i \gamma_i \dot{\vec{r}}_i &= \sum_i \gamma_i \sum_k \{[\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_i] - [\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_k]\} = \\ &= \sum_k [\dot{\vec{\phi}}_k \times c\vec{R}] - (\sum_i \gamma_i) \sum_k [\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_k] = 0. \end{aligned} \quad (16)$$

Вводя вектор суммы векторов угловых скоростей поворотов вокруг связей

$$\begin{aligned} \sum_i \gamma_i \sum_k \{[[\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_i] \times \vec{r}_i] - [[\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_k] \times \vec{r}_i]\} &= \\ = \sum_i \gamma_i [[\dot{\vec{\Phi}} \times \vec{r}_i] \times \vec{r}_i] - \sum_i \gamma_i [[\dot{\vec{\Phi}} \times \vec{R}] \times \vec{R}] &= \\ = \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot \vec{r}_i) \vec{r}_i - \dot{\vec{\Phi}} \sum_i \gamma_i \vec{r}_i^2 + \sum_i \gamma_i \{\dot{\vec{\Phi}} \vec{R}^2 - \vec{R}(\dot{\vec{\Phi}} \cdot \vec{R})\} = 0. \end{aligned} \quad (19)$$

Выделяя члены с суммой векторов угловых скоростей получим

$$\dot{\vec{\Phi}} (\sum_i \gamma_i \vec{r}_i^2 - \sum_i \gamma_i \vec{R}^2) = \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot \vec{r}_i) \vec{r}_i - \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot \vec{R}) \vec{R}. \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \dot{\vec{\Phi}} (\sum_i \gamma_i (\vec{r}_i - \vec{R}_0)^2 - \sum_i \gamma_i (\vec{R} - \vec{R}_0)^2) &= \\ = \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot (\vec{r}_i - \vec{R}_0)) (\vec{r}_i - \vec{R}_0) - \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot (\vec{R} - \vec{R}_0)) (\vec{R} - \vec{R}_0). \end{aligned} \quad (21)$$

Поэтому, выбирая в качестве начала координат неподвижную точку с вектором \mathbf{R} (6), получаем:

$$\dot{\vec{\Phi}} \sum_i \gamma_i (\vec{r}_i - \vec{R})^2 - \sum_i \gamma_i (\dot{\vec{\Phi}} \cdot (\vec{r}_i - \vec{R})) (\vec{r}_i - \vec{R}) = 0. \quad (22)$$

Полагая суммарный вектор угловой скорости не равным 0 и умножая скалярно на него уравнение (22), приходим к соотношению

$$\dot{\vec{\Phi}}^2 \sum_i \gamma_i (\vec{r}_i - \vec{R})^2 \sin^2 \alpha_i = 0, \quad (23)$$

где α_i — углы между суммарным вектором угловых скоростей и радиус-векторами частиц относительно начала координат (точки \mathbf{R}). Множитель при квадрате суммарной угловой скорости может быть равен 0 только в исключительном случае строго линейной конфигурации макромолекулы. В любом ином случае получаем противоречие.

$$\dot{\vec{\Phi}} = \sum_k \dot{\vec{\phi}}_k, \quad (17)$$

в соответствии с выражениями (8) и (16) получаем:

$$[\dot{\vec{\Phi}} \times \vec{R}] = \sum_k [\dot{\vec{\phi}}_k \times \vec{r}_k]. \quad (18)$$

Заметим, что уравнение (18) не зависит от выбора начала координат.

Воспользуемся далее изотропностью однородной вязкой среды и подставим выражение (15) в соотношения (13). С учетом свойства двойного векторного произведения и соотношения (18), а также уравнений (6) и (8), получаем:

Заметим, что соотношение (20), так же как и соотношение (18), не зависит от выбора начала системы отсчета \mathbf{R}_0 :

Следовательно, сумма векторов угловых скоростей поворотов в линейном полимере в вязкой среде должна быть равна 0:

$$\dot{\vec{\Phi}} = \sum_k \dot{\vec{\phi}}_k = \sum_k \dot{\phi}_k \vec{b}_k / b_k = 0. \quad (24)$$

В формуле (24) мы также для наглядности ввели величины угловых скоростей и вектора \mathbf{b}_k вдоль связей между узлами цепи. Реально выполнение условия (24) означает, что при релаксационном сворачивании полимерной цепи процесс идет таким образом, что направления поворотов вокруг связей неким образом чередуются так, чтобы в сумме компенсировать друг друга (это мы интуитивно чувствовали при разборе ситуации на рис. 1). В результате имеет место тенденция к формированию спиральных или спиралеподобных структур. Этот эффект мы наблюдали ранее при моделировании динамики сворачивания по-

липептидных цепей [17,18] и модельных линейных полимеров в вязкой среде [16].

Дополнительную информацию о характере конформационных движений цепи можно получить, умножая (24), например, скалярно на специально сконструированные векторы. Так, например, если умножить (24) на вектор \vec{l} :

$$\vec{l} = \sum_i \vec{b}_i,$$

который соединяет концы цепи, получим

$$\sum_k \dot{\phi}_k l_k = 0; \quad l_k = (\vec{b}_k \vec{l}) / b_k. \quad (24.1)$$

Отметим, что обсуждаемые закономерности динамики полимерной цепи в однородной вязкой среде наиболее применимы к условиям, когда все узлы цепи экспонированы в раствор, то есть в ситуации развернутого состояния или достаточно рыхлого клубка. Если цепь находится в развернутом состоянии, то скалярные произведения l_k в сумме (24.1) преимущественно положительные. Следовательно, угловые скорости должны часто менять знак для выполнения условия (24.1). По мере сворачивания цепи ориентация направления векторов связей относительно вектора \vec{l} будет изменяться и чередование знаков угловых скоростей станет не столь выраженным. Эта ситуация наблюдалась ранее при моделировании сворачивания длинной полипептидной цепи [17].

Заметим, что при учете в уравнениях движения флуктуаций среды и переходе от уравнений (1) к уравнениям Ланжевена [19, 25] полученные выше соотношения выполняются лишь в среднем по ансамблю. С другой стороны, соотношения типа (24) могут дать идеи для проведения численных и обычных экспериментов для дополнительного выяснения механизмов самоорганизации пространственной структуры макромолекул и их комплексов в различных условиях. Отметим также, что сочетание полученных здесь и в работе [19] правил движения репрезентативной точки при конформационных движениях в вязкой среде и особенностей топографии энергетических ландшафтов биополимеров и подобных им структур [20–22] может оказаться существенным для понимания физических принципов формирования линейных полимеров с уникальными пространственными структурами (см. ниже).

В известной работе [9], посвященной 50-летию проблемы фолдинга, отмечались нерешенные вопросы, среди которых в данном контексте актуально также следующее. Это практическое отсутствие экспериментальных данных об устройстве энергетического ландшафта, необходимого для фолдинга и отсутствие количественной микроскопической картины понимания фи-

зики и правил фолдинга для произвольных последовательностей. Ниже мы рассмотрим, что дополнительно можно сделать в этих направлениях, отталкиваясь от топологии конфигурационного пространства и соображений симметрии относительно перестановки одинаковых звеньев линейной полимерной цепи.

ЭФФЕКТЫ СИММЕТРИИ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕСТАНОВКИ ОДИНАКОВЫХ ЗВЕНЬЕВ В ЛИНЕЙНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ ЦЕПИ

Как хорошо известно [26], пространственная структура и динамика линейных полимеров определяется поворотами по двугранным (торсионным) углам вокруг одинарных химических связей с барьерами внутреннего вращения порядка нескольких ккал/моль. Валентные колебания не вносят заметного вклада в изменение пространственной конфигурации макромолекулы. Деформация валентных углов может иметь некоторое значение для уменьшения высоты барьера в случае стерических ограничений при повороте вокруг связи [11]. Для дальнейшего рассмотрения этот эффект также не имеет принципиального значения.

Таким образом, потенциальная энергия линейной полимерной цепи (точнее, ее часть, которая зависит от конформации) может быть представлена функцией N торсионных углов ϕ_i . Для линейного полимера это функция большого числа переменных, каждая из которых циклически меняется от $-\pi$ до $+\pi$. Область определения каждого угла – это точки окружности. Область определения множества N углов – это топологическое произведение окружностей или многомерный тор (гипертор) [27] (рис. 2). Иначе говоря, функция потенциальной энергии задана в конфигурационном пространстве с топологией многомерного тора.

Тор (и гипертор) можно развернуть, сделав в евклидовом пространстве соответствующей размерности ячейки с периодическими граничными условиями (рис. 2б). Такая развертка может быть более удобна для восприятия общих геометрических соотношений и мы по умолчанию будем ей пользоваться ниже, обращая внимание на те моменты, где периодичность ячеек играет существенную роль.

Как известно, топология пространства, на котором заданы функции, оказывает существенное влияние на свойства этих функций [27]. Функция, заданная на гиперторе, может быть разложена в многомерный дискретный ряд Фурье [28]

$$U(\vec{\varphi}) = \sum_{\vec{n}} A(\vec{n}) e^{i\vec{n}\vec{\varphi}}, \quad (25)$$

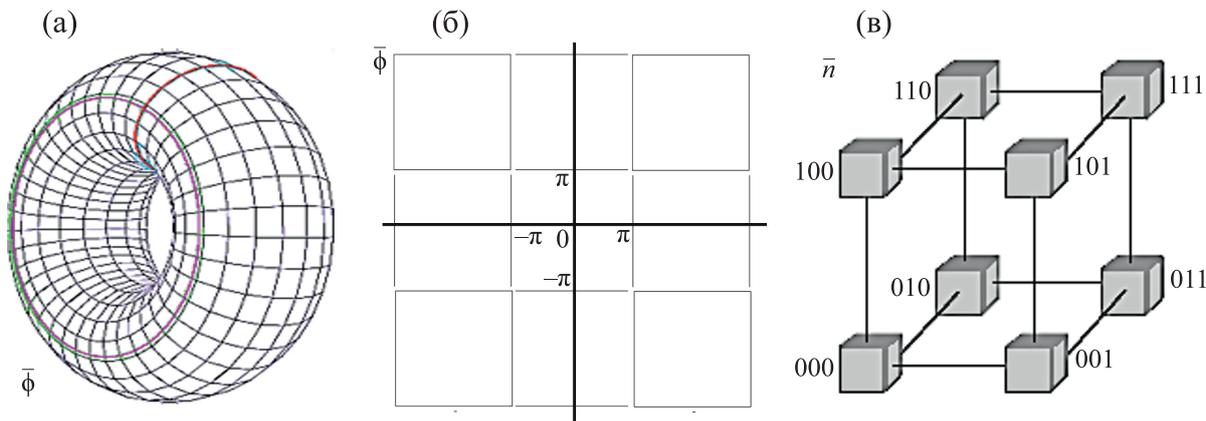


Рис. 2. Схематическое изображение: (а) – топологии конфигурационного пространства торсионных углов (для двух измерений); (б) – развертки тора в евклидовом пространстве (пример двумерных ячеек с периодическими граничными условиями); (в) – векторного пространства номеров гармоник (для трех измерений), показана единичная ячейка.

где мы для сокращения записи ввели алгебраический вектор набора торсионных углов

$$\bar{\varphi} = (\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_i, \dots, \varphi_N) \quad (26)$$

и алгебраический вектор соответствующих номеров гармоник ряда Фурье

$$\bar{n} = (n_1, n_2, \dots, n_i, \dots, n_N); \quad n_k = 0, \pm 1, \pm 2. \quad (27)$$

Скалярное произведение векторов определено обычным образом:

$$\bar{n}\bar{\varphi} = \sum_{k=1}^N n_k \varphi_k. \quad (28)$$

Коэффициенты разложения (25) определяются интегралом

$$A(\bar{n}) = \frac{1}{(2\pi)^N} \int_{-\pi}^{\pi} \dots \int_{-\pi}^{\pi} U(\bar{\varphi}) e^{-i\bar{n}\bar{\varphi}} d^N \bar{\varphi}. \quad (29)$$

Заметим, что привычные нам межатомные потенциалы имеют сингулярность в нулевой точке. Однако эта сингулярность лежит в классически

запрещенной области и не мешает пользоваться разложением в ряд Фурье для поверхности потенциальной энергии (ППЭ). Более подробно это обстоятельство рассмотрено в работе [22]. Заметим также, что разложением, например, в трехмерный ряд Фурье часто пользуются для вычисления вклада кулоновских взаимодействий при моделировании динамики систем с периодическими граничными условиями (суммы Эвальда).

В коэффициентах разложения в выражении (25) содержится вся информация об устройстве многомерной ППЭ, которая связана с особенностями химического строения макромолекулы, ее электронном состоянии и свойствах ее окружения. Комплексная форма представления разложения выбрана из соображений удобства. Так как функция потенциальной энергии вещественна, то для коэффициентов разложения имеем очевидные соотношения (ниже в тексте жирным шрифтом мы обозначаем многомерные алгебраические вектора, а в формулах сохраняем обозначение с чертой сверху):

$$A(\bar{n}) = |A(\bar{n})| e^{i\theta(\bar{n})}; \quad A(-\bar{n}) = A(\bar{n})^* = |A(\bar{n})| e^{-i\theta(\bar{n})}. \quad (30)$$

Аргумент комплексной амплитуды $A(\mathbf{n})$ в выражениях (30) изменяется в пределах

$$-\pi < \theta(\bar{n}) \leq \pi. \quad (31)$$

Из вещественности суммы в выражении (25) приходим также к заключению, что амплитуды и фазы коэффициентов разложения связаны условиями

$$|A(-\bar{n})| = |A(\bar{n})|; \quad \theta(-\bar{n}) = -\theta(\bar{n}). \quad (32)$$

Соотношение для фаз θ можно представить также в виде скалярного произведения вектора номеров гармоник \mathbf{n} (27) и некоторого вектора $\mathbf{C}(\mathbf{n})$, который является четной функцией векторов номеров гармоник:

$$\theta(\pm\bar{n}) = \pm h(\bar{n}) - \bar{C}(\bar{n})\bar{n}. \quad (33)$$

Здесь $h(\mathbf{n})$ принимает значение 0, если фаза θ лежит в правой комплексной полуплоскости (действительная часть амплитуды в выражении

(30) положительна) или 1 в противоположном случае.

Эти почти очевидные соотношения будут весьма полезны для понимания общих свойств энергетической поверхности (25), заданной на многомерном торе множества углов поворотов вокруг химических связей. Так как в сумме в выражении (25) слагаемые для векторов \mathbf{n} и $-\mathbf{n}$ всегда встречаются парой, получаем

$$U(\vec{\varphi}) = \sum_{\vec{n}} (-1)^{h(\vec{n})} |A(\vec{n})| \cos[\vec{n}(\vec{\varphi} - \vec{C}(\vec{n}))]. \quad (34)$$

Заметим, что в выражении (34) мы учли соотношения (32) и (33) и то, что при суммировании по всем возможным векторам \mathbf{n} в выражении (34) каждое слагаемое разложения (25) встречается два раза. Коэффициенты разложения $A(\mathbf{n})$ и фазы $\theta(\mathbf{n})$ членов ряда определяют, вообще говоря, очень сложное строение многомерной поверхности потенциальной энергии с огромным числом критических точек [29].

Отметим важный момент. Такое представление ППЭ принципиально отличается от обычно используемых при молекулярном моделировании методов расчета ППЭ с использованием атом-атомных потенциалов и чем-то отдаленно напоминает использование сумм Эвальда [30, 31]. Тщательная калибровка параметров силовых полей для конкретных типов молекулярных структур часто позволяет добиваться хороших результатов и определенного согласия экспериментальных и расчетных данных. Однако, как уже отмечалось [20], расчет ППЭ путем суммирования вкладов атом-атомных потенциалов имеет очевидное внутреннее противоречие, связанное с точностью вычислений. Для системы, например, из 1000 атомов мы имеем порядка миллиона слагаемых, каждое из которых имеет ошибку, составляющую порядка процента. Поэтому точность вычисления ППЭ (а тем более, градиентов ППЭ) оказывается в общем случае под большим вопросом. Вместе с тем парадоксальным образом методы молекулярной динамики для больших молекул все же работают, несмотря на то, что точность определения всей ППЭ и ее градиентов плохо контролируется. Объяснение этого парадокса мы видим в том, что согласно общим закономерностям для конформационных движений в вязкой среде [19] и результатам первой части статьи реально доступными оказываются лишь относительно небольшие области конфигурационного пространства и для молекулярного моделирования нужна аппроксимация ППЭ только на очень ограниченных и относительно гладких участках ППЭ [19]. Такая аппроксимация, по-видимому, оказывается возможной за счет калибровки параметров силовых полей для конкретных типов систем. (Заметим, что роль вязкой среды во многих расчетах выполняет термостат). С другой

стороны, понятно, что такой вариант расчета ППЭ не годится для постановки задачи при изучении общих вопросов, связанных с формированием пространственной структуры и динамических свойств систем макромолекул. В этом случае мы должны строго придерживаться внутренне непротиворечивой схемы описания ППЭ, основанной на базовых принципах. Использование приведенных выше многомерных разложений Фурье кажется чрезмерно сложным (в общем случае так и есть) по сравнению с использованием точечных атом-атомных потенциалов. С другой стороны, представление энергетического ландшафта в виде суммы таких потенциалов не дает возможности анализировать общие закономерности устройства ультрамногомерных ППЭ, которые связаны с топологией конфигурационного пространства, симметрией систем относительно перестановок одинаковых звеньев, возможной химической эволюцией структур линейных полимеров и др. С точки зрения обычно принятых методов представления ППЭ в виде суммы парных потенциалов кажется весьма странным или игрой невероятного случая само возникновение макромолекулярных структур с ППЭ, которые имеют единственный глобальный минимум и удовлетворяют условиям фолдинга за разумное время. Тем более не возникает и никаких идей относительно топографии ППЭ. Ниже, используя аналитическую структуру ППЭ, описываемую выражением (25), мы обсудим принципиальную возможность реализации в процессе формирования, отбора и эволюции линейных полимеров относительно гладких энергетических поверхностей с четко выраженным единственным глобальным минимумом.

Отметим сразу важную особенность ППЭ, определяемой формулой (34) в случае зеркально симметричных структур (т.е. линейных полимеров без хиральных звеньев). Так как при зеркальном отражении знаки углов меняются на противоположные, то для зеркально симметричных структур имеем

$$U_s(\vec{\varphi}) = U_s(-\vec{\varphi}). \quad (35)$$

В этом случае коэффициенты разложения в выражении (25) являются вещественными и в формулах (33) и (34) мы должны положить

$$\vec{C}_s(\vec{n}) = 0 \quad (36)$$

для всех векторов гармоник многомерного Фурье-разложения (25). В этом случае разложение для ППЭ сводится к виду

$$U_s(\vec{\varphi}) = \sum_{\vec{n}} (-1)^{h(\vec{n})} |A(\vec{n})| \cos[\vec{n}\vec{\varphi}]. \quad (37)$$

Среди множества теоретически возможных потенциальных поверхностей, описываемых выражениями (25) или (34), выделяется класс по-

верхностей для хиральных линейных полимеров, которые могут иметь единственный четкий глобальный минимум, отвечающий уникальной пространственной структуре. Для таких поверхностей значение фазы $\theta(\mathbf{n})$ в членах разложения может быть выбрано, например, следующим образом [20]:

$$\theta(\pm\bar{n}) = \pm\pi - \bar{n}\bar{\varphi}_m, \quad (38)$$

где $\bar{\varphi}_m$ — вектор торсионных углов для положения глобального минимума. Соотношения (32) и (33) для фаз $\theta(\mathbf{n})$ при этом, очевидно, выполняются. В этом случае поверхность потенциальной энергии может быть записана в виде

$$U(\bar{\varphi}) \sim \sum_n |A(\bar{n})| \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m)]. \quad (39)$$

Необходимым условием такого аналитического представления ППЭ, как уже отмечалось, является хиральность полимерной молекулы. Если бы молекула была зеркально симметрична, то у нее должен наблюдаться, по меньшей мере, второй симметричный минимум с координатами в точке $-\bar{\varphi}_m$. Заметим также, что при зеркальном отражении, когда меняются знаки всех угловых переменных и мы переходим к структуре с другой хиральностью, значение потенциальной энергии (39) не изменяется в силу выполнения условия (32) для модуля коэффициентов разложения и четности косинуса.

Аналитическая структура потенциальной поверхности (39) является оптимальной среди прочих для описания уникальной пространственной структуры с точки зрения феномена фолдинга, например, полипептидных цепей в уникальные пространственные белковые структуры. Поверхности, для которых имеется аналитическое представление (39), ниже мы будем называть идеальными поверхностями потенциальной энергии (ИППЭ). Возможные причины формирования и отбора в ходе молекулярной эволюции таких ИППЭ мы обсудим несколько ниже. Для реальных систем в сумме выражения (39), конечно, могут присутствовать слагаемые, которые не укладываются в идеальную картину устройства фаз коэффициентов разложения (38). Но общая структура ППЭ сохраняется, если вклад таких слагаемых не является определяющим.

Ранее мы обнаружили, что при некоторых условиях для коэффициентов разложения в выражении (39) можно получить рациональное объяснение многим и весьма разнородным экспериментальным фактам, которые наблюдаются в процессе фолдинга и которые, на первый взгляд, никак не связаны друг с другом [20, 21]. Анализ общей структуры энергетических ландшафтов линейных полимеров, задаваемых выражением (34), показывает условия, при которых может

возникнуть вполне определенная физическая закономерность, приводящая к такого рода энергетическим ландшафтам. С точки зрения общей структуры энергетической поверхности можно было бы думать, что физико-химический этап эволюции линейных полимеров привел к максимальному упрощению зависимостей $h(\mathbf{n})$ и векторов $\mathbf{C}(\mathbf{n})$ и превращению этих функций в константы для наиболее значимых членов разложения (34):

$$\bar{C}(\bar{n}) = \bar{C}_m; \quad h(\bar{n}) = 1. \quad (40)$$

Рассмотрим возможные причины формирования полимерных структур с энергетическими ландшафтами, которые могли бы быть предшественниками ППЭ со структурой типа (39). Обратим внимание на линейные полимеры, строение которых полностью симметрично относительно перестановки в цепи мономерных звеньев. Речь, очевидно, в первую очередь идет о циклических гомополимерах следующего вида:

$$|-L - L - \dots \dots - L -|. \quad (41)$$

Вместе с этими структурами можно также рассматривать очень длинные почти гомополимерные цепи. В этом случае можно считать, что система полностью симметрична относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев вдали от концов цепи. Этот тип симметрии, насколько нам известно, не рассматривался ранее в молекулярной биофизике. Каждое мономерное звено может содержать также несколько внутренних элементов с соответствующими конформационными степенями свободы (как, например, у аминокислотных остатков или одинаковых последовательностей из аминокислотных остатков). Для более компактного изложения мы будем обозначать набор из k внутренних торсионных углов в мономере L_i алгебраическим вектором

$$\bar{\Psi}_i = (\Psi_{i1}, \Psi_{i2}, \dots, \Psi_{ik}). \quad (42)$$

Соответствующий этому набору торсионных углов алгебраический вектор номеров гармоник обозначим следующим образом:

$$\bar{m}_i = (m_{i1}, m_{i2}, \dots, m_{ik}). \quad (43)$$

В этом случае алгебраический вектор торсионных углов полимерной цепи определим как

$$\bar{\Phi} = (\bar{\Psi}_1, \bar{\Psi}_2, \dots, \bar{\Psi}_N) \quad (44)$$

и соответственно вектор номеров гармоник для Фурье-разложения потенциальной энергии как

$$\bar{n} = (\bar{m}_1, \bar{m}_2, \dots, \bar{m}_N). \quad (45)$$

В случае циклического гомополимера потенциальная энергия симметрична относительно перестановок торсионных углов любых мономерных звеньев:

$$U(\bar{\Psi}_1, \bar{\Psi}_2, \dots, \bar{\Psi}_i, \dots, \bar{\Psi}_j, \dots, \bar{\Psi}_N) = U(\bar{\Psi}_1, \bar{\Psi}_2, \dots, \bar{\Psi}_i, \dots, \bar{\Psi}_j, \dots, \bar{\Psi}_N). \quad (46)$$

В этом случае коэффициенты разложения потенциальной энергии в ряд Фурье инвариантны относительно любой перестановки номеров гармоник

$$A(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_N) = |A(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_N)|; \quad (47)$$

$$\theta(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_N) = \theta(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_N).$$

Заметим, что при выполнении условия (46) координаты критических точек [29] (локальные и глобальный минимумы, максимумы, седловые точки различного индекса) будут соответствовать различным спиральным конфигурациям, так как

соответствующие угловые переменные в этих точках принимают одинаковые численные значения. Формулы (46) и (47) показывают также, что при перестановке компонент в векторе номеров гармоник не изменяются значения скалярного произведения векторов $\mathbf{nC}(\mathbf{n})$ и значения $h(\mathbf{n})$ в выражении (33).

Разобьем все множество векторов \mathbf{n} на непересекающиеся подмножества $P_i(\mathbf{n})$, которые для некоторого вектора \mathbf{n} объединяют тип векторов, отличающихся друг от друга только перестановкой компонент. Тогда можем переписать для гомополимеров разложение (34) в виде

$$U(\bar{\varphi}) = \sum_i (-1)^{h(n_i)} |A(\bar{n}_i)| \sum_{\bar{n} \in P_i(\bar{n})} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i(\bar{n}))]. \quad (48)$$

где \mathbf{n}_i — один из векторов из множества $P_i(\mathbf{n})$. Элементы множества векторов $P_i(\mathbf{n})$, по которым ведется внутреннее суммирование, отличаются перестановкой компонент заданного вектора гармоник \mathbf{n} . Если все компоненты вектора гармоник \mathbf{n} различны, то число таких элементов равняется $N!$. Если в векторе \mathbf{n} имеются совпадающие номера гармоник, то число элементов N_i получается делением $N!$ на произведение факториалов числа соответствующих одинаковых компонент k_i вектора \mathbf{n}

$$N_i = \frac{N!}{k_1! k_2! \dots} \quad (49)$$

Максимально возможное число групп одинаковых номеров гармоник — это $N/2$ различных пар одинаковых чисел (если N четное). Если N нечетное, то это целая часть от $N/2$ пар. Если данный номер гармоники встречается в векторе один раз, то $k_i = 1$. Если данный номер гармоники встречается N раз (вектор вида (n, n, n, \dots, n)), то $k_1 = N$, остальные $k_i = 0$ и т.д.

Вектор $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ в формуле (48) устроен следующим образом. Компоненты вектора $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ при перестановке компонент вектора номеров гармоник \mathbf{n} также переставляются таким образом, чтобы скалярное произведение этих векторов не изменялось. Для циклического гомополимера, построенного из нехиральных мономеров, вектор $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ просто равен 0. Заметим также, что внутренняя сумма в формуле (48) симметрична относительно перестановки компонент вектора торсионных углов (44).

В общем случае внутренняя сумма в формуле (48) содержит очень большое число осциллирую-

щих слагаемых с одинаковой амплитудой, фазы которых не коррелированы. Такая сумма не выделяет четких экстремумов, и линейный гомополимер, построенный даже из хиральных мономеров, может сформировать уникальную пространственную структуру только при специальных условиях. Это условие наглядно прослеживается из формулы (48). Для формирования четкого глобального минимума необходимо, чтобы компоненты вектора $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ были одинаковы и не зависели от перестановок компонент в векторе \mathbf{n} . В этом случае во внутренней сумме формулы (48) возникает корреляция фаз и резкое усиление экстремума (пропорциональное, максимум, в $N_i!$ раз) в конфигурации, определяемой векторами $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ с одинаковым набором различных компонентов.

Так как эти вектора в пространстве углов имеют одинаковые (для каждого типа торсионных углов) компоненты, то соответствующая конфигурация является спиралью. Таким образом, если химическая структура гомополимерной цепи такова, что при формировании спирали уменьшается потенциальная энергия, то внутренняя сумма в формуле (48) дает четкий минимум ППЭ. Вид этой спирали может быть весьма разнообразный, особенно, если мономерное звено содержит много внутренних конформационных степеней свободы. Кроме того, если полимерная цепь получает некий выигрыш в энергии при формировании нескольких типов спиралей, обозначаемых ниже α , β и т.д. (совпадение обозначений с известными типами спиралей в полипептидах в данном случае не несет никакой смысловой нагрузки), то сумму (48) мы можем представить в виде

$$U(\bar{\varphi}) \sim - \sum_{i=\alpha,\beta,\dots} |A(\bar{n}_i)| \sum_{n \in P_i(n)} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i)] + \sum_{i \neq \alpha,\beta,\dots} (-1)^{h(n_i)} |A(\bar{n}_i)| \sum_{n \in P_i(n)} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i(\bar{n}))] \quad (50)$$

$$\bar{C}_i = (\bar{C}_{im}, \bar{C}_{im}, \dots, \bar{C}_{im}).$$

Напомним, что векторное обозначение компонент \bar{C}_{im} связано с тем, что оно отражает набор значений внутренних торсионных углов в мономерах. Первая группа слагаемых — это вклады в ППЭ от спиральных структур, каждая из которых имеет четко определенную фазу в пространстве конформаций и отрицательный знак. Вторая группа слагаемых не имеет четко определенной фазы и знака и воспринимается скорее как шум. Это приводит нас к выводу, что гомополимерные цепи в силу симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев создают предпосылки (при определенном химическом строении) к формированию уникальных спиральных пространственных структур. Возможно, этот эффект мог быть первичным этапом эволюции энергетических ландшафтов, с чем и может быть связано обилие спиральных структур (а также кольцевых структур у простейших организмов) в пространственной организации биополимеров. Мы никак не связываем обсуждаемые возможные типы протоформ линейных полимеров с протеинами или нуклеиновыми кислотами в живых системах. Модификация и настройка химических форм мономеров происходила, по-видимому, в ходе длительной физико-химической эволюции.

Рассмотрим далее, что реально можно получить из вышеописанных соображений симметрии для понимания процессов фолдинга белков, которые все еще оставляют достаточно много загадок.

Мы исходим из общепринятой концепции, что ППЭ для макромолекулы, формирующей уникальную пространственную структуру, имеет глобальный минимум и процесс сворачивания устроен так, что репрезентативная точка имеет возможность достичь глобального минимума энергии. Мы полагаем также, что общий аналитический вид многомерной ППЭ близок к структуре, которая была условно названа идеальной (ИППЭ) и описывается формулой (39). Выше были высказаны соображения в пользу отбора таких форм ППЭ в ходе физико-химической эволю-

ции, основанные на соображениях симметрии относительно перестановки одинаковых (или почти одинаковых) мономерных звеньев. С другой стороны, было бы очень странным, если обширный класс линейных биополимеров с уникальной пространственной структурой, например, белков, которые синтезируются по единым физико-химическим механизмам, был бы представлен объектами, у которых глобальный минимум ППЭ сформирован для каждого объекта неким случайным образом. Ранее мы показали [20, 21], что, используя структуру ИППЭ, описываемую формулой (39), мы можем получить результаты, которые позволяют интерпретировать самые разнородные эффекты для фолдинга белков.

Обратимся далее к зависимости коэффициентов разложения в формуле (39) от векторов номеров гармоник. В настоящее время есть достаточно общие соображения, каким образом должны быть устроены эти коэффициенты разложения. Как мы отмечали выше, в разложениях для ППЭ (формула (48)) или регулярной части разложения (50) в силу симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев коэффициенты ряда должны быть функциями некоторых инвариантов векторов номеров гармоник (т.е. функциями, которые не изменяются при перестановке компонент векторов \mathbf{n} для одинаковых звеньев цепи). Простейшими инвариантами являются длина вектора или, например, скалярное произведение вектора \mathbf{n} на вектор, пропорциональный единичному вектору. Последний случай в более общем варианте был нами обсужден ранее в работах [20, 21]. Ниже мы рассмотрим модель гауссовой зависимости коэффициентов разложения от длины вектора номеров гармоник, что дает результаты качественно близкие к полученным в работах [20, 21], но позволяет получить более компактные формулы, из которых видны интересные следствия.

В простейшем варианте, когда в мономере имеется только один торсионный угол, мы будем исходить из следующей гауссовой формы для коэффициентов разложения:

$$|A(\bar{n})| = a_0 \frac{1}{2\lambda\sqrt{\pi}} \left\{ \exp\left[-\frac{1}{\lambda^2}(\bar{n} - \bar{a})^2\right] + \exp\left[-\frac{1}{\lambda^2}(\bar{n} + \bar{a})^2\right] \right\} \exp\left[-\sum_i \varepsilon_i n_i\right]. \quad (51)$$

Коэффициенты разложения в формуле (51) будут симметричны относительно перестановок компонент вектора номеров гармоник, если многомерный алгебраический вектор \mathbf{a} равен нулю или пропорционален единичному вектору. Ниже мы увидим, что все формулы также работают и

при некотором нарушении идеальной симметрии в случае произвольного вектора \mathbf{a} . Если в мономерных звеньях имеется k торсионных углов, то формула несколько усложняется в соответствии с обозначениями в формулах (42)–(45):

$$|A(\bar{n})| = \frac{a_0}{2^k \pi^{k/2}} \left\{ \sum_{j=1}^k \frac{1}{\lambda_j} \exp\left[-\frac{1}{\lambda_j^2} (\bar{m}_j - \bar{a}_j)^2\right] + \sum_{j=1}^k \frac{1}{\lambda_j} \exp\left[-\frac{1}{\lambda_j^2} (\bar{m}_j + \bar{a}_j)^2\right] \right\} \exp\left[-\varepsilon \sum_i |n_i|\right]. \quad (52)$$

Поясним смысл и возможности этих формул. Прежде всего, последний множитель отражает то обстоятельство, что для физически разумной функции коэффициенты ряда Фурье примерно экспоненциально уменьшаются с ростом номеров гармоник [22, 28]. Быстрота затухания коэффициентов с увеличением номера гармоники определяются параметрами ε . Ниже в конечных формулах для ППЭ мы перейдем к пределу $\varepsilon \rightarrow 0$ и нам не важны различия в этом параметре для разных степеней свободы.

Сумма двух гауссовых экспонент и знак модуля в показателе последней экспоненты введены для обеспечения симметрии коэффициентов разложения при изменении знака вектора номеров гармоник в соответствии с общими требованиями к формулам (30) и (32). Отметим, что суммирование ряда (39) происходит по всем значениям номеров гармоник, как положительным, так и отрицательным. Поэтому добавление второй гауссовой экспоненты в формулах (51) и (52) носит

декоративный характер. Параметры λ определяют масштаб допустимых отклонений величин в показателях гауссовых экспонент от 0. При стремлении λ к 0 гауссовы экспоненты превращаются в дельта-функции. Несмотря на относительную простоту формул (51) и (52), они дают возможности для генерации весьма разнообразных типов ИППЭ при вариации значений введенных параметров. Важно, что такие поверхности допускают изучение аналитическими методами. Ранее были подробно исследованы возможности зависимостей, аналогичных описываемым формулами (51) и (52), для описания топографии ППЭ и топографии поверхности свободной энергии [20–22]. Предлагаемый ниже вариант более удобен для обсуждения общих эффектов влияния симметрии относительно перестановки в полимерной цепи мономерных звеньев на топографию ППЭ.

Удобство формул типа (51) для получения аналитических результатов основано на применении интегрального представления

$$\exp[-(n_i \mp a_i)^2 / \lambda^2] = \frac{\lambda}{2\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[-\frac{\lambda^2}{4} t^2 \pm i(n_i \mp a_i)t\right] dt \quad (53)$$

и использования суммы ряда

$$F_0(\phi, \varepsilon) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{-\varepsilon|n| \pm n\phi} = \frac{\text{sh}\varepsilon}{\text{ch}\varepsilon - \cos\phi} \sim \frac{2\varepsilon}{\varepsilon^2 + 4\sin^2(\phi/2)}; \quad \varepsilon \ll 1. \quad (54)$$

Подставляя коэффициенты из формулы (51) в формулу (39), выбирая для косинусов в формуле (39) представление в виде суммы комплексных экспонент, представляя гауссовы экспоненты в формуле (51) в виде произведения множителей

из формулы (53), а также учитывая, что сумма всевозможных произведений равна произведению сумм, и пользуясь формулой (54), получим для ППЭ:

$$U(\bar{\phi}) = -\frac{a_0}{2} \frac{\lambda^N}{2^N \pi^{N/2}} \prod_{i=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[-\frac{\lambda^2}{4} t_i^2 - ia_i t_i\right] F_0(t_i + \phi_i - \phi_{mi}, \varepsilon) dt_i + CC. \quad (55)$$

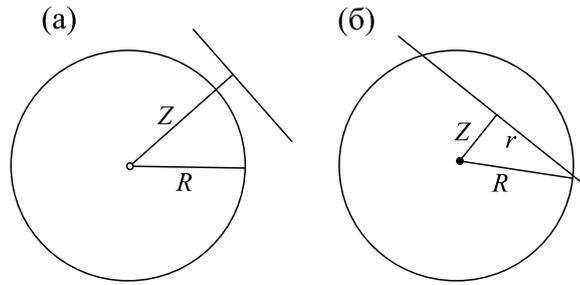


Рис. 3. Пояснение к выполнению условия $R > Z$: (а) – радиус сферы меньше расстояния до плоскости и нет точек пересечения угловых переменных, которые удовлетворяют условиям (58); (б) – радиус сферы больше расстояния до плоскости и есть множество точек пересечения, удовлетворяющих условиям (58), которое представляет собой сферу размерности меньшей на единицу и радиусом $r = (R^2 - Z^2)^{1/2}$. Если $R = Z$, то имеется точка касания.

СС в формуле (55) обозначает комплексно сопряженное слагаемое. При $\epsilon \ll 1$ основной вклад в интегралы дает окрестность нуля для аргумента функции F_0 , и мы получаем

$$U(\bar{\phi}) \sim a_0 \lambda^N \pi^{N/2} e^{-\frac{\lambda^2}{4} \sum_i (\phi_i - \phi_{im})^2} \cos \sum_i a_i (\phi_i - \phi_{im}); \quad \lambda \epsilon \ll 1. \tag{56}$$

По структуре выражения (56) видно, что целесообразно ввести две обобщенные переменные

$$R^2 = \sum_i (\phi_i - \phi_{im})^2 = (\bar{\phi} - \bar{\phi}_m)^2; \quad Z = \frac{1}{\|\bar{a}\|} \sum_i a_i (\phi_i - \phi_{im}) = \frac{\bar{a}}{\|\bar{a}\|} (\bar{\phi} - \bar{\phi}_m), \tag{57}$$

$$\|\bar{a}\|^2 = \sum_i a_i^2.$$

Первая переменная по геометрическому смыслу задает гиперсферы радиуса R в пространстве торсионных углов, описанных вокруг точки глобального минимума. Вторая переменная определяет гиперплоскости, перпендикулярные вектору \mathbf{a} и находящиеся на расстоянии Z (с точностью до знака) от точки глобального минимума.

В результате ППЭ, описываемую формулой (56), можно переписать в простом виде

$$U(\bar{\phi}) = U(R, Z) = -U_0 e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}} \cos \|\bar{a}\| Z; \quad R \geq |Z|. \tag{58}$$

Соблюдение нестрогого неравенства $R \geq Z$ в формуле (58) очень важно, так как в противном случае не существует такого набора угловых переменных, которые одновременно удовлетворяют условиям (57). Это наглядно видно из рис. 3.

Если проделать все то же самое с формулой (52), то получим немногим более сложную формулу:

$$U(\bar{\phi}) = U(R, Z) = -U_0 e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}} \cos \|\bar{a}_\lambda\| Z; \quad R \geq |Z|. \tag{59}$$

Структура формулы (58) сохранилась, но входящие в нее параметры приняли следующий вид:

$$R^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^k (\xi_{ij} - \xi_{ijm})^2; \quad Z = \frac{1}{\|\bar{a}_\lambda\|} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^k \frac{a_{ij}}{\lambda_j} (\xi_{ij} - \xi_{ijm}); \quad \xi_{ij} = \lambda_j \Psi_{ij}. \tag{60}$$

Здесь индекс i нумерует в цепи мономеры, а индекс j нумерует в мономере типы торсионных углов. Видно, что общие принципы устройства топографии ППЭ сохраняются. Масштабным преобразованием угловых переменных мы можем перейти к знакомой ситуации сечения гиперсфе-

ры размерностью $N \cdot k$ гиперплоскостью, которая находится на расстоянии Z от центра – точки глобального минимума ППЭ, перпендикулярна вектору с компонентами (a_{ij}/λ_j) и получить аналогичные ограничения на значения R . Обозначения понятны из контекста. Основные характеристики

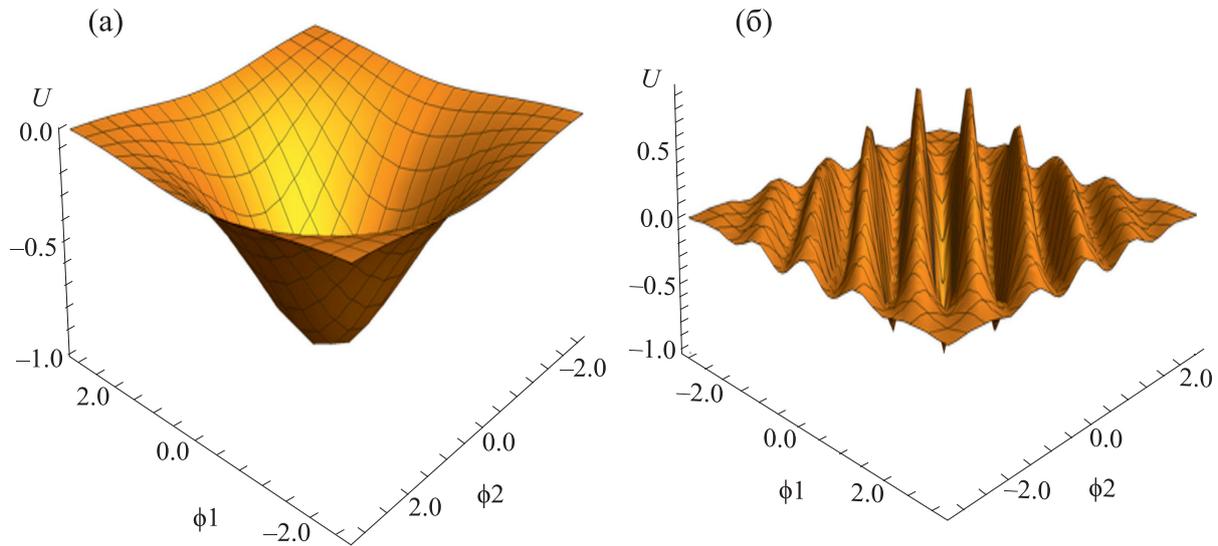


Рис. 4. Характерные топографии ППЭ в гауссовом приближении для двух угловых переменных

$$U(\bar{\phi}) = -\exp\left[-\frac{1}{4}(\phi_1^2 + \phi_2^2)\right] \cos[\|a\|(\phi_1 + \phi_2)] : \text{(a) } - \|a\| = 0, \text{(б) } - \|a\| = 5.$$

топографии ППЭ мы можем проследить и на более простом варианте поверхности, задаваемом формулой (58).

Характерные примеры топографии ППЭ в случае двух угловых переменных приведены на рис. 4. Если вектор \mathbf{a} равен 0, то мы имеем просто гауссову воронку. При конечной длине вектора \mathbf{a} рельеф ППЭ представляет собой набор воронок. Имеется самая глубокая центральная воронка, которую окружают сателлитные воронки с умень-

шающей глубиной по мере удаления от центральной воронки. Все воронки отделены друг от друга потенциальными барьерами.

У рассматриваемых формул есть следующее полезное свойство: даже если угловых переменных больше двух, то мы все равно можем изучать топографию ППЭ в терминах обобщенных переменных R и Z .

Пример топографии ППЭ в переменных R и Z приведен на рис. 5. Мы видим, что при конечной длине вектора \mathbf{a} пространство конфигураций полимерной цепи оказывается разрезанным на области с относительно низкой конформационной энергией, которые отделены друг от друга потенциальными барьерами (рис. 6).

Как и в случае, описанном в работе [20], топография ППЭ представляет собой систему энергетических воронок (рис. 7). В обобщенных переменных R и Z имеется центральная и самая глубокая воронка, которая ведет к глобальному минимуму ППЭ. Имеется также множество сателлитных воронок, глубина которых уменьшается по мере удаления от центральной воронки. Сателлитные воронки в обобщенных переменных, так же как и в угловых переменных, отделены от центральной воронки и друг от друга потенциальными барьерами.

Обсудим далее в рамках рассматриваемого гауссового приближения роль и значение вектора \mathbf{a} . Если рассматриваемый полимер состоит из абсолютно одинаковых мономерных звеньев и поверхность симметрична относительно

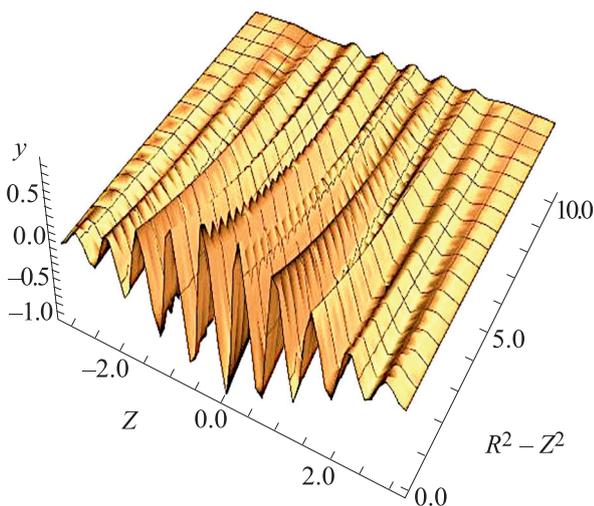


Рис. 5. Топография ППЭ по формуле (58) в обобщенных переменных Z и $R^2 - Z^2$. Модельное ППЭ вида $U(R, Z) = -\exp(-0.25R^2)\cos(10Z)$.

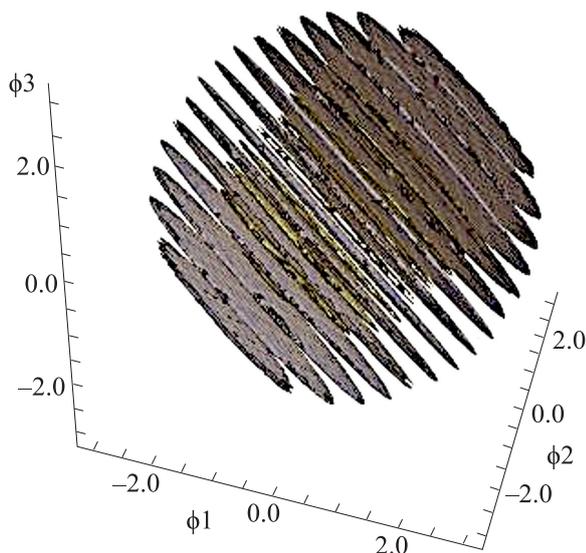


Рис. 6. Пространственное сечение трехмерной ППЭ. Пример расслоения конфигурационного пространства на разрешенные (в окрестности локальных минимумов) и запрещенные по энергии области (на рисунке не покрашены) слои для ППЭ модельного вида (согласно рис. 5).

перестановки переменных торсионных углов одинакового типа, то по соображениям симметрии этот вектор должен быть или равен нулю, или быть пропорциональным единичному вектору. В первом случае мы имеем ППЭ с простой топографией, как на рис. 4а. Такая топография ППЭ полностью соответствует принципу минимальной фрустрации и идеальна для очень быстрого сворачивания в уникальную пространственную структуру (в данном случае, спиральную), которая достижима из любой начальной конфигурации цепи. Отметим, что известны примеры очень быстрого фолдинга полипептидов за времена порядка наносекунд [12]. Если вектор \mathbf{a} не равен нулю, то формируется топография множества вложенных энергетических воронок (рис. 4б). При этом проявляются определенные особенности процесса сворачивания полимера. Внутри центральной воронки (так же как и внутри спутных воронок) топография энергетической поверхности удовлетворяет принципу минимальной фрустрации. Координаты и значение энергии в минимуме спутной воронки определяются согласно формуле (58) следующим соотношением:

$$\|\bar{\mathbf{a}}\|Z = \sum_i a_i(\phi_i - \phi_{im}) = 2\pi k; k = \pm 1, \pm 2... \quad (61)$$

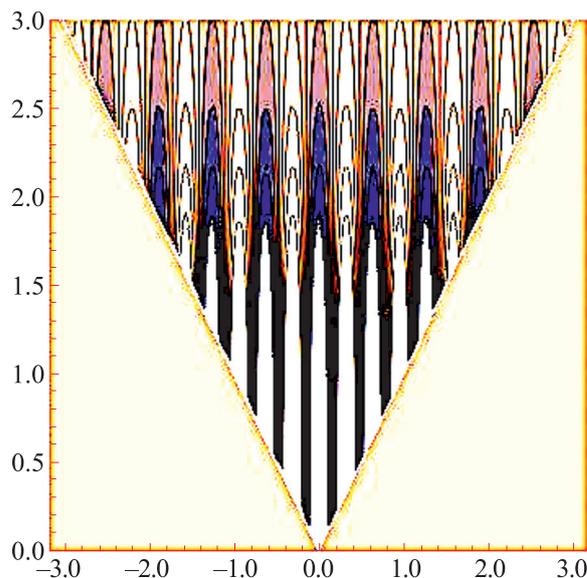


Рис. 7. Энергетические воронки для ППЭ (согласно рис. 5) в обобщенных переменных R и Z . Ось Z – по горизонтали, $R^2 > Z^2$. Самая глубокая – центральная воронка, справа и слева спутные воронки с уменьшающейся глубиной. Воронки отделены друг от друга барьерами, высоты которых уменьшаются по мере удаления от точки глобального минимума.

Значение координаты R в точке минимума определяется согласно (58) значением $R = Z$ (или $R = -Z$). Соответственно значения энергии в ложбинах спутных воронок определяются формулой

$$U_k = -U_0 \exp(-\pi^2 \lambda^2 k^2 / \|\bar{\mathbf{a}}\|^2) \cdot e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}}; R \geq 2\pi k. \quad (62)$$

Смещения координат положений минимумов энергии в спутных воронках относительно положения глобального минимума составляют

$$\phi_{ik} - \phi_{im} = 2\pi k a_i / \|\bar{\mathbf{a}}\|^2. \quad (63)$$

Заметим, что число спутных воронок ограничено очевидными условиями:

$$|\phi_{ik} - \phi_{im}| < \pi; |k| < \|\bar{\mathbf{a}}\|^2 / 2|a_i|. \quad (64)$$

Значения энергии для высоты потенциальных барьеров между воронками k и $k-1$ (рассматриваем только положительные $k \geq 1$, для отрицательных k ситуация симметрична) определяются формулами

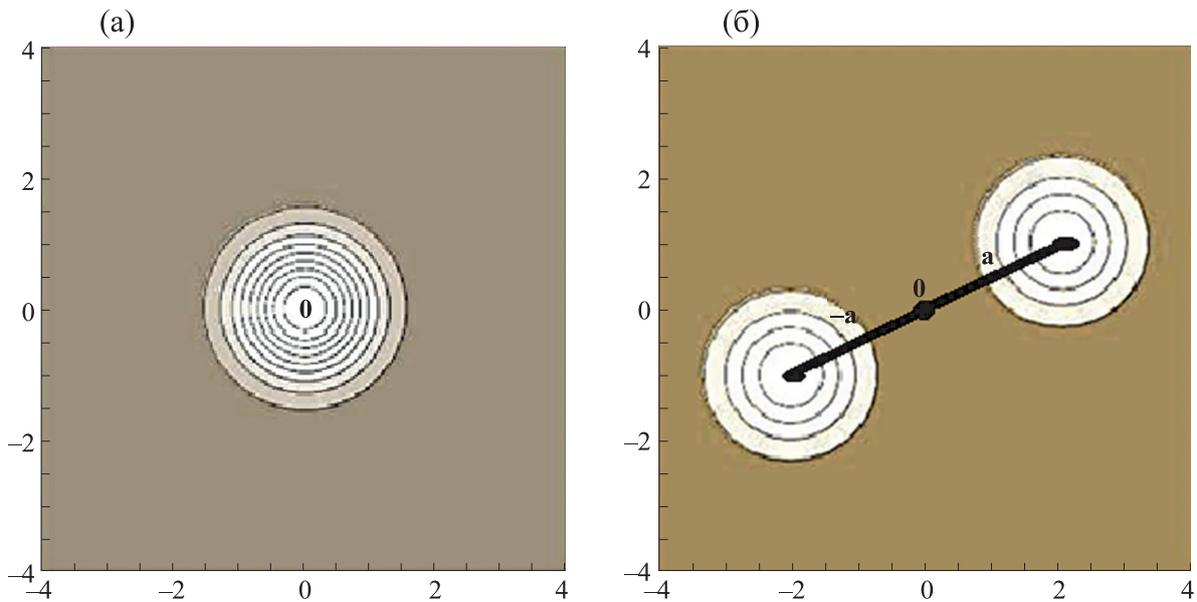


Рис. 8. Распределение вкладов от областей пространства номеров гармоник в случае идеальной симметрии $\mathbf{a} = 0$ полимерной цепи относительно перестановки мономерных звеньев (а) и слабой симметрии (б) в гауссовом приближении.

$$B_k(R) = U_0 \exp[-\pi^2 \lambda^2 (2k-1)^2 / 4 \|\bar{\mathbf{a}}\|^2] e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}}; R \geq (2k-1)\pi. \quad (65)$$

Вычитая из высоты барьера (65) значение энергии в ложбине сателлитной воронки (62), видим, что возможность перехода репрезентативной точки между соседними воронками быстро возрастает с увеличением номера воронки и значения обобщенной координаты R . Увеличение длины вектора \mathbf{a} способствует более резкому рельефу ППЭ с более выраженными барьерами и более глубокими ложбинами. Увеличение параметра λ , напротив, сглаживает рельеф ППЭ, не изменяя глубину центральной воронки.

Таким образом, в рамках рассматриваемой гауссовой модели имеется обширная область значений параметров, когда переход репрезентативной точки между энергетическими воронками сильно затруднен; такое строение ППЭ включает механизм связи между стартовой конформацией цепи, которая возникает в процессе синтеза и конечной пространственной структурой, получаемой в процессе фолдинга за разумное время. С точки зрения отбора линейных полимеров, которые формируют строго определенные пространственные структуры преимущество на первом этапе должны были бы получить макромолекулы, ППЭ которых устроено максимально симметрично и гладко. В рамках рассматриваемой гауссовой модели это структуры с ППЭ, у которых вектор \mathbf{a} равен нулю. Если мономерные звенья у таких структур подвергались далее модификациям, например, в области боковых групп, то такая иде-

альная симметрия для коэффициентов разложения и ППЭ нарушается, что в рамках рассматриваемой модели трактуется как возникновение ненулевого вектора \mathbf{a} и усложнение топографии ППЭ. Соблюдая общие условия симметрии для коэффициентов разложения (32), в рамках рассматриваемой гауссовой модели мы описываем эти изменения как смещения центра распределения коэффициентов разложения в пространстве номеров гармоник на вектора \mathbf{a} и $-\mathbf{a}$ (рис. 8). Это минимальный шаг в усложнении топографии ППЭ, который очень похож на снятие вырождения многократно вырожденного состояния при включении дополнительного возмущения. В этом случае, как мы видели выше, топография ППЭ имеет вид системы воронок, разделенных энергетическими барьерами. При этом однозначность результата сворачивания полимера за разумное время требует соблюдения определенных условий для стартовых конфигураций цепи. Эти пространственные конфигурации для успешного сворачивания и перемещения репрезентативной точки в глобальный минимум должны принадлежать к хотя и весьма обширному, но определенному множеству начальных состояний, которые находятся в области притяжения центральной энергетической воронки. С точки зрения развиваемых представлений в современных живых системах это может быть реализовано, по-видимому, в варианте котрансляционного сворачивания,

когда стартовый набор конфигураций полипептидной цепи определяется механизмами биосинтеза. Определенную роль в формировании таких стартовых конфигураций играют, по-видимому, также шапероны, которые фиксируют определенные конфигурации цепи [32] и направляют тем самым траекторию сворачивания в нужном направлении.

ПОВЕРХНОСТЬ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ЛИНЕЙНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ ЦЕПИ

Перейдем далее к рассмотрению поверхности свободной энергии (ПСЭ) линейной полимерной

цепи, которая формирует уникальную пространственную структуру. В реальных экспериментах по фолдингу при конечных температурах наблюдаемые эффекты определяются именно поверхностью свободной энергии макромолекул. В рамках развиваемых гауссовых моделей для ППЭ имеется достаточно простой и логичный переход от ППЭ к поверхности свободной энергии цепи (ПСЭ) в терминах обобщенных координат R и Z . Как известно, свободная энергия системы в состоянии равновесия при заданных условиях (значениях R и Z) определяется через сумму по состояниям [33]:

$$G(R, Z) = -k_B T \ln W(R, Z)$$

$$W(R, Z) = \int_{\{\phi\}} \exp[-U(\bar{\phi}) / k_B T] \times \delta(R - \|\bar{\phi} - \bar{\phi}_m\|) \times \delta(Z - \bar{a}(\|\bar{\phi} - \bar{\phi}_m\|) / \|\bar{a}\|) \times \theta(R - |Z|) d^N \bar{\phi}. \quad (66)$$

Дельта-функции в интеграле (66) вырезают области N -мерного конфигурационного пространства торсионных углов, которые определяются уравнениями (57), а тета-функция Хевисайда вырезает значения переменных R и Z в соответствии с условием (58). Несмотря на сложный вид интеграла (66), его вычисление в рамках рассматрива-

емой гауссовой модели и ППЭ не составляет труда. Дельта-функции и функция Хевисайда вырезают при заданном значении потенциальной энергии из фазового пространства объем гиперсферы с радиусом $r = (R^2 - Z^2)^{1/2}$ (см. рис. 3), и для суммы по состояниям получаем

$$W(R, Z) \sim (R^2 - Z^2)^{(N-1)/2} e^{-U(R, Z)/k_B T} = e^{-G(R, Z)/k_B T}; R \geq |Z|, \quad (67)$$

соответственно для свободной энергии получаем

$$G(R, Z) = U(R, Z) - k_B T(N - 1) \ln \sqrt{R^2 - Z^2}; R \geq Z. \quad (68)$$

Энтропия состояния с фиксированными R и Z пропорциональна логарифму фазового объема этих состояний:

$$S(R, Z) = k_B(N - 1) \ln \sqrt{R^2 - Z^2}; R \geq |Z|. \quad (69)$$

Численный множитель в формуле (67) мы опустили, так как после логарифмирования он влияет лишь на начало отсчета свободной энергии в формуле (68). В формуле (68) есть проблема в точке $R^2 = Z^2$, где свободная энергия обращается в минус бесконечность, так как фазовый объем точки касания гиперсферы R и гиперплоскости Z равен нулю. В этом случае нам необходимо будет учесть квантовые поправки, обусловленные нулевыми колебаниями по торсионным углам с конечной амплитудой. При этом $(R^2 - Z^2)$ не может быть меньше некоторой конечной величины, пропорциональной квадрату амплитуды нулевых

колебаний по торсионным углам. Оценим эти величины. Полагаем, что амплитуды нулевых колебаний одинаковы для всех углов, и согласно формуле (57) имеем:

$$\langle R^2 \rangle_0 = \langle \|\bar{\phi} - \bar{\phi}_m\|^2 \rangle_0 = N \langle \phi^2 \rangle_0$$

$$\langle Z^2 \rangle_0 = \langle \|\bar{\phi} - \bar{\phi}_m\|^2 \cos^2 \alpha [\bar{a}, (\bar{\phi} - \bar{\phi}_m)] \rangle_0 = \frac{1}{2} N \langle \phi^2 \rangle_0. \quad (70)$$

Угол α в формулах (70) есть угол между векторами, и при усреднении происходит усреднение квадрата косинуса по всем ориентациям. Таким образом, получаем:

$$\langle R^2 - Z^2 \rangle_0 = \frac{1}{2} N \langle \phi^2 \rangle_0. \quad (71)$$

$$\langle \phi^2 \rangle_0 = \frac{\hbar}{3l\sqrt{Mu}}, \quad (73)$$

Оценим далее квадрат амплитуды нулевых колебаний по торсионным углам, следуя обычно используемой процедуре [26]. Полагая, что потенциальная энергия при повороте вблизи минимума имеет вид

$$U(\phi) \sim \frac{1}{2} u(1 - \cos 3\phi) \sim \frac{9}{4} u\phi^2, \quad (72)$$

получим для квадрата амплитуды нулевых колебаний:

где M – масса боковой группы, которая поворачивается при торсионных нулевых колебаниях, l – длина связи между узлом и этой группой. Полагая, что масса M составляет порядка 20 а.е.м, l – порядка 1.5 Å и u – порядка 3 ккал/моль, получаем для квадрата амплитуды нулевых колебаний значение порядка 0.01 квадратных радиан.

Для устранения расходимости в формуле для энтропии (69) добавим к значению радиуса гиперсферы под знаком логарифма вклад амплитуд нулевых колебаний по торсионным углам, определяемый из формулы (71). В результате получим:

$$G(R, Z) = -U_0 \left\{ e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}} \cos \|\bar{a}\| Z + \frac{T}{T_0} \ln \left[1 + \frac{\sqrt{R^2 - Z^2}}{\sqrt{\langle R^2 - Z^2 \rangle_0}} \right] \right\}; R \geq Z, \quad (74)$$

где мы ввели параметр характеристической температуры

$$T_0 = U_0 / k_B N, \quad (75)$$

который по смыслу пропорционален удельному уменьшению потенциальной энергии при сворачивании, приходящемуся на одну степень свободы. Пример поверхности свободной энергии приведен на рис. 9.

Из формулы (74) с учетом формулы (73) можно оценить порог температуры, при котором свободная энергия свернутого состояния будет ниже,

чем полностью денатурированного состояния. Заметим, что предельное значение параметра R^2 составляет порядка $N\pi^2$, а предельное значение величины под знаком логарифма не зависит от $N(!)$ и составляет порядка 45. Иначе говоря, в рамках рассматриваемой гауссовой модели при заданных значениях параметров свернутое состояние оказывается термодинамически выгодным при $T < 0.26 T_0$ (рис. 10). Заметим, что эта оценка при больших N практически не зависит от длины цепи, а также параметра λ .

Полагая, например, что температурный порог денатурации белка составляет порядка 60°C (~333 К), оценим параметр T_0 , который составит около 1280 К. Таким образом, данная модель предсказывает по температуре денатурации выигрыш в потенциальной энергии макромолекулы, который приходится на одну степень свободы и составляет в данном конкретном случае порядка 2.56 ккал/моль. Получаем, что энергия невалентных взаимодействий двух многомерных звеньев при сворачивании в данном случае составляет порядка 5 ккал/моль или порядка энергии водородной связи в водной среде. Естественно, это ориентировочные значения, которые демонстрируют разумный порядок величин.

Из рис. 10 виден также характерный вулканообразный профиль свободной энергии, который наблюдается в экспериментах по фолдингу белков в растворах [9, 10]. Область энергетической воронки, которая ведет к свернутому состоянию, отделена от денатурированного состояния барье-

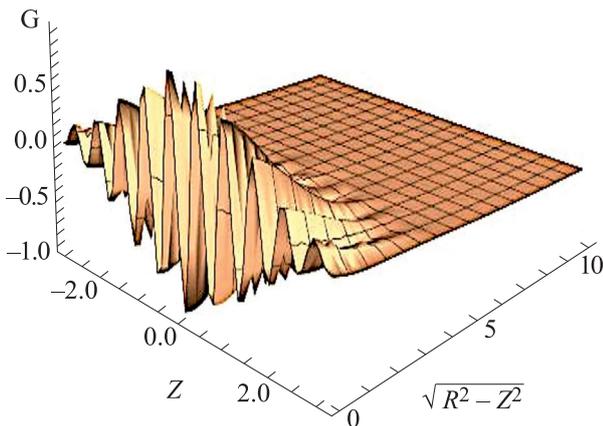


Рис. 9. Топография поверхности свободной энергии (74) в пространстве обобщенных переменных

$$G = -\exp(-0.25R^2) \cos 10Z - 0.15 \ln(1 + \sqrt{R^2 - Z^2}).$$

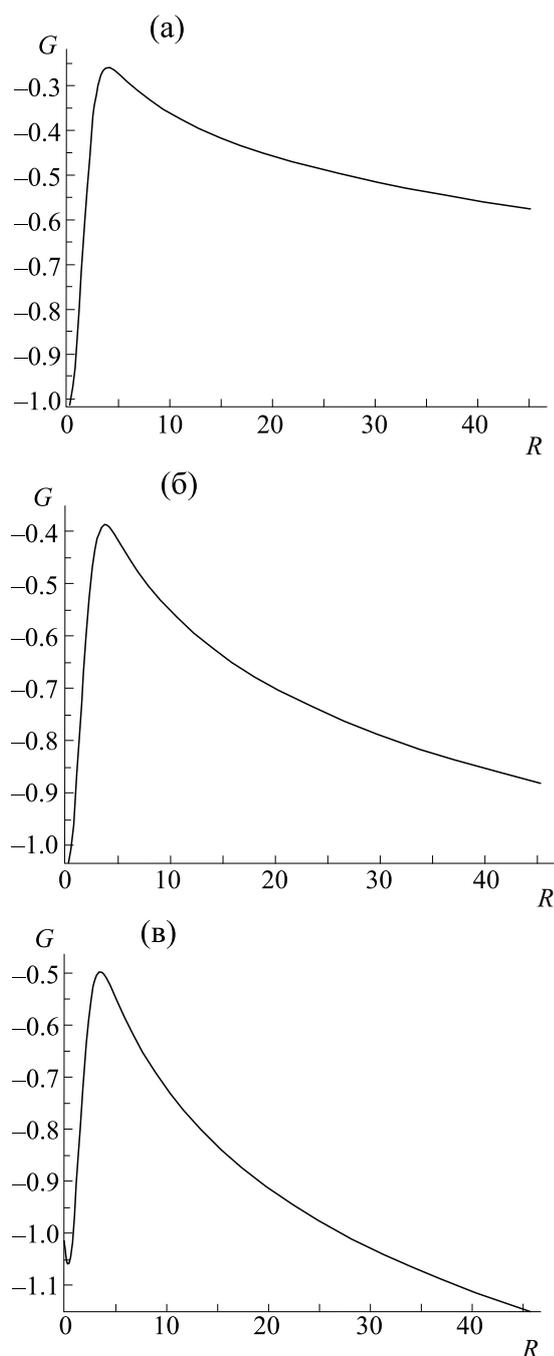


Рис. 10. Профиль свободной энергии (согласно рис. 9) в центральной воронке ($Z = 0$): (а) — $T/T_0 = 0.15$, (б) — $T/T_0 = 0.23$, (в) — $T/T_0 = 0.3$; (а) и (б) — свернутое состояние термодинамически выгодно, (в) — свернутое состояние термодинамически не выгодно.

ром, который имеет энтропийную природу. В принципе, сравнивая экспериментальные значения высоты энтропийного барьера и зависимости на рис. 10, можно оценить диапазон значений обобщенной координаты R для состояния денатурированного белка в растворе.

О ВОЗМОЖНОСТИ И ПРИЧИНАХ НАПРАВЛЕННОЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ В СТОРОНУ ФОРМИРОВАНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ С УНИКАЛЬНОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРОЙ

Отметим далее важное обстоятельство, которое объединяет все изложенные выше соображения о топографии ППЭ, ПСЭ и правилах движения репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии макромолекулы в вязкой среде, изложенных в первой части данной работы и дополнительно в работе [19]. Все изложенные выше принципы, по-видимому, могут работать в комплексе и быть направлены на решение задачи молекулярной эволюции — отбору молекулярных конструкций, формирующих уникальные пространственные структуры в определенном диапазоне значений параметров внешней среды и химического состава полимеров.

Как уже отмечалось, успешный результат фолдинга или попадание репрезентативной точки в глобальный минимум свободной (или потенциальной) энергии в нетривиальной ситуации, когда вектор \mathbf{a} не равен нулю, во многом определяется стартовым положением репрезентативной точки, которой очень желательно оказаться в области притяжения центральной энергетической воронки. Мы видим, например, на рис. 9, что поверхность свободной энергии (так же, как и ППЭ) для денатурированных состояний вдали от дна энергетических воронок (большие значения R) достаточно гладкая и попадание в центральную воронку даже при правильном выборе стартовой конфигурации в области притяжения этой воронки будет возможно при условии не слишком сильного изменения параметра Z при движении репрезентативной точки. Следовательно, весьма полезным для процесса правильного фолдинга является условие практически нулевого значения производной по времени обобщенной переменной Z , особенно в области больших значений обобщенной переменной R , там, где формируется начальная конфигурация полимера в процессе синтеза и появляется возможность «правильного» выбора стартовой конфигурации. Это значит, что в области больших R и в зоне притяжения центральной воронки условие начала правильного сворачивания выглядит следующим образом:

$$\frac{dZ}{dt} = \sum_i a_i \dot{\phi}_i \sim 0. \quad (76)$$

Напомним, что точка над торсионным углом означает дифференцирование по времени. Таким образом, весьма благоприятным для правильного фолдинга является вариант процесса сворачивания, когда определенная линейная комбинация

угловых скоростей поворота по торсионным углам близка к нулю. С аналогичной ситуацией мы практически сталкивались в формуле (24.1) при обсуждении корреляции конформационных движений полимерной цепи в вязкой среде:

$$\sum_k \dot{\phi}_k l_k = 0; l_k = (\vec{b}_k \vec{l}) / b_k.$$

Напомним, что \vec{l} — это вектор, соединяющий начало и конец цепи, а \vec{b}_k — вектора связей между узлами цепи. Если, например, все компоненты вектора \vec{a} имеют один знак (как в полимерах, которые симметричны относительно перестановки мономерных звеньев), то вариант, например, вытянутой стартовой конформации, который приводит к знакопеременным направлениям поворотов по двугранным углам в соответствии с формулой (24.1) оказывается благоприятным и для достижения репрезентативной точкой глобального минимума. Такой вариант динамики сворачивания мы наблюдали для полипептидной цепи в вязкой среде [17]. В случае старта сворачивания из конфигурации развернутой цепи преимущество будут получать полимеры, которые сворачиваются в центральной воронке в спиралеподобные структуры.

Формулы (76) и (24.1) показывают возможность существования эффекта положительной корреляции между областью стартовых конфигураций цепи, возникающих при синтезе и топографией энергетической поверхности (в рассмотренной гауссовой модели это определяется компонентами вектора \vec{a}_j), которая определяется химическим составом и последовательностью мономеров в цепи. Благоприятная реализация такой корреляции, по-видимому, может при определенных условиях привести к тенденции формирования полимерных молекул с уникальной пространственной структурой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше мы рассмотрели эффекты двух типов симметрии, которые нетривиальным образом сказываются на динамике линейных полимеров в вязкой среде и на топографии их энергетических ландшафтов.

В приближении однородной вязкой среды динамика макромолекулы инвариантна относительно трансляций и поворотов объекта как целого. Это приводит к достаточно очевидным законам сохранения (5) и (13). Менее очевидный, но полезный результат можно получить как следствие этих формул для полимерной цепи с жесткими связями и валентными углами. Сумма векторов угловых скоростей поворотов вокруг связей (или вращений по торсионным углам) оказывается равной нулю. В принципе, этот результат не является неожиданным, так как из уравнений движе-

ния в сильно вязкой среде следует, что суммарный момент вращения макромолекулы должен быть равен нулю. Формула (24) имеет и дополнительные интерпретации, если ее умножить на специально сконструированный вектор, например, вектор, связывающий начальный и конечный узел линейной цепи (24.1). Полученные соотношения наглядно показывают, что на начальном этапе сворачивания развернутой линейной цепи должны наблюдаться четкие эффекты корреляции поворотов по двугранным углам с достаточно регулярным изменением знака угловых скоростей. Как результат — появляется тенденция к формированию спиральных структур, если такие структуры разрешены по энергетическим соображениям. Такого типа эффекты мы наблюдали ранее при моделировании методами молекулярной динамики сворачивания полипептидных [17, 18] и модельных полимерных структур [16, 34, 35] в вязкой среде (в определенных случаях роль вязкости могут выполнять, например, термостаты [37]). Заметим, что учет тепловых флуктуаций и переход от уравнений механики для частиц в вязкой среде к уравнениям Ланжевена [19] делает картину сворачивания цепи менее детерминированной и обсуждаемые соотношения выполняются лишь в среднем по ансамблю. Но вдали от положения равновесия, там, где имеются большие градиенты потенциальной энергии, описанный выше эффект вполне может выполнять функцию направления траектории репрезентативной точки, например, в сторону формирования спиральных структур. Отметим еще одно важное обстоятельство, связанное с правилами движения репрезентативной точки по ультрамногомерным энергетическим поверхностям. Ограничения, которые накладываются на конформационные движения в вязкой среде соотношениями типа (24) и (24.1) вместе с ограничениями на распределение скоростей диссипации энергии по узлам цепи, которые были изложены ранее в работе [19], делают недоступным для репрезентативной точки большую часть энергетической поверхности даже если на это нет энергетических запретов. Это, по-видимому, сильно упрощает проблему калибровки параметров силовых полей, которые используются при вычислении траекторий в молекулярной динамике больших систем. При этом приемлемо точная аппроксимация всей ультрамногомерной и энергетически доступной области поверхности потенциальной энергии не нужна (реально это и невозможно), а оказывается достаточно точным калибровкой потенциалов аппроксимировать лишь относительно небольшую и динамически доступную для репрезентативной точки область ППЭ.

Проблема топографии ультрамногомерной энергетической поверхности полимеров и биополимеров имеет несколько непростых аспектов.

Физическая теория в этой области в настоящее время была практически ограничена феноменологическими представлениями об относительно гладком устройстве многомерной энергетической поверхности в форме потенциальной воронки (принцип минимальной фрустрации энергетической воронки [14]). Не существует и четких физических соображений, почему одни линейные полимеры сворачиваются в уникальные пространственные структуры, а другие (даже очень похожие по химическому составу) – нет. Выше мы кратко обсудили почему нельзя решить проблему вычисления ППЭ путем суммирования обычно используемых атом-атомных потенциалов из-за неконтролируемой ошибки при суммировании огромного числа слагаемых. С чисто технической точки зрения вычисление, например, 100-мерной поверхности с приемлемой точностью (даже отвлекаясь от точности задания потенциалов) с шагом, например, 3.6° по каждому углу потребует вычисления 10^{200} чисел, что совершенно нереально даже при самых смелых прогнозах о развитии производительности суперкомпьютеров. Вместе с тем без понимания основных принципов устройства таких многомерных ППЭ практически невозможно дальнейшее развитие физической теории формирования уникальных пространственных структур биополимеров и пространственной укладки их комплексов, например, в хроматине. В этой ситуации, по нашему мнению, внимание необходимо уделить установлению аналитической структуры такого типа многомерных поверхностей с учетом особенностей рассматриваемых макромолекулярных объектов.

Как известно, валентные связи и валентные углы практически не дают вклада в изменение пространственной конфигурации линейных полимеров и биополимеров, в то время как изменение их пространственной структуры происходит за счет поворотов вокруг одинарных связей. Тем самым топология конфигурационного пространства таких полимеров соответствует топологии многомерного тора, и функция потенциальной энергии, которая задана на этом торе, должна быть представлена в виде многомерного ряда Фурье. При рассмотрении общих свойств многомерной поверхности мы фактически обязаны отталкиваться от этого аналитического представления многомерной ППЭ и учитывать различные конкретные обстоятельства, которые накладывают определенные ограничения на коэффициенты разложения ППЭ в ряд Фурье. Ранее мы показали [20, 21], что определенные ограничения на коэффициенты разложения приводят к таким типам топографии поверхности свободной энергии, которые позволяют интерпретировать достаточно разнородные факты, наблюдаемые при фолдинге белковых структур. Выше во второй части данной

статьи было показано, каким образом симметрия линейных полимеров относительно перестановки одинаковых звеньев ограничивает возможный вид коэффициентов разложения ППЭ в ряд Фурье. В идеальном варианте гомополимера коэффициенты разложения инварианты относительно перестановки номеров гармоник для различных угловых переменных. Наиболее естественными инвариантами векторов гармоник являются длины, а также суммы компонент этих векторов. Выше мы рассмотрели зависимости коэффициентов разложения от этих инвариантов алгебраических векторов номеров гармоник. Рассматриваемые эффекты симметрии для гомополимерных структур приводят к тому, что глобальные минимумы потенциальной энергии (при их наличии) отвечают спиральным структурам. При учете температурных эффектов и рассмотрении состояний с минимумом свободной энергии спиральные структуры будут определенным образом деформироваться. При изучении возможных вариантов топографии многомерных поверхностей потенциальной энергии, а также поверхностей свободной энергии мы перешли к рассмотрению частных случаев или моделей, обладающих требуемыми свойствами симметрии. В качестве базовой модели была выбрана гауссова зависимость коэффициентов разложения от длины вектора номеров гармоник с поправкой на возможное смещение максимума распределения на некоторый вектор в пространстве номеров гармоник. Гауссова зависимость описывает ситуацию, когда в пространстве номеров гармоник имеется область с некоторым объемом, которая дает главный вклад в ряд Фурье. Аналитически гауссова зависимость удобна тем, что позволяет получить компактные формулы, из которых наглядно прослеживаются свойства соответствующих макромолекулярных структур и которые можно сравнить с имеющимися общими экспериментальными фактами, например, для процессов фолдинга и денатурации белков.

Как оказалось, ППЭ в рамках гауссовой модели зависит от двух обобщенных переменных (57), которые имеют простой геометрический смысл в пространстве торсионных углов – радиус гиперсферы вокруг точки глобального минимума и расстояние от точки глобального минимума до гиперплоскости, перпендикулярной вектору, проведенному в точку максимума гауссового распределения в пространстве номеров гармоник. Столь удачная параметризация ППЭ в рамках гауссовой модели позволяет понять возможные причины, которые лежат в основе обсужденного выше принципа минимальной фрустрации энергетической воронки [14]. Получаемая топография многомерной ППЭ удовлетворяет этому принципу и при определенных условиях дает возможность для достаточно быстрого фолдинга в уни-

кальную пространственную структуру. С другой стороны, рассматриваемые топографии ППЭ в общем случае показывают, что все многомерное конфигурационное пространство полимера в общем случае разрезано на отдельные и весьма обширные области, которые разделены достаточно высокими потенциальными барьерами. В результате сворачивание полимерной цепи может быть весьма чувствительно к стартовой конфигурации (конформации) цепи, которая получается, например, в процессе синтеза полимера или биополимера или его силовой денатурации. Такие эффекты наблюдались ранее при сравнении результатов рефолдинга белков в зависимости от способа разворачивания полипептидной цепи. При силовом способе разворачивания с использованием атомно-силовых микроскопов рефолдинг в нативное состояние был затруднен [38, 39]. Возможно, что котрактационное сворачивание полипептидной цепи [36] связано с возможностью согласования областей конфигурационного пространства, которые, с одной стороны, оптимальны для сворачивания в глобальный минимум энергии и, с другой стороны, являются результатом конкретного механизма синтеза полипептида на рибосоме.

Учет энтропийных эффектов и переход к поверхности свободной энергии сохраняет в целом основные черты топографии энергетической поверхности. При этом появляется важный новый аспект – вулканообразный профиль ПСЭ, который обычно и наблюдается в экспериментах по фолдингу [9, 10]. При переходе к ПСЭ автоматически появляется также новый параметр – характеристическая температура макромолекулы, которая пропорциональна удельному на один мономер (или на одну угловую переменную) выигрышу в потенциальной энергии при переходе в точку глобального минимума ППЭ. Здесь также мы имеем относительно простые аналитические выражения, которые позволяют подробно проследить за возможными эффектами. В частности, можно определить температуру, при которой свернутое состояние становится неустойчивым. Выбирая температуру денатурации, свойственную белковым структурам, можно оценить требуемые значения энергии взаимодействия мономерных звеньев, которая оказывается в рамках рассматриваемого подхода порядка 5 ккал/моль или порядка энергии водородной связи в водной среде. Отметим, что эта оценка получается автоматически как результат, который основан на топологии конфигурационного пространства линейного полимера, некоторой симметрии относительно перестановки мономерных звеньев, модельной гипотезы о наличии в пространстве векторов гармоник области, которая дает главный вклад в ряд Фурье и без дополнительных физико-химических соображений.

Очевидно, что далеко не каждый линейный полимер способен к формированию уникальных пространственных структур, которые необходимы для функционирования живых систем. Проведенные выше рассуждения о роли эффектов симметрии в топографии ППЭ и некотором динамическом упорядочении конформационной динамики в вязкой среде приводят к мысли о возможных механизмах формирования и отбора в ходе физико-химической эволюции макромолекул, которые имеют тенденцию к формированию уникальных пространственных структур. Мы исходим из необходимости добиологического этапа молекулярной эволюции, когда в результате химических процессов и определенных физических закономерностей отбирались макромолекулы, стабильно сворачивающиеся в уникальные пространственные структуры, которые могли в дальнейшем формировать надмолекулярные структуры с некоторыми функциями. Подчеркнем, что мы не имеем в виду конкретные биополимеры в современном виде, механизмы образования и отбора которых являются отдельной и до конца не очень понятной задачей даже по своей постановке. Предыдущий этап формирования из некоего первичного «бульона» неких молекулярных «конструкций» со стабильной пространственной структурой и функционалом видится в числе весьма возможных вариантов эволюционного перехода к простейшим формам комплексов макромолекул, имеющих некоторые признаки, свойственные живым системам. Принципиальный вопрос состоит в следующем – имеются ли и при каких условиях объективные физико-химические причины направленной эволюции макромолекул в сторону формирования объектов с уникальной пространственной структурой? Мы предлагаем рассматривать этот вопрос с точки зрения эволюции энергетических ландшафтов линейных полимеров и динамики сворачивания в направлении уникальных пространственных структур, т.е. пространственных структур с единственным глобальным минимумом, попадание в который возможно за разумное время и при вполне достижимых условиях. В этой связи выше мы обратили внимание на возможный эффект совместного действия двух типов симметрии. Первое – это формирование энергетического ландшафта с множеством энергетических воронок согласно формуле (74). Такой тип ПСЭ вполне может сформироваться, как показано выше, в случае линейного гомополимера или полимера с не слишком сильно различающимися боковыми группами у мономерных звеньев. Для фолдинга такого полимера в уникальную пространственную структуру необходимо, чтобы репрезентативная точка оказалась в области притяжения центральной энергетической воронки. Удержанию репрезентативной точки в области притяжения цен-

тральной воронки могут способствовать эффекты частичного упорядочения конформационных движений в вязкой среде. В статье приведены рядом две формулы: формула (76) и повтор формулы (24.1), из которых видно каким образом могут коррелироваться условия, накладываемые на линейные комбинации угловых скоростей поворотов по торсионным углам в результате эффектов двух обсуждаемых типов симметрии. Заметим, что эффекты вязкости в конформационной динамике, которые описаны в работе [19] и приводят к примерному равномерному распределению скоростей диссипации энергии (равно как и скоростей изменения потенциальной энергии) по узлам цепи, вносят дополнительный вклад в динамическое упорядочение конформационных степеней свободы макромолекулы и делают более строгими правила движения репрезентативной точки по многомерным энергетическим поверхностям. Таким образом, в рамках развиваемых теоретических представлений мы видим определенные физические предпосылки к направленной физико-химической эволюции в сторону образования полимерных макромолекул с уникальными пространственными структурами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Ю.А. Бахтуруину за полезное обсуждение, а также М.П. Кирпичникову и А.Т. Фоменко за внимание к работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-30003 (эффекты вязкости) и Министерства образования и науки РФ, грант № 075-15-2021-1354 (топография энергетических ландшафтов).

Выполнению работы способствовала поддержка Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» и «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. М. Лифшиц, А. Ю. Гросберг и А. Р. Хохлов, *Успехи физ. наук* **127** (3), 353 (1979).
2. A. Y. Grosberg and A. R. Khokhlov, *Giant Molecules. Here, There, and Everywhere*, 2nd Ed. (World Scientific, 2011).
3. Н. Frauenfelder, *The Physics of Proteins. Biological and Medical Physics*, Biomedical Engineering (Springer, N.-Y., 2010).
4. R. L. Mossbauer, *Hyperfine Int.*, **33**, 199 (1987).
5. К. В. Шайтан и А. Б. Рубин, *Молекуляр. биология* **14** (6), 1323 (1980).
6. К. В. Шайтан и М. Г. Михайлюк, *Хим. физика* **20** (2), 3 (2001).
7. К. В. Шайтан, *Биофизика* **39** (6), 949 (1994).
8. K. V. Shaitan, in *Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules*, Ed. by W. Ebeling, L. Schimansky-Gefer, and Y. M. Romanovsky (World Scientific, Singapore, 2003), pp. 283–308.
9. K. A. Dill and J. L. MacCallum, *Science* **338**, 1042 (2012).
10. А. В. Финкельштейн, *Успехи биол. химии* **58**, 7 (2018).
11. А. В. Финкельштейн и О. В. Птицын, *Физика белка* (КДУ, М., 2012).
12. W. A. Eaton, *J. Phys. Chem. B*, **125**, 3452 (2021).
13. Ю. Ф. Крупянский и В. И. Гольданский, *Успехи физ. наук* **172** (11), 1247 (2002).
14. J. N. Onuchic and P. G. Wolynes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 70 (2004).
15. S. Piana, J. L. Klepeis, and D. E. Shaw, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 98 (2014).
16. К. В. Шайтан, М. А. Ложников и Г. М. Кобельков, *Биофизика* **62** (2), 249 (2017).
17. К. В. Шайтан, Ф. Ю. Попеленский и Г. А. Армеев, *Биофизика* **62** (3), 443 (2017).
18. А. А. Эрендженова, Г. А. Армеев и К. В. Шайтан, *Биофизика* **65** (5), 860 (2020).
19. К. В. Шайтан, *Биофизика* **63** (1), 5 (2018).
20. К. В. Шайтан, *Биофизика* **63** (4), 629 (2018).
21. К. В. Шайтан, *Биофизика* **63** (5), 850 (2018).
22. К. В. Шайтан, *Биофизика* **63** (6), 1057 (2018).
23. Дж. Эллиот и П. Добер, *Симметрия в физике*, т. 1. (Мир, М., 1983).
24. Л. Д. Ландау и Е. М. Лифшиц, *Механика* (Наука, М., 1988).
25. К. Хир, *Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы* (Мир, М., 1976).
26. М. В. Волькенштейн, *Конфигурационная статистика полимерных цепей* (Изд. АН СССР, М.-Л., 1959).
27. А. Т. Фоменко, *Наглядная геометрия и топология. Математические образы в реальном мире*, Изд. 3 (URSS, 2018).
28. А. Зигмунд, *Тригонометрические ряды*, т. 2 (Мир, М., 1965).

29. Дж. Милнор, *Теория Морса* (URSS, 2011).
30. D. J. Wales, *Energy Landscapes* (Univ. Press, Cambridge, 2003).
31. F. H. Stillinger, *Energy Landscapes, Inherent Structures, and Condensed-Matter Phenomena* (Univ. Press, Princeton, 2016).
32. V. V. Marchenkov and G. V. Semisotnov, *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2066 (2009).
33. Дж. В. Гиббс, *Основные принципы статистической механики* (Наука, М., 1982).
34. К. В. Шайтан и И. В. Федик, *Биофизика* **60** (3), 421 (2015).
35. К. В. Шайтан и И. В. Федик, *Биофизика* **53** (1), 61 (2008).
36. G. Kramer, D. Boehringer, N. Ban, and B. Bukau, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (6), 589, (2009).
37. A. S. Lemak and N. K. Balabaev, *Mol. Simulation* **15**, 223 (1995).
38. D. T. Edwards, M.-A. LeBlanc, and T. T. Perkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118** (12), e2015728118 (2021).
39. A. Bordgia, P. M. Williams, and J. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **77** (1), 101 (2008).

Hidden Symmetry Effects in the Dynamics of Linear Polymers and Biopolymers

K.V. Shaitan*, **

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/1, Moscow, 119991 Russia

**Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

The effects of two types of symmetry for linear polymers are considered: spatial symmetry with respect to translations and rotation of the macromolecule as a whole in a homogeneous viscous medium and symmetry with respect to permutations of identical monomer units (or sections of the polymer chain with the same chemical structure) in the chain. It is shown that, in a homogeneous viscous medium, for a macromolecule with rigid bonds during relaxation folding, the conservation law is carried out – the sum of the rotation vectors over torsion angles is equal to zero. Symmetry with respect to permutations in the polymer chain of identical monomer units under certain conditions leads to the formation of energy funnels that satisfy the principle of minimal frustration and correspond to helical or multihelical spatial structures. In this case, there is the deepest central funnel and less deep satellite funnels, separated from each other by energy barriers. This topography of the energy funnel corresponds to a number of effects that are observed in the kinetics of protein folding (a volcano-like profile of the free energy surface, the sensitivity of protein refolding to denaturing steps etc.). When calculating the topography of the free energy surface, the characteristic temperature parameter T_0 arises and this is defined as energy gain due to chain folding per one conformational degree of freedom. It is shown that at $T > 0.26T_0$, the spatial structure of the folded polymer is destroyed. The parameter T_0 and the denaturation temperature in the system under consideration arise from the basic mathematical principles of the arrangement of energy landscapes in the configuration space of torsion angles with the topology of a multidimensional torus and symmetry considerations regarding the permutation of identical monomer units. At biopolymer denaturation temperatures, for example, of the order of 60°C, this ratio leads to an estimate of the energy of nonvalent bonds of monomers of the order of 2.5 kcal/mol per one conformational degree of freedom, that is very similar to hydrogen bonds in aqueous medium. The two types of symmetries under study and their influence on the dynamics of macromolecules and the topography of the energy landscapes of linear polymers can occur simultaneously under certain conditions. The observation of effect occurrence may provide additional information about the prebiological physical-chemical evolution of macromolecules in association with the formation of a pool of linear polymers with unique spatial structures.

Keywords: regularities in the dynamics of linear polymers in a viscous medium, energy landscapes of linear polymers and biopolymers, spatial structure of biopolymers, folding dynamics, minimum frustration principle for an energy funnel, problems of calibration of force fields, multidimensional Fourier series, free energy of a biopolymers, critical temperature of denaturation, physical-chemical molecular evolution

УДК 577.3

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОВЫХ СТАДИЙ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Э.К. Рууге*, **, А.Н. Тихонов*, ***

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а
E-mail: ruuge@mail.ru

***Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2022 г.

После доработки 20.02.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Метод ЭПР находит широкое применение в биофизике фотосинтеза, поскольку он служит эффективным инструментом для изучения процессов электронного и протонного транспорта в различных фотосинтетических системах. Работа посвящена исследованию регуляции электронного транспорта в хлоропластах методом ЭПР, выполненному при непосредственном участии авторов. Показаны возможности использования метода ЭПР для изучения кинетики переноса электронов в хлоропластах высших растений *in situ* (листья высших растений) при комнатных температурах и рассмотрены спектры ЭПР хлоропластов при криогенных температурах. Последнее имеет особое значение для обоснования используемого нами «кинетического» метода измерения рН внутри тилакоидов.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, фотосинтез, электронный транспорт.

DOI: 10.31857/S0006302922030097, EDN: ANNGVU

У высших растений процессы оксигенного фотосинтеза протекают в хлоропластах – специализированных энергопреобразующих органеллах растительной клетки [1]. Схематическое изображение хлоропласта показано на рис. 1а. Под двойной оболочкой хлоропласта, состоящей из наружной и внутренней мембран, находятся протяженные мембранные структуры, которые образуют замкнутые везикулы, имеющие форму дисков и называемые тилакоидами. Мембраны тилакоидов содержат фотосинтетические пигмент-белковые комплексы (рис. 1б). У высших растений тилакоиды группируются в граны – стопки сплюснутых и тесно прижатых друг к другу тилакоидов. Продолжением отдельных тилакоидов гран служат выступающие из них межгранные (стромальные) тилакоиды. В строме (пространство между оболочкой хлоропласта и тилакоидами) содержатся молекулы РНК, ДНК, рибосомы, крахмальные зерна, а также многочисленные

ферменты, которые обеспечивают усвоение CO_2 растениями. Тилакоидные мембраны содержат пигмент-белковые комплексы, участвующие в фотосинтетическом транспорте электронов, а также АТФ-синтазные комплексы, катализирующие образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата (Φ_{H}).

Биофизические методы исследования сыграли решающую роль в выяснении механизмов транспорта электронов у растений. Методами абсорбционной спектроскопии высокого временного разрешения были идентифицированы и охарактеризованы переносчики электрон-транспортной цепи хлоропластов; флуоресцентный анализ пигментов фотосинтетического аппарата лежит в основе диагностики функционального состояния хлоропластов *in vivo*. Особую роль в изучении оксигенного фотосинтеза сыграл метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), с помощью которого в хлоропластах были идентифицированы электронные переносчики, практически невидимые традиционными оптическими

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II.

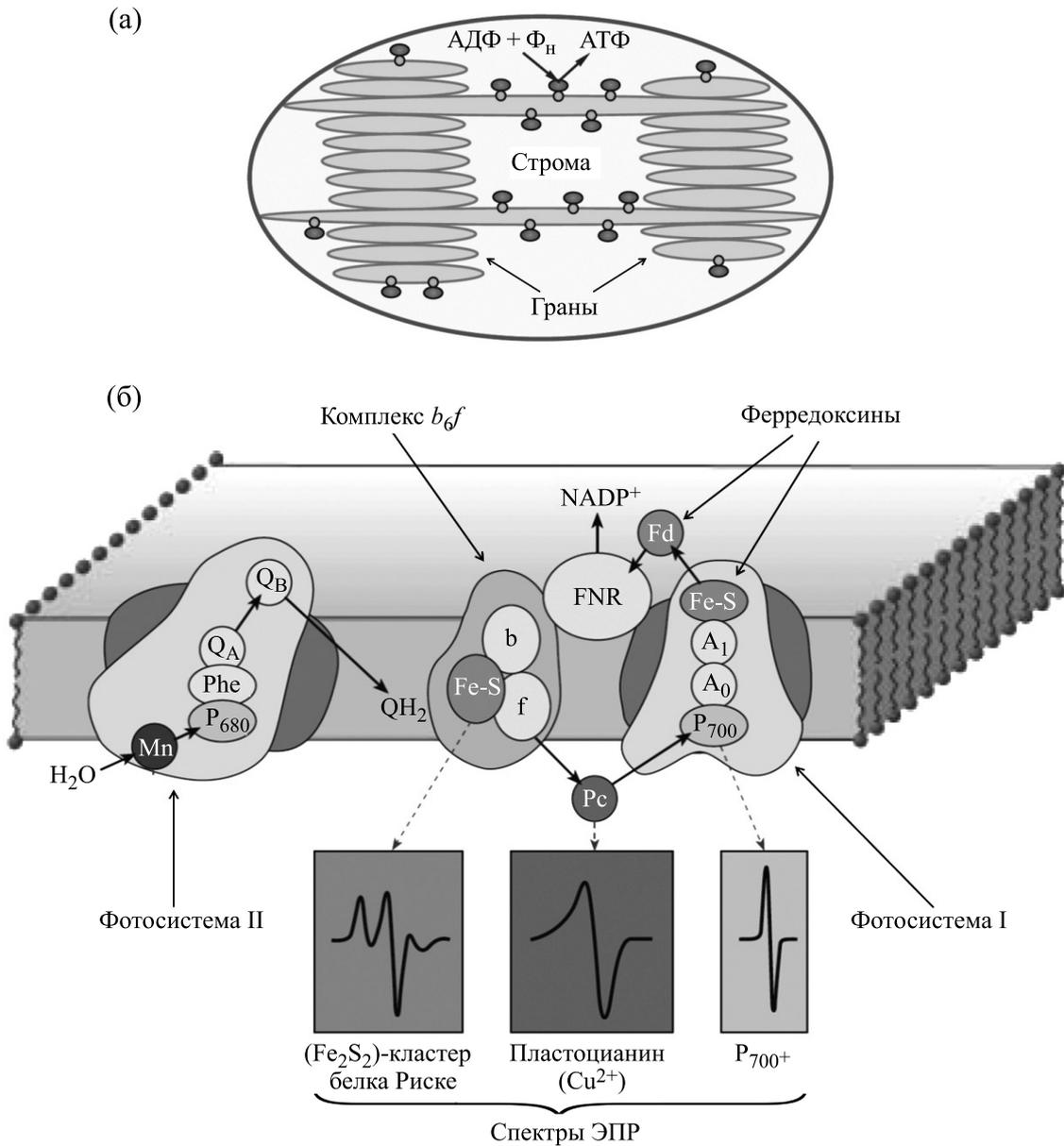


Рис. 1. Схематические изображения тилакоидной системы хлоропласта (а) и фотосинтетической цепи переноса электронов (б).

методами, поскольку сравнительно слабые спектры поглощения этих молекул замаскированы интенсивными спектрами поглощения фотосинтетических пигментов и цитохромов. К таким переносчикам относятся кофакторы электронного транспорта, содержащие негемовое железо – белки, входящие в пигмент-белковый комплекс фотосистемы I (ФС I) [2], медь-содержащий белок пластоцианин [3] и железо-серный кластер (Fe₂S₂) белка Риске [4], входящего в цитохромный b₆f-комплекс хлоропластов [5–8].

Л.А.Блюменфельду принадлежит приоритет в изучении биологических систем методом ЭПР.

Он был одним из первых в мире, кто начал такие исследования в конце 50-х годов XX века (см. очерк С.Э. Шноля в книге [9]). В научном наследии Л.А. Блюменфельда значительная часть исследований посвящена изучению фотосинтетических систем методом ЭПР [10–20]. Эти работы проводились в течение многих лет на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в Институте химической физики Академии наук. Охватить в краткой статье все многообразие исследований в области биофизики фотосинтеза, выполненных под руководством Л.А. Блюменфельда, не представляется

возможным. Отметим лишь некоторые из наиболее важных научных достижений в этой области. Методом ЭПР была детально изучена кинетика фотоиндуцированных превращений P_{700} в хлоропластах высших растений *in situ* (листья) и выявлены два участка регуляции фотосинтетического переноса электронов – акцепторный участок ФС I и стадия окисления пластохинола (PQH_2) цитохромным b_6f -комплексом [21–24]. В работе Блюменфельда с сотрудниками Института химической физики [20] было показано функционирование двух-электронного «затвора», связанного с двух-электронным восстановлением пластохинона (PQ) на акцепторном участке фотосистемы 2 (ФС II) до его полностью восстановленной формы – пластохинола (PQH_2). Пластохинол окисляется цитохромным b_6f -комплексом, содержащим железо-серный кластер Fe_2S_2 белка Риске. Анализируя релаксационные характеристики Fe_2S_2 центров в цепях электронного транспорта митохондрий и хлоропластов, Блюменфельд предположил, что в белках Риске цитохромных комплексов bc_1 и b_6f происходят сравнительно медленные конформационные перестройки белковой глобулы. Согласно релаксационной концепции ферментативного катализа, выдвинутой Блюменфельдом [11–14], эти перестройки инициируются быстрыми реакциями переноса электронов в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов. Впоследствии предположение о конформационных изменениях белка Риске нашло убедительное экспериментальное доказательство [25] (см. также обзорные статьи [5–8]).

Л.А. Блюменфельд с большим интересом отнесся к работам в области биофизики фотосинтеза, которые велись на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В краткой статье нет возможности рассказать обо всех направлениях этих исследований. Мы остановимся на работах, посвященных изучению регуляции электронного транспорта в хлоропластах методом ЭПР, которые были выполнены под руководством и при непосредственном участии авторов данной статьи. Мы проиллюстрируем возможности использования метода ЭПР для изучения кинетики переноса электронов в хлоропластах высших растений *in situ* (листья высших растений) при комнатных температурах и рассмотрим спектры ЭПР хлоропластов при криогенных температурах. Последнее имеет особое значение для обоснования используемого нами «кинетического» метода измерения рН внутри тилакоидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили листья комнатного растения китайской розы (*Hibiscus rosa-sinensis*), листья бобов (*Vicia faba*) и изолированные из них хлоропласты. Методика выделения хлоропластов класса Б из проростков бобов сорта «Русские черные» описана в работах [18, 26]. Хлоропласты суспендировали в среде инкубации, содержащей 10 мМ буфер трицин (рН 7.5). В качестве искусственного акцептора электронов в ФС I использовали 10 мкМ раствор метилвиологена. Спектры ЭПР, измеряемые при комнатной температуре (22–24°C), регистрировали при СВЧ-мощности 10 мВт и амплитуде ВЧ-модуляции, равной 0.4 мТл. Для регистрации кинетики окислительно-восстановительных превращений фотореакционного центра фотосистемы I (P_{700}) магнитное поле фиксировали на низкополевом экстремуме сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ . Образцы освещали белым светом от лампы накаливания (300 Вт), возбуждающим обе фотосистемы, или дальним красным светом ($\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм, 8 Вт), выделяемым с помощью интерференционного фильтра IF707 (Karl Zeiss Jena, Германия) и возбуждающим преимущественно ФС I.

Измерения спектров ЭПР исследуемых объектов проводили с помощью ЭПР-спектрометров E-4 и E-9E (Varian, США), укомплектованных приставками для варьирования температуры образцов в широком диапазоне. Измерения спектров ЭПР при криогенных температурах проводили с использованием установки ESR-9 (Oxford Instruments, Великобритания). Препараты выделенных хлоропластов помещали в кварцевые ампулы и затем адаптировали к темноте или освещали белым светом в течение 1 мин. Затем ампулы с образцами быстро замораживали путем охлаждения их в жидком бутане до 77 К и помещали в резонатор спектрометра E-109E. Температуру измеряемых образцов варьировали в интервале 6–30 К, СВЧ-мощность – в интервале 0.01–10 мВт. Температуру образцов в резонаторе спектрометра измеряли с помощью калиброванной термодпары. Особое внимание было уделено тщательному выбору кварцевых ампул, которые не давали паразитных сигналов ЭПР при криогенных температурах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика фотоиндуцированных редокс-превращений P_{700} в хлоропластах. На рис. 2 показаны спектры ЭПР хлоропластов бобов и кинетики фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ в листьях и в изолированных хлоропластах бобов. Из

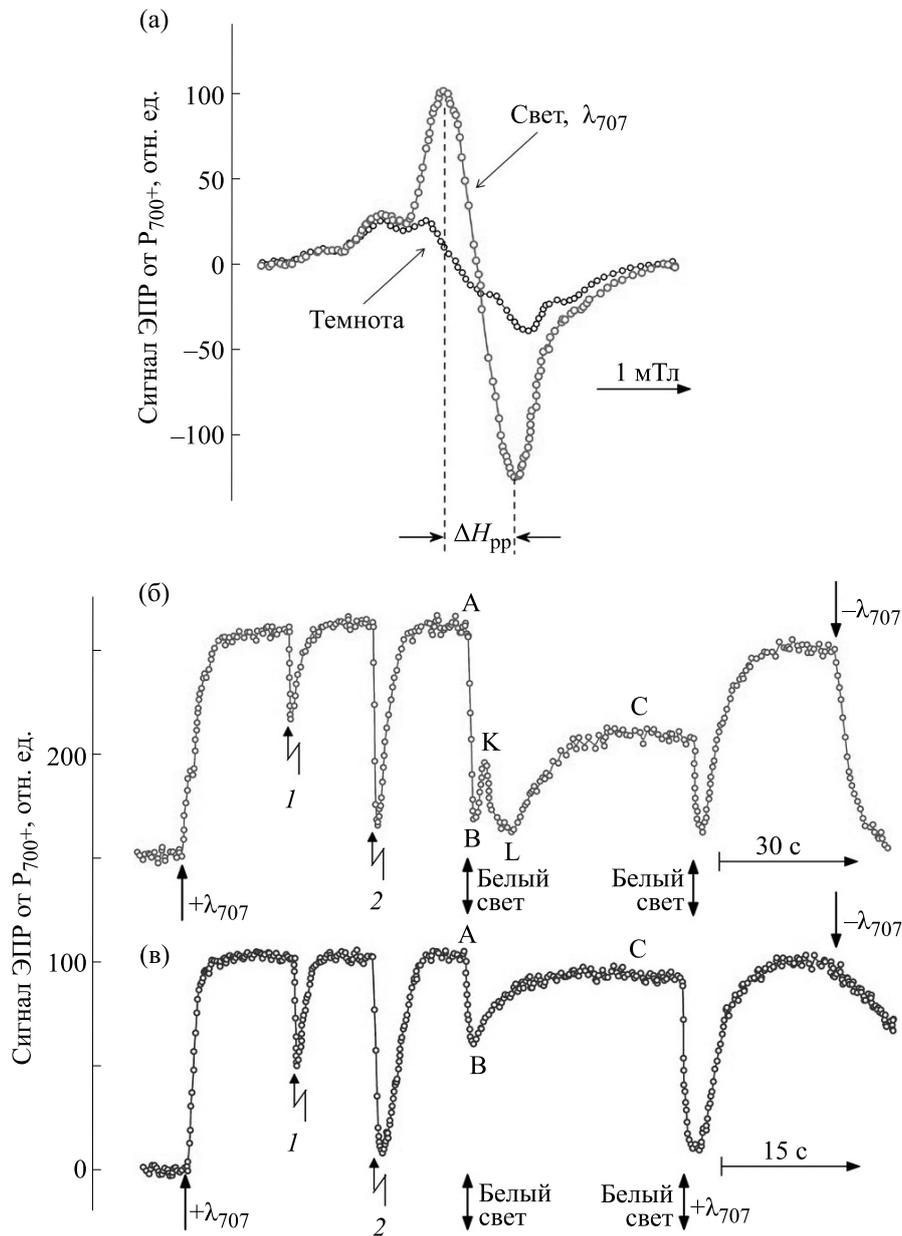


Рис. 2. Спектры ЭПР хлоропластов бобов ((а), первая производная спектра поглощения) и кинетики фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от P_{700}^+ в листьях (б) и изолированных хлоропластах бобов (в). Зигзагообразными стрелками показаны моменты подачи всплеск белого света длительностью $t_{1/2} = 7$ мкс (1) или $t_{1/2} = 750$ мкс (2).

рис. 2а видно, что освещение хлоропластов дальним красным светом ($\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм) вызывает окисление P_{700} . Об этом однозначно свидетельствуют параметры сигнала ЭПР, индуцированного дальним красным светом (значение g -фактора, равного 2.0025, и полуширина сигнала $\Delta H_{pp} = 0.9$ мТл) [27]. В ответ на всплески белого света различной длительности, подаваемые на фоне дальнего красного света, происходит сначала восстановление P_{700}^+ , вслед за которым наблюдается ре-окисление P_{700} за счет действия света с $\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм.

После включения непрерывного белого света происходили немонотонные фотоиндуцированные изменения сигнала ЭПР от P_{700}^+ . В листьях бобов (рис. 2б) мы наблюдали многофазную кинетику, включающую несколько стадий изменений величины сигнала (кривая А–В–К–Л–С). В случае изолированных хлоропластов класса Б наблюдалась более простая кинетическая кривая (так называемый «перехлест» А–В–С, рис. 2в).

Нами была изучена зависимость кинетики окислительно-восстановительных превращений

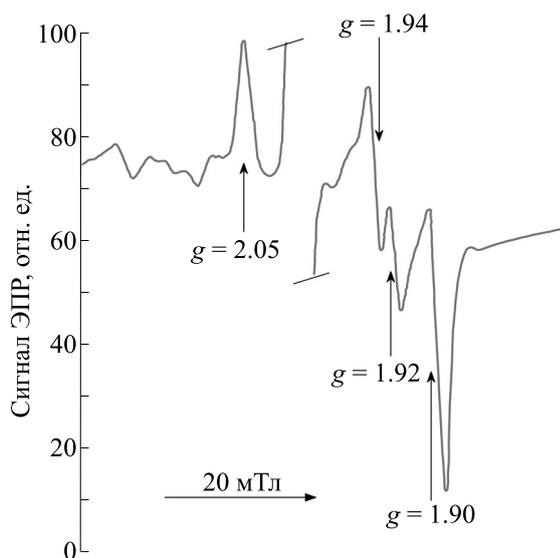


Рис. 3. Спектр ЭПР хлоропластов бобов, замороженных на свету в присутствии 20 мМ дитионита натрия. Температура образца при регистрации спектров равна 20 К.

P_{700} от предыстории освещения образцов (длительность адаптации к темноте или к свету определенного спектрального состава) и от действия ингибиторов или медиаторов электронного транспорта, а также разобщителей, подавляющих трансмембранную разность электрохимических потенциалов в хлоропластах (см. подробнее работы [22–24, 28–32]). На основании этого было выяснено, какие факторы регуляции электронного транспорта определяют немонотонную кинетику изменений сигнала ЭПР от P_{700}^+ в хлоропластах листьев, адаптированных к темноте. Установлено, что основной вклад в наблюдаемые явления вносят: 1) фотоиндуцированное увеличение активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона, вызывающее ускорение оттока электронов от ФС I; 2) уменьшение скорости притока электронов к P_{700}^+ [18, 23, 24, 32]. Ослабление потока электронов от ФС II к ФС I может происходить по разным причинам, включая уменьшение фотохимической активности ФС II вследствие усиления нефотохимического тушения возбуждения хлорофилла в светособирающей антенне ФС II и замедления скорости окисления пластохинола (PQH_2) цитохромным b_6f -комплексом в результате фотоиндуцированного закисления внутритилакоидного пространства (pH_{in}) [33–37].

Последнее представляет особый интерес, поскольку на этом явлении основан «кинетический» метод неинвазивного измерения pH_{in} в хлоропластах *in situ* и *in vitro*. Суть метода заключается в измерении скорости переноса электро-

нов к P_{700}^+ , зависящей от pH_{in} [18, 29, 34]. «Кинетический» метод измерения pH_{in} был использован в наших работах для измерения транстилакоидной разности pH (ΔpH) в различных метаболических состояниях хлоропластов (см. подробнее обзор [37]). Одно из условий для адекватного использования этого метода заключается в том, что состояние электронных переносчиков как в сопряженных, так и в разобщенных хлоропластах, используемых для построения калибровочной зависимости скорости переноса электронов между ФС II и ФС I от pH_{in} , должно быть одинаковым. Для обоснования этого метода положения нами были проведены описанные ниже измерения низкотемпературных спектров ЭПР хлоропластов.

Окислительно-восстановительное состояние переносчиков электрон-транспортной цепи (по данным низкотемпературной ЭПР-спектроскопии). На рис. 3 представлены спектры ЭПР хлоропластов бобов, восстановленных дитионитом и замороженных непосредственно во время их освещения белым светом. В спектре ЭПР видны интенсивные линии, принадлежащие восстановленным акцепторам ФС I – железо-серным центрам F_A и F_B . Сопоставление g -факторов этих сигналов с литературными данными свидетельствует о том, что в наблюдаемый спектр могут вносить вклад как взаимодействующие, так и не взаимодействующие друг с другом центры F_A и F_B (сигналы с $g = 1.94$ и $g = 1.92$) (об идентификации линий ЭПР в хлоропластах при криогенных температурах см. обзорные работы [38–40]). Как и следовало ожидать, в спектре ЭПР отсутствует сигнал, который мог бы принадлежать к фракции водорастворимого феррредоксина, вымываемого при выделении хлоропластов класса Б. Наиболее интенсивная линия сигнала с $g_y = 1.89–1.90$ близка к полосе с $g_x = 1.89$, принадлежащей акцептору F_B и/или F_A (при условии, что он взаимодействует с восстановленным акцептором F_B).

Для однозначного отнесения сигнала с $g_y = 1.90$ к восстановленному Fe_2S_2 кластеру белка Рискен необходимо было доказать, что он отличается по своим характеристикам от компоненты сигнала с $g_x = 1.89$, принадлежащего восстановленному центру F_B . Мы смогли убедиться в этом, измеряя зависимость интенсивностей линий с различными значениями g -тензора в зависимости от СВЧ-мощности и температуры образца (данные не приведены).

В верхней части рис. 4 показаны спектры ЭПР в хлоропластах, замороженных в темноте после предварительного освещения хлоропластов белым светом в присутствии грамицидина D. Четко видны сигналы, принадлежащие окисленному

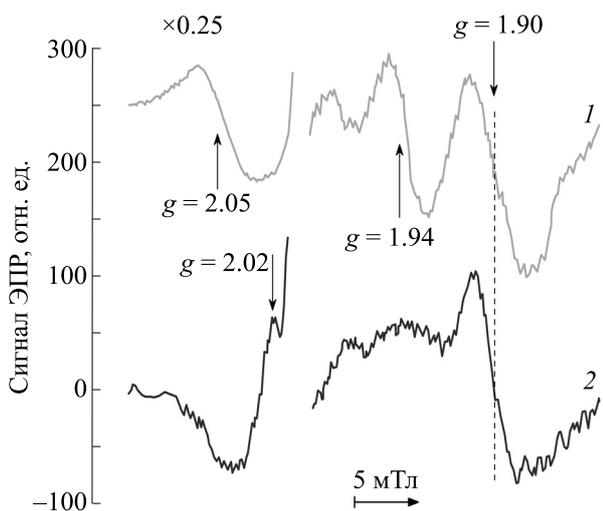


Рис. 4. Спектры ЭПР хлоропластов бобов, измеренные при 17 К: спектр 1 – хлоропласты замороженные в темноте после предварительного освещения белым светом в течение 30 с; спектр 2 – хлоропласты, адаптированные в течение 40 мин к темноте в присутствии 10 мМ аскорбата натрия.

пластоцианину ($g = 2.05$), восстановленному Fe-S центру F_A ($g = 1.94$) и восстановленному центру Риске ($g = 1.90$). Принадлежность сигнала с $g = 1.90$ центру Риске доказывается тем, что этот

сигнал наблюдается в хлоропластах, инкубированных в темноте в присутствии 10 мМ аскорбата. В этом случае линии сигнала ЭПР с $g = 1.94$ и $g = 1.92$, относящиеся к восстановленным центрам F_A и F_B , отсутствовали. Вместе с тем наряду с линией при $g = 1.90$ наблюдалась компонента с $g = 2.02$, относящаяся к низкополевой компоненте сигнала ЭПР от восстановленного железо-серного кластера белка Риске.

На рис. 5 показаны фрагменты спектров ЭПР образцов хлоропластов для компонент сигнала с $g = 2.05$ (окисленный пластоцианин) и с $g = 1.90$ (восстановленный Fe_2S_2 центр белка Риске). Образцы были получены путем быстрого замораживания хлоропластов в разных метаболических состояниях на свету или в темноте (через 30 с после выключения света). Из этих данных видно, что во время освещения хлоропластов непрерывным белым светом большая часть молекул пластоцианина и Fe_2S_2 центра Риске находятся в окисленном состоянии. После выключения света эти переносчики восстанавливаются за счет пластохинонового пула, который поддерживается, по крайней мере частично, в восстановленном состоянии. О состоянии пластохинонового пула в условиях освещения мы можем судить по кинетике окислительно-восстановительных превращений P_{700} , показанной на рис. 2в. Быстрое восста-

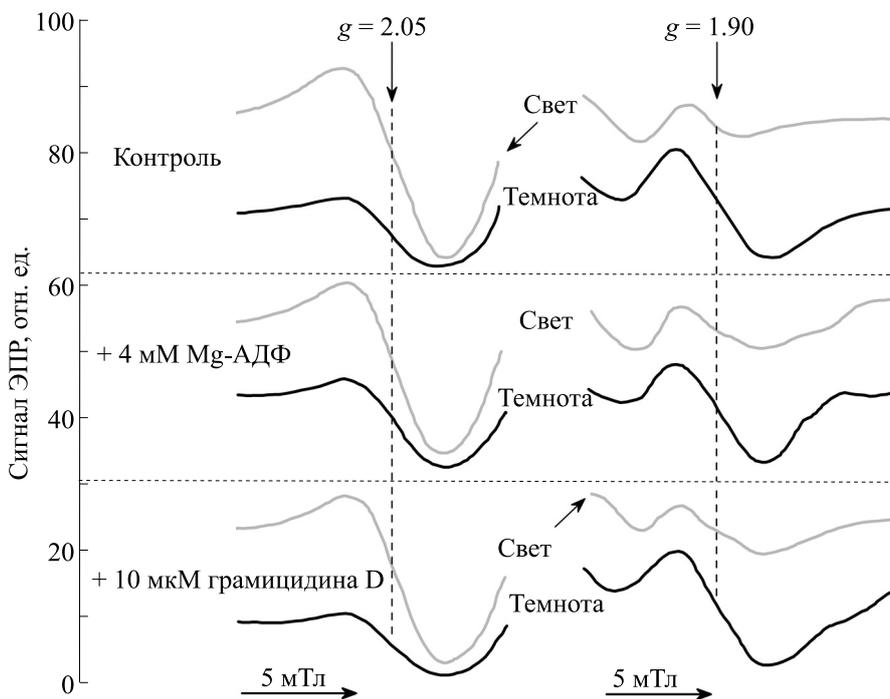


Рис. 5. Спектры ЭПР хлоропластов бобов, измеренные при 20 К. Образцы были получены путем быстрого замораживания суспензий хлоропластов, находившихся в разных метаболических состояниях при освещении и в темноте (после выключения света). Контроль – хлоропласты без добавок; хлоропласты в условиях синтеза АТФ (в присутствии 10 мМ Mg-ADP); разобщенные хлоропласты (в присутствии 10 мкМ грамицидина D).

новление P_{700}^+ сразу после выключения белого света свидетельствует о том, что в цепи электронного транспорта между ФС II и ФС I имеются восстановленные молекулы пластохинола.

Приведенные на рис. 5 данные свидетельствуют о том, что во все трех метаболических состояниях – в контроле (без добавок), в условиях фотофосфорилирования (в присутствии 4 мМ Mg-АТФ) и в разобренных хлоропластах (при добавлении 10 мкМ грамицидина D), состояние донорного участка цепи переноса электронов между цитохромным b_6f -комплексом и P_{700} было практически одинаковым. На основании этого мы можем утверждать, что одно из основных требований, необходимых для корректного измерения внутритилакоидного рН (pH_{in}) «кинетическим» методом, в наших опытах выполняется. Различие в скоростях восстановления P_{700}^+ , наблюдавшееся нами в разных метаболических состояниях хлоропластов [18, 29], обусловлено разными значениями внутритилакоидного pH_{in} , а не разными состояниями электрон-транспортной цепи на участке между цитохромным b_6f -комплексом и P_{700} . Отметим, что развитый нами «кинетический» метод измерения pH_{in} имеет одно неоспоримое преимущество – с его помощью можно проводить неинвазивные (*in situ*) измерения pH_{in} в хлоропластах, находящихся в листьях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отметим, что метод ЭПР нашел широкое применение в биофизике фотосинтеза, поскольку он служит эффективным инструментом для изучения процессов электронного и протонного транспорта в различных фотосинтетических системах. Выше мы рассмотрели лишь некоторые направления в исследованиях биоэнергетических процессов в фотосинтезирующих системах путем регистрации электрон-транспортных процессов в хлоропластах и листьях высших растений методом ЭПР. Другие возможности использования метода ЭПР в изучении фотосинтеза связаны с использованием стабильных радикалов (спиновых меток). С помощью стабильных радикалов, служащих парамагнитными зондами, чувствительными к их локальному окружению, можно следить за структурными перестройками в пигмент-белковых комплексах, а также измерять *транс*-тилакоидную разность электрохимических потенциалов ионов водорода [37, 41].

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа посвящена 100-летию со дня рождения нашего учителя, Льва Александровича

Блюменфельда, одного из пионеров применения ЭПР в изучении биологических систем.

Мы благодарны нашим коллегам, Г.Б. Хомутову, А.А. Тимошину и С.Б. Рыжикову, совместно с которыми была выполнена часть тех наших ранних работ по исследованию механизмов регуляции электронного транспорта в хлоропластах высших растений, на которые мы ссылаемся в данной работе. Мы также признательны Ю.А. Кокшарову и Б.В. Трубищину за компьютеризацию спектрометров ЭПР моделей Е-4 и Е-109Е, использованных в нашей работе. Наша особая благодарность Б.В. Трубищину за помощь в оцифровке спектров ЭПР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20047).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дж. Эдвардс и Д. Уокер, *Фотосинтез С3 и С4 растений: механизмы и регуляция* (Мир, М., 1986).
2. R. Malkin and A. J. Bearden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 16 (1971).
3. R. Malkin and A. J. Bearden, Biochim. Biophys. Acta **292**, 169 (1973).
4. R. Malkin and P. J. Aparicio, Biochim. Biophys. Res. Commun. **63**, 1157 (1975).
5. W.A. Cramer and S. S. Hasan, Adv. Photosynth. Respiration **41**, pp.177–207 (2016).
6. A. N. Tikhonov, In *Membrane protein complexes: structure and function, sub-cellular biochemistry*, Ed. by J. R. Harris and E. J. Boekema (Springer, Singapore, 2018), Vol. 87, pp. 287–328.
7. L. A. Malone, M. S. Proctor, A. Hitchcock, et al., Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics, **1862**, 148380 (2021).
8. M. Sarewicz, S. Pintscher, R. Pietras, et al., Chem. Rev. **121**, 2020 (2021).
9. С. Э. Шноль, *Герои, злодеи, конформисты отечественной науки*, изд. 6, испр. (URSS, М., 2022).
10. Л. А. Блюменфельд, Изв. АН СССР. Сер. биол., № 3, 285 (1957).
11. Л. А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Москва: Наука, 1974).

12. L. A. Blumenfeld, *Physics of Bioenergetic Processes* (Springer-Verlag, Heidelberg, 1983).
13. L. A. Blumenfeld and A. N. Tikhonov, *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell* (Springer-Verlag, New-York, 1994).
14. L. A. Blumenfeld, R. M. Davydov, and A. N. Tikhonov, *J. Mol. Liquids* **42**, 231 (1989).
15. Э. К. Рууге, А. Н. Тихонов и Л. А. Блюменфельд, *Биофизика* **19**, 938 (1974).
16. Э. К. Рууге, А. Н. Тихонов и Л. А. Блюменфельд, *Биофизика* **19**, 1033 (1974).
17. А. Н. Тихонов, Э. К. Рууге, В. К. Субчински и др., *Физиол. растений* **22**, 5 (1975).
18. A. N. Tikhonov, G. V. Khomutov, E. K. Ruuge, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **637**, 321 (1981).
19. А. Н. Тихонов, А. А. Тимошин и Л. А. Блюменфельд, *Молекуляр. биология* **17**, 1236 (1983).
20. L. A. Blumenfeld, M. G. Goldfield, A. I. Tzapin, et al., *Photosynthetica* **8**, 168 (1974).
21. А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Биофизика* **20**, 1049 (1975).
22. Э. К. Рууге и А. Н. Тихонов, *Биофизика* **22**, 268 (1977).
23. С. Б. Рыжиков и А. Н. Тихонов, *Биофизика* **33**, 642 (1988).
24. A. N. Tikhonov, *Photosynthesis Research* **125**, 65 (2015).
25. Z. Zhang, L. Huang, V. M. Schulmeister, et al., *Nature* **392**, 677 (1998).
26. S. Izawa, R. Kraayehof, E. K. Ruuge, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **314** (3), 328 (1973).
27. A. N. Webber and W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 61 (2001).
28. А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Биофизика* **22**, 839 (1978).
29. A. N. Tikhonov, G. V. Khomutov, and E. K. Ruuge, *Photobiochem. Photobiophys.* **8**, 261 (1984).
30. А. Н. Тихонов., Г. Б. Хомутов и Э. К. Рууге, *Молекуляр. биология* **13**, 1085 (1979).
31. Г. Б. Хомутов, А. Н. Тихонов и Э. К. Рууге, *Молекуляр. биология* **15**, 182 (1981).
32. B. V. Trubitsin, A. V. Vershubskii, V. I. Priklonskii, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **152**, 400 (2015).
33. B. Rumberg and U. Siggel, *Naturwissenschaften* **56**, 130 (1969).
34. A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.* **116**, 511 (2013).
35. D. M. Kramer, C. A. Sacksteder, and J. A. Cruz, *Photosynth. Res.* **60**, 151 (1999).
36. A. N. Tikhonov, R. V. Agafonov, L. A. Grigor'ev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 285 (2008).
37. A. N. Tikhonov, *Cell Biochem. Biophys.* **75**, 421 (2017).
38. K. Brettel, *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322 (1997).
39. J. H. Golbeck, *Photosynth. Res.* **61**, 107 (1999).
40. I. R. Vassiliev, M. L. Antonkine, and J. H. Golbeck, *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 139 (2001).
41. A. N. Tikhonov and W. K. Subczynski, In *Biomedical EPR – Part A: Free radicals, metals, medicine, and physiology*, Ed. by S. S. Eaton, G. R. Eaton, and L. J. Berliner (Kluwer Academic/Plenum Publishers, Boston, MA, 2005), Vol. 23, pp. 147–194.

Electron Paramagnetic Resonance: Study of the Regulatory Mechanisms of Light Phases of Photosynthesis in Plants

E.K. Ruuge*, ** and A.N. Tikhonov*, ***

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

**Chazov National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

***Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Electron paramagnetic resonance (EPR) is a method widely used in biophysics of photosynthesis, since it serves as an effective tool for studying the processes of electron and proton transport in different photosynthetic systems. The aim of this study was to investigate the regulation of electron transport in chloroplasts using the EPR method, carried out by researchers who prepared this research paper. This paper provides information regarding the use of the EPR method for studying the kinetics of electron transfer in chloroplasts of higher plants *in situ* (leaves of higher plants) at room temperatures and considers the EPR spectra of chloroplasts at cryogenic temperatures. The latter holds particular significance for substantiation of the "kinetic" method we use for measuring pH inside the thylakoids.

Keywords: electron paramagnetic resonance, photosynthesis, electron transport

ТЕРМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ

© 2022 г. В. А. Караваяев, О. А. Калмацкая, Б. В. Трубицин, А. Н. Тихонов

Физический факультет Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: karavaev@phys.msu.ru, an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

Рассмотрены основные механизмы возникновения полос термолюминесценции фотосинтетических объектов в интервале температур от -20 до 80°C . Приведены примеры использования метода термолюминесценции для диагностики функционального состояния фотосинтетического аппарата растений.

Ключевые слова: термолюминесценция, кислородный фотосинтез, электронный транспорт.

DOI: 10.31857/S0006302922030103, EDN: AOAWKT

Явление термолюминесценции (ТЛ) нашло широкое применение в исследованиях физико-химических свойств различных систем в физике, биофизике, геохимии и палеонтологии. Это явление широко используется для изучения энергетической структуры кристаллофосфоров при создании люминесцирующих веществ, для измерения поглощенной дозы радиоактивного излучения, диагностики функционального состояния фотосинтетических систем, а также для анализа свойств различных минералов и археологических артефактов [1, 2].

На кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова исследования ТЛ биологических объектов начались в середине 60-х годов XX века. Эти работы были инициированы профессором Л.А. Блюменфельдом. Предпосылкой для них послужила гипотеза о том, что индуцированные светом процессы миграции и преобразования энергии в фотосинтетических системах могут протекать подобно полупроводниковым механизмам преобразования энергии в физических системах. Исследования биологических систем методом ТЛ активно велись на кафедре биофизики в течение нескольких десятилетий А.К. Кукушкиным, М.К. Солнцевым и их учениками. М.К. Солнцев сконструировал высокочувствительную экспериментальную установку, позволившую регистрировать сравнительно слабое свечение, возникающее при нагревании

предварительно облученных объектов [3]. На первом этапе основное внимание было уделено измерениям ТЛ порошков азотистых оснований (аденин), нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Эти исследования показали существование процессов миграции энергии возбуждения между нуклеотидами, предположительно защищающих нуклеиновые кислоты от радиационных повреждений. В дальнейшем основное направление исследований было сконцентрировано на изучении фотосинтетических объектов (листья и изолированные хлоропласты). В ходе этих исследований были разработаны оптимальные протоколы регистрации ТЛ, позволяющие следить за функциональным состоянием фотосинтетического аппарата растений, произрастающих в разных условиях и подвергнутых воздействию разных физиологически активных соединений. Существенный вклад в изучение фотосинтетических систем внесли сотрудники кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова [4].

В настоящей статье мы кратко рассмотрим основы явления ТЛ и приведем примеры того, как метод ТЛ можно использовать для диагностики функционального состояния фотосинтетического аппарата растений.

ОСНОВЫ ЯВЛЕНИЯ ТЕРМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Термолюминесценция – это свечение, возникающее при нагревании объектов, предваритель-

Сокращения: ТЛ – термолюминесценция, ФС II – фотосистема II, МИФ – медленная индукция флуоресценции.

но охлажденных и освещенных при пониженной температуре. При освещении вещества в нем могут возникать носители разноименных зарядов (электроны и «дырки»), которые локализуются и стабилизируются на центрах захвата («ловушках»). Рекомбинация разноименных зарядов может сопровождаться свечением. Для высвобождения электронов и «дырок» из «ловушек» необходима дополнительная энергия, которую можно сообщить либо путем нагревания объекта, либо при его освещении инфракрасным светом [5, 6]. Если предварительно освещенный объект подвергнуть нагреву в темноте, то, достигнув температуры, при которой тепловая энергия становится сравнимой с энергией активации (энергия, необходимая для высвобождения носителя заряда из ловушки), вещество начнет светиться. С течением времени, по мере нагревания образца, все электрон-дырочные пары рекомбинируют и свечение прекращается. Изучая зависимость интенсивности свечения от температуры, при которой регистрируется излучение, получают кривую ТЛ, которая несет в себе информацию о природе и об энергетических характеристиках ловушек носителей зарядов.

ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ МЕТОДОМ ТЕРМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Природа спектров термолюминесценции хлоропластов высших растений. Явление ТЛ фотосинтетических объектов впервые наблюдали В. Арнольд и Н. Шервуд [7]. Они зарегистрировали высокотемпературную термохемилюминесценцию, которую связывают обычно с перекисным окислением липидов и которая не относится непосредственно к фотосинтезу. Компоненты, связанные с фотосинтезом, были обнаружены позднее (см., например, работы [8, 9]). Основным источником свечения, испускаемого хлоропластами — энергопреобразующими органеллами растительной клетки — являются возбужденные молекулы хлорофилла. После охлаждения образца и его освещения при низкой температуре и при последующем нагреве происходят процессы обратного переноса «дырок» от кислородвыделяющей системы и электронов с хиноновых акцепторов фотосистемы II (ФС II); их рекомбинация сопровождается излучением запасенной энергии [10, 11].

При возбуждении реакционных центров происходит быстрое разделение зарядов с переносом электрона на первичный акцептор феофитин. Далее электрон переносится на первичный хиноновый акцептор Q_A , а затем на двухэлектронный вторичный хиноновый акцептор Q_B . Донором электронов для окисленного реакционного цен-

тра ФС II (P^+_{680}) является, в конечном итоге, кислородвыделяющая система. Система выделения кислорода может находиться в одном из пяти состояний: S_0, S_1, S_2, S_3 и S_4 . Эти состояния соответствуют состояниям ионов марганца различной степени окисленности. В результате четырехкратного взаимодействия с ионами марганца разлагаются две молекулы воды.

Выделение молекулы кислорода происходит при переходе $S_4 \rightarrow S_0$, для которого свет не требуется.

В работах М.К. Солнцева с соавторами [12–16] ТЛ листьев растений регистрировали главным образом после их охлаждения и облучения при -30°C . При этой температуре «заморожены» процессы окисления вторичного хинонового акцептора Q_B^- , а также переходы $S_4 \rightarrow S_0$, и кратковременное освещение образца белым светом приводит к накоплению электронов на акцепторной стороне ФС II и дырок — в ее донорной части. После дальнейшего замораживания до азотных температур (77 К) и при последующем нагревании обычно наблюдались три более или менее выраженные полосы с максимумами в интервалах от -20 до 0°C (полоса А), от 0 до 40°C (полоса В, состоящая из двух компонент B_1 и B_2) и от 40 до 60 – 80°C (полоса С) [17–20] (рис. 1). В настоящее время можно считать установленным, что полосы А и В непосредственно связаны с функционированием фотосинтетической цепи переноса электронов [6]. Предполагается, что полоса А возникает в основном в результате рекомбинации состояний $S_3Q_A^-$ [21], а полоса В — в результате рекомбинации $S_3Q_B^-$ и $S_2Q_B^-$ [6]. Существует, однако, предположение, что полоса А имеет двухкомпонент-

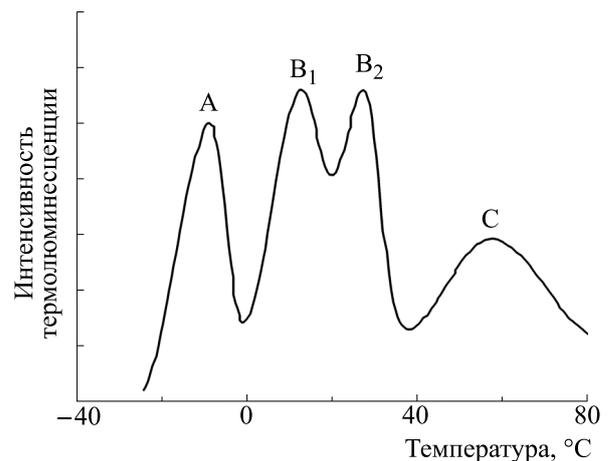


Рис. 1. Схематическое изображение характерных полос термолюминесценции фотосинтезирующих объектов.

ный состав; ее низкотемпературный компонент вызван рекомбинацией состояний $S_4Q_A^-$, а высокотемпературный — рекомбинацией состояний $S_3Q_A^-$ [20]. Выделяют еще пик Q (гербицидный, или, в других обозначениях, G-пик), наблюдаемый в интервале от 2 до 10°C при блокировании переноса электронов от Q_A к Q_B ; предполагается, что эта полоса связана в основном с рекомбинацией состояний $S_2Q_A^-$ [6].

Полоса В состоит из двух компонент: V_1 и V_2 . Разделение этих компонент происходит, если рН суспензии хлоропластов менее 6.0; при рН в интервале 7.0–7.5 эти две компоненты наблюдаются при одинаковых температурах и проявляют себя, как один пик В [10]. Предполагается, что за пик V_1 ответственна рекомбинация состояний $S_3Q_B^-$, а за пик V_2 — $S_2Q_B^-$ [2]. При дальнейшем увеличении рН (больше 8.0) величина пика В уменьшается. Это связано с выпадением ионов Mn, связанных с кислородвыделяющей системой, что приводит к подавлению выделения кислорода. Этот процесс обратим, достаточно либо уменьшить рН, либо добавить NaCl [11].

Высокотемпературная полоса С непосредственно с фотосинтезом не связана. Считается, что она обусловлена хемилюминесценцией, сопровождающей реакции продуктов, которые образуются в результате деструкции мембран хлоропластов при замораживании [22]. Наличие или отсутствие полосы С является определенным тестом на устойчивость растений к тем или иным неблагоприятным факторам среды: чем менее интенсивна полоса С, тем шире диапазон устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям.

Влияние физиологического состояния растений на спектры термолюминесценции. Характеристики ТЛ листьев и хлоропластов весьма чувствительны к изменению физиологического состояния растений [2]. Рассмотрим, например, как изменяются спектры ТЛ листьев пшеницы при различных минеральных подкормках растений, которые были подробно изучены в работе [12]. В этих опытах растения выращивали в сосудах с почвой, а поливали их либо водопроводной водой, либо водой с добавлением азотсодержащих, калийных или фосфорных солей. При всех типах подкормки наблюдалось увеличение показателя $S_B/S_{общ}$, где S_B — светосумма (площадь под кривой) ТЛ в температурном диапазоне от 0 до 40°C, а $S_{общ}$ — светосумма ТЛ в диапазоне от 0 до 80°C. Этот эффект объясняется, с одной стороны, увеличением количества Q_B^- , накопленных к моменту регистрации ТЛ, а с другой, — уменьшением светосуммы полосы С. Полоса А в этих экспериментах отсут-

ствовала. Очевидно, это было связано с тем, что предварительное освещение образца проводили при 0°C, когда еще не «заморожены» процессы окисления Q_B^- и переходы $S_4 \rightarrow S_0$.

В ряде работ, выполненных на физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова, была изучена ТЛ листьев растений в условиях различной фотосинтетической активности. В опытах с растениями пшеницы, пораженными мучнистой росой, было установлено, что изменения фотосинтетической активности (скорости выделения O_2 на свету) положительно коррелируют с изменениями показателя $S_A/S_{общ}$, где S_A — светосумма (площадь под кривой ТЛ) пика А, $S_{общ}$ — общая светосумма ТЛ (освещение образцов в этих опытах проводили при –30°C) [13]. Аналогичные коррелятивные взаимосвязи были установлены в экспериментах с обработкой растений различными физиологически активными веществами, причем в условиях как повышенной, так и пониженной фотосинтетической активности [14].

В другой серии экспериментов, выполненных М.К. Солнцевым с коллегами, существенные изменения интенсивности ТЛ в области полосы А наблюдали у растений, выращенных в условиях подкормки растений удобрением «Кемира люкс». В этих экспериментах семена пшеницы высаживали в пакеты с песком объемом около 0.5 л. Песок перед высаживанием семян обрабатывали до полного смачивания либо водой, либо растворами удобрений «Кемира люкс» (изготовитель «Кемира Агро», Московская обл.) в пропорции 1 г удобрения на 200 мл воды. Растения выращивали в лабораторных условиях, а измерения ТЛ проводили через три недели после посадки. Согласно инструкции удобрение «Кемира люкс» содержит следующие элементы: 32% азота, 20.6% фосфора, 27.1% калия, 0.1% железа, 0.02% бора, 0.01% меди, 0.1% марганца, 0.002% молибдена, 0.01% цинка. Применение удобрения «Кемира люкс» приводило к значительному «разгоранию» пика А (рис. 2), связанному, как предполагается, с увеличением фотосинтетической активности проростков пшеницы в условиях минеральной подкормки. Вместе с тем, в этом случае наблюдалось незначительное увеличение интенсивности высокотемпературной ТЛ (выше 50°C), в области полосы С, что, очевидно, свидетельствует о некотором ухудшении структурно-функциональных характеристик мембран хлоропластов. Этот пример наглядно иллюстрирует возможности использования метода ТЛ для подбора оптимальных с точки зрения влияния на фотосинтетический аппарат растений норм расхода препаратов.

В ряде работ В.А. Караваева и М.К. Солнцева с соавторами [15, 16, 23, 24] было проведено комплексное исследование люминесцентных показате-

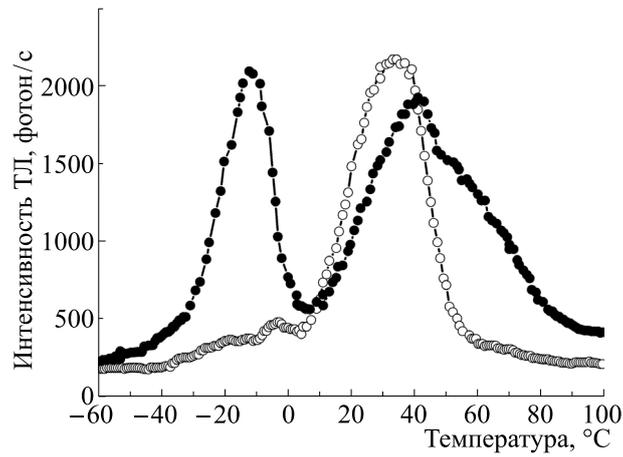


Рис. 2. Характерные кривые термолюминесценции контрольных (светлые кружки) и обработанных препаратом «Кемира Люкс» (темные кружки) проростков пшеницы.

телей растений, обработанных различными физиологически активными веществами. В качестве таких показателей авторы использовали относительные светосуммы ТЛ (параметры $S_A/S_{\text{общ}}$ и $S_C/S_{\text{общ}}$), а также значения относительного тушения флуоресценции $(F_M - F_T)/F_T$ при регистрации медленной индукции флуоресценции (МИФ) хлорофилла *a* фотосинтезирующих объектов. Так, в опытах с проростками бобов, обработанных β -аминомасляной кислотой, была установлена положительная корреляция между изменениями показателя $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ листьев растений, с одной стороны, и относительной светосуммы полосы А термолюминесценции – с другой. Наряду с этим наблюдалось уменьшение вклада полосы С в общую светосумму ТЛ, что свидетельствует о положительном влиянии препарата на характеристики мембран [15].

В опытах с растениями огурца, пораженными трипсами и обработанными амарантином (азотсодержащий алкалоид, содержащийся в листьях и соцветиях амаранта), было зарегистрировано уменьшение значений $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ листьев огурца при поражении трипсами (на 30–35% по отношению к контролю), что свидетельствовало о снижении удельной (в расчете на хлорофилл) фотосинтетической активности пораженных листьев. После обработки листьев амарантином значения $(F_M - F_T)/F_T$ возрастали (до 75–80% от контроля), то есть фотосинтетическая активность частично восстанавливалась. Измерения ТЛ показали, что при поражении растений трипсами резко возрастает интенсивность полосы С при температурах от 40 до 80°C, а после обработки амарантином эта интенсивность уменьшается. Как отмечалось выше, полоса С

обусловлена хемилюминесценцией продуктов, образующихся в результате деструкции мембран при замораживании [22]. На основании этих данных был сделан вывод, что устойчивость тилакоидных мембран к стрессовым воздействиям при поражении трипсами снижается, а после обработки амарантином – частично восстанавливается [16].

В работе [23] исследованы МИФ и ТЛ листьев сирени *Syringa vulgaris* и клена серебристого *Acer saccharinum*, черенки которых перед посадкой были обработаны индолилмасляной кислотой, цирконом, корневином или препаратом рибав-экстра. В опытах с саженцами сирени зарегистрировано увеличение значений $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ и $S_A/S_{\text{общ}}$ ТЛ по сравнению с контролем в последовательности индолилмасляная кислота → корневин → циркон, а в опытах с саженцами клена – в последовательности рибав-экстра → корневин → циркон → индолилмасляная кислота. В таких же последовательностях происходило уменьшение значений $S_C/S_{\text{общ}}$. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии обработки черенков исследованными препаратами на физиологическое состояние проростков сирени и клена.

В работе [24] при обработке проростков бобов сверхкритическими флюидными экстрактами горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis* с использованием диоксида углерода наблюдалось увеличение интенсивности ТЛ в области отрицательных температур (полоса А), но только в случае, если при получении экстракта были использованы небольшие концентрации этанола (2%) или же этанол не использовался вовсе (рис. 3). Расчеты показали, что в обоих этих случаях зна-

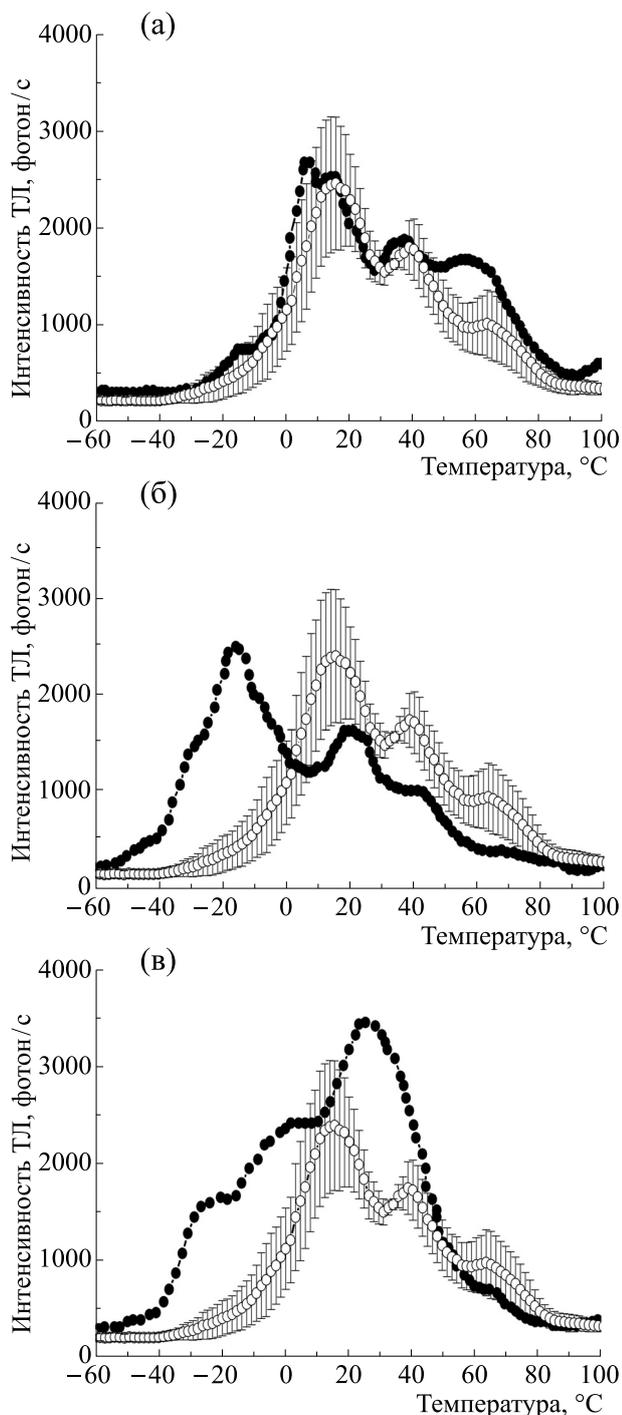


Рис. 3. Характерные кривые термолуминесценции листьев бобов контрольных растений (светлые кружки) и растений, обработанных сверхкритическими флюидными экстрактами *Reynoutria sachalinensis* (темные кружки). При получении сверхкритических флюидных экстрактов использовали CO_2 с 10% этанола (а), с 2% этанола (б) и чистый CO_2 (в).

чительно возрастала относительная светосумма полосы А (показатель $S_A/S_{\text{общ}}$, где S_A – площадь под кривой ТЛ в интервале от -40 до 0°C , $S_{\text{общ}}$ –

площадь под всей кривой ТЛ), что свидетельствует об увеличении фотосинтетической активности растений. Наиболее сильно эффект увеличения $S_A/S_{\text{общ}}$ оказался выражен при использовании 2% этанола при получении сверхкритических флюидных экстрактов, что согласуется с данными, полученными методом МИФ. Кроме того, в вариантах с чистым CO_2 и CO_2 с добавкой 2% этанола наблюдалось уменьшение высокотемпературной ТЛ в области полосы С, что свидетельствует о повышении устойчивости мембран хлоропластов к неблагоприятным воздействиям [22]. При высокой (10%) концентрации этанола, использовавшегося в качестве соразтворителя при получении экстракта, значительно увеличивалась интенсивность ТЛ в области полосы С, что указывает на негативное воздействие больших количеств этанола на структурно-функциональные характеристики мембран хлоропластов. Стимулирующее действие экстрактов *R. sachalinensis* на фотосинтетический аппарат листьев бобов может быть связано с поступлением в клетки листа физиологически активных соединений хиноновой природы, увеличивающих пул акцепторов электрона ФС II.

В ряде работ, выполненных М.К. Солнцевым с коллегами, методом ТЛ были изучены механизмы действия на фотосинтетический аппарат растений ряда препаратов, обладающих гербицидным и фунготоксическим действием [14, 25, 26]. Большое число «фотосинтетических» гербицидов являются ингибиторами электронного транспорта между ФС II и ФС I. Изменения в состоянии акцепторов Q_A и Q_B при обработке этими гербицидами приводят к соответствующим изменениям кривых ТЛ. Эти исследования наглядно продемонстрировали возможности метода ТЛ для оценки ингибирующего действия гербицидов на первичные процессы фотосинтеза. Как отмечено в работе [19], метод ТЛ выгодно отличается от дорогостоящего и трудоемкого метода, основанного на регистрации радиоактивности соответствующим образом меченых препаратов.

В работе [27] методами ТЛ, РАМ-флуориметрии и электронного парамагнитного резонанса было проведено сравнительное исследование фотосинтетических характеристик листьев традесканции, выращенной в условиях низкой ($50\text{--}125 \text{ мкЭ}/(\text{м}^2\text{с})$) и высокой ($875\text{--}1000 \text{ мкЭ}/(\text{м}^2\text{с})$) освещенности. Выявлены существенные различия в соотношении светосумм полос ТЛ с максимумами около 0 и $25\text{--}30^\circ\text{C}$. Сделан вывод о различиях в пулах молекул пластохинона между фотосистемами (ФС). Предполагается, что увеличенное количество молекул пластохинона на акцепторной стороне ФС II способствует эффективному протеканию фотосинтеза в листьях

растений, выращенных при пониженной освещенности.

Таким образом, обширные литературные данные, а также многолетние исследования, выполненные на кафедре биофизики физического факультета МГУ, свидетельствуют о возможности использования метода ТЛ для оценки функциональной активности фотосинтетического аппарата растений, находящихся в различных физиологических условиях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная статья посвящена 100-летию со дня рождения нашего учителя, профессора Л.А. Блюменфельда, который инициировал начало исследований методом ТЛ на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Основной вклад в реализацию программы разнообразных исследований в этой области внес наш друг и коллега Михаил Константинович Солнцев. Он оставил нам созданную им установку для изучения биологических объектов методом ТЛ и детально разработанные протоколы исследований фотосинтетических объектов. Остаются актуальными научные открытия М.К. Солнцева в области практических применений метода ТЛ в агрофизике и биофизике фотосинтеза. Неугасима светлая память о М.К. Солнцева, которому мы посвящаем эту статью.

Авторы выражают благодарность профессору кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова В.И. Лобышеву за ценные рекомендации при написании статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20047).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К. К. Шварц, З. А. Грант, Т. К. Меж и др., *Термолюминесцентная дозиметрия* (Рига: Зинатне, 1968), 185 с.
2. Й. Иноу и К. Сибата, в кн. *Фотосинтез*, под ред. Говинджи (Мир, М., 1987), Т. 1, сс. 680–712.
3. F. Pliquet and M. K. Solntsev, *Thermolumineszenz biologischer Objekte* (Leipzig: VEB Georg Thieme, 1978).
4. П. П. Нокс, П. С. Венедиктов, А. А. Кононенко и др., *Молекуляр. биология* **18**, 766 (1984).
5. I. Vass and Govindjee, *Photosynth. Res.* **48**, 117 (1996).
6. J.-M. Ducruet and I. Vass, *Photosynth. Res.* **101**, 195 (2009).
7. W. Arnold and N. E. Sherwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43**, 105 (1957).
8. А. К. Кукушкин, *Биофизика* **14**, 1124 (1968).
9. I. Vass, *Photosynth. Res.* **76**, 303 (2003).
10. Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* **634**, 309 (1981).
11. I. Vass, H. Koike, Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta* **810**, 302 (1985).
12. В. А. Караваев, М. К. Солнцев, Т. П. Юрина и др., *Физиология растений* **44**, 20 (1997).
13. Т. П. Юрина, А. М. Умнов, В. А. Караваев и др., *Физиология растений* **39**, 270 (1992).
14. М. К. Солнцев, Н. П. Ф. Екобена, В. А. Караваев, et al., *J. Luminescence* **76&77**, 349 (1998).
15. М. К. Солнцев, В. В. Францев, Д. Ю. Школьников и др., в кн. *Матер. Всерос. конф. «Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования»* (Белгород, 2006), т. 1, сс. 379–383.
16. М. К. Солнцев, В. В. Францев, В. А. Караваев и др., *Collection of scientific papers, Faculty of agriculture in Ceske Budejovice. Series for Crop Sciences* **21**, 209 (2004).
17. W. Arnold and J. R. Azzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 29 (1968).
18. Т. Ichikawa, Y. Inoue, and K. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* **408**, 228 (1975).
19. S. Demeter and Govindjee, *Physiol. Plantarum* **75**, 121 (1989).
20. М. К. Солнцев, З. П. Грибова и В. А. Караваев, *Физиология растений* **36**, 686 (1989).
21. H. Koike, Y. Siderer, T. Ono et al., *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 80 (1986).
22. М. К. Солнцев, *Журн. физ. химии* **63**, 1959 (1989).
23. Е. А. Кузнецова, В. А. Караваев, М. К. Солнцев и др., в кн. *Материалы IV международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений»* (Минск, 2005), с. 124.
24. С. А. Глазунова, В. А. Караваев, О. И. Покровский и др., *Сверхкритические флюиды. Теория и практика*, **1**, 66 (2009).
25. М. К. Солнцев, Л. Э. Гунар, В. Ташиш, *Изв. РАН, сер. биол.* **4**, 502 (1996).
26. А. М. Kuznetsov, M. K. Solntsev, V. A. Karavaev, et al., in *Modern fungicides and antifungal compounds II*, Ed. by H. Lyr, P.E. Russel, H.-W. Dehne, and H. D. Sisler, (Intercept, Andover, 1999), pp. 229–236.
27. О. А. Kalmatskaya, B. V. Trubitsin, I. S. Suslichenko, et al., *Photosynth. Res.* **146**, 123 (2020).

Thermoluminescence and Diagnostics of the Photosynthetic Apparatus in Plant Leaves

V.A. Karavaev, O.A. Kalmatskaya, B.V. Trubitsin, and A.N. Tikhonov

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The basic mechanisms of the appearance of thermoluminescence bands of photosynthetic objects in the temperature range from -20°C to 80°C are considered. Examples are given to illustrate how the thermoluminescence method can be used for the diagnosis of the functional state of the photosynthetic apparatus in plants.

Keywords: thermoluminescence, oxygenic photosynthesis, electron transport

УДК 577.34

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ БАКТЕРИЙ *Salmonella typhimurium* И *Staphylococcus aureus* ПРИ ИМПУЛЬСНОМ ФОТОВОЗБУЖДЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

© 2022 г. С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никиян, Д.А. Раздобреев, Л.В. Галактионова, Д.В. Дорофеев, Д.Е. Цюрко

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, просп. Победы, 13

E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 05.04.2022 г.

Обсуждаются механизмы инактивации планктонных культур бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* при возбуждении сенсibilизаторов мощными импульсами лазерного излучения длительностью 10 нс. Показано, что в зависимости от типа сенсibilизаторов и характера их взаимодействия с бактериями в растворах имеют место фотодинамическая инактивация активными формами кислорода и локальная гипертермия клеток. При высокой плотности мощности возбуждающего излучения (выше 10 МВт/см²) доминирующим механизмом повреждения бактерий становится деструкция клеток ударными акустическими волнами, возникающими в результате быстрого локального нагрева среды при трансформации сенсibilизаторами световой энергии в тепловую.

Ключевые слова: молекулярные сенсibilизаторы, бактериальная инактивация, фотодинамическое действие, гипертермия, ударные волны.

DOI: 10.31857/S0006302922030115, EDN: AOCQTJ

Непрерывное увеличение количества штаммов, устойчивых к традиционным антимикробным препаратам, рискует обернуться значительными гуманитарными и экономическими последствиями. Способность патогенных бактерий вырабатывать устойчивость к антибиотикам инициирует поиск новых способов инактивации, к которым они не смогут выработать иммунитет [1–3].

Таким требованиям воздействия на живые микроорганизмы удовлетворяет фотодинамическая обработка с участием активных форм кислорода (АФК) [4–13]. Однако фотодинамическое действие эффективно только в высоко аэрированных прозрачных средах, в которых возбуждающий свет проникает в глубокие слои. Среда, содержащая микроорганизмы, как правило, мутные и сильно рассеивающие. В таких средах фотосенсibilизаторы (ФС) эффективны только в периферийных приповерхностных слоях.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ФС – фотосенсibilизаторы, ВЭС – высокие электронно-возбужденные состояния (молекул), КОЕ – колониеобразующие единицы, ДРС – динамическое рассеяние света, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

Для воздействия на микроорганизмы в глубоких слоях непрозрачных сред можно использовать ударные волны [11, 14, 15]. Воздействие будет эффективным, если ударная волна создает достаточный для разрушения клеток перепад давления в масштабе, сравнимом с размерами микроорганизма. Если ударную волну возбуждать путем быстрого локального нагрева среды за время ~1 нс, то протяженность фронта волны составит ~1.5 мкм, что соизмеримо с размерами бактерий (порядка 1–5 мкм) и при достаточной амплитуде окажется губительным для микроорганизмов.

Ударные волны могут образовываться при участии ФС, если возбуждение будет осуществляться короткими, но мощными импульсами лазерного излучения [15]. В задаче инактивации микроорганизмов можно сформулировать следующие требования к ФС:

- высокий коэффициент поглощения на длине волны возбуждающего света;
- хорошая растворимость в среде с микроорганизмами;
- эффективное превращение лучистой энергии в тепло.

Таким требованиям удовлетворяют молекулы органических красителей. Для обеспечения се-

лективности локального нагрева возбуждение молекул красителей целесообразно производить видимым светом в основной полосе $S_0 \rightarrow S_1$ поглощения. Показано [14–19], что при высокой плотности мощности возбуждения (больше чем $8\text{--}10\text{ МВт/см}^2$) молекулы способны поглощать два и более кванта падающего излучения и ступенчато переходить через нижние синглетные S_1 - или триплетные T_1 -уровни в высокие электронно-возбужденные состояния (ВЭВС) S_n и T_m . Время жизни ВЭВС практически всех многоатомных молекул не превышает несколько пикосекунд, а релаксация их ВЭВС осуществляется посредством безызлучательной внутренней конверсии. Таким образом, фактически вся запасенная энергия ВЭВС трансформируется в нагрев среды [20, 21]. Если в красителе термосенсибилизаторов использовать красители с высоким квантовым выходом в триплетное состояние, то одновременно с нагревом такие молекулы могут обеспечивать эффективную генерацию АФК. В случае связывания молекул красителей со стенками бактерий или их проникновения внутрь клеток, возможна гипертермия клеток. В настоящей работе представлены результаты исследований различных механизмов повреждения бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* в присутствии анионных и катионных сенсибилизаторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили штаммы *Salmonella typhimurium* LT2 и *Staphylococcus aureus*. Бактерии *S. typhimurium* предварительно культивировали в течение суток на висмут-сульфитном агаре при 37°C . Затем клетки суспендировали в 0.9%-м стерильном растворе NaCl до значения оптической плотности 0.1 на длине волны 625 нм, которую измеряли на спектрофотометре ImmunoChem-2100 (High Technology Inc., США). Культуру *S. aureus* выращивали на LB-агаре (Sigma-Aldrich, США) в течение 18–24 ч при 30°C . Полученную бактериальную массу суспендировали в 0.9%-м растворе NaCl и доводили оптическую плотность до 0.015 на длине волны 450 нм.

Суспензию в объеме 200 мкл помещали в кварцевую кювету сечением $5 \cdot 24\text{ мм}^2$ и высотой 37 мм, добавляли от 0.2 до 0.5 мл красителя-сенсибилизатора в исходной концентрации (1 мМ) и доливали 0.9%-й раствор NaCl до общего объема 2 мл. Красители растворяли в том же физиологическом растворе, что и бактерии.

В качестве сенсибилизаторов использовали красители эритрозин и родамин С. Ксантоновый анионный краситель эритрозин обладает высоким (близким к единице) квантовым выходом в триплетное состояние и является очень эффек-

тивным генератором АФК. Родамин С является катионным красителем. Его квантовый выход в триплетное состояние низкий (близок к нулю), и он не является генератором АФК. Заметим, что вместо этой пары красителей можно было использовать любые другие соединения. Настоящая статья посвящена не конкретным сенсибилизаторам процессов, а различным механизмам фотоповреждения бактерий.

Для фотоинактивации бактерий суспензию с красителем через торцевую стенку кюветы (5 мм) возбуждали импульсами сфокусированного лазерного излучения. Источником возбуждения служил импульсно-периодический YAG:Nd лазер LQ-215 (SolarLS, Беларусь). Параметры возбуждения: длина волны $\lambda = 532\text{ нм}$, длительность импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц. С помощью цилиндрической собирающей линзы в кювете создавали зону возбуждения с апертурой $3.5 \times 0.35\text{ мм}^2$. Плотность мощности возбуждения была максимальной в фокусе линзы и регулировалась в пределах $0.1\text{--}30\text{ МВт/см}^2$. Часть света за фокусом линзы проникала в раствор. В зависимости от концентрации красителей и интенсивности накачки возбуждающее излучение проникало вглубь раствора на расстояние не более 5–6 мм. Перемешивание образцов в кювете во время облучения, а также после облучения не проводилось.

Выбранные красители очень эффективно поглощают излучение длины волны $\lambda = 532\text{ нм}$. Безызлучательная релаксация электронно-возбужденных состояний молекул красителей сопровождается локальным нагревом среды. В результате в зоне фокусировки возникают ударные волны аксиальной симметрии. Распространение волн по объему кюветы фиксировалось по рассеянию зондирующего луча сечением менее 1 мм от невозмущающего He-Ne-лазера. Зондирующий луч пересекал кювету в направлении перпендикулярном возбуждающему лучу на регулируемом расстоянии от фокуса линзы. Детально экспериментальная установка и методика регистрации ударных волн представлены в работе [22].

Инактивирующее действие лазерного излучения на *S. typhimurium* оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). До и после облучения из кюветы отбирали 0.3 мл суспензии и проводили серию разведений в растворе NaCl с последующим высевом из двух параллельных разведений (10^{-2} и 10^{-3}) на висмут-сульфитный агар (для получения достоверно значимых результатов исследования проводили в пятикратной повторности). Полученную среду инкубировали при 37°C в течение 24 ч с последующим подсчетом КОЕ.

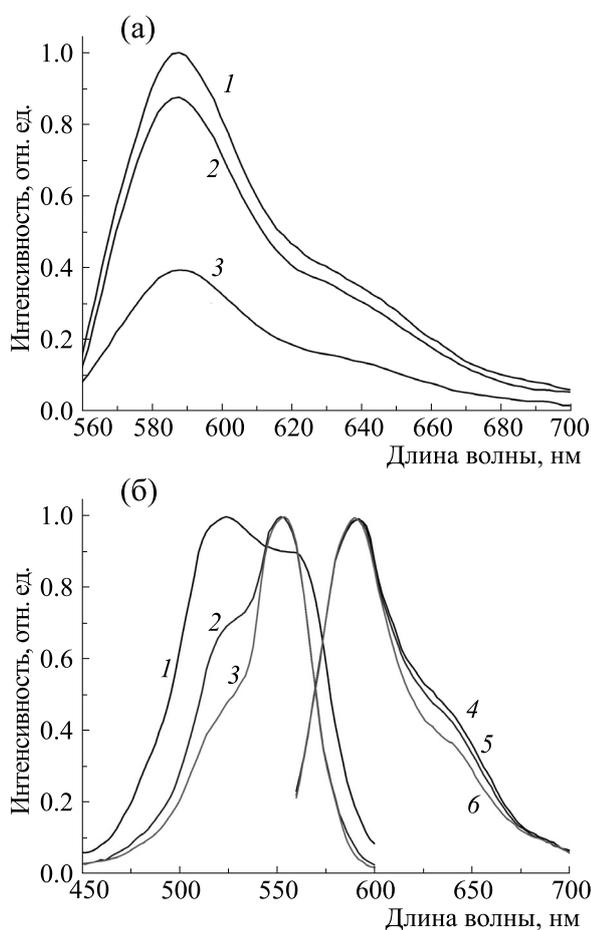


Рис. 1. (а) – Спектры флуоресценции родамина С в физиологическом растворе (0.25 мМ) при различном содержании *S. typhimurium*: $0.25 \cdot 10^6$ КОЕ/мл (1); $0.5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл (2), и 10^7 КОЕ/мл (3). (б) – Спектры поглощения (1, 2, 3) и люминесценции (4, 5, 6) родамина С в физиологическом растворе. Концентрация красителя: 1 ммоль/л (1, 4), 0.5 ммоль/л (2, 5) и 0.1 ммоль/л (3, 6).

Для оценки повреждения *S. aureus* пробы суспензии бактерий с красителями до и после облучения вносили в 1 мл ЛВ-бульона, и инкубировали при 30°C в течение 16–18 ч, после чего переносили в лунки прозрачного планшета и измеряли оптическую плотность на длинах волн 450 и 630 нм.

Размеры частиц и их распределения по размерам определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью наносайзера Photocor (ООО «Фотокор», Москва) и программы DynaLS. Подвижность частиц и их среднее число в объеме рассеяния оценивали визуально с помощью микроскопа Altami (ООО «Альтами», Санкт-Петербург).

Для установления характера повреждения бактерий и изменения их топографии использовали зондовый сканирующий микроскоп ССМ-2000

(ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ», Зеленоград), работающий в атомно-силовом режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие красителей с бактериями. Известно [23], что на поверхности бактерий распределен отрицательный заряд, сформированный анионными полимерами клеточных стенок, в первую очередь, пептидогликаном со встроенными карбоксильными группами γ -глутаминовой и мезо-диаминопимелиновой кислот, а также терминальные остатки D-Ala пептидных субъединиц. Наличие отрицательного заряда у бактерий приводит к тому, что в растворах за счет электростатического взаимодействия молекулы-катионы связываются с клетками, что сопровождается изменениями их спектрально-люминесцентных свойств. Поэтому взаимодействие родамина С и эритрозина с бактериями исследовано методами электронной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.

В электронных спектрах поглощения и флуоресценции эритрозина в физиологическом растворе при добавлении бактерий *S. typhimurium* существенные изменения не зафиксированы. Незначительное уменьшение пропускания света растворами и падение интенсивности флуоресценции обусловлено рассеянием зондирующего (возбуждающего) света микроорганизмами.

Напротив, родамин С активно взаимодействует с бактериями. На рис. 1а представлены спектры флуоресценции родамина С (0.25 мМ) в физиологическом растворе при различной концентрации бактерий *S. typhimurium*. С ростом концентрации бактерий интенсивность флуоресценции красителя уменьшается. Это обусловлено связыванием молекул красителя со стенками клеток. При этом катионы красителя восстанавливаются, а отрицательный заряд стенки *S. typhimurium* частично нейтрализуется.

Анализ спектров поглощения и флуоресценции родамина С (рис. 1б) указывает на присутствие в растворе (даже без бактерий) ассоциатов красителя уже при концентрации молекул выше 10^{-4} моль/л. В спектрах поглощения и флуоресценции красителя появляются максимумы в области 510 нм и 640 нм соответственно. Это важно потому, что при образовании ассоциатов тепловыделение в растворе после фотовозбуждения увеличивается, поскольку квантовый выход флуоресценции ассоциатов красителя ниже, чем мономеров [24]. Однако в бактериальных растворах ни в спектрах поглощения, ни в спектрах флуоресценции не обнаружены новые максимумы, свидетельствующие об образовании ассоциатов красителя. Момеры родамина С относительно равномерно распределяются по поверхности бак-

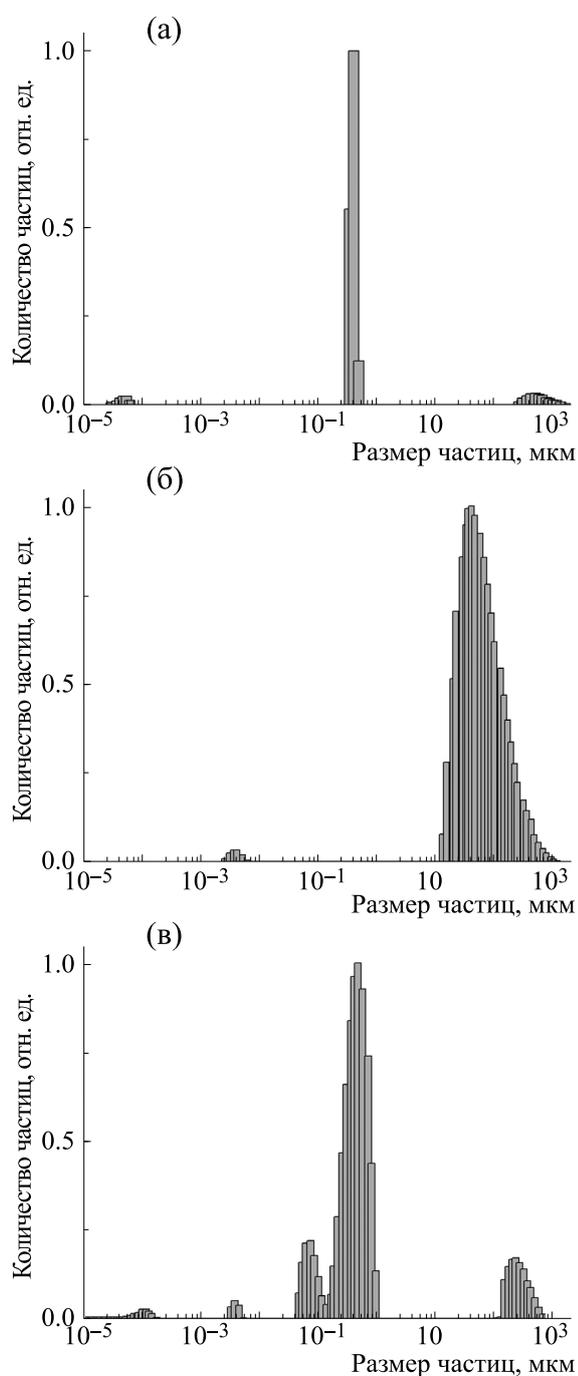


Рис. 2. Распределение частиц в бактериальной суспензии *S. typhimurium* по размерам, полученное методом ДРС: (а) — бактерии в чистом физрастворе; (б) — бактерии в растворе родамина С (0.1 ммоль/л в физрастворе); (в) — то же после облучения.

терий, то есть при связывании красителя со стенками клеток не проявляется кооперативный эффект.

Связывание родамина С микроорганизмами оказывает существенное влияние на взаимодей-

ствии бактерий друг с другом. Нейтрализация заряда внешней стенки клеток приводит к тому, что они «слипаются» в крупные агрегаты размером около 5–10 мкм. Такие крупные объекты нетрудно наблюдать в оптический микроскоп. Для оценки распределения частиц по размерам построены гистограммы ДРС растворами бактерий до и после добавления родамина С, представленные на рис. 2а,б. В растворах без красителя эффективный гидродинамический радиус у 85.4% бактерий составлял 0.594 мкм, а у 11.6% — 6.4 мкм (рис. 2а). После добавления родамина С одиночных бактерий в растворе практически не остается. Эффективный радиус образующихся скоплений микроорганизмов на порядок больше (рис. 2б).

Обоснованием достоверности определения размеров частиц методом ДРС служит достаточно большая концентрация частиц в объеме рассеяния (не менее 200 бактерий) и незначительная доля (около 5% от общего числа) активно движущихся бактерий (можно надежно считать, что основная масса бактерий совершает броуновское движение). Время корреляции, связанное с релаксацией флуктуаций концентрации бактерий за счет их собственного перемещения, более быстрого, чем тепловое броуновское движение, можно оценить по левому пику на рис. 2а.

Форму и размеры образующихся агрегатов клеток *S. typhimurium* определяли с помощью сканирующей зондовой микроскопии. Форма бактериальных агрегатов, образующихся после добавления родамина С (рис. 3а), не обязательно сферическая. При этом размеры агрегатов совпадают с размерами, полученными методом ДРС (рис. 2б). Следует обратить внимание, что при добавлении в суспензию с бактериями эритрозина крупные агрегаты клеток не наблюдаются (рис. 3б).

Фотоинаktivация бактерий связанными и несвязанными красителями. На рис. 4а показаны значения КОЕ *S. aureus* до и после облучения в присутствии родамина С и эритрозина при облучении растворов импульсным излучением различной плотности мощности.

На рис. 4б представлены результаты измерения оптической плотности необлученных и облученных суспензий со стафилококками.

Из рис. 4 видно, что жизнеспособность бактериальных клеток, помещенных в раствор красителя, существенно снижается после облучения. При этом в присутствии эритрозина это снижение наблюдается уже при плотности мощности возбуждения $P \leq 1$ МВт/см², в то время как в растворах родамина заметная инаktivация наблюдается при P около 8–10 МВт/см². Это может быть связано с вкладом либо фотодинамических процессов, либо ударных волн.

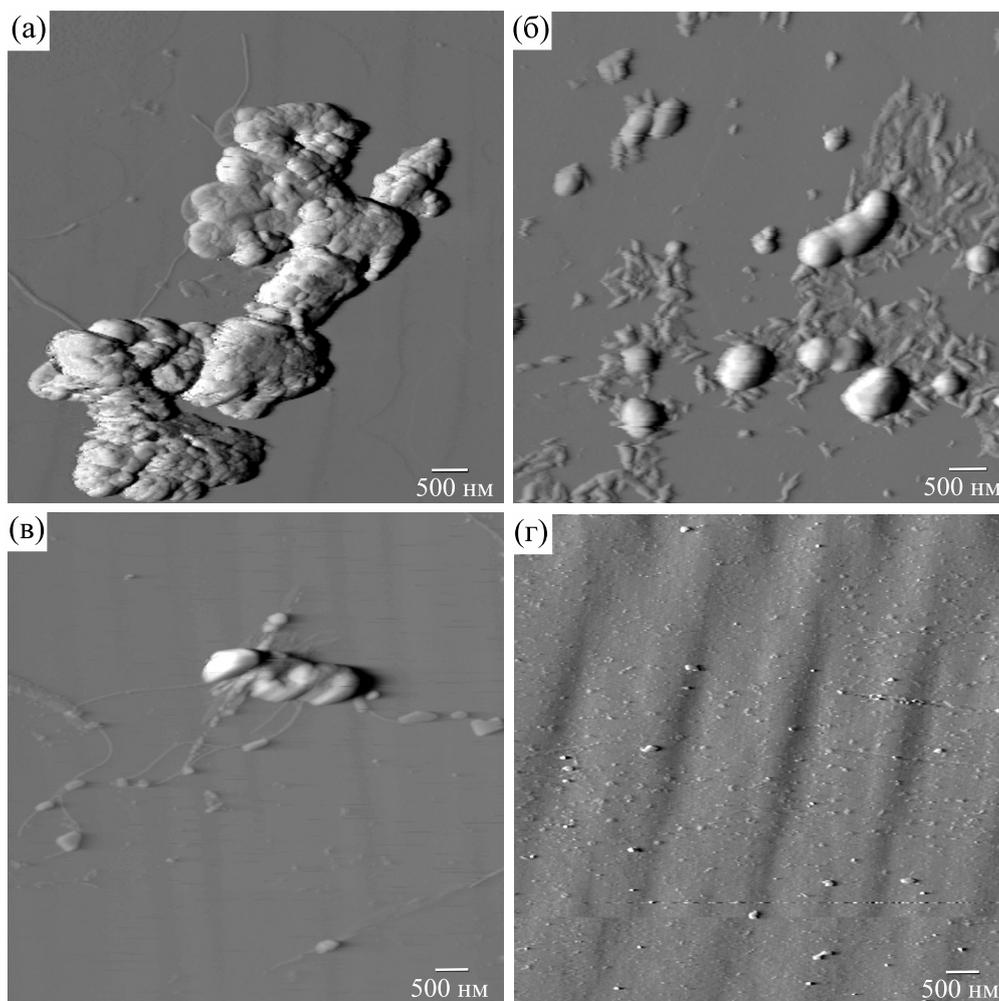


Рис. 3. АСМ-изображения клеток *S. typhimurium*. Бактерии в растворе родамина С (а) и эритрозина (б) (0,1 ммоль/л в физрастворе). То же после облучения для раствора родамина С (в) и эритрозина (г).

Для оценки вклада фотодинамических процессов в повреждение микроорганизмов сравнивались КОЕ бактерий, взятых из растворов, содержащих кислород, и из бескислородных растворов. Для вытеснения кислорода суспензию с красителем продували газобразным азотом. Уменьшение содержания кислорода в растворе контролировали по увеличению времени жизни триплетных состояний эритрозина, измеряемого по кинетике фосфоресценции. После продувания раствора азотом в течение 10 мин время жизни фосфоресценции эритрозина увеличивалось с 5 до 600 мкс. Посев бактерий из обескислороженных растворов и определение КОЕ до облучения показало, что анаэробные *S. typhimurium* и *S. aureus* хорошо переносят эту процедуру.

В кислородных растворах, содержащих эритрозин, выживаемость бактерий после облучения оказалась на 10–20% ниже, чем в дезаэрированных растворах при тех же условиях облуче-

ния. Это указывает на то, что фотодинамическое повреждение бактерий имеет место, но данный механизм не является доминирующим. В основном инактивация микроорганизмов происходит под действием ударных волн.

Квантовый выход в триплетное состояние у эритрозина в физрастворе ~ 0.99 , а константа скорости $S_1 \rightarrow T_1$ интеркомбинационной конверсии $\sim 10^9 \text{ с}^{-1}$ [24]. Поэтому даже при плотности мощности возбуждающего света 1.0 МВт/см^2 практически каждая молекула после возбуждения в основной полосе $S_0 \rightarrow S_1$ за время примерно 1 нс переходит в долгоживущее триплетное T_1 состояние, и становится источником тепловыделения за счет циклических безызлучательных переходов $T_1 \leftrightarrow T_m$, или $T_1 \rightarrow T_m \rightarrow S_1 \rightarrow T_1$. У родамина С квантовый выход $S_1 \rightarrow T_1$ интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ~ 0.01 , а основной

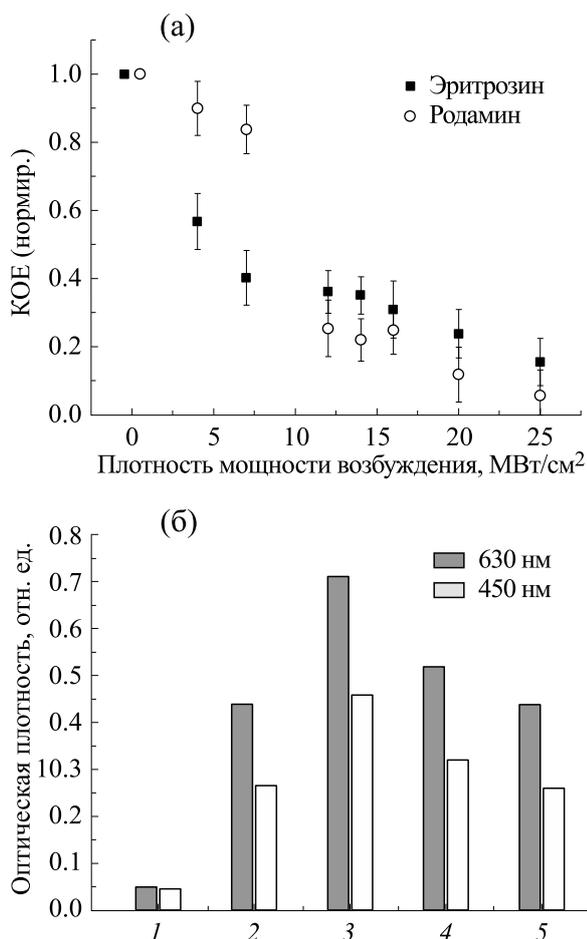


Рис. 4. (а) – КОЕ *S. aureus* после импульсного лазерного облучения при различной плотности мощности в растворах родамина С и эритрозина. Продолжительность облучения 20 с. Концентрация красителей 0.25 ммоль/л в физрастворе. (б) – Оптическая плотность растворов эритрозина (0.25 ммоль/л в физрастворе) на длине волны 450 и 630 нм: 1 – оптическая плотность пустой лунки, 2 – чистый физраствор, 3 – бактерии до облучения, 4 – бактерии после облучения (образцы взяты на расстоянии 10 мм от зоны облучения), 5 – бактерии после облучения (образцы взяты непосредственно из зоны облучения).

канал релаксации S_1 -состояний – $S_1 \rightarrow S_0$ флуоресценция [25]. Для родамина С процесс поглощения становится двухквантовым только при плотности мощности возбуждения около 8–10 МВт/см², при этом высокие S_n -состояния молекул заселяются по схеме $S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$ [16–19].

Ударные волны могут распространяться в темные зоны, куда возбуждающий свет не проникает. На рис. 5 показаны гистограммы КОЕ клеток *S. typhimurium* до и после облучения лазерными импульсами растворов бактерий с разными сен-

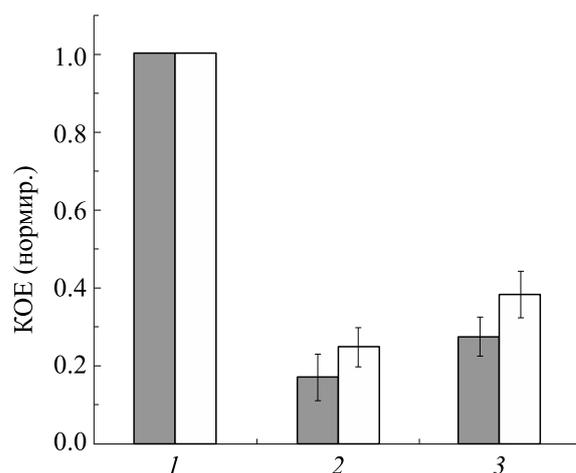


Рис. 5. Гистограммы КОЕ клеток *S. typhimurium*, взятых из растворов в присутствии эритрозина (темные столбики) и родамина С (светлые столбики): 1 – до облучения; 2 – после облучения лазерными импульсами, образцы КОЕ собраны непосредственно в зоне возбуждения; 3 – то же, образцы КОЕ собраны на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения. Параметры возбуждения: длина волны 532 нм, длительность каждого импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц, плотность мощности в фокусе линзы 15 МВт/см², продолжительность облучения 20 с.

сублизаторами. КОЕ бактерий взятых непосредственно из зоны возбуждения (на рис. 5 обозначены цифрой 2) как в случае использования эритрозина, так и родамина С, заметно уменьшаются по сравнению с необлученным раствором. Цифрой 3 на рис. 5 обозначены КОЕ клеток, взятых из тех же растворов на расстоянии 10 мм от зоны возбуждения. В эту область возбуждающий свет не проникал, и повреждение бактерий возможно исключительно ударными волнами. При увеличении дозы облучения или повышении плотности мощности излучения в фокусе линзы до 20 МВт/см² в образцах вообще не остается жизнеспособных бактерий.

Повреждение бактерий ударными волнами можно зарегистрировать методом ДРС. На рис. 2в представлены гистограммы ДРС облученных растворов *S. typhimurium* в присутствии родамина С. После облучения 73.2% частиц имеют радиус 0.414 мкм, 13.4% – 2.5 мкм и 11.1% – 0.07 мкм. Ударные волны разрушают не только большие кластеры бактерий, но и повреждают отдельные бактерии. На полученных методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изображениях бактерий после облучения (рис. 3в,г) видно, что линейный размер частиц сокращается на порядок вплоть до 0.05–0.1 мкм.

На рис. 6 показаны гистограммы ДРС растворами бактерий *S. aureus*. До облучения в присутствии эритрозина в растворе присутствуют части-

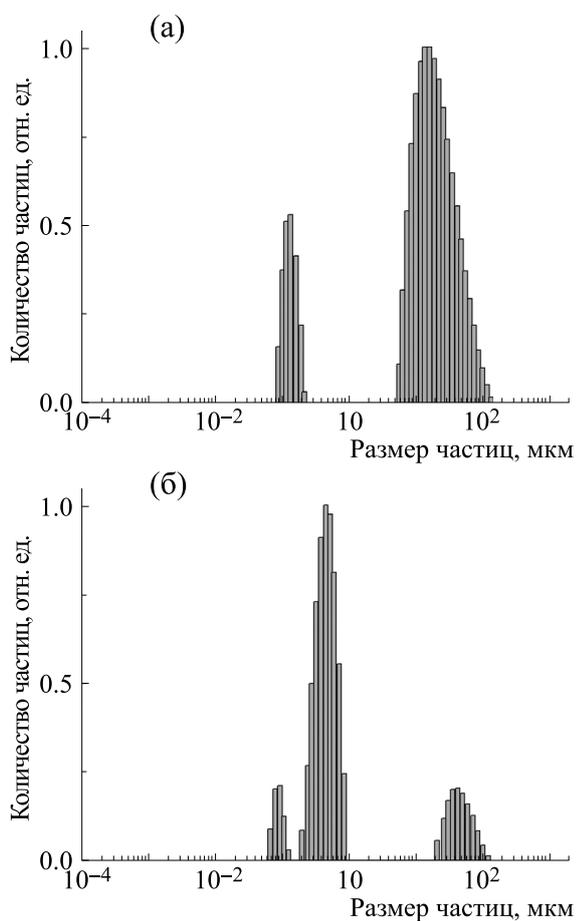


Рис. 6. Гистограмма распределения *Staphylococcus aureus* по размерам в физиологическом растворе до (а) и после (б) облучения импульсами света длины волны $\lambda = 532$ нм в присутствии эритрозина (0.25 ммоль/л).

цы в основном двух размеров – 84.1% частиц (рис. 6а) имеют размер примерно 4–5 мкм, и около 15.0% частиц – 0.9–1.0 мкм. Таким образом, до облучения в растворе стафилококки в основном объединены в гроздь, но имеются и одиночные бактерии.

После облучения растворов распределение *S. aureus* по размерам кардинально изменяется (рис. 6б). Примерно 84% частиц имеют эффективный гидродинамический радиус 0.447 мкм, около 12% рассеивающих частиц имеют радиус 2.2 мкм и около 4% – 0.09 мкм. Гроздь стафилококков в основном разрушаются, и кроме одиночных бактерий появляются мелкие рассеивающие объекты, которые, по-видимому, представляют собой фрагменты разрушенных бактерий. Эти предположения подтверждаются АСМ-изображениями. На АСМ-снимках до облучения бактерии представляли собой гроздь в основном из 12–15 единиц. После облучения гроздьев *S. aureus* в растворе практически не остается.

Чтобы выявить характер повреждений отдельных бактерий ударными волнами анализировались УФ спектры поглощения растворов до и после облучения. Обнаружено увеличение оптической плотности растворов на длине волны $\lambda = 260$ нм (максимум поглощения ДНК) от 0.01 до 0.20 и на длине волны $\lambda = 280$ нм (максимум поглощения белков) от 0.01 до 0.18, что свидетельствует о присутствии внутриклеточных компонентов в среде. Таким образом, в результате облучения стафилококков в присутствии красителей в растворе не только разрушаются гроздьи бактерий, но и происходит разрушение мембран отдельных клеток.

В растворе эритрозина непосредственно в зоне возбуждения бактерии дополнительно (кроме ударных волн) повреждаются действием АФК, а в растворе родамина С свой вклад в инактивацию бактерий дает локальная гипертермия клеток. Поэтому, выживаемость бактерий, взятых из зоны возбуждения, заметно ниже, чем на расстоянии 10 мм, где клетки повреждаются только ударными волнами (рис. 5).

При повреждении стафилококков прослеживаются те же закономерности, что и для клеток *S. typhimurium*. Заметим, что выживаемость стафилококков превышает выживаемость сальмонелл. Хорошо известно, что фотодинамическое повреждение грамотрицательных бактерий анионными сенсibilизаторами малоэффективно из-за более сложной структуры клеточной стенки у таких микроорганизмов по сравнению с грамположительными бактериями [26]. Однако, как видно из рис. 2–5, успешно инактивировать грамотрицательные бактерии можно с помощью ударных волн, используя для этого как анионные, так и катионные сенсibilизаторы. При этом совершенно не важно, связан ли сенсibilизатор с бактерией или нет.

Заметим, что повреждение бактерий теоретически возможно в результате безызлучательного переноса энергии с высоких электронно-возбужденных уровней сенсibilизаторов на молекулы окружения. После поглощения двух квантов света с длиной волны 532 нм ФС накапливает энергию около 5 эВ, что превышает энергию любой химической связи. Однако в работах [27, 28] было показано, что эффективность переноса энергии с высоких электронных уровней молекул красителей на молекулы окружения в бактериальных растворах очень низкая и этот канал инактивации бактерий можно не учитывать.

Воздействие на растворы с красителями светом высокой интенсивности может сопровождаться образованием радикалов. При исследовании кинетики и спектров наведенного поглощения в диапазоне 300–800 нм не обнаружено новых полос, ответственных за появление ради-

калов. Это свидетельствует об отсутствии в растворах активных фотопродуктов, потенциально способных инактивировать микроорганизмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм повреждения бактерий зависит от типа ФС и характера его взаимодействия с микроорганизмами.

Если ФС имеет большой квантовый выход в триплетное состояние, но не связывается с бактериальными клетками (в нашем случае эритрозин), то непосредственно в зоне облучения повреждение бактерий возможно в результате фотодинамического действия. При двухквантовом поглощении и заселении ВЭВС сенсibilизатора возможна инактивация организмов ударными волнами, образующимися при быстром локальном нагреве среды в результате безызлучательной релаксации ВЭВС.

Если ФС не генерируют химически активные формы кислорода, но связываются с клеточными стенками (в нашем случае родамин С), повреждение бактерий происходит либо при прямом перегреве клеток, либо в результате действия на них ударных волн. Оба этих механизма становятся эффективными при заселении ВЭВС молекул сенсibilизаторов.

Разумеется, при одновременном соблюдении двух условий, когда ФС прикрепляется к бактериям и генерирует АФК, все перечисленные механизмы могут иметь место. Однако эффективность фотодинамического механизма будет зависеть от содержания кислорода в облучаемой среде [29].

Наиболее эффективно бактерии в суспензиях инактивируются ударными волнами, которые генерируются при заселении ВЭВС молекул. Для этого требуется плотность мощности возбуждения выше 8–10 МВт/см². Ударные волны не только разрушают естественные образования бактерий (гроздь стафилококков) и конгломераты, возникающие при «слипаниии» бактерий при нейтрализации заряда внешней стенки, но и с высокой эффективностью разрушают стенки клеток. Ударные волны в растворах могут инактивировать клетки на большом удалении от зоны возбуждения. Данный механизм уничтожения бактерий в растворах может быть эффективным в случае недостаточного проникновения света или кислорода в среду. Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых антибактериальных методов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации (проект № FSGU-2020-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. O'Neill (chair). *Review on antimicrobial resistance*. <http://amr-review.org/> (accessed 15 January 2015).
2. P. W. Taylor, P. D. Stapleton, and J. Luzio, *Drug Discov. Today*, **7**, 1086 (2002). DOI: 10.1016/s1359-6446(02)02498-4
3. C. A. Arias and B. E. Murray, *N. Engl. J. Med.* **360**, 439 (2009). DOI: 10.1056/NEJMp0804651
4. M. Wilson, *J. Photochem. Photobiol.* **3**, 412 (2004). DOI: 10.1039/b211266c
5. M. R. Hamblin, *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67 (2016). DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008
6. L. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin, *Methods Mol. Biol.* **635**, 155 (2010). DOI: 10.1007/978-1-60761-697-9_12
7. N. Kashef, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, *Nanophotonics* **6** (5), 853 (2017). DOI: 10.1515/nanoph-2016-0189
8. M.-J. Kim, *Food Control*. **82**, 205 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.040>
9. R. S. Adriele, *Antibiotics* **8** (4), 1 (2019). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040211>
10. F. Vatansever, W. de Melo, P. Avci, et al. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 955 (2013). DOI: 10.1111/1574-6976.12026
11. S. N. Letuta, U. G. Letuta, and S. N. Pashkevich, *Biophysics* **64** (4) 576 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919040092
12. O. Planas, N. Macia, M. Agut, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **138** (8), 2762 (2016). DOI: 10.1021/jacs.5b12704
13. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **163**, 232 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036
14. Y. Ito, D. Veysset, S. E. Kooi, et al., *Commun. Physics* **3**, 124 (2020). DOI: 10.1038/s42005-020-0394-3
15. A. G. Doukas and T. J. Flotte, *Ultrasound in Medicine & Biology* **22** (2), 151 (1996). DOI: 10.1016/0301-5629(95)02026-8
16. P. Sperber and A. Penzkofer, *Opt. Quantum. Electron.*, **18**, 381 (1986). DOI: 10.1007/BF02032565
17. S. Tobita, Y. Kaisu, H. Kobayashi, and I. Tanaka, *J. Chem. Phys.* **81** (7), 2962 (1984). DOI: 10.1063/1.448046
18. G. C. Orner and M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.* **32** (3) 407 (1975). DOI: 10.1016/0009-2614(75)85204-3

19. H.-B. Lin and M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.*, **48** (2), 251 (1977). DOI: 10.1016/0009-2614(77)80309-6
20. V. L. Ermolaev, *Russ. Chem. Rev.* **70**, 471 (2001). DOI: 10.1070/RC2001v070n06aBEH000657
21. C. Nagaoka, M. Fujita, T. Takemura, and H. Baba, *Chem. Phys. Lett.* **123** (6), 489 (1986). DOI: 10.1016/0009-2614(86)80048-3
22. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, and A. N. Nikiyan, *Russ. J. Phys. Chem. A* **95** (4), 848 (2021). DOI: 10.1134/S0036024421040142.
23. B. J. Gottenbos, *Antimicrob. Chomother.* **48** (1), 7 (2001). DOI: 10.1093/jac/48.1.7
24. M. J. Snare, F. E. Treloar, K. P. Ghiggino, and P. J. Thistlethwaite, *J. Photochem.* **18** (4), 335 (1982). DOI: 10.1016/0047-2670(82)87023-8
25. K. K. Rohatgi-Mukherjee, *Fundamentals of Photochemistry* (Wiley Eastern Ltd., New Delhi, Bangalore, Bombay, 1978). DOI: 10.1002/bbpc.19790830824
26. M. R. Hamblin and G. Jori *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* (Royal Society of Chemistry, UK, 2011). DOI: 10.1039/9781849733083
27. R. P. Steer, *Can. J. Chem.* **95** (10), 1025 (2017). DOI: 10.1139/cjc-2017-0369
28. D. V. Dorofeev, S. N. Letuta, and D. E. Tsurko, *Russ. Chem. Bull.* **70**, 427 (2021). DOI: 10.1007/s11172-021-3104-8
29. F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, et al., *Crit. Rev. Microbiol.* **44** (5), 571 (2018). DOI: 10.1080/1040841X.2018.1467876

Mechanisms of Damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon Pulse Photoexcitation of Molecular Sensitizers

S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, A.N. Nikiyan, D. A. Razdobreev, L.V. Galaktionova, D.V. Dorofeev, and D.E. Tsurko

Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

This paper is dedicated to discussing the mechanisms of inactivation of bacterial planktonic cultures *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon excitation of molecular sensitizers with high-energy pulsed laser source at 10-ns pulse duration. It was shown that depending on the types of sensitizers and the mechanisms of sensitizer-bacterial interactions in suspensions, photodynamic inactivation mediated by reactive oxygen species and local hyperthermia of cells occur. At high power density excitation light (greater than 10 MW/cm²), the dominant mechanism of cell damage is cell destruction by shock waves as the results of rapid local heating of the suspension due to the light energy being transformed into heat by the sensitizers.

Keywords: molecular sensitizers, bacterial inactivation, photodynamic action, hyperthermia, shock waves

УДК 57.05

СТОХАСТИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА p53 В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Р.А. Ковалёв, Н.Д. Федорова, Р.А. Пантина, Е.В. Семенова, М.В. Филатов, Е.Ю. Варфоломеева

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 188300, Гатчина, Ленинградская обл., мкр. Орлова роща, 1

E-mail: varfolomeeva_ey@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 24.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Стохастическая экспрессия генов может иметь важные последствия для судьбы как каждой конкретной клетки, так и клеточной популяции в целом. В данной работе мы демонстрируем значительную вариабельность экспрессии p53, вплоть до полного ее отсутствия, в клетках первичных глиобластом человека, чего не наблюдается в клетках нормальных фибробластов ФЛЭЧ и перевиваемых опухолевых линий, таких как HeLa и HT1080. При этом вариабельность экспрессии p53 в клетках зависит от густоты посева. Показываем, что при подавлении транскрипции актиномицином Д или нокдауне гена p53 РНК-интерференцией восстановление его уровня экспрессии в клетках проходит стохастически.

Ключевые слова: стохастическая клеточная гетерогенность, экспрессионный шум, p53, первичные глиобластомы.

DOI: 10.31857/S0006302922030127, EDN: AODLQO

Экспрессия генов – это стохастический процесс, в результате которого в популяции генетически идентичных клеток могут возникнуть значительные межклеточные расхождения в уровнях мРНК и белков. Неоднородность экспрессии может иметь важные последствия для судьбы как каждой конкретной клетки, так и клеточной популяции в целом [1–4]. Клетки разнообразных организмов от микробов до высших постоянно подвергаются воздействию эндогенных и экзогенных стрессов, приводящих к генетическим повреждениям, эпигенетическим отклонениям и ошибкам регуляторных систем, что, в конечном итоге, и обуславливает стохастический характер экспрессии генов [2, 5]. Экспрессионный шум способствует формированию различных фенотипов и улучшает способность приспосабливаться к изменяющимся условиям на уровне популяции, являясь, по-видимому, важной составляющей эволюционного прогресса. Однако в некоторых случаях стохастические флуктуации экспрессии могут вызывать индукцию онкогенов или нарушение регуляции генов-супрессоров опухолей, облегчая адаптивные программы злокачественной трансформации в условиях стресса [6]. Ключевую

роль в определении судьбы клетки при повреждениях играет белок p53 [7]. Отсутствие белка p53 в клетках затрудняет своевременный ответ на клеточные стрессы, способствуя онкогенезу. Очевидно, что анализ стохастических процессов при экспрессии гена p53 в опухолевых клетках представляет не только научный, но и большой практический интерес, поскольку экспрессионный профиль может контролироваться различными стратегиями регуляции генов, приводящим к режимам с низким уровнем шума [8].

Наиболее подходящей методологией исследования стохастической экспрессии генов является мониторинг продукции, деградации и функционального состояния биомолекул в реальном времени в живых клетках [9]. В подавляющем большинстве работ уровень экспрессии p53 оценивают, используя вестерн-блот либо полимеразную цепную реакцию, однако эти методы дают лишь усредненное значение уровня экспрессии, не отражая поклеточного распределения. Конфокальная микроскопия и цитометрия же позволяют выявить неоднородность экспрессионных профилей внутри популяции.

В этой работе мы изучали экспрессию гена p53 в клетках различных линий человека, как в перевиваемых, так и в первичных. Продемонстриро-

Сокращение: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein).

вана стохастическая изменчивость экспрессии гена *p53* в популяции при внесении возмущений в функционирование клеток. Используя покадровую микроскопию и проточную цитометрию, мы исследовали кинетику такой изменчивости экспрессии генов в клетках. Также нами показана значительная вариабельность экспрессии *p53* в первичных клетках глиобластомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и условия культивирования.

Работа проведена на первичных и перевиваемых культурах клеток человека: ФЛЭЧ (фибробласты легкого эмбриона человека), HT-1080 (фибросаркома) и HeLa (аденокарцинома шейки матки) — стандартные перевиваемые клеточные линии с диким типом белка *p53* (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург), и G1-La, G1-Tr — первичные культуры глиомных клеток, полученные в нашей лаборатории, а также на клеточной линии GFP-p53ΔY126-HEK293, полученной нами путем введения плазмиды p53ΔY126-GFP в клетки линии HEK293 с последующим клонированием [10].

Клетки культивировали в полной среде (DMEM/F12 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Biowest, Франция)), без антибиотиков, в 5%-й CO₂-атмосфере при 37°C.

Для получения клонов (потомков одной клетки) клетки линии GFP-p53ΔY126-HEK293 рассевали в 96-луночные планшеты. Один из наиболее ярких по уровню флуоресценции меченого зеленого флуоресцентного белком (GFP — Green Fluorescent Protein) клон (далее в тексте GFP-клон) с высоким уровнем экспрессии белка GFP-p53ΔY126 был использован в дальнейшей работе. Ранее было показано, что в клетках GFP-клона детектируются как белок GFP-p53ΔY126, так и белок *p53* дикого типа [11]. В дальнейшем пересев клеток осуществляли по мере образования клетками монослоя. Клетки обрабатывали раствором Версен/трипсин 1:1 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) в течение 10 мин, переносили в центрифужную пробирку, осаждали 5 мин при 1000 об/мин, ресуспендировали в питательной среде и 1/20 часть суспензии клеток переносили в свежий флакон. Анализ полученных клеточных линий (клонов) и отбор линий с высоким содержанием GFP проводили на цитометре Cell LabQuanta (Beckman Coulter, США). Для прижизненного наблюдения клетки сеяли в чашки диаметром 35 мм с оптическим дном (MatTek Corp., США) и визуализировали на конфокальном микроскопе Leica SP5 (Leica, Германия).

Проточная цитометрия и сортировка клеток. Регистрацию количества клеток, несущих флуорес-

центный белок GFP, проводили с помощью проточного цитофлуориметра Cell Lab Quanta SC фирмы Beckman Coulter (США). Сортировка клеток по уровню флуоресценции GFP-белка осуществлялась с помощью сортера фирмы Beckman Coulter (США).

Анализ экспрессии генов в режиме реального времени в живых клетках по технологии SmartFlare. Для прижизненного наблюдения за уровнем и динамикой включения экспрессии генов в клетках (оценка концентрации РНК) использовали набор SmartFlare™ (Merck Millipore, Германия). Согласно инструкции производителя зонды SmartFlare™ добавляли к исследуемому образцу, спустя 4 ч инкубации с использованием конфокального микроскопа (Leica, Германия) регистрировали флуоресценцию в клетках.

Процедура подавления транскрипции РНК с помощью актиномицина Д. Исследуемый образец клеток инкубировали в полной среде с добавлением актиномицина Д в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 14 ч. Далее добавляли зонды SmartFlare™ на 4 ч и затем регистрировали флуоресценцию на конфокальном микроскопе. После этого заменяли полную среду с актиномицином Д на полную среду без него, снова добавляли зонды SmartFlare™ и наблюдали за динамикой флуоресценции образца в течение суток (для регистрации флуоресценции использовался конфокальный микроскоп).

Система РНК-интерференции для подавления экспрессии гена TP53. Подавление экспрессии гена *p53* проводили с помощью трансфекции коротких интерферирующих молекул РНК (антиP53-siРНК) через 24 ч после посева клеток в чашки с оптическим дном. Трансфекцию антиP53-siРНК (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon, США) в концентрации 100 нМ в 1× трансфекционном буфере (Dharmacon, США) проводили с использованием липофектамина (Dharmacon-FECT) по методике производителя (<http://www.dharmacon.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стохастическая экспрессия белка GFP-p53ΔY126 в клетках линии GFP-p53ΔY126-HEK293. Плаزمида p53ΔY126-GFP кодирует мутантный белок *p53* с делецией тирозина в 126-м положении пептидной цепи белка, несущий на N-конце зеленый флуоресцентный белок (GFP). Мутантная форма белка *p53* обладает некоторыми функциями белка *p53* дикого типа. В частности, белок *p53*ΔY126 может работать как транскрипционный фактор, активируя индукцию белка *p21*, и вызывать клеточную гибель, однако по сравнению с диким типом белка *p53* его актив-

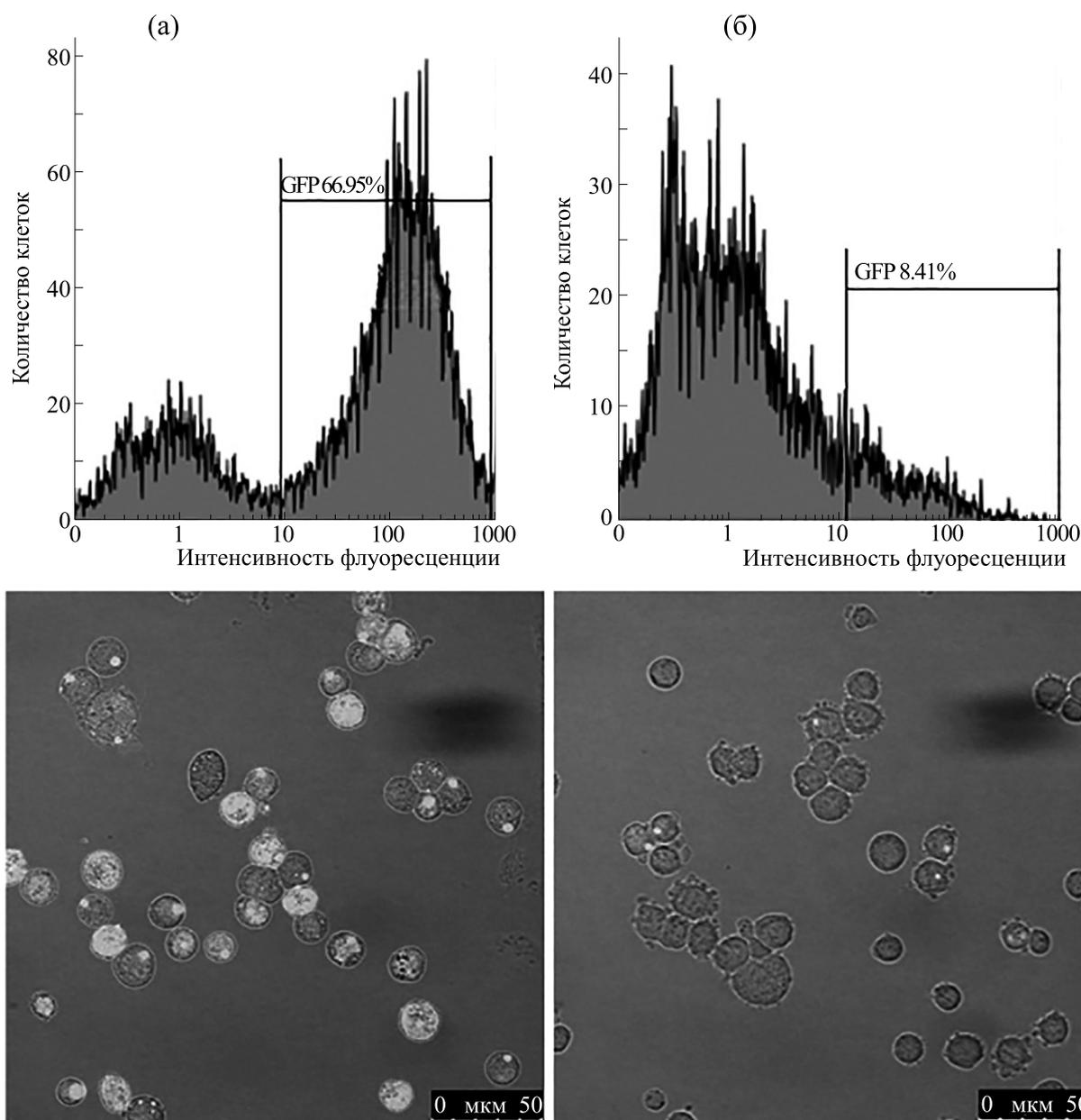


Рис. 1. Экспрессия белка GFP-p53ΔY126 в клетках различных клонов HEK293.

ность снижена [11]. Исследование клона линии HEK293, экспрессирующего белок GFP-p53ΔY126, показало существенное различие экспрессии данного белка в различных клетках клона от высокой до полностью отсутствующей. Чтобы исключить зависимость наблюдаемой нами разницы в концентрации GFP-p53ΔY126 как от потери встроенной плазмиды во время роста клеточной культуры, так и разницы в считывании из-за места ее встраивания, мы повторно расклонировали линию GFP-p53ΔY126-HEK293. Все полученные нами новые клоны также продемонстрировали разнообразие концентрации белка GFP-

p53ΔY126 GFP от клетки к клетке в каждом клоне (рис. 1а,б).

Чтобы показать, что в конкретной клетке концентрация исследуемого белка GFP-p53ΔY126 может меняться с течением времени, мы с помощью конфокального микроскопа в течение 72 ч вели наблюдение за живыми клетками линии GFP-p53ΔY126-HEK293. Мы обнаружили, что концентрация GFP-p53ΔY126 меняется стохастически в каждой отдельно взятой клетке от полного отсутствия наблюдаемого белка к его высокой концентрации через несколько часов, и наоборот (рис. 2).

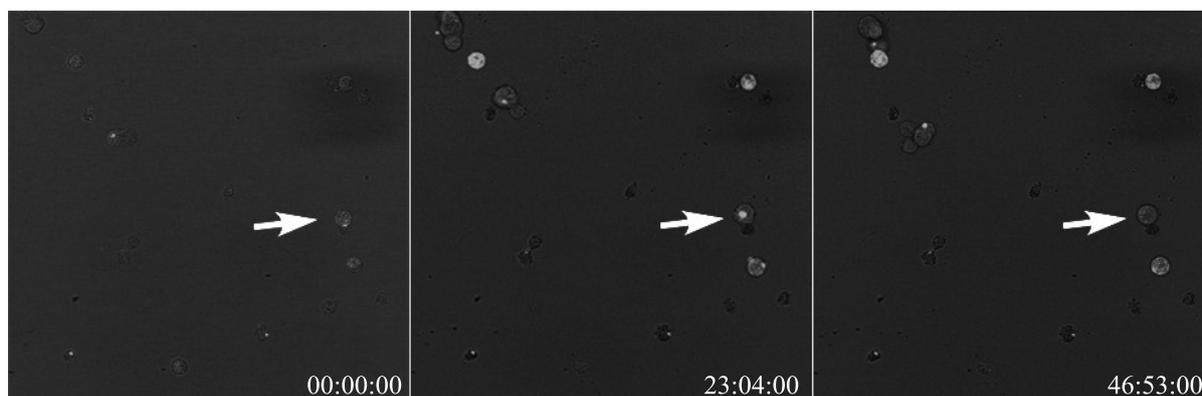


Рис. 2. Изменение концентрации белка GFP-p53ΔY126 в клетках с течением времени.

Чтобы оценить кинетику экспрессии белка GFP-p53ΔY126 в отдельных клетках исследуемой нами линии GFP-p53ΔY126-HEK293, мы отобрали на сортере клетки с низким («темные») и высоким («яркие») уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126. Отсортированные темные клетки (рис. 3б) были помещены в питательную среду при температуре 37°C. Нами было отмечено, что после 17 ч культивирования появляются яркие клетки, содержащие белок GFP-p53ΔY126 (рис. 3в). С течением времени количество флуоресцентно окрашенных клеток увеличивалось, и спустя 72 ч соотношение «темных» и «ярких» клеток приблизилось к распределению в исходной популяции (рис. 3а,г). При дальнейшем культивировании клеточной культуры в течение 30 суток картина распределения «темных» и «ярких» клеток существенно не менялась. Однако вариabельность экспрессии белка GFP-p53ΔY126 могла быть обусловлена как местом встраивания плазмиды в генетический материал клетки, так и наличием мутации в гене p53ΔY126.

Вариabельность мРНК, кодирующей p53 в клетках первичных и перевиваемых клеточных линий. Для проверки гипотезы о стохастичности экспрессии белка p53 мы проанализировали изменение концентрации кодирующей его мРНК в различных клеточных линиях. Нами была использована методика прижизненной оценки концентрации РНК с помощью зонда Smart Flare на пяти клеточных линиях. Наблюдение за концентрацией мРНК гена p53 показало наличие некоторых особенностей экспрессии данного гена в зависимости от условий роста и типа используемых культур клеток.

Так, для перевиваемых линий (HeLa, HT1080, ФЛЭЧ) и первичных культур клеток (G1-La и G1-Tr) наблюдается разница в характере экспрессии гена p53.

Если на перевиваемых линиях мы не отметили значимых различий в концентрации РНК, коди-

рующей p53 между клетками каждой из этих культур, то первичные культуры клеток глиомы человека демонстрируют заметную вариabельность по количеству кодирующей p53 РНК, от полного отсутствия до ее значительной концентрации в каждой конкретной клетке (рис. 4).

Также была обнаружена зависимость количества мРНК p53 в первичных культурах клеток глиом человека от густоты посева. На редких посевах можно увидеть как клетки, содержащие РНК, так и клетки с полным ее отсутствием, а на густых посевах мы не наблюдаем значительной разницы в количестве РНК (рис. 5).

Изучение динамики восстановления уровня транскрипции мРНК p53 после ее подавления различными агентами. Нами было установлено, что в клетках перевиваемых линий профиль мРНК p53 не отличался от клетки к клетке при стандартных условиях культивирования (рисунок 4а–в). Наблюдаемое единообразие может быть обусловлено относительной стабильностью клеточных процессов, сформировавшейся в результате длительного культивирования линий. Возможно, именно это кардинально отличает степень экспрессионной гетерогенности в перевиваемых линиях от таковой в первичных опухолевых линиях. Для проверки этого предположения мы решили нарушить нормальное функционирование клеток перевиваемых линий, влияя на различные внутриклеточные механизмы. Мы использовали как агент, подавляющий общую транскрипцию в клетке (актиномицин Д), так и прямое специфичное выключение гена с помощью РНК-интерференции. Далее с помощью конфокальной микроскопии визуализировали динамику восстановления профиля экспрессии (рис. 6). В обоих случаях мы наблюдаем стохастичное восстановление экспрессии исследуемого гена.

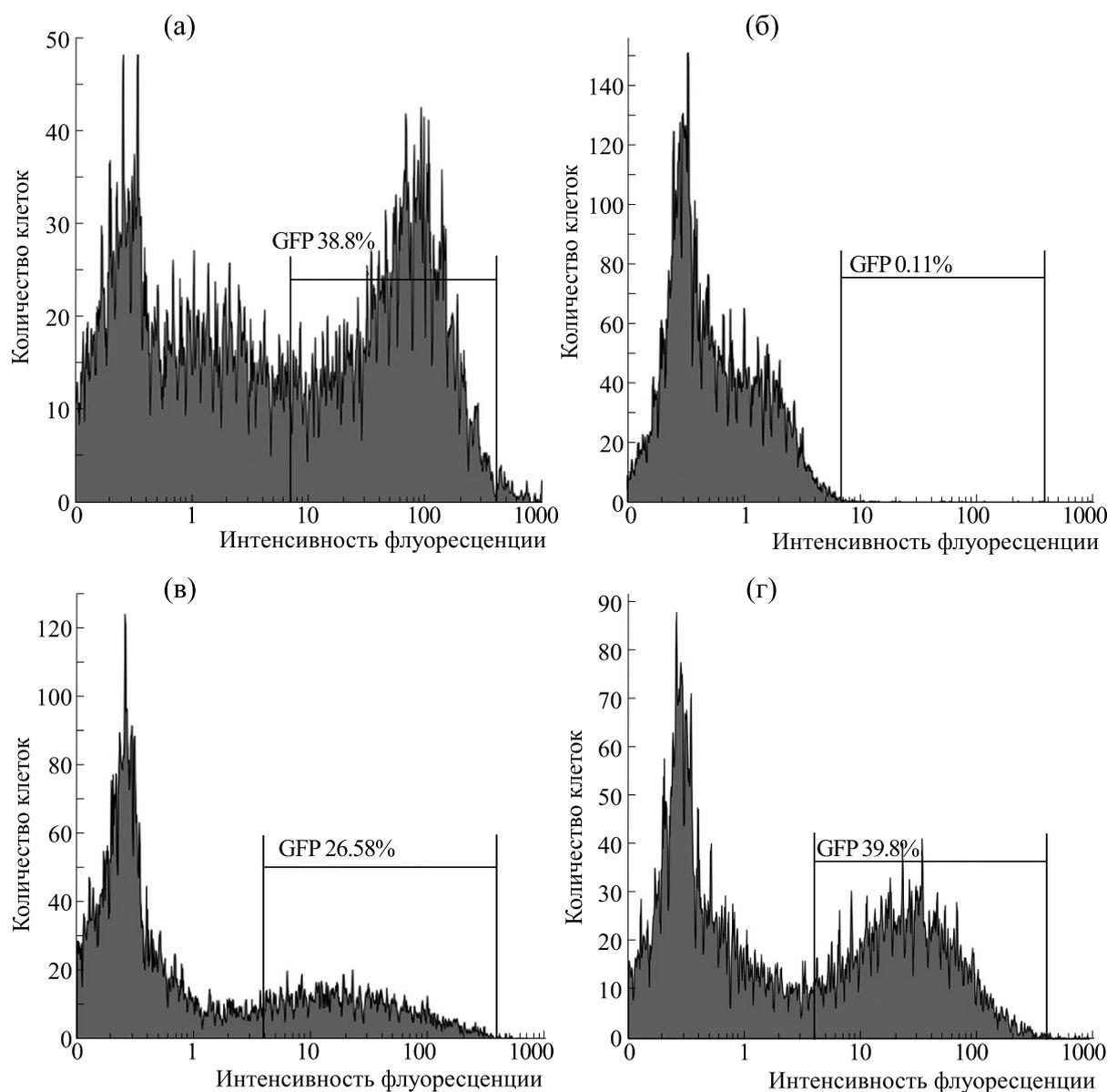


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии GFP-p53ΔY126 в отобранной на сортере популяции клеток, изначально его не экспрессирующих. (а) – исходная популяция клеток с различным уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126; (б) – отобранная на сортере популяция клеток с нулевым уровнем экспрессии GFP-p53ΔY126; (в) – уровень экспрессии GFP-p53ΔY126 спустя 17 часов после культивирования отобранных на сортере “темных” клеток; (г) – уровень экспрессии GFP-p53ΔY126 спустя 72 часа и более после культивирования отобранных на сортере “темных” клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки одного организма могут отличаться количеством РНК, образующейся в результате работы одного и того же гена, а также количеством конкретных белков. Экспрессионный «шум» (случайные флуктуации экспрессии генов) возникает по разным причинам, как внешним, так и внутренним (различное количество доступных клеткам питательных веществ, разная скорость перемещения белков между рецепторами в разных клетках, ограниченное число молекул, ре-

гулирующих экспрессию генов) [5, 12, 13]. В результате транскрипция может носить характер чередующихся всплесков и затуханий различной продолжительности, что приводит к неизбежной стохастичности синтеза как мРНК, так и белка. Негенетическая гетерогенность, возникающая в результате множественных стохастических процессов, может играть значимую роль в развитии таких важных процессов, как гибель клетки, злокачественная трансформация, метастазирование и др. [14, 15].

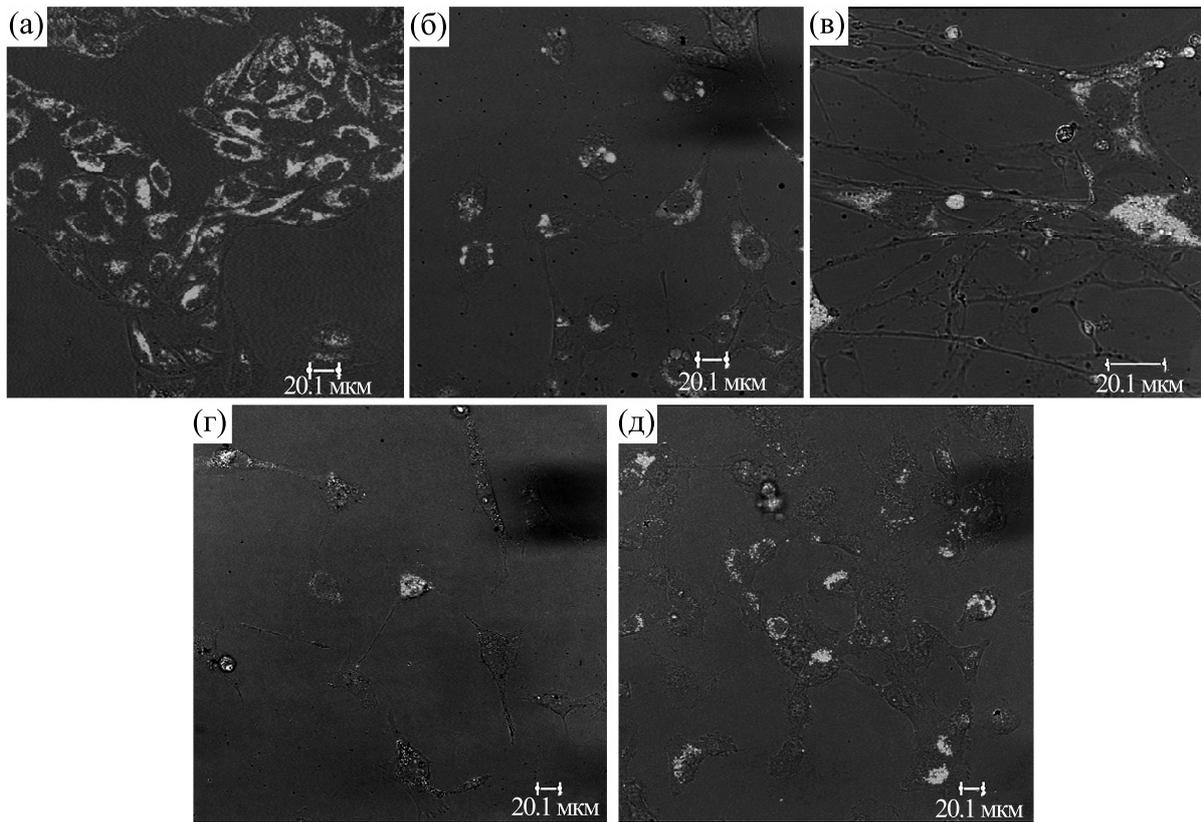


Рис. 4. Вариабельность экспрессии p53 для перевиваемых культур (HeLa – а, HT1080 – б, ФЛЭЧ – в), первичных культур (G1-La - г, G1-Tr - д).

В предотвращении онкогенеза огромную роль играет белок p53 [16]. В ответ на активацию онкогенов, повреждения ДНК и другие типы стресса он активирует множество сигнальных путей, таких как остановка клеточного цикла, старение, апоптоз и др. [17]. Обычно p53 инактивируется или через мутацию в самом гене, или посредством приобретения клеткой других генетических или эпигенетических изменений, которые блокируют функционирование p53 [18–21]. У гомозиготных мышей с нокаутом p53 уже через 10 недель с высокой частотой развиваются опухоли, включая лимфомы и саркомы [22]. Считается, что для выполнения функции опухолевого супрессора необходима постоянная экспрессия данного белка, которая жестко регулируется, и в нормальных клетках при физиологических условиях поддерживается на низком уровне его отрицательными регуляторами, главным образом MDM2 и MDM4 [23, 24]. Мутации в гене *p53* или его отсутствие являются признаком наследственной предрасположенности к раку и часто считаются плохим прогнозом для пациентов [25, 26]. Выключение (инактивация) гена *p53* в клетках в результате стохастичности экспрессии также может способ-

ствовать онкогенезу, метастазированию и снижать чувствительность к терапии опухолей.

Мы не отметили значимых различий в концентрации РНК, кодирующей p53 между клетками нормальных фибробластов человека ФЛЭЧ, как не было достоверных вариаций в экспрессии данного гена и в клетках перевиваемых опухолевых линий, таких как HeLa и HT1080 (рис. 4а–в). Однако мы обнаружили значительную вариабельность экспрессии p53, вплоть до полного ее отсутствия, в клетках первичных глиобластом G1-La и G1-Tr (рис. 4г,д). Также мы показали, что при введении в клетки HEK293 плазмиды содержащей последовательность *GFP-p53ΔY126*, мутантный белок p53ΔY126 экспрессируется стохастически. Концентрация белка GFP-p53ΔY126 меняется с течением времени от полного отсутствия наблюдаемого белка в клетке к высокой его концентрации через несколько часов и наоборот (рис. 3). Можно предположить, что экспрессия генов, как в нормальных клетках, так и клетках перевиваемых опухолевых линий, сбалансирована в большей степени по сравнению с клетками первичных опухолей и клетками с введенной генетической конструкцией.

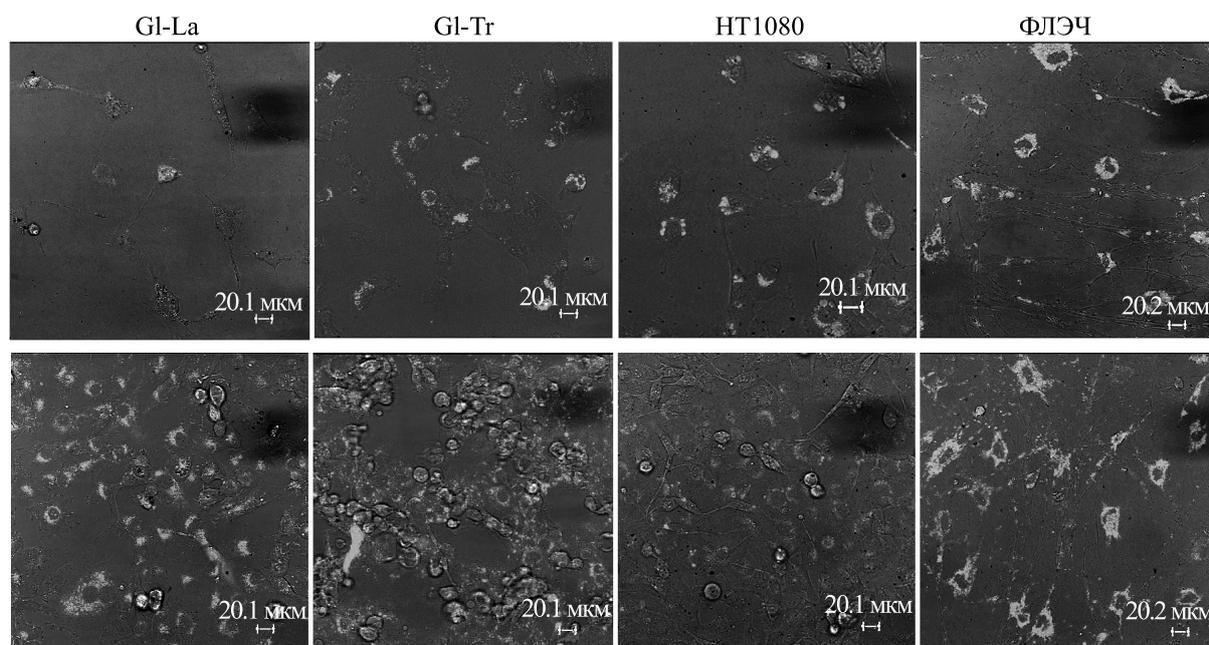


Рис. 5. Вариабельность экспрессии РНК, кодирующей $p53$ в клетках первичных линий (глиом G1-La и G1-Tr), и перевиваемых HT1080 и ФЛЭЧ при разной густоте посева: верхний ряд – редкий посев, нижний ряд – густой посев.

Мы обнаружили, что вариабельность экспрессии $p53$ в клетках и G1-La и G1-Tr зависит от густоты посева клеток (рис. 5). Так, при редком посеве наблюдаются значительные отличия в уровнях экспрессии между клетками, но при дальнейшем уплотнении популяции эти различия сглаживаются, и в монослое клетки выглядят относительно однородно по уровню РНК $p53$. Эти результаты согласуются с немногочисленными литературными данными на эту тему. Межклеточные взаимодействия стабилизируют и поддерживают относительную однородность экспрессионных паттернов близлежащих клеток во время развития и дифференцировки [15, 27]. В тканях гипофиза взрослого человека клеточные контакты обеспечивают локальную координацию экспрессии гена пролактина [28]. Нарушение межклеточных взаимодействий и потеря контактного торможения ответственны за повышенный шум экспрессии, который может быть причиной возникновения и прогрессии опухоли [6, 15].

Профиль экспрессии гена $p53$ не отличался между клетками перевиваемых линий. Однако при нарушении нормального функционирования клеток, а именно подавлении транскрипции актиномицином Д или с использованием РНК-интерференции с дальнейшей заменой среды на полную, мы отметили стохастическое восстановление уровня экспрессии гена $p53$ в клетках (рис. 6). Вероятно, после остановки транскрипции и снижения уровня РНК клеткам требуется

время для ее наработки и стабилизации клеточных процессов, причем в разных клетках одной популяции накопление РНК проходит стохастически. Предполагается, что в регуляции стохастической экспрессии генов участвует микроРНК [29, 30], и мы видим, что после обработки короткой интерферирующей РНК с последующей отмывкой, клеткам также требуется значительное время, чтобы ситуация стабилизировалась и прекратились экспрессионные колебания.

Таким образом, можно заключить, что характер экспрессии гена $p53$ в клетках перевиваемых клеточных линий существенно не различается между клетками одной популяции. Однако при внесении возмущения и нарушении нормального функционирования клеток наблюдается экспрессионная вариабельность.

Раковые клетки характеризуются дестабилизированным паттерном экспрессии генов [6, 31]. Кроме того, экспрессия некоторых генов радикально отличается на разных стадиях прогрессии опухоли, что также может вносить важный вклад в увеличение негенетической гетерогенности популяции опухолевых клеток [32]. Степень гетерогенности первичных глиобластом, у которых наблюдаются субпопуляции с различными транскрипционными профилями [33], существенно влияет на результаты лечения. Мы показали, что первичные клетки глиобластом могут демонстрировать значительное различие уровня экспрессии гена $p53$ (рис. 4г,д). Представленные нами результаты позволяют предположить, что стоха-

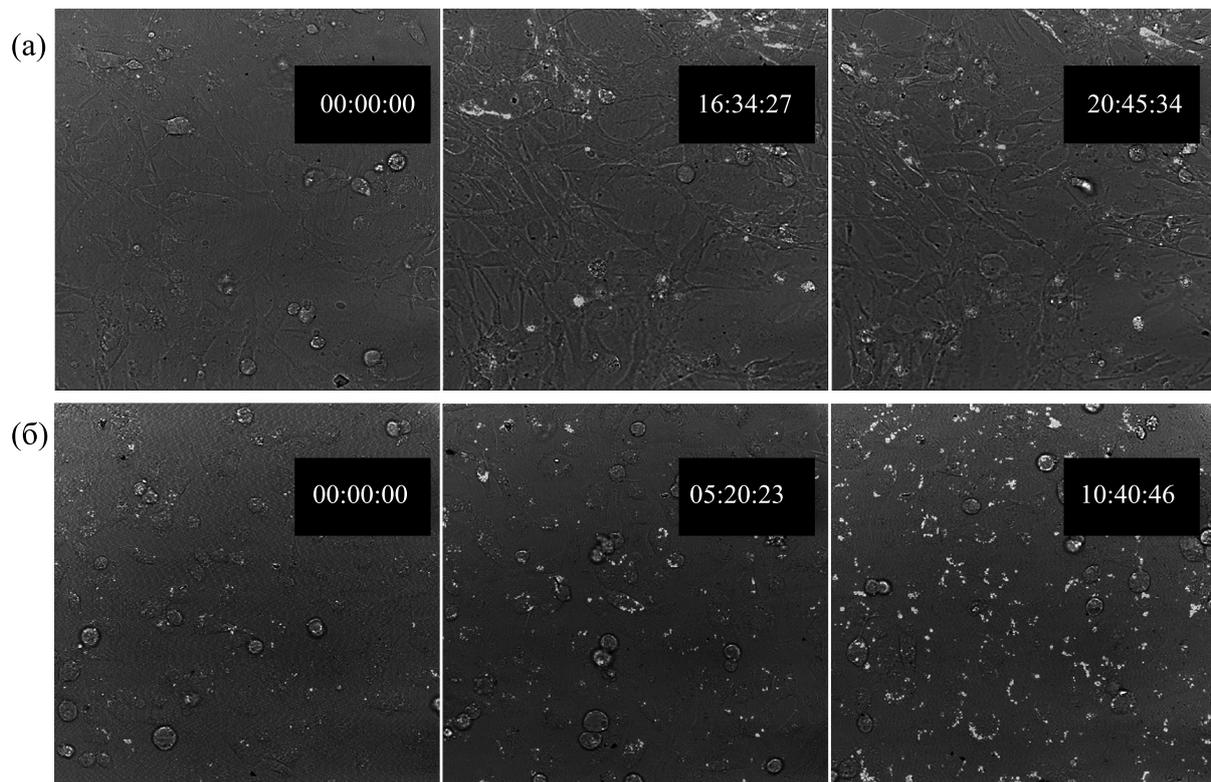


Рис. 6. Восстановление транскрипции РНК после прекращения воздействия актиномицином D (а) и siRNA (б).

стичность экспрессии p53 в первичных опухолевых клетках может обуславливать их общую нестабильность и влиять на опухолевую трансформацию и метастазирование, а также, возможно, чувствительность к гамма- и химиотерапии, поскольку известно, что экспрессионный шум в опухолевых клетках усиливается при низких дозах ионизирующей радиации [34] и способствует лекарственной устойчивости [35].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный № 121060200125-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Mitosch, G. Rieckh, and T. Bollenbach, *Cell Syst.* **4** (4), 393 (2017).
2. A. Raj and A. van Oudenaarden, *Cell* **135** (2), 216 (2008).
3. K. H. Kim and H. M. Sauro, *PLoS Comput. Biol.* **8** (1), e1002344 (2012).
4. М. В. Головкин, Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, *Биофизика* **54**, 581 (2009).
5. P. Dong and Z. Liu, *Open Biol.* **7** (5), 170030 (2017).
6. J. P. Capp, *Int. J. Cancer* **140** (11), 2408 (2017).
7. A. J. Levine and M. Oren, *Nat. Rev. Cancer* **9**, 749 (2009).
8. A. F. Ramos, J. E. Hornos, and J. Reintz, *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **91** (2), 020701 (2015).
9. N. T. Ingolia and A. W. Murray, *Curr. Biol.* **17** (8), 668 (2007).
10. V. S. Burdakov, R. A. Kovalev, R. A. Pantina, et al., *Cell Tissue Biol.* **12** (1), 20 (2018).
11. E. M. Makarov, T. A. Shtam, R. A. Kovalev, et al., *PLoS One* **12**, e0185126 (2017).
12. H. Xu, L. A. Sepulveda, L. Figard, et al., *Nat. Methods* **12**, 739 (2015).
13. C. J. Zopf, K. Quinn, J. Zeidman, and N. Maheshri, *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003161 (2013).
14. P. W. S. Hill, R. Amouroux, and P. Hajkova, *Genomics* **104**, 324 (2014).
15. L. Ho and G. R. Crabtree, *Nature* **463**, 474 (2010).
16. K. H. Vousden and C. Prives, *Cell* **137**, 413 (2009).

17. Y. Liang, J. Liu, and Z. Feng, *Cell Biosci.* **3**, 9 (2013).
18. P. Hainaut, T. Hernandez, A. Robinson, et al., *Nucl. Acids Res.* **26**, 205 (1998).
19. R. Saldana-Meyer and F. Recillas-Targa, *Epigenetics* **6**, 1068 (2011).
20. C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, et al., *Nature* **502** (7471), 333 (2013).
21. C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, et al., *Nat. Rev. Cancer* **9**, 862 (2009).
22. L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, et al., *Nature* **356**, 215 (1992).
23. P. Hainaut, *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 76 (1995).
24. A. Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl, *Genes Dev.* **8**, 2540 (1994).
25. M. Olivier, M. Hollstein, and P. Hainaut, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (1), a001008 (2010).
26. D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong, et al. *Science* **250**, 1233 (1990).
27. C. V. Harper, K. Featherstone, S. Semprini, et al., *J. Cell Sci.* **123**, 424 (2010).
28. K. Featherstone, K. Hey, H. Momiji, et al., *Elife* **5**, e08494 (2016).
29. M. Del Giudice, S. Bo, S. Grigolon, and C. Bosia, *PLoS Comput. Biol.* **14** (4), e1006063 (2018).
30. L. Laurenti, A. Csikasz-Nagy, M. Kwiatkowska, and L. Cardelli, *Biophys. J.* **114** (12), 3000 (2018).
31. A. Brock, H. Chang, and S. Huang, *Nat. Rev. Genet.* **10**, 336 (2009).
32. G. Martello and A. Smith, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **30** (1), 647 (2014).
33. A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta, et al., *Science* **344**, 1396 (2014).
34. L. Bodgi, A. Canet, A. Granzotto, et al., *Cancer Radiother.* **20** (4), 314 (2016).
35. K. S. Farquhar, D. A. Charlebois, M. Szenk, et al., *Nature Commun.* **10** (1), 2766 (2019).

Stochasticity in p53 Protein Expression in Human Primary Cells and Overpassed Cell Lines

R.A. Kovalev, N.D. Fedorova, R.A. Pantina, E.V. Semenova, M.V. Filatov, and E.Yu. Varfolomeeva

Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Orlova Roscha 1, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia

Stochastic gene expression can have an important impact on fate of any single cell as well as on the whole cell population. In this work, we demonstrate significant variability in p53 expression, up to its complete absence, in primary glioblastoma cells from human tumor specimens, that does not happen in cells of normal human fibroblasts and tumour cell lines, such as HeLa and HT1080. At the same time, variability in p53 expression in cells depends on the density of the cell layer. We show that when the transcription is suppressed with actinomycin D or p53 gene expression is knocked down by RNA interference, the level of p53 gene expression in cells is restored and this process proceeds stochastically.

Keywords: stochastic cell heterogeneity, expression noise, p53, primary glioblastoma cells

ВКЛЮЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ БРОМИДОМ, В СОСТАВ ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА

© 2022 г. Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, С.В. Канныкин, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

E-mail: zinkovae@list.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 17.03.2022 г.

Обладая высокой биосовместимостью с клетками организма в силу состава из мембранобразующих липидов, липосомы могут быть использованы в качестве эффективного средства адресной доставки лекарственных препаратов при лечении заболеваний различной этиологии. Взаимодействие липосом с клетками-мишенями может принимать разные формы: адсорбция (прикрепление) на клеточной поверхности, эндоцитоз, слияние липосом с мембранами клеток. Внедрение в липосомы компонентов для активного управления внешним магнитным полем в виде магнитовосприимчивых наночастиц позволяет многократно повысить эффективность и скорость доставки лекарственных препаратов. Нами были получены липосомальные наночастицы, содержащие наночастицы магнетита. Для создания магнитоуправляемых липосом были использованы полученные в нашей лаборатории наночастицы магнетита диаметром 4.2 ± 1.2 нм. Поверхность синтезированных частиц магнетита покрывали молекулами цетилтриметиламмония бромида, после чего включали магнетит в состав липосом из фосфатидилхолина. Количественную оценку интегрированных в липидный бислой липосом магнитовосприимчивых наночастиц проводили спектральными методами и методом просвечивающей электронной микроскопии. В ходе проведенных исследований показано, что модификация наноструктурированного магнетита цетилтриметиламмония бромидом повышает эффективность внедрения наночастиц магнетита в липидный бислой на 31.6%.

Ключевые слова: наночастицы, магнитолипосомы, магнетит, ЦТАБ.

DOI: 10.31857/S0006302922030139, EDN: AONQWD

Наночастицы на сегодняшний день применяются в различных областях медицины [1–3]. Липосомы, содержащие в своем составе магнитовосприимчивые наночастицы (магнитолипосомы), позволяют комбинировать диагностику и лечение, выступая в качестве контрастирующих веществ для магнитно-резонансной томографии наравне с терапевтическим действием. Более того, использование липосом решает проблему растворимости и коллоидной устойчивости магнитных наночастиц, которые в свободном состоянии коагулируют и формируют агрегаты в кровеносном русле, вызывая эмболию сосудов и ишемические повреждения клеток [4]. Однако при получении магнитолипосом и по сей день существует ряд проблем, главными из которых являются сложность получения наночастиц стандартизированного размера, достаточная степень включения лекарственного препарата. Знание механизмов взаимодействия компонентов нано-

систем для адресной доставки лекарственных средств необходимо для решения вышеуказанных и других вопросов при их получении.

В частности, остается открытым вопрос о способах включения магнитных наночастиц в структуру липосом, их интеграция в состав липосом может происходить различными путями, наиболее предпочтительным из которых является их включение в структуру липидного бислоя, это позволяет сохранить объем внутренней полости липосом для переноса большего количества лекарственного вещества, исключая взаимодействие магнетита с использованным препаратом [5, 6]. Известен ряд работ, посвященных вопросам включения магнитных наночастиц в бислой липосом, с этой целью производят гидрофобизацию поверхности наночастиц при помощи различных веществ [7–13]. По совокупности параметров (намагничиваемость, токсичность) магнетит является оптимальным вариантом. В связи с вышесказанным большой интерес представляет собой изучение распределения компонентов

Сокращение: ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид.

внутри системы для доставки лекарственных средств и стандартизация размеров получаемых наночастиц.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния модификации наночастиц магнетита цетилтриметиламмония бромидом на их включение в состав липосом на основе соевого лецитина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом. Наночастицы магнетита получали модифицированным методом Массарта путем соосаждения солей железа II и железа III в щелочной среде [14]. В качестве осаждающего реагента использовали 1%-й раствор аммиака, от которого наночастицы магнетита отмывали три раза дистиллированной водой. Поверхность полученных наночастиц магнетита была модифицирована цетилтриметиламмония бромидом (ЦТАБ) в концентрации 0.06 М, после чего наночастицы трижды отмывали дистиллированной водой и высушивали в лиофильной сушилке производства Labconco (США) [15].

Синтез липосом из фосфатидилхолина и наночастиц Fe₃O₄-ЦТАБ. Контрольные наночастицы и комплекс Fe₃O₄-ЦТАБ были добавлены в состав натрий-фосфатного буфера к липосомам.

Липосомы готовили методом гидратации/регидратации, выпаривая 5 мл 1%-го раствора соевого лецитина в этиловом спирте на ротационном испарителе RV10 (ИКА, Германия) при температуре водяной бани 60°C. В результате на стенке испарительной колбы получали пленку липидов. Затем добавляли сантимолярный натрий-фосфатный буфер (рН 7.4) с наночастицами магнетита (1 мг/мл) в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение 1 мин.

Следующим этапом стала стандартизация получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвуком с помощью дезинтегратора Q500 (Qsonica Sonicators, США) в течение 15 мин (20 кГц, импульс длительностью 10 с и перерывом 3 с) [16].

Методы контроля размера частиц. Изображения Fe₃O₄ получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) с использованием методики получения светопольных изображений [17]. Приготовление препаратов для исследования образцов порошков магнетита осуществляли следующим образом: предметные сетки с тонкой пленкой аморфного углерода погружали в водно-желатиновую суспензию порошка, измельченного в агатовой ступке. Лишнюю жидкость удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

Состав полученных наночастиц контролировали методом рентгеновской дифракции на анализаторе ARL X'TRA (ThermoScientific, США).

Размер полученных липосом измеряли с помощью метода динамического светорассеяния Zeta-sizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания).

Определение встраивания наночастиц Fe₃O₄-ЦТАБ в липидную мембрану липосом. Оценку встраивания магнетита в липосомы производили спектрофотометрическим методом. Синтезированные липосомы осаждали с помощью центрифугирования при 50000 об/мин в течение 20 мин на микроультрацентрифуге Sorvall MTX 150 (ThermoScientific, США) с использованием ротора S120-AT2, после чего отбирали супернатант и регистрировали оптическую плотность (магнетит, не вошедший в липосомы, D_1). Осажденные липосомы ресуспензировали в объеме натрий-фосфатного буфера, равном изначальному, и разрушали путем инкубации в 1%-м растворе Triton X-100 в течение 1 ч. При использовании этого детергента происходит сольubilизация фосфолипидов с образованием смешанных мицелл либо червеобразных везикул [18]. Магнетит, находившийся изначально внутри липосом, при этом выходил в раствор. Затем опять производили осаждение образовавшихся структур при аналогичных условиях и отбирали супернатант (магнетит, находящийся во внутренней полости липосом, D_2). Оптическую плотность регистрировали с помощью спектрофотометра UV 2401-PC (Shimadzu, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 412 нм.

Процент встраивания наночастиц магнетита в мембрану липосом оценивали по формуле:

$$Hv = (1 - D^{412}_1 / D^{412}_{исх} - D^{412}_2 / D^{412}_{исх}) \times 100\%,$$

где Hv – количество включенного в мембрану липосом магнетита в процентах, D^{412}_1 – оптическая плотность раствора после центрифугирования липосом, D^{412}_2 – оптическая плотность раствора после разрушения и центрифугирования липосом, $D^{412}_{исх}$ – оптическая плотность исходного раствора магнетита в буфере.

Приготовление образцов липосом для просвечивающей электронной микроскопии. Препараты липосом для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии были подготовлены согласно работе [18]. В качестве контрастирующего вещества использовали 2%-й раствор OsO₄. Изображения получали с помощью микроскопа JEM-100C (JEOL, Япония).

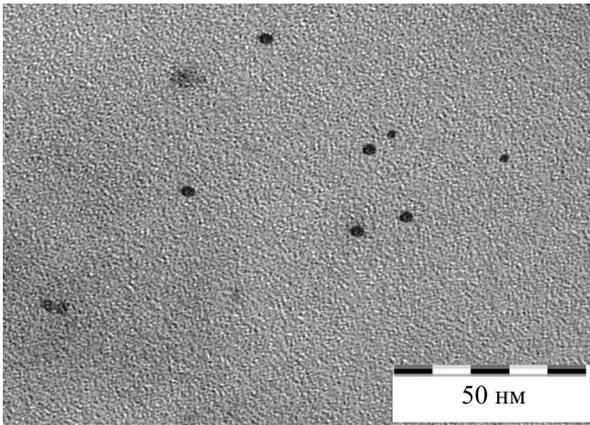


Рис. 1. Изображение наночастиц магнетита, полученное с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы методом просвечивающей электронной микроскопии был определен размер синтезированных нами магнитных наночастиц. Было проанализировано 100 наночастиц магнетита, размер которых рассчитывали с помощью программы Adobe Photoshop®.

Было установлено, что размер синтезируемых наночастиц составил 4.2 ± 1.2 нм (рис. 1).

Для оценки качественного состава синтезируемого магнетита были зарегистрированы рентгенограммы наночастиц. Обнаруженные на рентгенограммах пики, соответствующие $2\theta = 18, 30.20, 35.53, 43.1$ и 57.1 , соответствуют показателям стандартного образца магнетита (Fe_3O_4) (PDF-2 карта № 01-088-0315) (рис. 2).

Полученные наночастицы магнетита встраивали в липосомы из соевого лецитина, которые синтезировали методом гидратации/регидратации. Размер липосом контролировали методом динамического светорассеяния. Исследование показало, что полученные липосомальные наночастицы имеют размеры 173.8 ± 12.5 нм (рис. 3). Данный размер позволяет рассматривать полученные нами липосомы в качестве возможного средства адресной доставки лекарственных препаратов.

На следующем этапе работы оценивали встраивание в липосомы нестабилизированных частиц магнетита и частиц магнетита, покрытых молекулами ЦТАБ.

Исследования с помощью спектрофотометрического метода показали, что в случае магнетита без оболочки наблюдается включение $49.2 \pm 0.5\%$ магнетита, при использовании покрытия в виде ЦТАБ в липидный бислой включается $80.8 \pm 0.5\%$ магнетита (таблица).

На рис. 4 представлены характерные электронномикроскопические изображения липосом с адсорбированными наночастицами магнетита. На микрофотографиях липосом с наночастицами Fe_3O_4 -ЦТАБ (рис. 4в) заметно увеличение числа наночастиц магнетита, встроенных в липидный бислой, по сравнению с частицами, немодифицированными ЦТАБ (рис. 4б).

Увеличение доли встроенных в липидную мембрану наночастиц Fe_3O_4 обусловлено взаимодействием гидрофобной углеводородной цепи молекулы ЦТАБ ($[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$) и гидрофобных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина.

Следовательно, покрытие наночастиц магнетита молекулами ЦТАБ способствует встраива-

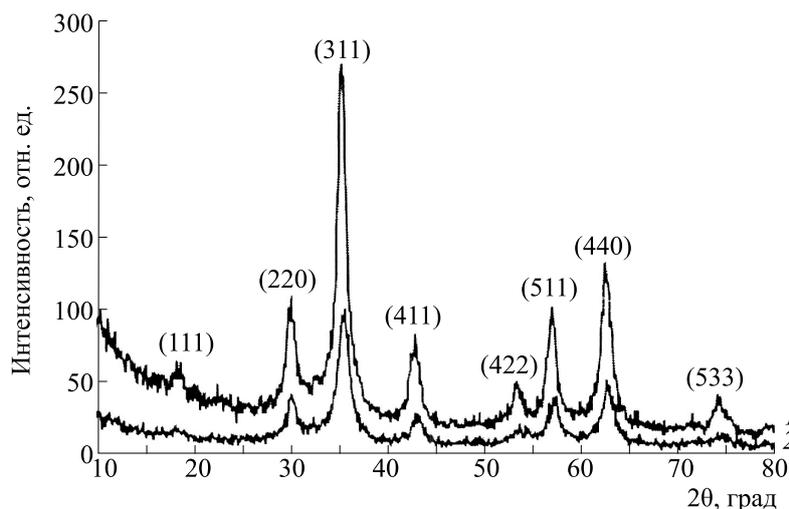


Рис. 2. Рентгенограмма наночастиц магнетита: 1 – Fe_3O_4 , 2 – Fe_3O_4 – ЦТАБ.

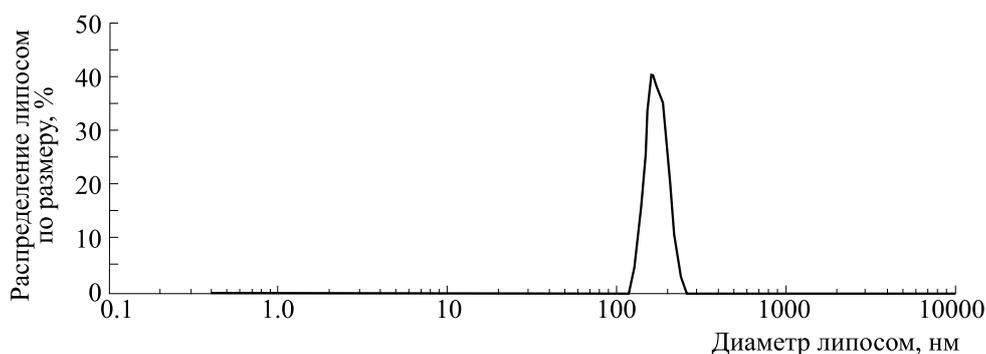


Рис. 3. Распределение по размерам липосом из соевого лецитина с включенными наночастицами магнетита.

Определение распределения магнетита в структуре липосом спектрофотометрическим методом

	Включение в липидный бислой, %	Включение во внутреннюю полость, %	Невключившийся магнетит, %
Fe_3O_4	49.2 ± 0.5	32.1 ± 0.5	18.9 ± 0.1
Fe_3O_4 -ЦТАБ	80.8 ± 0.5	13.9 ± 0.2	5.2 ± 0.3

нию наночастиц в структуру липидного бислоя липосом. В результате происходит увеличение свободного пространства во внутренней полости липосом, что позволит доставлять к клеткам-мишеням большее количество гидрофильных лекарственных препаратов.

Так как одной из главных проблем при синтезе липосом является их высокая склонность к агрегации, нами были проведены исследования по контролю изменений размера полученных нами липосом. Было показано, что увеличение размеров липосом происходит уже через 2 ч в обоих образцах (рис. 5).

Таким образом, по данным динамического светорассеяния мы можем сделать вывод о том, что покрытие ЦТАБ наночастиц магнетита не влияет на склонность липосом к агрегации. Столь быстрое увеличение размеров синтезированных липосом связано с тем, что в данной работе эксперименты проводились на модельных липосомах, липидный бислой которых состоит только из фосфатидилхолина, который при физиологических значениях pH имеет суммарный нейтральный заряд. Поэтому для применения в клинической практике необходимо включать в состав липосом отрицательно заряженные липиды.

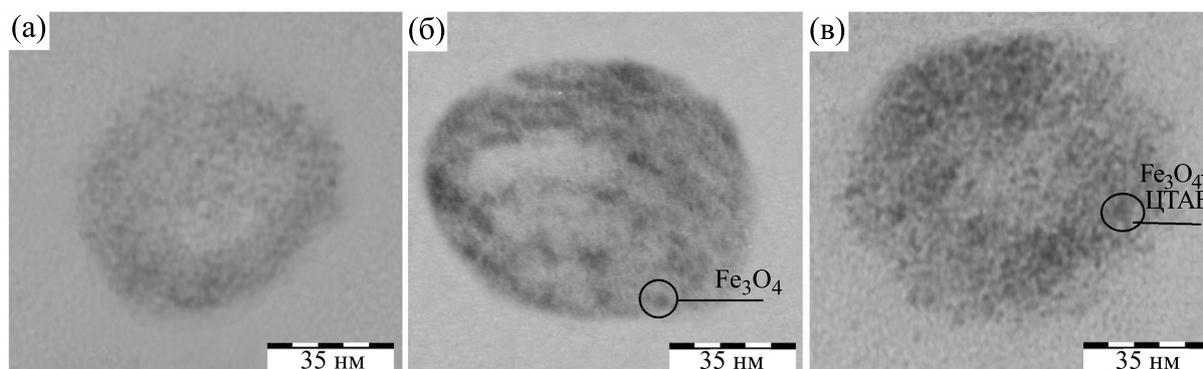


Рис. 4. Изображения липосом, полученные с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии: (а) — липосомы без добавления магнетита; (б) — липосомы с включенными наночастицами магнетита; (в) — липосомы с включенными наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ.

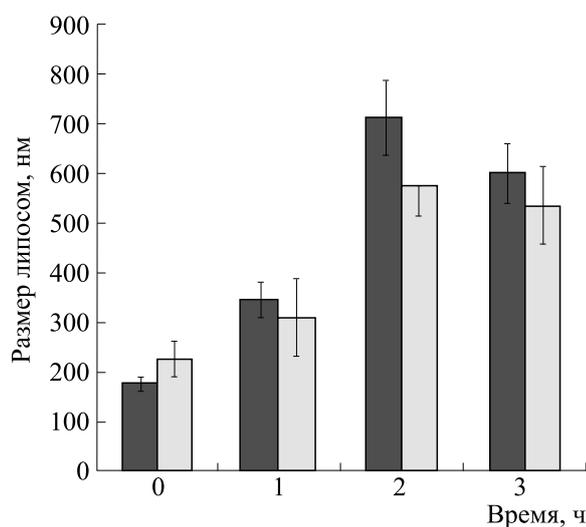


Рис. 5. Изменение размеров полученных липосом в течение времени: темные столбики – липосомы с магнетитом без покрытия; светлые столбики – липосомы с наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных нами исследований было изучено влияние покрытия наночастиц магнетита цетилтриметиламмония бромидом на их встраивание в липосомы из соевого лецитина.

Синтезированные магнитные наночастицы магнетита обладают необходимыми размерными характеристиками для встраивания в липидный бислой липосом.

Таким образом, интегрирование магнитных наночастиц в структуру липидного бислоя при получении магнитоуправляемых липосом позволит снизить риск взаимодействия вводимого в них препарата с материалом самих наночастиц, а рост свободного объема внутренней полости, вследствие ее освобождения от включенного наноматериала, сделает возможным увеличить удельное содержание доставляемого к клеткам-мишеням лекарственного препарата с одновременным снижением количества вводимых в организм липосом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты исследований были получены на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКПНО ВГУ (контроль размера получаемых наночастиц) и сектора электронной микроскопии ЦКП ПНЦБИ РАН (исследования препаратов липосом методом просвечивающей электронной микроскопии).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект №FZGU-2020-0044.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. А. Наквасина и В. Г. Артюхов, *Основы бионанотехнологии* (Издательский дом ВГУ, Воронеж, 2016).
2. C. Buzea, I. P. Blandino, and K. Robbie, *Biointerphases* **2** (4), MR17 (2007).
3. В. Н. Никифоров, *Изв. Академии инженерных наук им. А. М. Прохорова*, № 1, 23 (2013).
4. De Mrinmoy, P. S. Ghosh, and V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **20**, 4225 (2008).
5. M. Auffan, J. Rose, and M. R. Wiesner, *J. Bottero Environ. Pollution* **157**, 1127 (2009).
6. J. Kohlbrecher, E. Müller, Th. Schweizer, et al., *Nano Lett.* **11** (4), 1664 (2011).
7. Y. Chen, Y. Chen, D. Xiao, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **116**, 452 (2014).
8. C. Berry and A. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R198 (2003).
9. A. H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222 (2007).
10. P. B. Santhosh, B. Drašler, D. Drobne, et al., *Int. J. Nanomed.* **10**, 6089 (2015).

11. J. Santoyo-Salazar, M. A. Castellanos-Roman, and L. B. Gomez. *Mater. Sci. Engineer.* **27**, 1317 (2007).
12. S. Laurent, D. Forge, M. Port, et al., *Chem. Rev.* **108**, 2064 (2008).
13. K. K. Kadyrzhanov, K. Egizbek, A. L. Kozlovskiy, and M. V. Zdorovets, *Nanomaterials (Basel)* **9** (8), 1079 (2019).
14. R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* **17** (2), 1247 (1981).
15. О. Р. Егунова, Дисс. ... канд. хим. наук (Саратовский гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2017).
16. Е. В. Шилова, В. Г. Артюхов, Е. Д. Скорбач и др., *Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век*, № 4, 9 (2018).
17. П. Хирш и др., *Электронная микроскопия тонких кристаллов* (Мир, М., 1968).
18. K. Asami, *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95**, 38 (1986).
19. С. В. Герман, Дисс. ... канд. ф.-м. наук (Саратовский гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2015).

Inclusion of Magnetite Nanoparticles Stabilized with Cetyltrimethylammonium Bromide in the Composition of Liposomes Prepared Using Soy Lecithin

E.V. Shilova, I.A. Koltakov, S.V. Kannykin, and V.G. Artyukhov

Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

Liposomes provide high biocompatibility with the cells of the human body due to the prevalence of membrane lipids in their composition and can be used as an effective tool for targeted delivery of drugs against diseases of different etiology. Interactions between liposomes and target cells can be different: adsorption on the cell surface, endocytosis, fusion of liposomes with cell membranes. However, by incorporation of magnetic nanoparticles into liposomes for active control of an external magnetic field, it is possible to enhance the efficiency and rate of drug release. To create magnetically controlled liposomes, we have chosen nanostructured magnetite obtained in our laboratory. In this work, we used nanoparticles of diameter 4.23 ± 1.19 nm. Surfaces of synthesized magnetite nanoparticles were covered with molecules of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), after that magnetite nanoparticles were included into the composition of liposomes formed with phosphatidylcholine. Quantitative analysis of magneto-sensitive nanoparticles embedded in the lipid bilayer was carried out by spectrophotometry and using the transmission mode in an electron microscope. This study showed that modification of nanostructured magnetite with CTAB increases the efficiency of magnetite nanoparticles incorporation into the lipid bilayer by 31.6%.

Keywords: nanoparticles, magnetoliposomes, magnetite, CTAB

УДК 57.088.1

ИЗМЕРЕНИЕ АДСОРБЦИИ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG НА ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫЕ МЕМБРАНЫ ИЗ НЕЙЛОНА-6

© 2022 г. А.М. Сенковенко*, А.М. Мойсенович*, А.А. Маслакова*,
Е.Р. Павлова**, Д.В. Багров*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

E-mail: bagrov@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

Биосенсоры на основе электроформованных мембран имеют ряд преимуществ перед традиционными биосенсорами, в которых рецепторный слой иммобилизован на плоском носителе. Развитая поверхность электроформованной мембраны позволяет увеличить количество сайтов связывания антитела, но не препятствует использованию классических методов детекции, например, электрохимических. В работе изучена способность электроформованных мембран из нейлона-6 адсорбировать антитела класса IgG. Показано, что при концентрации антител 2.5–10 мкг/мл связывающая способность мембран имеет порядок ~100 мкг/г, а доля антител, адсорбированных из раствора, составляет 40–45%. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что адсорбированные антитела более эффективно вымываются с внешних слоев мембраны, чем с внутренних. Методика измерения связывающей способности мембран, описанная в данной работе, может быть полезна для разработки иммуносенсоров.

Ключевые слова: электроспиннинг, полимерная мембрана, адсорбция, нейлон-6, антитела, иммуноанализ.

DOI: 10.31857/S0006302922030140, EDN: AOOXHP

Биосенсоры – это устройства, предназначенные для обнаружения аналита в пробе и измерения его концентрации. Основопологающим этапом создания биосенсора является функционализация поверхности подложки молекулами, распознающими аналит, например, антителами или высокоаффинными лигандами. Процедура создания рецепторного слоя должна не только иммобилизовать молекулы на поверхности, но также сохранять их функциональность и обеспечивать диффузию аналита [1].

В качестве твердого носителя для иммобилизации рецепторного слоя могут служить мембраны, сформированные методом электроспиннинга (электроформования). Обычно они состоят из нановолокон с диаметрами в диапазоне 100 нм – 1 мкм, что обеспечивает большую площадь поверхности и потенциально высокую связывающую способность. Электроформованные мембраны находят применение в электрохимических

и оптических биосенсорах [2]. Для иммобилизации биологически активных молекул на поверхности волокон существует множество процедур [3]. В простейшем случае рецепторный слой иммобилизуют с помощью физической адсорбции. Ее используют при проведении иммуноферментного анализа в полистирольных планшетах [4], при изготовлении устройств бумажной микрофлюидики [5] и тест-полосок [6], а также сенсоров, использующих электроформованные мембраны в качестве носителей [7, 8]. При разработке биосенсоров возникают задачи оценки связывающей способности подложки по отношению к молекулам рецепторного слоя, а также контроля его однородности. В данной работе эти задачи решены на примере электроформованных мембран из нейлона-6 и мышинных антител класса IgG.

Нейлоны – это класс синтетических термопластичных полиамидов, широко применяемых в производстве одежды и напольных покрытий, для упаковки пищевых продуктов, армирования резины и т.д. Коммерчески доступные нейлоны включают нейлон-6, нейлон-4/6, нейлон-6/6,

Сокращения: КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, PBS – фосфатно-солевой буфер.

нейлон-6/10, нейлон-6/12, нейлон-11 и нейлон-12. Числовая номенклатура нейлона отражает количество атомов углерода в одном мономерном звене (например, нейлон-6), а в случае, если звено нейлона образовано димером, первое число отражает количество атомов углерода в диамине, а второе — в дикарбоновой кислоте (например, нейлон-4/6).

Нейлоны часто используются для иммобилизации белков, в том числе антител. Пористые мембраны из нейлона более активно адсорбируют альбумин, чем мембраны из поливинилиденфторида или большинство мембран из нитроцеллюлозы [9]. Нейлоновые мембраны могут использоваться в разных типах блоттинга [10, 11], для создания электрохимических иммуносенсоров [12] и в других приложениях. Нейлон-6 (рис. 1) гидрофилен (краевой угол смачивания сплошной пленки, приготовленной из расплава, составляет 70° [13]), поэтому мембраны из него хорошо смачиваются водными растворами. Если электроформованная мембрана используется в качестве элемента биосенсора и не полностью смачивается анализируемой пробой, предел детекции может ухудшаться [14].

В данной работе описана методика измерения адсорбции антител класса IgG на электроформованные мембраны. В основе этой методики лежит флуориметрия; для визуализации структуры мембран использованы методы сканирующей электронной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электроспиннинг. Мембраны были изготовлены из раствора нейлона-6 (Sigma-Aldrich, США) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол («ПиМ-Инвест», Россия) с концентрацией 100 мг/мл. Электроспиннинг проводили на установке Nanofiber Electrospinning Unit (Китай). Расстояние и разность потенциалов между иглой шприца и коллектором составляло 30 см и 30 кВ соответственно. Подача полимерного раствора осуществлялась с помощью шприцевого насоса со скоростью 2 мл/ч. Для оценки сорбционной емкости были подготовлены круглые мембраны диаметром 6 мм, которые были вырезаны с помощью лазерной гравировальной машины LaserPro Spirit GLS (GSS, Тайвань), оснащенной инфракрасным CO₂ лазером мощностью 100 Вт.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы мембран из нейлона-6 покрывали слоем золота толщиной 20 нм с использованием установки IonCoater IB-3 (Eiko Engineering, Япония). Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе TM 3000 (Hitachi, Япония) при напряжении 15 кВ.

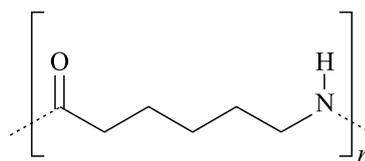


Рис. 1. Химическая структура нейлона-6.

Мечение антител флуорофором. Лиофилизированные иммуноглобулины мыши IgG («Имтек», Москва) растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 0.05% азидом натрия (PBS/NaN₃) в течение 10 мин при легком покачивании. Проводили дополнительную процедуру перевода препарата антител в буфер PBS/NaN₃ методом ультрафильтрации в фильтрующих блоках с порогом 3 кДа (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, UFC800324, Millipore, США). 200 мкг антител метили флуорофором Cy3 с помощью реагента Cy3-NHS (PA13101, Cytiva, США) в термостате при 37°C в течение часа. Препарат IgG-Cy3 очищали от свободного красителя ультрафильтрацией с порогом 30 кДа в фильтрующих блоках (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters, UFC503096, Millipore, США).

Определение связывающей способности. Мембраны из нейлона-6 индивидуально взвешивали на аналитических весах Analytical Plus (Ohaus, США) и помещали в лунки 96-луночного полистирольного планшета с плоским дном (Greiner Bio-One, США). Готовили разведения антител в PBS в концентрациях 10, 5 и 2.5 мкг/мл и добавляли в лунки планшета с мембранами по 100 мкл раствора, а также в пустые лунки для калибровки. На каждую концентрацию антител брали по четыре мембраны. Далее продолжали титровать антитела в пробирках Protein LoBind Tube (022431081, Eppendorf AG, Германия) с шагом в два раза до нижней концентрационной точки, соответствующей 9.77 нг/мл антител, и добавляли по 100 мкл в соответствующие лунки. Планшет герметично закрывали клейкой пленкой, накрывали фольгой и инкубировали в течение полутора часов при комнатной температуре при покачивании со скоростью 200 об/мин. Далее каждую мембрану трижды отмывали PBS с 0.05% Tween-20 в объеме 100 мкл, затем трижды в PBS. Для этого мембраны аккуратно подхватывали пинцетом и переносили в следующий ряд планшета. После последней отмывки мембраны извлекали из растворов и готовили для исследования методом КЛСМ.

Флуориметрия. Измерения флуоресценции от ячеек планшета проводили на многофункциональном планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), оснащенный ксеноновой лампой. Возбуждение флуоресценции происходило на длине волны 530 нм (с использованием

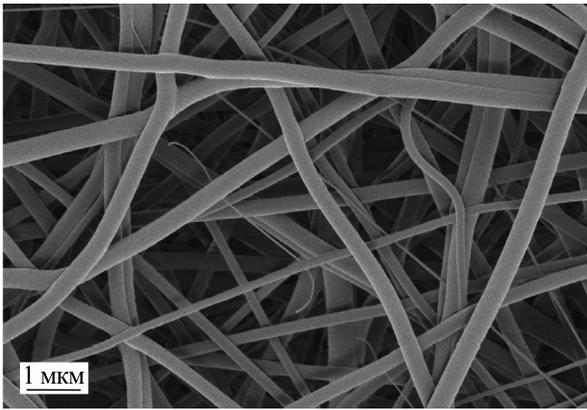


Рис. 2. Изображение поверхности электроформованной мембраны из нейлона-6, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

фильтра 530/20 нм), регистрация эмиссии – на 580 нм (с использованием фильтра 580/30 нм). Перед экспериментом проводили предварительную оптимизацию фокусного расстояния и регулировку усиления сигнала относительно лунки с заведомо максимальным сигналом (точка калибровки с максимальной концентрацией IgG-Су3). Флуоресценцию регистрировали с помощью верхней оптической системы.

По величине флуоресцентных сигналов вычисляли массы антител в каждой из лунок. Калибровочную кривую, т.е. зависимость массы антител в лунке от интенсивности флуоресценции, строили в двойных логарифмических координатах. Связывающую способность мембраны Q вычисляли по формуле

$$Q = \frac{m_{\text{нач}} - m_{\text{ост}} - \sum_i m_{\text{отм } i}}{m_{\text{мембраны}}},$$

долю адсорбированного белка A вычисляли по формуле

$$A = \frac{m_{\text{нач}} - m_{\text{ост}} - \sum_i m_{\text{отм } i}}{m_{\text{нач}}},$$

где $m_{\text{нач}}$ – начальная масса антител в растворе, в который помещали мембрану с массой $m_{\text{мембраны}}$, $m_{\text{ост}}$ – масса антител, оставшихся в лунке после инкубации мембраны в ней, $m_{\text{отм } i}$ – масса антител в тех лунках, в которых мембрану отмывали.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Измерения методом КЛСМ проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Мембраны, обработанные растворами флуоресцентно меченых антител, размещали между парой покровных стекол в смеси глицерина и желатина. Образец

помещали на предметный столик микроскопа, определяли верхнюю и нижнюю поверхности мембраны и фокусировали лазер на равном расстоянии от них для настройки динамического диапазона. Коррекцию настроек по оси z проводили в соответствии с рекомендациями производителя с использованием программного обеспечения NIS-Elements.

Для визуализации структуры мембран и измерения их толщины настройки (мощность лазера, коэффициент усиления, скорость сканирования, количество точек) оптимизировали для каждого образца. Изображения получали с помощью объективов CFI Plan Apo VC 20×/0.75 и Apo TIRF Plan Fluor 63×/1.49. Для оценки количества адсорбированных антител изображения получали при одинаковой мощности лазера, чувствительности детектора и скорости сканирования; использовали объектив CFI Plan Apo VC 20×/0.75.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электроформованные мембраны были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 2). Мембраны состояли из гладких цилиндрических волокон без утолщений и «бусин» на их поверхности. Средний диаметр волокон мембраны составил 280 ± 150 нм (среднее \pm стандартное отклонение).

Электроформованные мембраны имели диаметр 6 мм и толщину $\sim 30\text{--}70$ мкм – их массы составляли менее 1 мг. Масса антител, адсорбированных на такую мембрану, еще на несколько порядков меньше, и зарегистрировать ее на весах практически невозможно. Тем не менее, ее можно вычислить с помощью оптических измерений.

Для растворов иммуноглобулинов мыши с концентрациями 2.5, 5 и 10 мкг/мл были вычислены связывающие способности мембран, а также доли белка, адсорбированного мембраной (рис. 3). Связывающая способность увеличивалась при увеличении концентрации антител, что можно ожидать при малых концентрациях. По данным атомно-силовой микроскопии при адсорбции глобулярных белков на плоскую поверхность из раствора с концентрацией $\sim 1\text{--}10$ мкг/мл, формируется не монослой, а покрытие из отдельных молекул [15].

Для сравнения: при адсорбции липазы на волокнистые мембраны из нейлона-6 также наблюдались линейные зависимости связывающей способности от концентрации белка в растворе [16]. Эти эксперименты выполнялись с растворами, имеющими концентрации порядка ~ 1 мг/мл, что как минимум на два порядка больше, чем концентрации, использованные в данной работе. Величина связывающей способности нейлоновых мембран по отношению к IgG составляла менее

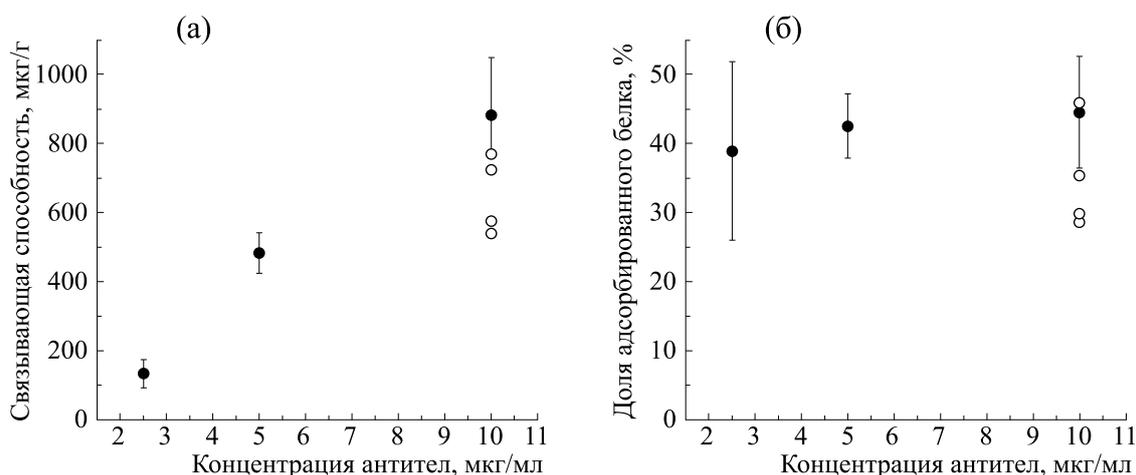


Рис. 3. Зависимости удельной связывающей способности мембраны (а) и доли адсорбированного белка (б) от концентрации антител в растворе. Светлые кружки соответствуют экспериментам с мембранами из нейлона, которые инкубировали в PBS, а затем погружали в раствор антител с концентрацией 10 мкг/мл.

1 мг/г (рис. 3а) — настолько малые значения, скорее всего, также объясняются низкими концентрациями антител. Для количественного измерения адсорбции антител на электроформованные мембраны массу антител иногда нормируют на площадь мембраны. При таких расчетах мы получаем адсорбцию в диапазоне $0.35\text{--}1.4$ мкг/см² — это близко к адсорбции антител на мембраны из нитроцеллюлозы (1.36 ± 0.64 мкг/см²) и полилактида (6.35 ± 0.64 мкг/см²) из раствора с концентрацией 20 мкг/мл [17].

По проведенным измерениям можно оценить долю молекул белка, адсорбированных на мембрану после ее инкубации в растворе (рис. 3б). Эта величина слабо зависела от концентрации антител, и составляла 40–45%. Для сравнения: электроформованные мембраны из поли(ε-капролактона) в аналогичных экспериментах адсорбировали 35% антител, и эту долю можно было увеличить до 52%, если добавить в раствор 200 мМ Na₂SO₄ [18]. Указанная доля определяется прежде всего энергией взаимодействия между антителами и поверхностью нейлоновых мембран. Оказалось, что если мембраны предварительно проинкубировать в PBS в течение 12 ч, то доля адсорбированных антител снижается. Такой эксперимент был проведен с растворами антител, концентрация которых составляла 10 мкг/мл — соответствующие количественные характеристики адсорбции антител показаны на рис. 3 светлыми кружками (приводятся индивидуальные экспериментальные точки, среднее значение составляет $35 \pm 7\%$). Снижение адсорбции может

объясняться тем, что инкубация мембран в PBS компенсирует электростатический заряд, который остается после электроспиннинга [19].

После инкубации в растворах флуоресцентно меченых антител мембраны исследовали методом КЛСМ. Типичное изображение мембраны показано на рис. 4.

Характерная яркость увеличивалась по мере увеличения концентрации — это заметно, если получить изображения всех мембран при одних и тех же настройках (рис. 5). Действительно, при постоянстве динамического диапазона на полученных изображениях мембран, обработанных антителами, мода интенсивности увеличивалась по мере увеличения концентрации антител.

Метод КЛСМ позволяет увидеть волокнистую структуру и измерить толщину окрашенного слоя мембран — она была линейно связана с их массой (рис. 6а), (коэффициент детерминации $R^2 = 0.88$). Согласно полученным изображениям (рис. 4), центральная область мембраны (слои) флуоресцирует более интенсивно, чем поверхность, т. е. с поверхности антитела были смыты. Действительно, молекулы белка, иммобилизованного на поверхности с помощью физической адсорбции, могут быть десорбированы с нее сравнительно легко, что было показано для многих поверхностей и, в частности, для нейлона-6 [9]. Таким образом, толщина окрашенного слоя систематически оказывалась меньше, чем толщина мембраны.

Электроформованные мембраны, полученные в одинаковых условиях, могут иметь вариации толщины, а также вариации диаметров волокон и

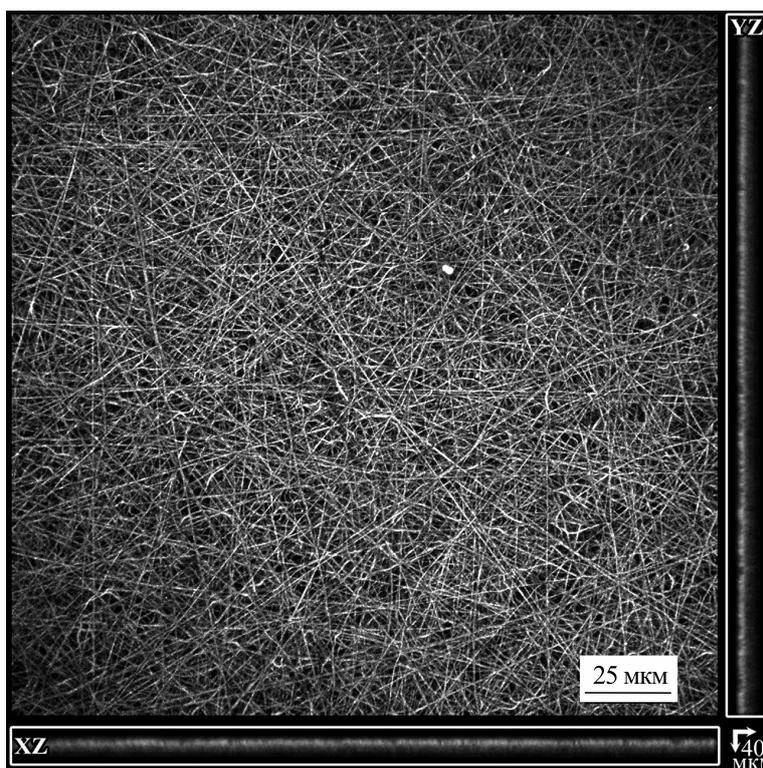


Рис. 4. Изображение мембраны, обработанной раствором флуоресцентно меченых антител с концентрацией 10 мкг/мл, полученное с использованием КЛСМ.

плотности их укладки [20]. Наблюдаемая линейная зависимость толщины окрашенного слоя от массы мембран косвенно указывает на постоянство их плотности — с учетом неоднородностей флуоресцентного окрашивания. Эти неоднородности, в частности, приводили к разбросу

измеряемых значений толщины мембраны. Действительно, при увеличении концентрации снижалось стандартное отклонение толщины окрашенного слоя и относительная погрешность измерения толщины (отношение стандартного отклонения к средней толщине, рис. 6б).

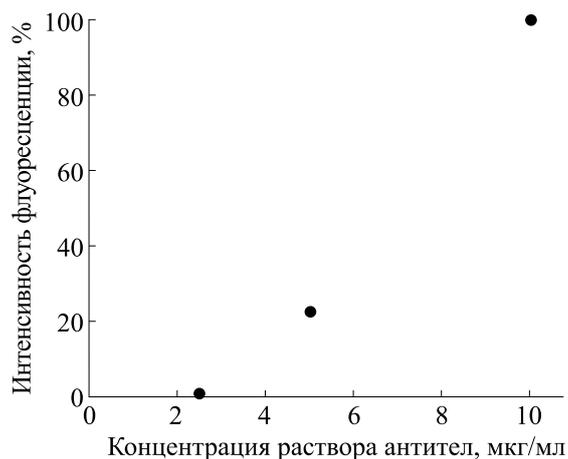


Рис. 5. Зависимость моды интенсивности флуоресценции на изображениях мембран от концентрации раствора антител, в котором их инкубировали.

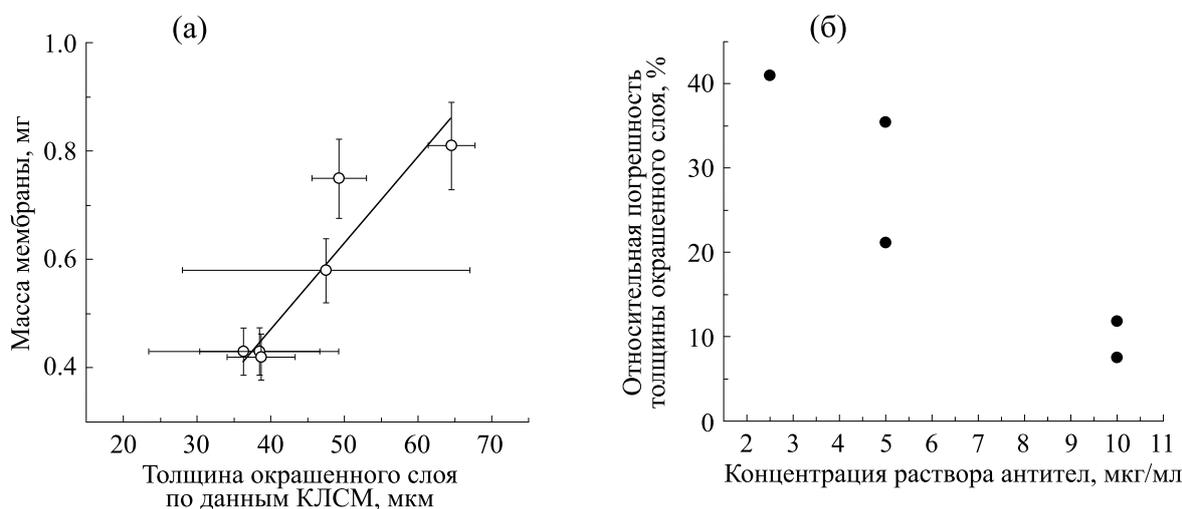


Рис. 6. Взаимосвязь между массой мембраны и ее толщиной (а) и влияние концентрации раствора антител на относительную погрешность толщины мембран, измеряемой КЛСМ (б). Каждая точка на графике соответствует одной мембране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом электроспиннинга были изготовлены электроформованные мембраны с толщиной ~40–70 мкм, состоящие из волокон со средним диаметром 280 ± 150 нм. Была измерена адсорбция антител IgG на поверхность этих мембран; после полутора часов инкубации связывающая способность составляла порядка ~100 мкг/г и увеличивалась при увеличении концентрации антител в растворе.

При разработке биосенсоров необходимо контролировать рецепторный слой – его структуру, однородность, стабильность и воспроизводимость. Если подложкой для его иммобилизации является электроформованная мембрана, то исследование свойств рецепторного слоя может оказаться сложным, вследствие гибкости и оптической непрозрачности (диффузного рассеяния света) мембран. Описанные в данной работе методики помогают преодолеть эти сложности, измерить связывающую способность электроформованных мембран и проконтролировать однородность адсорбции молекул на поверхности волокон.

БЛАГОДАРНОСТИ

Измерения методами сканирующей электронной микроскопии и КЛСМ выполнены с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова до 2020 года. Авторы работ благодарят Научно-образовательную школу МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-10042.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. A. Mercante, A. Pavinatto, T. S. Pereira, et al., *Sensors and Actuators Reports* **3**, 100048 (2021).
2. N. Aliheidari, N. Aliahmad, M. Agarwal, and H. Dalir, *Sensors* **19**, 3587 (2019).
3. S. Smith, K. Goodge, M. Delaney, A. Struzyk, et al., *Nanomaterials* **10**, 1 (2020).
4. A. Nieto, A. Gayá, C. Moreno, et al., *Ann. l'Institut Pasteur / Immunol.* **137**, 161 (1986).
5. R. C. Murdock, L. Shen, D. K. Griffin, et al., *Anal. Chem.* **85**, 11634 (2013).
6. Z. Chen, K. Zhou, W. Ha, et al., *Food Agric. Immunol.* **30**, 497 (2019).
7. D. Yang, X. Niu, Y. Liu, et al., *Adv. Mater.* **20**, 4770 (2008).
8. J. Wang, Q. S. Kang, X. G. Lv, et al., *PLoS One* **8**, 1 (2013).
9. E. R. Tovey and B. A. Baldo, *J. Biochem. Biophys. Methods* **19**, 169 (1989).

10. S. Pierotti, C. Albano, A. Milandri, et al., *Toxicon* **49**, 36 (2007).
11. A. Dubitsky, D. DeCollibus, and G. A. Ortolano, *J. Biochem. Biophys. Methods* **51**, 47 (2002).
12. R. Shaimi and S. C. Low, *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 40 (2018).
13. *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Ed. By F. M. Fowkes (Advances in Chemistry, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1964), vol. 43.
14. J. S. Hersey, A. Meller, and M. W. Grinstaff, *Anal. Chem.* **87**, 11863 (2015).
15. G. C. Ratcliff and D. A. Erie, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5632 (2001).
16. H. Y. Y. Zeng, X. Y. Y. Liu, P. He, et al., *Biocatal. Bio-transformation* **32**, 188 (2014).
17. F. Ma, L. He, E. Lindner, and D. Y. Wu, *Appl. Surf. Sci.* **542**, 21 (2021).
18. D. Wu, D. Han, and A. J. J. Steckl, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 252 (2010).
19. H. Esfahani, M. P. Prabhakaran, E. Salahi, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **443**, 143 (2015).
20. L. D. Burke, K. A. Blackwood, and F. Z. Volpato, in *Electrospun Biomater. Relat. Technol.*, Ed. by J. Almodovar (Springer Int. Publ., Cham, 2017), pp. 1–19.

Measurements of IgG Antibodies Adsorption onto Electrospun Nylon-6 Membranes

A.M. Senkovenko*, A.M. Moysenovich*, A.A. Maslakova*,
E.R. Pavlova*, **, and D.V. Bagrov*

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119435 Russia

Biosensors based on electrospun membranes have some advantages over the traditional biosensor devices that include a receptor layer immobilized on a flat support. Due to the large surface area of the electrospun membrane, the number of analyte-binding sites increases but it does not interfere with traditional detection methods (e.g., electrochemical detection). In this study, the adsorption of IgG antibodies onto electrospun nylon-6 membranes was explored. It was shown that at an antibody concentration of 2.5–10 µg/ml, the membrane had a binding capacity of ~100 µg/g and the volume fraction of the adsorbed antibodies was 40–45%. Using laser scanning confocal microscopy, it was found that the adsorbed antibodies were washed from the outer layers of the membrane more efficiently than from the inner layers. The procedure for measuring the binding capacity of membranes introduced in this paper can be a useful tool in developing immunosensors.

Keywords: electrospinning, polymer membrane, adsorption, nylon-6, antibodies, immunoassay

ПАРАМЕТРЫ УПРАВЛЕНИЯ РАЗДЕЛЕНИЕМ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ КРЫС, ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПОЛЕ СТОЯЧЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОЛНЫ

© 2022 г. Т.Н. Пашовкин, Д.Г. Садикова

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: pashovkin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Исследованы параметры управления разделением клеток эритроцитов и лимфоцитов, и показана возможность быстрого (минуты) разделения клеток крови на фракции в поле стоячей ультразвуковой волны. Выделено семь основных параметров управления, связанных: с энергией поля стоячей ультразвуковой волны, с линейной скоростью прокачки суспензии клеток, геометрическими размерами клеток, соотношением плотностей клеток и сред суспендирования, соотношением скоростей ультразвука в материале клеток и средах суспендирования. Показано, что при условии эффективного термостатирования камер ультразвуковых систем разделения и концентрирования с суспензией клеток возможно резкое (более чем на порядок) сокращение времени разделения и концентрирования клеток не только разного вида, но и близких по размерам одинаковых клеток, выделенных из крови разных видов животных.

Ключевые слова: ультразвук, стоячие волны, акустический импеданс, плотность, скорость продольных волн, клетки, эритроциты, лимфоциты, разделение, концентрирование.

DOI: 10.31857/S0006302922030152, **EDN:** AOUXNJ

Явление формирования узлов давления акустических колебаний давно известно. Еще 200 лет назад Э. Хладни показал, что на резонансных пластинах возможно создание геометрических узоров из песка во время его движения к узловым точкам [1]. Данные закономерности были названы фигурами Хладни.

Тот же самый эффект можно наблюдать при воздействии стоячей ультразвуковой волны на частицы или клетки в суспензии. При этом на взвешенные частицы воздействует первичная акустическая сила (сила радиационного давления), в результате чего частицы движутся к узлам или пучностям стоячей волны в зависимости от свойств материала частицы и среды. При движении в среде частицы могут сливаться в агрегаты. Изменяя силу Стокса, можно осуществить разделение частиц по их размеру и свойствам.

Разделение частиц имеет большое значение в таких областях как нефтехимия, биотехнология, фармацевтика, химия, медицина и клеточная

Сокращение: ПУС – продольное ультразвуковое селективное.

биология. Возможность разделения клеток в объеме под действием силы радиационного давления в поле стоячей волны и силы Стокса привела к развитию ряда новых методов концентрирования и разделения клеток в поле стоячей ультразвуковой волны для научных исследований в области биологии клетки и медицины [2–9]. В последнем случае это связано с возможностью увеличения эффективности подготовки проб для анализа крови за счет значительного уменьшения времени выделения клеток, необходимых для работы, и увеличения времени работы с этими клетками. Дальнейшее развитие ультразвуковых методов разделения и концентрирования клеток, выделенных из различных биологических объектов, зависит не только от разработки новых, более совершенных методов концентрирования и разделения с помощью ультразвуковой техники, но и от изучения физических процессов, которые являются основополагающими для этих методов.

Целью нашей работы было показать возможность разделения разных видов клеток крови с помощью метода продольного ультразвукового селективного.

ПРИНЦИП РАБОТЫ СИСТЕМ
УЛЬТРАЗВУКОВОГО РАЗДЕЛЕНИЯ
И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ КЛЕТОК В ПОЛЕ
СТОЯЧЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОЛНЫ

В нашей работе используется система продольного ультразвукового селективного разделения, показанная на рис. 1. Данная система состоит из одного пьезоэлектрического преобразователя и камеры, в которой создается стоячая волна [10, 11]. Камера располагается в системе термостатирования. Одновременно термостатирующая жидкость является контактной средой между излучателем и ячейкой. Поле стоячей ультразвуковой волны в камере образуется за счет интерференции волн, падающих под разными углами. В результате этого в камере образуются пучности и узлы давления.

Концентрирование клеток в проточной системе зависит как от действия силы радиационного давления, которое возникает в ультразвуковом поле, так и за счет потока жидкости вокруг частиц, удерживаемых полем. Силу радиационного давления для эритроцитов можно выразить следующим образом [12]:

$$F = \frac{D^2}{4} \pi \bar{E} k H K \sin(2kx), \quad (1)$$

где $\bar{E} = \frac{I}{C_0}$ – средняя плотность энергии (I – интенсивность ультразвукового поля, C_0 – скорости ультразвука в частицах и суспендирующей среде соответственно), D – диаметр эритроцитов, H – высота эритроцитов, K выражается как:

$$K = \left[\frac{\frac{\rho_0}{\rho}}{\left(\frac{c}{c_0}\right)^2} - \frac{1 + 2\left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)}{2 + \frac{\rho_0}{\rho}} \right],$$

где ρ и ρ_0 – плотность частицы и среды соответственно.

Для лимфоцитов сила радиационного давления:

$$F = 4/3 \pi E k r^3 K \sin(2kx), \quad (2)$$

где r – радиус лимфоцитов.

Когда частицы находятся в жидкости, которая осуществляет ламинарное движение вдоль всей ячейки, на них действует сила Стокса, которая выражается как:

$$F_{тр} = 6\pi r \nu \eta, \quad (3)$$

где r – радиус клеток, ν – скорость потока жидкости, η – вязкость жидкости.

Когда на частицы действует сила радиационного давления, их направление в акустическом поле определяется коэффициентом K . Если $K < 0$, то частицы будут двигаться к узлу давления, если $K > 0$, то частицы будут двигаться к пучности. Большинство частиц имеют отрицательный коэффициент K , в соответствии с этим они движутся к узлу акустического давления.

В данной работе проведено исследование эритроцитов и лимфоцитов, и показана возможность разделения клеток крови на фракции. Для этого мы выделяли и сравнивали между собой эритроциты и лимфоциты крыс. В том числе были исследованы параметры эритроцитов человека, чтобы понять, возможно ли разделение клеток

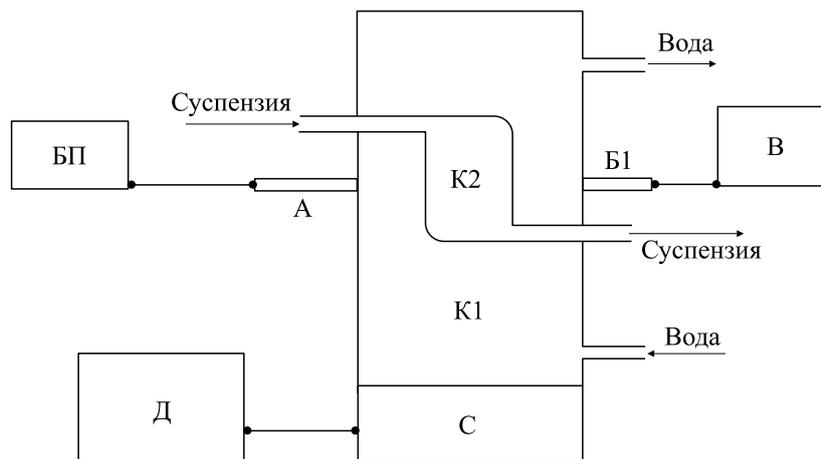


Рис. 1. Устройство продольного ультразвукового селективного разделения: К1 – внешняя термостатирующая камера, К2 – термостатируемая камера разделения и концентрирования клеток, С – ультразвуковой излучатель, Д – генератор ультразвука, А – лазерный излучатель, В – приемник светового излучения, БП – блок питания лазера, В – компьютерная система анализа сигнала.

с небольшим различием в физических свойствах (в данном случае эритроцитов крыс и человека).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования мы использовали эритроциты и лимфоциты крысы, а также эритроциты человека. Выбор объектов исследования объясняется различием их свойств.

Эритроциты крысы были получены из хвостовой вены крыс Вистар. Кровь помещали в 0.9%-й физиологический раствор NaCl с добавлением гепарина. Затем клетки трижды промывали и разводили в 0.9% NaCl до требуемой концентрации.

Лимфоциты получали из цельной крови крыс серии Вистар, выделенных по методике, описанной в работе [13].

После декапитации животного в собранную кровь добавляли гепарин. Затем кровь с гепарином разводили в фосфатно-солевом буфере с ЭДТА в соотношении 1:2. В пробирки типа «Эппендорф» (2 мл) на 0.5 мл верофиколла аккуратно наслаивали по 1.5 мл разведенной крови. Центрифугировали 20 мин при 3400 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). После центрифугирования образовывался осадок эритроцитов и пленка гранулоцитов на поверхности осадка. На границе верофиколла и плазмы располагался тонкий слой мононуклеаров – лимфоцитов и моноцитов. Этот слой отбирали в отдельную пробирку и отмывали от верофиколла и плазмы в фосфатно-солевом буфере с ЭДТА, для этого центрифугировали содержимое 7 мин при 2600 об/мин. Надосадочную жидкость убирали и суспендировали осадок.

Эритроциты человека были получены капиллярным методом. Кровь помещали в 0.9%-й физиологический раствор NaCl с добавлением гепарина. Затем клетки трижды промывали и разводили в 0.9% NaCl до требуемой концентрации.

Размер клеток определяли с помощью световой микроскопии. С этой целью клетки в камере Горяева были сфотографированы с помощью видеоокуляра. Затем измеряли диаметр клетки. В случае эритроцитов измеряли не только наружный диаметр, но и диаметр двояковогнутой мембраны. С использованием трассировки IGL 1.26b [14] измеряли диаметр клеток.

Плотность клеток рассчитывали по весу сухой клетки, определяемой путем испарения воды из суспензии клеток в термостате до постоянной массы с учетом концентрации и объема клеток. Взвешивание проводили с использованием микровесов (Mettler, Швейцария) с точностью 0.0001 г.

Плотность вычислялась далее по формуле: $\rho = m/V$, где m – масса, V – объем клеток. Стати-

стическую обработку результатов проводили с помощью программы Sigma Plot 8.

Метод продольного ультразвукового селектирования. Метод разделения и концентрирования основан на принципе, названном его автором Н.Н. Князьковым [10, 11] продольным ультразвуковым селектированием (ПУС) суспензий. Данный метод заключается в том, что клетки ограничены полем стоячей ультразвуковой волны во время течения суспензии вдоль направления распространения ультразвука. В этом случае на частицы в поле стоячей волны воздействуют различные силы.

Чтобы обеспечить эффективную реализацию способа, длина волны ультразвука выбирается из соотношения $\lambda \leq 2na$, где λ – длина волны ультразвука и a представляет собой характерный размер n частиц, смещаемых полем. Если это условие нарушается, то использование силы излучения становится неэффективным.

Из-за сложной зависимости силы излучения от характеристик системы ПУС способ работы не может быть описан простым математическим выражением. Поэтому скорость жидкости и интенсивность ультразвукового поля определяются экспериментально для каждого конкретного случая.

Устройство для разделения и концентрирования жидкой дисперсионной системы (рис. 1) содержит камеру К1 с входными и выходными трубками для перекачки клеточных суспензий, которая помещена в стеклянную термостатирующую камеру К2. Излучатель с рабочей частотой 2.64 МГц установлен в конце камеры К2. Стеклянная поверхность 3 на другом конце камеры К2 служит отражателем; таким образом, генерируется стоячая ультразвуковая волна. В двух системах ПУС был использован фокусирующий преобразователь площадью 4 см². В фокальной области ультразвукового поля радиус фокального пятна и длина фокальной области составляли 1.2 и 7 мм соответственно. Интенсивность ультразвука контролировали с помощью дифференциальной термомпары, калиброванной по интенсивности ультразвука. Затем проводили пересчет интенсивности в среднюю плотность энергии в фокальной области излучателя.

Экспериментальное определение граничных условий концентрирования/разделения для тестируемых клеток в стоячей ультразвуковой волне. Определение граничных условий для концентрирования/разделения в поле ультразвука выполняли с использованием камер для разделения методом ПУС (рис. 1).

Пример концентрирования клеток методом ПУС приведен на рис. 2.



Рис. 2. Концентрирование клеток в поле стоячей ультразвуковой волны при $f = 2.64$ МГц: эритроциты крысы. Стрелки указывают камеры, в которых сосредоточены клетки. Время концентрирования составляет 0, 5 и 10 мин после включения ультразвука. Средняя плотность энергии составляет $1.2 \cdot 10^{-4}$ Дж/см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании системы для концентрирования с протоком суспензии, необходимо рассматривать движение клеток под действием радиационной силы при наличии влияния на них потока жидкости. При концентрировании клеток в ультразвуковой стоячей волне на них действует не только сила радиационного давления и трения (сила Стокса), но и другие силы, которые либо компенсируют друг друга, либо пренебрежимо малы. Исследуя силы радиационного давления и Стокса, можно подбирать граничные условия для разделения и концентрирования клеток в суспензии в поле стоячей ультразвуковой волны.

В табл. 1 приведены результаты измерений некоторых физических параметров клеток (эритроцитов крысы, эритроцитов человека и лимфоцитов крысы), использованных при расчетах сил, действующих на клетки в поле стоячей ультразвуковой волны.

Используя полученные данные, приведенные в табл. 1, мы вычислили силу радиационного давления и силу Стокса. Сила радиационного давления или радиационная сила и силы Стокса были рассчитаны по формулам (1, 2) и (3) соответственно. В результате расчетов были получены радиационные силы и силы Стокса, как представлено в табл. 2.

Математически сила радиационного давления для всех клеток имеет отрицательный знак. Физически это означает, что все типы рассматриваемых клеток перемещаются, а затем собираются в узлах переменного давления. Зависимость силы радиационного давления от средней плотности энергии ультразвукового поля для эритроцитов крысы, лимфоцитов крысы и эритроцитов человека линейна с углом наклона, характерным для каждого типа клеток.

Чтобы получить граничные значения линейной скорости прокачки суспензии клеток в камере для ультразвукового концентрирования, необ-

Таблица 1. Измеренные параметры клеток и сред суспендирования

	Свойства клеток			Свойства сред суспендирования		
	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека	Дистиллированная вода	0.9% NaCl	Фосфатно-солевой буфер
Плотность, кг/м ³	1.092	1.107	1.038	0.999	1.005	1.004
Размеры, мкм	6.8	3	7.5	–	–	–
Скорость ультразвука, м/с	1584.2	1591.6	1569.2	1484.2	1507	1493.4

Таблица 2. Силы, действующие на клетки в поле стоячей ультразвуковой волны

	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека
Радиационная сила, Н	$1.918 \cdot 10^{-11}$	$0.33 \cdot 10^{-11}$	$2.56 \cdot 10^{-11}$
Сила Стокса при $v = 1$ см/мин, Н	$1.068 \cdot 10^{-11}$	$0.4712 \cdot 10^{-11}$	$1.178 \cdot 10^{-11}$

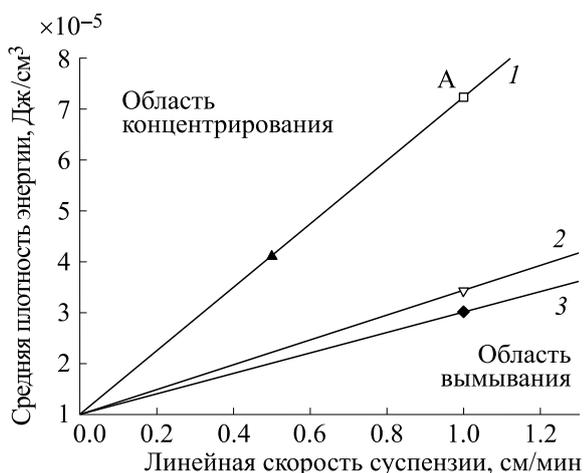


Рис. 3. Определение областей концентрации, разделения и вымывания для трех типов клеток в системе координат средней плотности энергии стоячей ультразвуковой волны и линейной скорости потока суспензии клеток. Теоретически рассчитанные линии разделения областей и экспериментальные данные (символы) для лимфоцитов крысы (1), эритроцитов крысы (2) и эритроцитов человека (3). А — Теоретически рассчитанная граничная точка для лимфоцитов при скорости прокачки суспензии клеток 1 см/мин.

ходимо было сравнить радиационные силы, действующие на клетки при разных средних плотностях ультразвуковой энергии с силами Стокса, действующей на клетки при наличии потока сред суспендирования, либо потока суспензии клеток [15].

При условии, что $F_r \geq F_{S1}$, клетки будут удерживаться в ультразвуковом поле (F_r — радиационная сила, F_{S1} — сила Стокса).

Результаты теоретических расчетов представлены в виде графиков со средней плотностью энергии ультразвукового поля и линейной скоростью потока суспензии ячейки в качестве осей координат, а также в табл. 2. Прямые линии на графиках разделяют области концентрации клеток, разделения и вымывания. Наклон этих прямых линий является характеристикой определенного типа ячейки. Сравнение таких зависимостей для трех типов клеток показывает, что существует область, в которой клетки одного типа будут вымы-

ваться, а клетки другого типа будут концентрироваться (рис. 2). Области между двумя типами клеток будут областями разделения клеток на фракции. Таким образом, можно определить параметры ультразвукового поля и скоростей прокачки суспензий клеток, при которых будет наблюдаться как концентрирование, так и разделение клеток.

Чтобы проверить выбранные граничные условия, представленные в табл. 3, мы провели ряд экспериментов по изучению удерживания клеток в камере для ультразвуковой сепарации при различных скоростях прокачки среды суспендирования. Для этого в каждом эксперименте в камеру помещали фиксированное количество клеток.

Для изменения скорости потока клеточной суспензии использовали перистальтический насос, откалиброванный перед каждым экспериментом. Для регулирования скорости прокачки суспензии клеток были использованы трубки разного диаметра (1–5 мм). Клеточная суспензия заполняла камеру К2 (рис. 1). Затем накладывалось ультразвуковое поле. Через камеру пропускали постоянный объем среды суспендирования. Затем суспензию клеток забирали из камеры К2. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. В этом случае количество ячеек было рассчитано в пяти или более больших квадратах. Для каждого типа клеток было проведено не менее пяти экспериментов. Таким образом, была определена средняя концентрация клеток, которые удерживаются в стоячей ультразвуковой волне, и ошибки среднего значения.

Рис. 4–6 показывают, что при заданной скорости прокачки и средней плотности энергии концентрация клеток соответствует теоретическому ожиданию нашего эксперимента. Поэтому можно сделать вывод, что для каждого изучаемого вида клеток рассматриваемая теория действия акустических сил применима с высокой степенью точности.

Исходя из данных, представленных в табл. 1 и 3, можно сказать, что плотность и размер клетки играют наиболее важную роль при управлении смещением частиц с помощью поля стоячей ультразвуковой волны. При этом размер в нашем случае играет определяющую роль. Несмотря на прямую зависимость средней плотности энергии от размера клеток, использовать только один па-

Таблица 3. Выбранные для экспериментальной проверки значения средней плотности энергии на теоретически определенных граничных прямых

	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека
$E \cdot 10^{-5}$, Дж/см ³	55.6	71	46

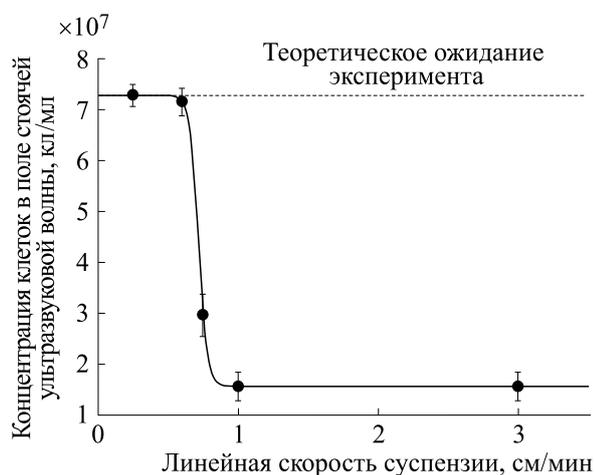


Рис. 4. Зависимость концентрации лимфоцитов от линейной скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $71 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

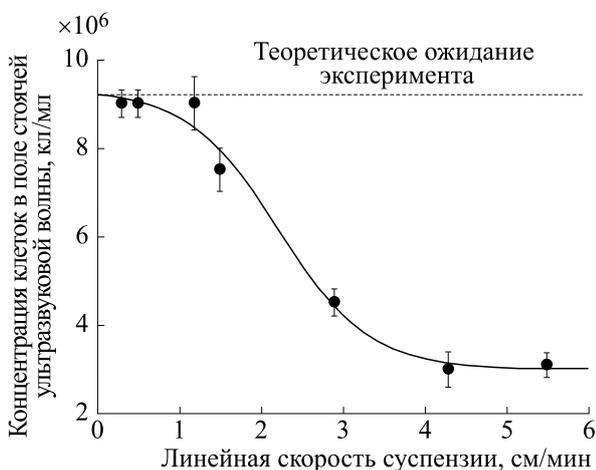


Рис. 5. Зависимость концентрации эритроцитов человека от линейной скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $46 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

раметр для получения угла наклона не корректно. Такое упрощение привело бы к неточности, что не позволило бы эффективно разделить клетки близкие по размеру, такие как эритроциты человека и крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разделение клеток с помощью стоячих акустических волн является перспективной технологичной альтернативой обычным методам разделения и выделения, таких как фильтрование, центрифугирование, гравитационного осаждения и многих других. В настоящий момент технология концен-

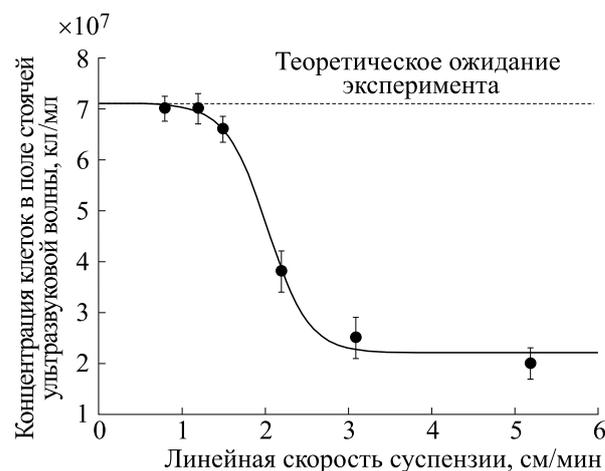


Рис. 6. Зависимость концентрации эритроцитов крысы от скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $55.6 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

трирования и разделения клеток в суспензии в стоячей ультразвуковой волне успешно используется в отдельных лабораториях.

В целом мы теоретически и экспериментально продемонстрировали возможность концентрирования и разделения клеток с разной плотностью, размером и другими физическими свойствами. Было показано, что существует возможность успешного разделения данных клеток без использования нескольких ультразвуковых излучателей и камер.

Как показывают теоретические исследования данного вопроса, эффективность разделения можно повысить за счет увеличения мощности и/или снижения скорости прокачки суспензии в камере.

Несмотря на всю сложность данного явления, мы считаем, что для полноценного использования метода для большинства видов клеток достаточно рассмотрения двух сил — силы радиационного давления и силы Стокса. Данные силы включают в себя все необходимые параметры для управления перемещением клеток в ультразвуковом поле. Такой подход позволяет упростить в дальнейшем проектирование оборудования для ультразвукового концентрирования и разделения клеток.

Несомненно, усложнение геометрии используемых частиц (клеток) требует дополнительного исследования для эффективной работы с такими клетками.

Данный метод разделения клеток в поле стоячей ультразвуковой волны имеет большой потенциал для использования в качестве дополнительного оборудования в медицинских, биологических и биотехнологических лабораториях, а

также получить развитие для применения на производстве.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. S. Bardell, *J. Sound Vib.* **174** (5), 655 (1994).
2. J. J. Hawkes and W. T. Coakley, *Sens. Act. B: Chem.* **75** (15), 213 (2001).
3. C. M. Cousins, J. R. Melin, W. A. Venables, and W. T. Coakley, *Bioseparation*, **9**, 343 (2001).
4. R. Bosma, W. A. van Spronsen, J. Tramper, and R. H. Wijffels, *J. Appl. Phycol.* **15**, 143 (2003).
5. G. D. Pangu and D. L. Feke, *Chem. Eng. Sci.* **64** (7), 1445 (2009).
6. T. Franke, S. Braunmüller, L. Schmid, et al., *Lab Chip* **10**, 789 (2010).
7. T. Franke, A. R. Abate, D. A. Weitza, and A. Wixforth, *Lab Chip* **18**, 2625 (2009).
8. D. Foresti, N. Bjelobrk, M. Nabavi, and D. Poulidakos, *J. Appl. Phys.* **109** (9), 093503 (2011). DOI: 10.1063/1.3571996
9. G. R. Goddard, C. K. Sanders, J. C. Martin, et al., *Anal. Chem.* **79** (22), 8740 (2007).
10. N. N. Knyaz'kov and G. V. Shil'nikov, *Bull. Exp. Biol. Med.* **121** (3), 287 (1996).
11. N. N. Knyaz'kov, E. D. Makarova, and A. D. Rabinovich, *Sci. Instrument*, **19** (1), 40 (2008).
12. В. А. Шутилов, *Основы физики ультразвука* (Изд-во ЛГУ, Л., 1980), сс. 114–117.
13. Л. Б. Хейфец и В. А. Абалакина, *Лаб. дело*, № 10, 579 (1973).
14. J. C. Fiala, In *Proc. Int. Joint Conf. on Neural Networks* (Honolulu, HI, 2002), pp. 1–4/
15. T. N. Pashovkin and D. G. Sadikova, *Acoust. Phys.* **55** (4–5), 584 (2009).

Parameters of Control Scheme for Monitoring Separation and Concentration of Murine Erythrocytes and Lymphocytes and Human Erythrocytes in the Field of a Standing Ultrasonic Wave

T.N. Pashovkin and D.G. Sadikova

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya ul. 3, 142290 Russia

In this paper, the parameters of control scheme for monitoring the separation of erythrocyte and lymphocyte cells are investigated, and the possibility of rapid separation of blood cells (within minutes) for fractioning blood components in the field of a standing ultrasound wave is shown. The seven key parameters of control scheme that are associated with the energy density in the field of the standing ultrasonic waves, the linear flow velocity of cell suspension, the geometric dimensions of the cells, cell number per suspension media volume, the ratio of ultrasonic velocity related to cell density to that in suspension media are identified. It is shown that effective temperature control of ultrasonically treated cell suspension in the processing chamber can drastically shorten the time (more than ten times larger) required for separation and reduction in concentration of cells not only of different types, but also of similar-sized identical cells isolated from blood of different animal species.

Keywords: ultrasound, standing waves, acoustic impedance, density, velocity of longitudinal waves, cells, erythrocytes, lymphocytes, separation, concentration

УДК 577.323: 576.385: 612.014.464

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ МЫШИ И КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MDA-MB-231 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОЗОНА, ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ГЕМЦИТАБИНА

© 2022 г. А.Б. Гапеев*, Е.С. Жукова**, В.А. Синельникова***, Г.Ю. Балакин***,
М.Ю. Земскова****, Г.К. Рысцов****, Т.Г. Щербатюк**, ***

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

**Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, 603005, Нижний Новгород, ул. Семашко, 20

***Пушинский государственный естественно-научный институт Минобрнауки России, 142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

****Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 5

E-mail: a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

Проведено сравнительное исследование генотоксической активности медицинского озона и пероксида водорода в отношении нормальных лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей линии Kv:SHK и клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231 *in vitro*. На основе данных, полученных методом ДНК-комет, определен интервал от минимальной концентрации, вызывающей повреждение ДНК опухолевых клеток, до минимальной генотоксической концентрации для нормальных клеток крови в пределах от 0.2 до 0.4 мг/л для озона в озон-кислородной смеси и от 0.1 до 3.0 мкМ для пероксида водорода. В установленных диапазонах озон по сравнению с пероксидом водорода проявляет меньшую генотоксическую активность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы. При комбинировании озона с концентрацией 0.4 мг/л в озон-кислородной смеси с цитостатическим препаратом гемцитабином наблюдалось потенцирование генотоксического эффекта цитостатика: повреждающее действие цитостатика на ДНК клеток увеличилось более чем в два раза. Предполагается, что усиление генотоксического эффекта гемцитабина в комбинации с озоном связано с интенсификацией инкорпорирования в структуру ДНК его основных метаболитов в результате стимулирования процессов репарации ДНК.

Ключевые слова: озон, пероксид водорода, гемцитабин, генотоксический эффект, лейкоциты периферической крови, клетки опухолевой линии MDA-MB-231.

DOI: 10.31857/S0006302922030164, EDN: AOVQOB

Несмотря на существенные достижения в области онкологии, проблема лечения злокачественных новообразований по-прежнему актуальна и требует разработок новых стратегий воздействия. Доклинические исследования, проведенные научными коллективами различных стран, установили наличие противоопухолевого

эффекта озона и перспективность его применения в составе комплексной противоопухолевой терапии [1]. Однако для перехода к клиническим испытаниям необходимо решить целый ряд вопросов, связанных с безопасным и эффективным применением озонотерапии в онкологии. К этим вопросам, в частности, относятся изучение дозозависимого эффекта озона и определение диапазона терапевтического дозирования, исследование вариации чувствительности различных опу-

Сокращения: ОКС – озон-кислородная смесь, dFdCTP – гемцитабина трифосфат, ПБС-ЭДТА – фосфатно-солевой буферный раствор с этилендиаминтетраацетатом.

холевых клеток, а также взаимодействия озона с различными противоопухолевыми агентами.

Ранее было показано, что озон оказывает прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки саркомы-45 при локальном применении (концентрация озона в озono-кислородной смеси (ОКС) – 0.8–5.0 мг/л) [2], а при системном введении потенцирует действие гамма-излучения (лимфосаркома Плисса, концентрация озона в ОКС 0.4 мг/л) [3], усиливает действие доксорубина и 5-фторурацила (штаммы гепатома 27 и гепатома Зайделя, концентрация озона в ОКС – 0.2 мг/л) [4], повышает эффективность фотодинамической терапии (штамм карциномы почки РА, концентрация озона в ОКС – 0.4 мг/л) [5]. Однако интервал от минимальной концентрации, вызывающей повреждение опухолевых клеток, до минимальной токсической концентрации для нормальных клеток, т. е. диапазон терапевтического действия озона, до сих пор определен не был.

Известно, что озон в высоких концентрациях способен окислять липиды, запуская их перекисное окисление, белки, а также деструктивно действовать на ДНК. Озон реагирует с двойными связями азотистых оснований нуклеиновых кислот, образуя озониды, которые в итоге вызывают образование разрывов в одиночных или двойных спиралях. Кроме того, озон нарушает включение азотистых оснований в структуру ДНК при ее синтезе [6]. Генотоксическое действие озона можно применять для усиления эффективности противоопухолевых препаратов, в основе механизмов действия которых лежит повреждение нуклеиновых кислот. Перспективность использования озона в сочетании с цисплатином, этопозидом и гемцитабином на клеточных линиях нейробластомы человека (SK-N-SH и SK-N-DZ) была продемонстрирована в работе [7]. Однако из-за выраженной токсичности гемцитабина на тестируемые клеточные линии оценить потенцирующий вклад озона в сочетании с этим цитостатиком не представилось возможным.

Гемцитабин — антиметаболит из группы антагонистов пиримидинов. Его основные метаболиты, гемцитабина дифосфат и гемцитабина трифосфат (dFdCTP), являются нуклеозидами. dFdCTP конкурирует с дезоксицитидинтрифосфатом за включение в ДНК, тем самым ингибируя удлинение цепи ДНК. Нетерминальное положение dFdCTP в цепи нуклеиновых кислот предотвращает обнаружение и репарацию вызванных им повреждений: этот процесс называется «замаскированным окончанием цепи ДНК». Включение dFdCTP в цепь ДНК в конечном итоге приводит к прекращению цепи, фрагментации ДНК и апоптотической гибели злокачественных клеток. Гемцитабин обладает феноменом само-

потенцирования фармакологического действия, что увеличивает вероятность успешного включения dFdCTP в цепь ДНК: гемцитабина дифосфат ингибирует рибонуклеотидредуктазу, фермент, ответственный за катализацию реакций, которые генерируют дезоксицитидинтрифосфат для синтеза ДНК. Поскольку гемцитабина дифосфат снижает уровень дезоксицитидинтрифосфата, уменьшается конкуренция для dFdCTP при включении в ДНК [8].

Однако одна из проблем терапевтического использования озона заключается в крайне малом времени его жизни в биологических тканях. При этом из всех активных форм кислорода самым стабильным является пероксид водорода [9, 10]. Этот оксидант характеризуется относительно малыми скоростями взаимодействия с органическими субстратами, высокой диффузной способностью и свойствами мессенджера при активации факторов транскрипции и редокс регуляции экспрессии генов [11]. При этом известно, что пероксид водорода является одним из вторичных мессенджеров, опосредующих действие озона на клетки крови при проведении озонотерапии [12], вероятно, через фактор транскрипции Nrf2 [13]. Открытым остается вопрос о целесообразности замены озона на более стабильный пероксид водорода, в первую очередь, в отношении генотоксического действия.

В связи с этим цель исследования состояла в определении на нормальных и опухолевых клетках эффективного генотоксического диапазона концентраций озона и пероксида водорода в сравнительном аспекте, а также в оценке перспективности усиления уровня повреждений ДНК при комбинировании гемцитабина с озоном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биологических образцов. В экспериментах использовали общую фракцию лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей линии Kv:SHK (возраст 2 месяца, масса тела 25–30 г), приобретенных в Центральном питомнике лабораторных животных РАМН (Крюково, Московская область). Мышей содержали в виварии, для кормления использовали стандартную диету со свободным доступом к коммерческому корму и водопроводной воде. Образцы периферической крови забирали из хвостовой вены мышей в пробирки, содержащие фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением ЭДТА в качестве антикоагулянта (ПБС-ЭДТА: 136.7 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ KH₂PO₄, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4). При этом концентрация лейкоцитов составляла около 1·10⁶ кл/мл.

В качестве опухолевых клеток использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клеточную линию культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, стрептомицина и пенициллина (50 мкг/мл) и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Москва). Рост клеточных культур поддерживали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) в увлажненной атмосфере, при температуре 37°C и 5%-м содержании CO₂. Пересев клеток производили каждые 72 ч по достижению 80%-й конfluence. После предварительного подсчета количества жизнеспособных клеток в образце культуры с использованием витального красителя трипанового синего и камеры Горяева образец культуры в питательной среде смешивали с ПБС-ЭДТА в необходимом соотношении до конечной концентрации $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ кл/мл.

Полученные суспензии лейкоцитов крови мыши или клеток аденокарциномы молочной железы человека использовали для приготовления микроскопных агарозных препаратов, состоящих из трех слоев 0.5%-й легкоплавкой агарозы с иммобилизованными клетками в среднем слое [14].

Обработка химическими агентами. В качестве генотоксических агентов использовали озон, пероксид водорода и гемцитабин.

При воздействии озоном препарат помещали в ПБС-ЭДТА, содержащий озон в определенной концентрации, и инкубировали в термостате в течение 10 мин при 37°C. Затем слайды с клетками помещали в лизирующий раствор. Для получения озона использовали аппарат терапевтический низких и средних концентраций озона с деструктором АОТ-НСК-01-С(А-16), разработанный в Российском федеральном ядерном центре – Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (Саров, Нижегородская область) [15]. Диапазон тестируемых концентраций озона в озono-кислородной смеси составил 0.1–1.4 мг/л. Озонированный ПБС-ЭДТА использовали сразу после окончания пятиминутного барботажа ОКС.

При воздействии пероксида водорода препарат помещали в фиксированный объем ПБС-ЭДТА (10 мл – большой объем раствора по сравнению со слайдами), содержащий пероксид водорода определенной концентрации и инкубировали в термостате 10 мин при 37°C. Диапазон используемых концентраций H₂O₂: 0.1–30 мкМ для опухолевых клеток и 3–200 мкМ для лейкоцитов крови мыши. Непосредственно после инкубации в присутствии пероксида водорода микроскопные слайды с клетками помещали в лизирующий раствор.

В случае комбинированного воздействия гемцитабина и озона сначала на препараты наносили

фиксированный объем раствора гемцитабина (4 мкл) в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл и помещали их в термостат на 10 мин при 37°C, затем слайды помещали в ПБС-ЭДТА, содержащий озон (концентрация озона 0.4 мг/мл в ОКС), и термостатировали при 37°C в течение 10 мин. Такую же процедуру проводили с изменением последовательности воздействия гемцитабина и озонированного раствора: сначала препараты помещали в озонированный ПБС-ЭДТА и инкубировали при используемых ранее условиях, затем на слайды наносили 4 мкл раствора гемцитабина с исследуемой концентрацией и термостатировали при 37°C в течение 10 мин. Затем слайды с клетками помещали в лизирующий раствор.

Анализ уровня повреждений ДНК в клетках проводили с использованием щелочного варианта метода ДНК-комет согласно протоколу, описанному в работе [16]. Каждую группу препаратов сравнивали с собственным контролем. По методу ДНК-комет регистрировали нуклеотиды, расположенные в центральной части препарата в одной плоскости. На каждом слайде фотометрировали по 25–30 «комет». Рассчитывалось среднее арифметическое значение показателя «процентное содержание ДНК в «хвосте кометы», которое отражает интенсивность флуоресценции окрашенной ДНК, мигрировавшей во время электрофореза в «хвост кометы», выраженное в процентах. Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» прямо пропорционально уровню повреждений ДНК в конкретной индивидуальной клетке и является одним из наиболее информативных показателей [17, 18].

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Поскольку все данные соответствовали нормальному распределению (по тесту Колмогорова–Смирнова), то статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генотоксического действия озона. Для определения терапевтического диапазона действия озона был исследован его генотоксический эффект на опухолевые клетки и лейкоциты крови мыши в составе агарозных препаратов в зависимости от концентрации озона в ОКС. В результате проведенных экспериментов была получена линейная зависимость величины генотоксического эффекта от концентрации озона на опухолевых клетках линии MDA-MB-231 (рис. 1). При этом минимально действующая концентрация озона в ОКС составила 0.2 мг/л, которая вызывала статистически значимые повреждения ДНК в исследуемых опухолевых клетках на

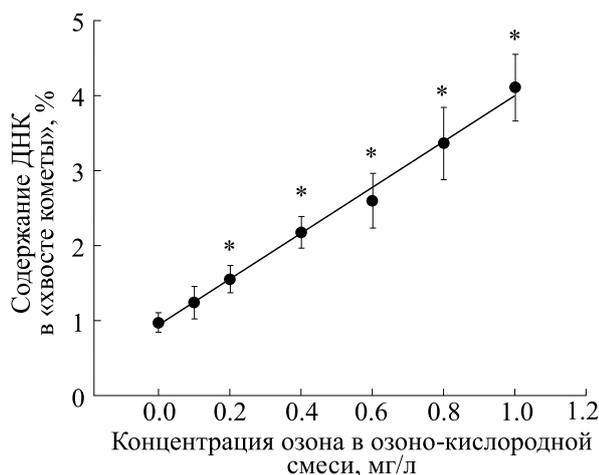


Рис. 1. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации озона в ОКС; * – $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

уровне $1.55 \pm 0.18\%$, что в полтора раза выше значений контрольных образцов без воздействия.

При оценке генотоксического эффекта этого же диапазона концентраций озона в ОКС на лейкоцитах крови мыши получена нелинейная зависимость (рис. 2). Было обнаружено, что чувствительность лейкоцитов крови мыши к озону ниже, чем чувствительность к озону опухолевых клеток. Минимальная генотоксическая концентрация для лейкоцитов крови мыши составила 0.4 мг/л, индуцирующая повреждения ДНК на уровне $0.99 \pm 0.11\%$, что в 1.9 раза выше контрольных значений без воздействия. Стоит отметить, что при воздействии на лейкоциты крови мыши концентраций озона выше 0.4 мг/л и до 1.4 мг/л увеличение уровня повреждений ДНК не наблюдалось (рис. 2). Это может быть связано с активацией защитных механизмов лейкоцитов от повреждающего действия озона, вероятно, за счет усиления компактизации хроматина и снижения доступности свободных радикалов к ДНК клеток [19]. Большая чувствительность и линейность зависимости уровня повреждений ДНК от концентрации озона в опухолевых клетках говорит о нарушении или отсутствии такого защитного механизма в клетках аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231.

Таким образом, на основании исследования генотоксического действия озона методом ДНК-комет можно заключить, что терапевтический диапазон является достаточно узким и составляет 0.2–0.4 мг/л озона в ОКС. При таких концентрациях в опухолевых клетках аденокарциномы молочной железы генерация повреждений ДНК наблюдается на уровне $(1.55 \pm 0.18\%)$ – $(2.17 \pm$

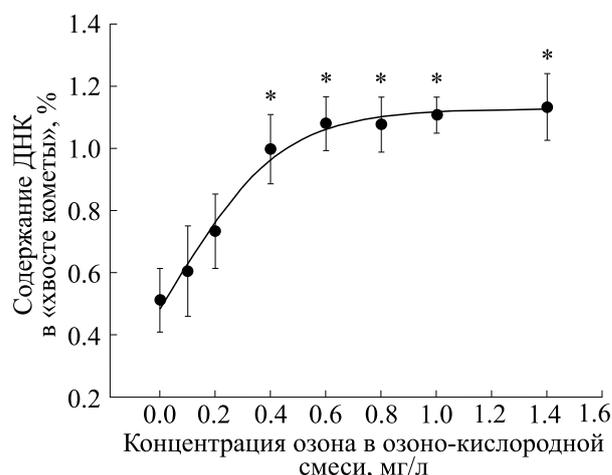


Рис. 2. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации озона в ОКС; * – $p < 0.001$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

0.21%), что свидетельствует о высокой чувствительности опухолевых клеток данной линии к действию озона.

Оценка генотоксического действия пероксида водорода. Поскольку пероксид водорода является вторичным мессенджером озона, для сопоставления их действия и оценки вклада H_2O_2 в индукцию повреждений ДНК в тех же условиях на клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и лейкоцитах крови мыши была протестирована генотоксичность различных концентраций пероксида водорода.

Наши исследования показали, что клетки линии MDA-MB-231 чувствительны к генотоксическому действию пероксида водорода и зависимость уровня повреждений ДНК от концентрации H_2O_2 оказывается линейной (рис. 3). Минимально действующей концентрацией H_2O_2 в отношении исследуемых опухолевых клеток является концентрация 0.1 мкМ, при которой уровень повреждений ДНК статистически значимо увеличивается в четыре раза ($1.14 \pm 0.09\%$) по сравнению с контролем ($0.28 \pm 0.05\%$).

Пероксид водорода оказывает генотоксическое действие на лейкоциты крови мыши и в этом случае зависимость уровня повреждений ДНК от концентрации H_2O_2 также является линейной (рис. 4). Минимальная генотоксическая концентрация пероксида водорода для нормальных клеток составляет 3.0 мкМ. При этом процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» увеличивается более чем в два раза ($0.37 \pm 0.07\%$) по сравнению с контролем ($0.15 \pm 0.03\%$). В целом чувствительность лейкоцитов крови интактных мышей к пероксиду водорода оказывается в среднем в десять

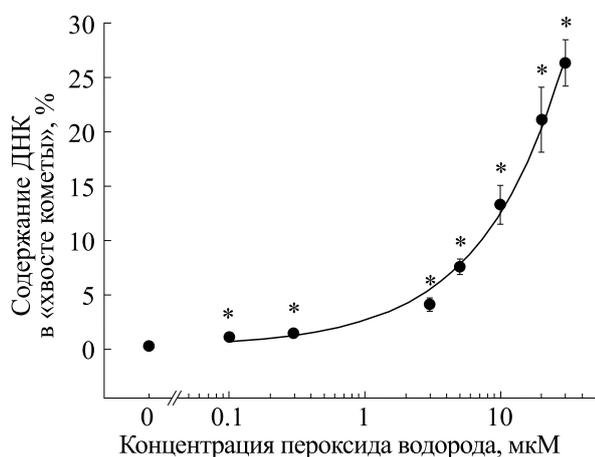


Рис. 3. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации пероксида водорода; * — $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

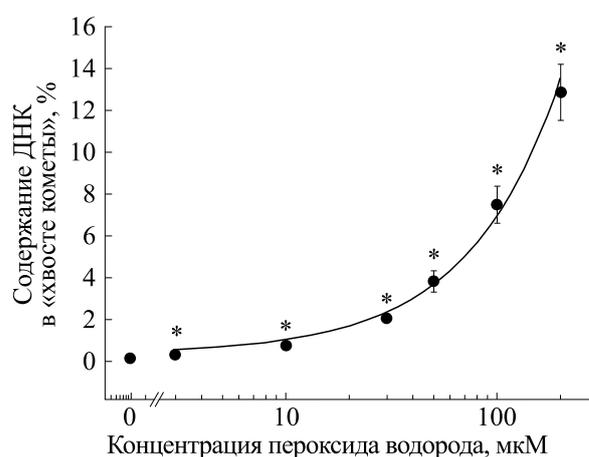


Рис. 4. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации пероксида водорода; * — $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

раз ниже по сравнению с клетками аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что терапевтический диапазон действия пероксида водорода находится в пределах 0.1–3.0 мкМ. В этом диапазоне в клетках аденокарциномы молочной железы можно индуцировать повреждения ДНК на уровне 1–4%, что превышает генотоксический эффект озона в терапевтическом диапазоне. Однако при концентрации пероксида водорода более 3.0 мкМ генотоксичность для нормальных клеток возрастает более выражено, чем для озона в пределах концентраций 0.4–1.4 мг/л. Эти данные свидетельствуют о том, что пероксид водорода если и является посредником в передаче сигнала озона при воздействии на клетки, то генотоксический эффект озона обусловлен более сложными механизмами.

Оценка совместного генотоксического действия озона и цитостатического препарата. Для определения перспективности увеличения уровня повреждений ДНК при комбинировании гемцитабина с озоном была проведена серия экспериментов, в ходе которых мы оценили повреждающее действие гемцитабина в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл с предварительной и последующей обработкой озонированным ПБС-ЭДТА. Концентрация озона в озono-кислородной смеси составляла 0.4 мг/л.

В ходе экспериментов установлено, что озон в концентрации 0.4 мг/л в ОКС усиливает генотоксичность цитостатического препарата на лейкоциты крови мыши. При комбинированном воздействии озона и гемцитабина уровень повреждений ДНК не зависит от последовательности

воздействий (рис. 5). Аналогичные результаты были получены и для клеток аденокарциномы. Показано, что уровень повреждений ДНК в опухолевых клетках линейно зависит от концентрации гемцитабина. При комбинированном воздействии озона и гемцитабина уровень повреждений ДНК не зависит от последовательности воздействий (рис. 6).

Предварительное или последующее воздействие озона в сочетании с гемцитабином позволяет снизить концентрацию последнего в 100 раз, так как повреждающее действие на опухолевые

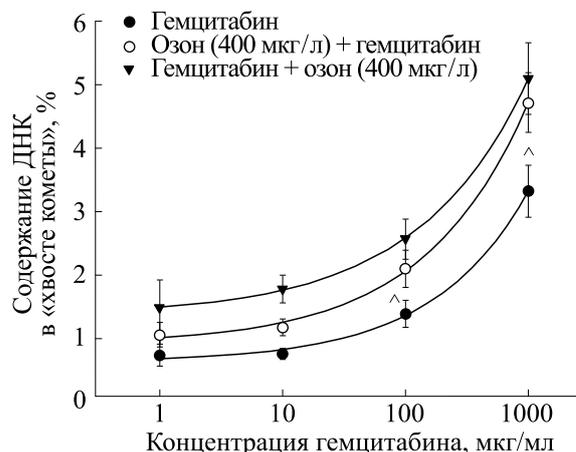


Рис. 5. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации гемцитабина; * — $p < 0.005$ относительно уровня повреждений при действии только гемцитабина по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$; ^ — $p < 0.01$ относительно уровня повреждений по сравнению с концентрацией гемцитабина 1 мкг/мл по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

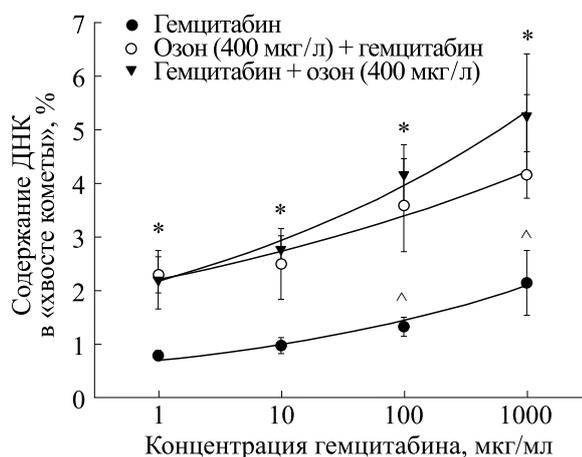


Рис. 6. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации гемцитабина; * – $p < 0,005$ относительно уровня повреждений при действии только гемцитабина по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$; ^ – $p < 0,01$ относительно уровня повреждений по сравнению с концентрацией гемцитабина 1 мкг/мл по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

клетки оказывает наибольшая концентрация гемцитабина 1000 мкг/л, а при совместном воздействии гемцитабина и озона такое же действие оказывает концентрация гемцитабина в 100 раз меньше – 10 мкг/л. Наблюдаемый эффект можно объяснить более эффективным встраиванием в ДНК клеток метаболитов гемцитабина за счет индуцирования озоном репаративных процессов, в результате которых дезоксицитидинтрифосфат замещается dFdCTP и нарушает структуру ДНК. При этом повреждающее действие цитостатика увеличивается более чем в два раза (рис. 5 и 6).

Следовательно, при введении озона в состав комплексной противоопухолевой терапии нужно учитывать, что возможно потенцирующее повреждающее действие исследуемого цитостатика не только на трансформированные, но и на нормальные клетки. Однако генотоксичность препарата можно нивелировать за счет снижения его дозы без потери эффективности.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основе данных генотоксичности, полученных с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, определен терапевтический диапазон действия в пределах от 0.2 до 0.4 мг/л для озона в озono-кислородной смеси и от 0.1 до 3.0 мкМ для пероксида водорода. Пероксид водорода, который является вторичным мессенджером при озонотерапии, возможно, вносит существенный вклад в генотоксическое действие озона, но не определяет его в полной мере.

Комбинирование озона с концентрацией в озono-кислородной смеси 0.4 мг/л с гемцитабином потенцирует генотоксический эффект цитостатика в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, что может позволить при разработке методики комплексной противоопухолевой терапии снизить дозу химиопрепарата и соответственно уменьшить побочные эффекты в отношении нормальных клеток. В связи с возможностью разработки более щадящих режимов противоопухолевой химиотерапии продолжение исследований в этой области оправдано и перспективно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 19-02-00667а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами и рекомендациями, установленными Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Baeza-Noci and R. Pinto-Bonilla, *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11796 (2021). DOI: 10.3390/ijms222111796
2. Т. Г. Щербатюк и К. Н. Конторщикова, Патент на изобретение RU 2137481 C1 (1999).
3. Т. Г. Щербатюк, *Фізіологіч. журн.* **54** (2), 41 (2008). DOI: 10.15407/fz54.02.041
4. Т. Г. Щербатюк, В. Д. Селемир и Е. С. Клинцева, Патент на изобретение RU 2361590 (2007).
5. Т. Г. Щербатюк, Е. С. Жукова (Плеханова), Ю. В. Никитина и др., *Биофизика* **65** (2), 367 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920020209
6. С. Н. Котельников, *Труды ИОФАН* **71**, 10 (2015).
7. A. Cannizzaro, C. V. Verga Falzacappa, M. Martinelli, et al., *J. Cell Physiol.* **213** (1), 115 (2007). DOI:10.1002/jcp.21097
8. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 60750, Gemcitabine*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gemcitabine> (Last modified: 05.03.2022, accessed 05.03.2022)
9. О. Ю. Гудкова, С. В. Гудков, А. Б. Гапеев и др., *Биофизика* **50** (5), 773 (2005).
10. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и др., *Биофизика* **53** (1), 1 (2008).

11. Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов и др., *Современные проблемы токсикологии*, № 2, 37 (2006).
12. V. Bocci, I. Zanardi, G. Valacchi, et al., *Cardiovasc. Haematol. Disorders – Drug Target* **15**, 127 (2015). DOI: 10.2174/1871529X1502151209114642
13. L. Re, *Front. Physiol.* **13**, 842229 (2022). DOI: 10.3389/fphys.2022.842229
14. A. B. Gapeyev, N. A. Lukyanova, and S. V. Gudkov, *Central Eur. J. Biol.* **9** (10), 915 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0326-x
15. С. Н. Буранов, В. И. Карелин, О. А. Пименов и др., *Мед. альманах* **3** (27), 26 (2013).
16. А. Б. Гапеев и Н. А. Лукьянова, *Биофизика* **60** (5), 889 (2015).
17. A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, et al., *Mutagenesis* **23** (3), 143 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gem051
18. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558** (1–2), 27 (2004).
19. Н. Ю. Воробьева, Е. Ю. Архангельская, А. Ю. Бушманов и др., *Саратовский науч.-мед. журн.* **10** (4), 735 (2014).

Comparative Study of DNA Damage in Mouse Blood Leukocytes and MDA-MB-231 Human Breast Adenocarcinoma Cells Depending on the Concentration of Ozone, Hydrogen Peroxide and Gemcitabine

A.B. Gapeyev*, E.S. Zhukova**, V.A. Sinelnikova***, G.Yu. Balakin***, M.Yu. Zemskova****, G.K. Rystov****, and T.G. Shcherbatyuk**, ***

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, ul. Semashko 20, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

****Pushchino State Institute of Natural Science, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The genotoxic activity of ozone and hydrogen peroxide was tested using the comet assay on normal Kv:SHK mouse peripheral blood leukocytes and human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 *in vitro*. The comet assay showed that the concentration range from the minimum ozone concentration in ozone-oxygen mixture that caused damage to DNA of tumor cells to the minimum ozone concentration that induced genotoxic effects on normal blood cells was 0.2 to 0.4 mg/l, while the minimum concentration of hydrogen peroxide was 0.1 to 3.0 μ M. Furthermore, the comet assay revealed that genotoxic effect of ozone on breast adenocarcinoma cells was less than that of hydrogen peroxide. Gemcitabine, a cytostatic drug, in combination with ozone-oxygen (ozone concentration in the mixture was 0.4 mg/l) induced potentiation of the genotoxic effect of the cytostatic agent: the cytotoxic effect of gemcitabine on cells increased more than twofold through enhancement of DNA damage. It is assumed that the increased genotoxic effect of gemcitabine in combination with ozone is associated with intensification of incorporation of gemcitabine main metabolites into the DNA strand because of stimulation of DNA repair processes.

Keywords: ozone, hydrogen peroxide, gemcitabine, genotoxic effect, peripheral blood leukocytes, MDA-MB-231 breast cancer cell line

МИОНЕВРАЛЬНАЯ ПЕРЕДАЧА В БАРИЕВОЙ СРЕДЕ

© 2022 г. С.Н. Гришин, А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, М.А. Мухамедьяров

*Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49**E-mail: sgrishin@inbox.ru*

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 01.02.2022 г.

Принята к публикации 02.02.2022 г.

Исследована проблема мионевральной передачи амфибий (озерной лягушки) в бескальциевой среде. Известно, что для инициации выхода нейромедиатора в синаптическую щель необходима активация потенциал-зависимых кальциевых каналов. В начальных экспериментах была воссоздана описанная многими авторами картина угнетения вызванных постсинаптических ответов вплоть до их полного исчезновения в бескальциевой внешней среде. В экспериментах после замены перфузионного раствора Рингера с нормальным ионным содержанием Ca^{2+} на бескальциевый, но с эквивалентным содержанием Ba^{2+} , амплитуда токов концевой пластинки упала более чем в десять раз, однако сохранялась в течение всего времени наблюдения – более 1 ч. Далее для чистоты эксперимента был использован кофеин – миметик выброса содержимого риаинодин-чувствительных кальциевых депо. После подачи (и отмывки) 100 мкМ кофеина вызванные ответы в исключительно бариевой среде возобновлялись (в особой специфической сверхзатянутой неровной форме) только в условиях продления потенциала действия нервного окончания путем аппликации 4-аминопиридина в концентрации 100 мкМ, причем всего лишь в несколько первых минут. В дальнейшем вызванные токи вновь прекращались, наблюдались лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов в ответ на каждую стимуляцию. Таким образом, подтверждена принципиальная возможность иницированной ионами бария нервно-мышечной передачи, хотя и в весьма специфических экспериментальных условиях.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, ионы бария, металлы щелочноземельной группы, потенциал-зависимые кальциевые каналы, вызванная квантовая секреция.

DOI: 10.31857/S0006302922030176, EDN: APNOGP

Хорошо известно, что потенциал действия, доходя до синаптического окончания, вызывает многоквантовый выход нейромедиатора, который активируют потенциал-зависимые кальциевые каналы [1]. В научной литературе обсуждается вопрос о проводимости этими каналами некальциевых двухвалентных катионов как общем свойстве нейрональной мембраны [2, 3]. Так, в ГАМК-ергических синапсах гиппокампа крысы при замене в базовом растворе Ca^{2+} на Sr^{2+} синаптическая передача осуществлялась, но менее эффективно. То же самое наблюдалось и при замене Ca^{2+} на Ba^{2+} [4].

В главную подгруппу второй группы периодической системы входят следующие металлы (в порядке возрастания номеров и размеров): бериллий, магний, кальций, стронций, барий и радий. Фактором, влияющим на проницаемость ионно-

го канала, является не размер иона. В первую очередь важную роль играет его способность как к гидратированию/дегидратированию, так и к связыванию в поре ионного канала [2].

Вклад вышеперечисленных катионов в создание примембранных фиксированных заряженных группировок описан еще в 1853 году Г. Гельмгольцем [5]. Далее М. Гуи [6] и Д. Чэпмен [7], основываясь на представлениях о двойном электрическом слое, независимо друг от друга связали этот эффект с количественным значением поверхностного потенциала. В последующем эти взгляды были существенно модифицированы О. Штерном [8]. Согласно их представлениям, введение в перфузионный раствор Ca^{2+} и других ионов вышеперечисленного ряда, приводит к изменению потенциала поверхностной мембраны. Причиной этого служит образование экранирующего слоя противоионов и нейтрализация зарядов соответствующих группировок.

Сокращение: ТКП – токи концевой пластинки.

Если бы действие Ca^{2+} и других катионов описываемого ряда определялось только путем экранирования поверхностных зарядов, то значение в процессе имела бы как валентность ионов, так и их концентрация. При наличии же связывания эффект должен зависеть также от химических характеристик ионов, которые определяют константу их связывания с фиксированными группировками [9].

Показано, что двухвалентные катионы в сопоставимых концентрациях оказывают различное влияние на потенциал-зависимые характеристики поверхностной мембраны, то есть они действительно связываются с фиксированными группировками. На Ca^{2+} -каналах скелетных мышечных волокон была исследована возможность связывания Ca^{2+} и Ba^{2+} [10]. Карбоксильную группу при этом рассматривали в качестве наиболее вероятной основы такой связи. Описание энергетического профиля Ca^{2+} -канала, по мнению авторов, может осуществляться в рамках модели с одной энергетической ямой и двумя энергетическими барьерами.

В 2014 г. были опубликованы результаты кристаллографического анализа селективного кальциевого фильтра, встроенного в гомотетрамерный бактериальный NaV -канал [11]. Приведенные данные показывают взаимодействие гидратированных ионов Ca^{2+} с двумя высокоаффинными Ca^{2+} -связывающими сайтами и последующим третьим низкоаффинным сайтом, который координирует движение иона Ca^{2+} внутрь клетки. Первый, входной сайт селективного фильтра образован четырьмя карбоксильными боковыми цепями, которые играют важную роль в селективности к ионам Ca^{2+} . Четыре карбоксильные группы и четыре основные карбонильные группы образуют второй сайт, который служит мишенью блокирующего действия как Cd^{2+} , так и Mn^{2+} . Последний сайт образован только четырьмя основными карбонильными группами, формирующими выход для катиона в центральную полость. Эта архитектура пор предполагает перемещение ионов Ca^{2+} через фильтр канала в процессе поэтапного связывания.

Что касается третьей группы теорий – аллостерической модуляции структуры Ca^{2+} канала – образующиеся в результате такого взаимодействия молекулярные изменения имеют важные физиологические и патофизиологические последствия. Аллостерическое подавление некоторых порообразующих $\text{Ca}_v\alpha_1$ -субъединиц ($\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.2$) ионами Zn^{2+} и Cu^{2+} может играть важную роль в регуляции тока катионов [12].

Существуют множественные свидетельства, что в центральных нейронах моллюсков Ba^{2+} и Sr^{2+} являются более эффективными переносчиками некоторых компонентов тока через Ca^{2+} -каналы мембраны, чем сам Ca^{2+} [13–16]. Замена в перфузионном растворе Ca^{2+} на Ba^{2+} в сходных концентрациях позволила оценить роль предварительной деполяризации мембраны в инактивации входящего тока Ca^{2+} [17–20].

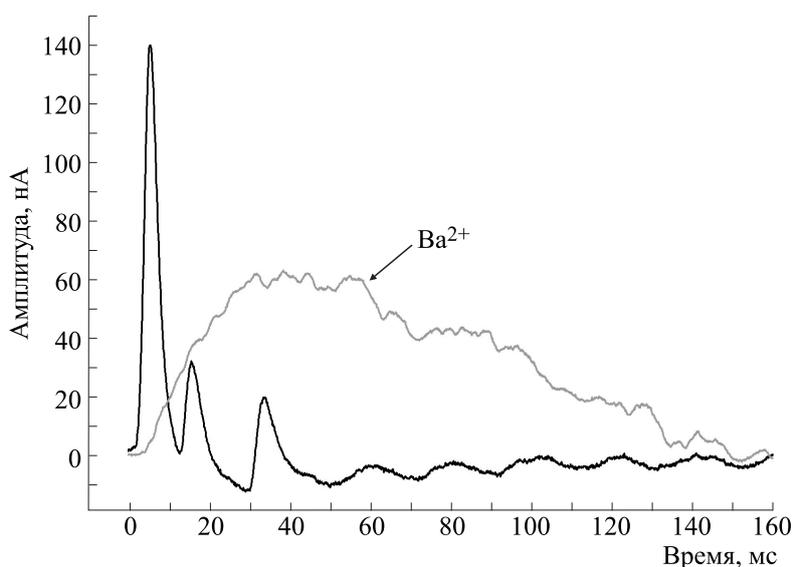
В наших предшествующих исследованиях на мотонейронах лягушки [21] показано, что при использовании ионов Sr^{2+} в периневральном Ca^{2+} токе инактивация в терминали двигательного нейрона определялась повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , которая обладает возвратным блокирующим действием [22].

МЕТОДИКА

Эксперименты по регистрации токов концевой пластинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате: *n. ichiatikus* – *m. sartorius Rana ridibunda*. Декапитацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсепаровывали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы ее волокна поперечно рассекали.

Непрямое раздражение нерва проводили с помощью серебряных электродов в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации токов концевой пластинки осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводили потенциальным и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов – накопления и усреднения ТКП – осуществляли с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin. Мышечный препарат перфузировали раствором Рингера со скоростью 2 мл/мин.



ТКП при потенциале действия нервного окончания в условиях его продления, вызванного аппликацией 100 мкМ 4-аминопиридина. Показан трек ТКП при полном отсутствии Ca^{2+} (с эквимольной заменой на Ba^{2+}) на фоне ТКП при нормальном содержании Ca^{2+} . В последнем заметна характерная повторная активность. Представлены репрезентативные результаты отдельных опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты в среде, свободной от двухвалентных катионов. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых ТКП в обычном растворе Рингера составила 138 ± 25 нА ($n = 10$). Спад токов описывался одной экспонентой с постоянной времени спада 1.41 ± 0.12 мс ($n = 10$).

В бескальциевом перфузионном растворе наблюдалось постепенное снижение амплитуды ТКП. После получаса содержания в свободном от ионов Ca^{2+} растворе ТКП переставали наблюдаться.

Эксперименты в бариевой среде. После замены в перфузионном растворе Ca^{2+} на эквимольное содержание Ba^{2+} амплитуда ТКП упала более чем в десять раз, но сохранялась все время наблюдения — более одного часа ($n = 9$).

Кофеин (100 мкМ) — агонист рианодин-чувствительных рецепторов кальциевых депо — в бариевой среде вызвал возобновление ответов, которые имели специфическую сверхзатянутую неровную форму (см. рисунок). Данная картина наблюдалась исключительно в условиях аппликации 4-аминопиридина (100 мкМ) и лишь в течение нескольких первых минут ($n = 9$). В дальнейшем вызванные токи прекращались. Наблюдалась лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов в ответ на каждую стимуляцию.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, в перфузионной среде, в которой Ca^{2+} заменен на Ba^{2+} , действие основных эндогенных модуляторов на мионевральную передачу кардинально изменяется [23], что, естественно, затрагивает и саму ацетилхолиновую трансмиссию. Тем интереснее данные работы [24], согласно которым амплитуда спонтанных ТКП не зависит от внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Корреляция между ними и частотой возникновения миниатюрных потенциалов здесь не прослеживается, что подтверждается и другими работами [25, 26].

Сохранение спонтанных ответов концевой пластинки в нервно-мышечном синапсе лягушки в растворах, не содержащих Ca^{2+} , но при его замене на Mg^{2+} , указывает на «дуальный» механизм выхода квантов ацетилхолина в мионевральных синапсах, о чем авторы работы [25] высказывались еще в 1954 г. Вскоре после этого стало известно, что в нервно-мышечном синапсе теплокровных (диафрагма крысы *in vitro*) частота спонтанных постсинаптических ответов снижается как при снижении концентрации Ca^{2+} , так и при увеличении содержания Mg^{2+} [27–29]. Позже было показано, что в поддержании спонтанного выхода квантов медиатора в мионевральных синапсах крысы ионы Sr^{2+} равноэффективны ионам Ca^{2+} . Кроме того, Co^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} и La^{3+} увеличивали время роста миниатюрных потенциалов, но были не в состоянии поддерживать квантовый

релиз достаточно долгое время [30]. Была показана также способность Ba^{2+} наравне с Ca^{2+} поддерживать спонтанную секрецию в синапсе диафрагмы мыши [31].

Ранее нами было показано, что в случае полной замены в растворе Ca^{2+} на Ba^{2+} наблюдалось двухфазное изменение положительной составляющей периневрального тока седалищного нерва лягушки [32]. После нескольких минут действия ионов Ba^{2+} амплитуда положительной компоненты увеличивалась на треть. В случае полной замены Ca^{2+} на Ba^{2+} в концентрации 1.8 мМ мы наблюдали двухфазное изменение последней положительной составляющей периневрального тока. После пятиминутного действия ионов Ba^{2+} амплитуда положительной компоненты увеличивалась примерно на треть. К двадцатой минуте этот показатель возрастал уже до двух третей от контроля.

Приведенные в данной статье результаты показали, что после замены перфузионного раствора Рингера с нормальным ионным содержанием на бескальциевый, но с эквимоллярным содержанием Ba^{2+} , амплитуда токов концевой пластинки упала более чем в десять раз, но сохранялась больше часа. Далее использовали кофеин (агонист выброса Ca^{2+} из рианодин-чувствительных депо) с целью истощения запасов внутриклеточного Ca^{2+} .

После подачи (и отмывки) кофеина в бариевой среде вызванные ответы возобновлялись только в условиях аппликации 4-аминопиридина, хотя и имели специфическую сверхзатянутую неровную форму. Эффект наблюдался всего лишь в течение нескольких первых минут, после чего вызванные токи вновь прекращались. При этом в ответ на каждую стимуляцию наблюдались лишь «вспышки» миниатюрных постсинаптических токов, что напоминает ответ на серию стимуляции в гипокальциевом растворе. Однако в нашем случае мы имели дело с одиночными нервными импульсами. Появление в первые минуты ТКП соответствует начальному подъему амплитуды последней положительной составляющей периневрального ответа при замене Ca^{2+} на Ba^{2+} .

В 1950 г. авторы работы [33] нашли, что в бескальциевой среде потенциал действия доходит до нервных окончаний. Однако, им не удалось зарегистрировать вызванные ТКП. В предельных гипокальциевых растворах вызванный одиночным нервным импульсом постсинаптический ответ не бывает крупнее, чем один миниатюрный. В этих условиях серия нервных импульсов вызывает случайный выброс небольших токов концевой пластинки. Вариация их амплитуд описывается ступенчатой модой, что, по-видимому, соответствует кратности разрядов этих токов [24].

Наблюдаемые в наших экспериментах результаты имели сходную картину.

Одни авторы сообщают о вызванных ТКП в бариевой среде [26], другим не удалось зарегистрировать их вне специальных условий [34]. В литературе также отмечалось, что Ba^{2+} -потенциалы являются очень неустойчивыми и быстро ослабевают при повторном вызове [35]. Однако отмечалось и то, что запускающий экзоцитоз везикул при одноквантовом выходе медиатора низкопороговый Ca^{2+} -связывающий сайт, активирующийся в области Ca^{2+} -макродомена, обнаруживает сходную чувствительность к ионам Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} [36]. Наиболее вероятным молекулярным кандидатом сайта служит высокоаффинная изоформа одного из белков мембраны везикул – синаптоагмин III, у которого обнаружена способность связывать перечисленные катионы [37].

Приведенные результаты собственных исследований являются подтверждением принципиальной возможности нервно-мышечной передачи, инициированной ионами Ba^{2+} . Однако это возможно лишь в весьма специфических условиях эксперимента.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin, A. L. Zefirov, and A. Palotas, *Pflügers Arch.* **458** (3), 563 (2009).
2. П. Г. Костюк, *Кальций и клеточная возбудимость* (Наука, М., 1986).
3. С. Н. Гришин, *Кальциевый ток* (Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, Казань, 2010).
4. T. Ohno-Shosaku, S. Sawada, K. Hirata, and C. Yamamoto, *Neurosci. Res.* **20** (3), 223 (1994).
5. H. Helmholtz, *Annalen der Physik und Chemie* **165** (6), 211 (1853).
6. M. Gouy, *J. Phys. Theor. Appl.* **9**, 457 (1910).
7. D. L. Chapman, *Phil. Mag. & J. Sci.* **25** (6), 475 (1913).
8. O. Z. Stern, *Electrochemistry* **30**, 508 (1924).
9. P. G. Kostyuk, *Neuroscience* **92** (4), 1157 (1999).
10. G. Cota and E. Stefani, *J. Physiol.* **351**, 135 (1984).
11. L. Tang, T. M. Gamal El-Din, J. Payandeh, et al., *Nature* **505** (7481), 56 (2014).

12. F. Neumaier, M. Dibué-Adjei, J. Hescheler, and T. Schneider, *Prog. Neurobiol.* **301** (15), 24 (2015).
13. B. Katz and R. Miledi, *J. Physiol.* **203** (2), 459 (1969).
14. D. A. Nachshen and M. P. Blaustein, *J. Gen. Physiol.* **79** (6), 1065 (1982).
15. H. D. Lux and K. Nagy, *Pflugers Arch.* **391** (3), 252 (1981).
16. R. DiPolo, C. Caputo, and F. Bezanilla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (6), 1743 (1983).
17. D. Tillotson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (3), 1497 (1979).
18. P. Brehm, R. Eckert, and D. Tillotson, *J. Physiol.* **306**, 193 (1980).
19. R. Eckert and D. L. Tillotson, *J. Physiol.* **314**, 265 (1981).
20. A. M. Brown, K. Morimoto, Y. Tsuda, and D. L. Wilson, *J. Physiol.* **320**, 193 (1981).
21. S. N. Grishin, *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **8** (3), 213 (2014).
22. M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin, A. L. Zefirov, and A. Palotas, *Brain Res. Bull.* **69**, 652 (2006).
23. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6423 (2020).
24. P. Fatt and B. Katz *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **17**, 275 (1952).
25. J. Del Castillo and B. Katz, *J. Physiol.* **124** (3), 553 (1954).
26. Z. L. Blioch, I. M. Glagoleva, E. A. Liberman, and V. A. Nenashev, *J. Physiol.* **199** (1), 11 (1968).
27. A. W. Liley, *J. Physiol.* **134** (2), 427 (1956).
28. J. I. Hubbard, *J. Physiol.* **159**, 507 (1961).
29. D. Elmqvist and D. S. Feldman, *J. Physiol.* **181** (3), 487 (1965).
30. R. Anwyl, T. Kelly, and F. Sweeney, *Brain. Res.* **246** (1), 127 (1982).
31. M. J. Curtis, D. M. Quastel, and D. A. Saint, *J. Physiol.* **373**, 243 (1986).
32. S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **10** (2), 99 (2016).
33. P. Fatt and B. Katz, *J. Physiol.* **111**, 46 (1950).
34. E. M. Silinsky, *Br. J. Pharmacol.* **59** (1), 215 (1977).
35. I. S. Magura, *J. Membr. Biol.* **35** (3), 239 (1977).
36. G. Neves, A. Neef, and L. Lagnado, *J. Physiol.* **535**, 809 (2001).
37. A. L. Zefirov and P. N. Grigor'ev, *Neurosci. Behav. Physiol.* **40** (4), 389 (2010).

Neuromuscular Transmission in a Barium Environment

S.N. Grishin, A.E. Khairullin, A.Y. Teplov, and M.A. Mukhamedyarov

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

The problem of the neuromuscular junction of amphibians (lake frogs) in a calcium-free medium was studied. It is known that activation of potential-dependent calcium channels is necessary to initiate the release of neurotransmitter into the synaptic cleft. In our initial experiments, we demonstrated depression of evoked postsynaptic responses up to their complete disappearance in a calcium-free environment as it was described by many authors. In our experiments, when Ringer's solution that contained a normal ionic content of Ca^{2+} was replaced with a calcium-free Ringer that had an equimolar content of Ba^{2+} , the amplitude of the end plate currents decreased by a factor of more than ten, although it remained at the same level during the entire observation time for more than one hour. Then, caffeine, that was required to initiate calcium release from ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores, was used for fairness. Responses elicited by 100 μM caffeine exclusively after the administration of barium were observed again (in a specific overtightened uneven shape) only after the application of 4-aminopyridine (100 μM) and lasted just the first few minutes. Further, the evoked currents were blocked again, only "flashes" of miniature postsynaptic currents were seen in response to each stimulation. In this work, we have confirmed the fundamental possibility of neuromuscular junction initiated by barium ions, even under very specific experimental conditions.

Keywords: neuromuscular junction, barium ions, alkaline earth metals, potential-dependent calcium channels, induced quantum secretion

УДК 577.3

ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ЛИГАНДОМ НА ОСНОВЕ *N*-АЦЕТИЛ-*L*-ЦИСТЕИНА ПРИ СУБЛИНГВАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЭТИХ КОМПЛЕКСОВ В ОРГАНИЗМ КРЫС

© 2022 г. А.А. Тимошин*, К.Б. Шумаев*.**, В.Л. Лакомкин*, А.А. Абрамов*, Э.К. Рууге*.***

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

**Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2

***Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: timoshin_a_a@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2022 г.

После доработки 16.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Проанализировано действие такой стабилизированной формы NO, как динитрозильные комплексы железа с лигандом на основе *N*-ацетил-*L*-цистеина, при сублингвальном введении данного соединения в организм крыс. Методом ЭПР установлено, что в результате его введения в ткани печени регистрируется образование и накопление комплексов динитрозильные комплексы железа с белковыми лигандами. Кроме того, в результате действия динитрозильных комплексов железа с *N*-ацетил-*L*-цистеином регистрируется достоверное увеличение общего уровня NO в ткани сердца и печени, причем наиболее существенный эффект установлен для печени животного.

Ключевые слова: *N*-ацетил-*L*-цистеин, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, спиновая ловушка, сублингвальное введение, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302922030188, EDN: APOAII

Известно, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами являются одной из основных природных форм депонирования NO в биосистемах [1–9]. Такие стабилизированные формы NO обеспечивают перенос и накопление NO в организме, а в результате их распада происходит высвобождение NO, S-нитрозотиолов и ионов двухвалентного железа [7, 8]. Известно также, что ДНКЖ обладают собственным антиоксидантным и цитопротекторным действием [4, 10–13], а также могут являться природным регулятором уровня NO в органах и тканях [14].

Известно также, что ДНКЖ с низкомолекулярными тиолсодержащими лигандами (глутатионом, цистеином) могут быть сравнительно просто синтезированы в лабораторных или промыш-

ленных условиях для их последующего введения в организм. Ранее нами в работах [15, 16] были представлены данные о действии ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-Глт) при различных способах введения этого комплекса в организм. Установлено, что формирование ДНКЖ с белковыми лигандами в крови и их гипотензивное действие регистрируются в тех случаях, когда ДНКЖ-Глт вводился в организм путем инъекции, а именно внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно и внутримышечно.

В данной работе предпринята попытка анализа биологической активности препарата ДНКЖ, в котором тиолсодержащим лигандом является *N*-ацетил-*L*-цистеин (ДНКЖ-Ацц). Известно, что данное соединение является нетоксичным и широко используется как муколитическое средство, которое легко проникает через клеточные мембраны. Можно предположить, что аналогичными свойствами будет обладать и ДНКЖ-Ацц. Ранее нами уже было показано, что данные амфифильные комплексы и/или продукты их полураспада проникают в организм в результате трансдермального [17] или ингаляционного [18] вве-

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Глт – динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДНКЖ-Ацц – динитрозильные комплексы железа с *N*-ацетил-*L*-цистеином, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, АД – артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений, Fe-DETC₂ – комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата.

дения, и выступают как источники NO в органах и тканях.

Целью данной работы является анализ действия такой стабилизированной формы NO, как ДНКЖ-Ацц, при сублингвальном введении данного соединения в организм крыс.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтез препарата ДНКЖ-Ацц проводили в лабораторных условиях в соответствии с методикой, описанной нами ранее [17]. Формирование данных комплексов, как и ранее, контролировали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [17]. Далее полученный водный раствор этого соединения замораживали, хранили в жидком азоте и размораживали непосредственно перед началом эксперимента. После размораживания в него добавляли глицерин, конечная концентрация которого составляла 20%.

Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar (самцы массой 350–450 г). Животных содержали в биоклинике НМИЦ кардиологии Минздрава России в клетках по пять особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировался в режиме 12 ч : 12 ч (свет : темнота) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

В начале опыта крыс анестезировали препаратом Золетил-100 (5 мг/кг массы тела). Далее для регистрации среднего артериального давления (АД_{ср}) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) животным в левую сонную артерию вводили полиэтиленовый катетер PE-50, который подключали к манометрическому датчику P23 Db (Gould Statham, США). Полученный сигнал АД через усилитель «Biograph-4» (СПбГУ аэрокосмического приборостроения, Россия) подавали на АЦП NI-USB 6210 (National Instruments, США) и обрабатывали на компьютере с помощью специальных программ записи и обработки сигналов физиологических параметров работы сердца (автор – Е.В. Лукошкова). Через тот же катетер проводили забор образцов крови после введения животным препарата ДНКЖ-Ацц.

Далее всех животных делили на две экспериментальные группы по пять-шесть особей в каждой. Животные из первой группы получали ДНКЖ-Ацц в глицерине путем сублингвального введения. В этом случае данный препарат вводили в ротовую полость или в защечный мешок капельно с помощью инсулинового шприца с тупой иглой в течение 35–40 мин. Общий объем препарата ДНКЖ-Ацц составлял 1.0 мл, а его доза была стандартной и составляла 5.0 мкмоль из расчета на одно животное. В другую группу входили контрольные животные, которым данный препарат не вводили. В ходе экспериментов у крыс реги-

стрировали АД_{ср} и ЧСС, причем как до, так и в течение одного часа после введения ДНКЖ-Ацц.

Далее в половине опытов животных забивали передозировкой уретана, после чего у них забирали образцы ткани органов (сердце, легкое, печень, почка, скелетная (бедренная) мышца), а также цельной крови. Полученные образцы помещали в пластиковые трубки диаметром 5.0 мм, которые сразу же замораживали, хранили в жидком азоте и использовали для регистрации их спектров ЭПР.

В других опытах в обеих экспериментальных группах методом ЭПР проводили исследование общего уровня NO в ткани органов. Для этого применяли липофильные спиновые ловушки оксида азота, такие как комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC₂), с регистрацией образующихся спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂ методом ЭПР. При этом животным через 1 ч после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц путем инъекций вводили компоненты этой спиновой ловушки NO – диэтилдитиокарбамат (DETC, 620 мг/(кг массы тела) в 1.0 мл физиологического раствора, внутривенно) и FeSO₄·7H₂O с цитратом натрия (25 и 125 мг/(кг массы тела) соответственно в 1.0 мл физиологического раствора, подкожно в область левого плеча). Далее через 20 мин животных забивали и изолировали их сердце, легкие, печень, почки и скелетную (бедренную) мышцу. Эти органы сразу промывали в физиологическом растворе и измельчали механически. Образцы размельченной ткани этих органов помещали в пластиковые трубки диаметром 5.0 мм, которые сразу же замораживали, хранили в жидком азоте и использовали для регистрации их спектров ЭПР.

Спектры ЭПР синтезированных ДНКЖ-Ацц в водной среде регистрировали при комнатной температуре в стеклянных капиллярах. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0.4 мТл. При этом мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра всегда устанавливали на уровне 10 мВт при частоте 9.14 ГГц. Сканирование магнитного поля, как и ранее (см. работу [17]), осуществляли с центром при $g = 2.03$.

Спектры ЭПР всех полученных образцов ткани органов регистрировали на ЭПР-спектрометре X-диапазона E-109E (Varian, США) при температуре жидкого азота. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0.4 мТл (при исследовании образцов ткани органов и крови без Fe-DETC₂) или 0.2 мТл (при регистрации сигналов спиновых аддуктов в ткани) при частоте 100 кГц. Мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра устанавливали на уровне 10 мВт, его частота составляла 9.33 ГГц. Сканирование магнитного поля при записи сигналов ЭПР таких образцов осуществляли с цен-

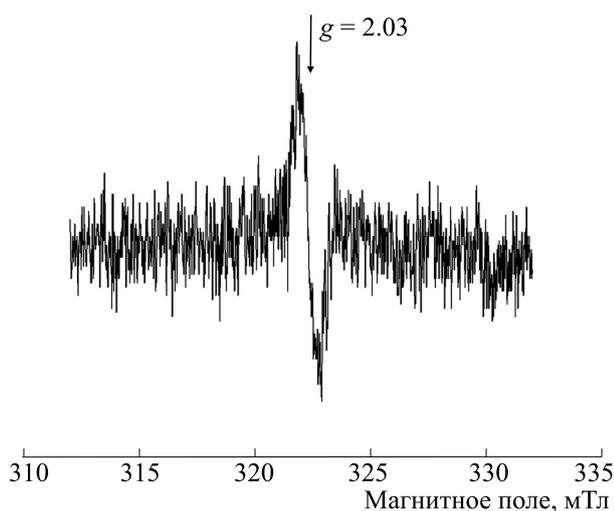


Рис. 1. Спектр ЭПР синтезированных комплексов ДНКЖ-Ацц в водном растворе при комнатной температуре.

тром при $g = 2.03$. После записи сигналов все образцы размораживали и определяли массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра.

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием пакета программ Origin 8 (OriginLab Corporation, США). Все данные в статье представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее пяти-шести экспериментов. Для проверки статистической достоверности эффектов использовали двусторонний t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов в лабораторных условиях проводили синтез препарата ДНКЖ-Ацц и исследовали его действие при сублингвальном введении в организм крыс. На рис. 1 представлен спектр ЭПР полученного соединения при комнатной температуре. Видно, что он представляет собой асимметричный синглетный сигнал с центром при $g = 2.03$, характерный для данных соединений и описанный ранее в работах многих авторов [7, 8, 17].

В другой части работы в ходе всего опыта проводили мониторинг параметров АД_{ср} и ЧСС. Установлено, что в исходном состоянии (до введения ДНКЖ-Ацц) АД_{ср} составляло 137 ± 6 мм рт. ст., а ЧСС — 394 ± 27 уд./мин. Через 5 мин после начала закапывания данного препарата под язык обычно наблюдали небольшой подъем АД_{ср} (до 156 ± 8 мм рт. ст.), при этом ЧСС немного падала (до 378 ± 29 уд./мин). Через 10–15 мин от начала введения ДНКЖ-Ацц АД_{ср} возвращалось к

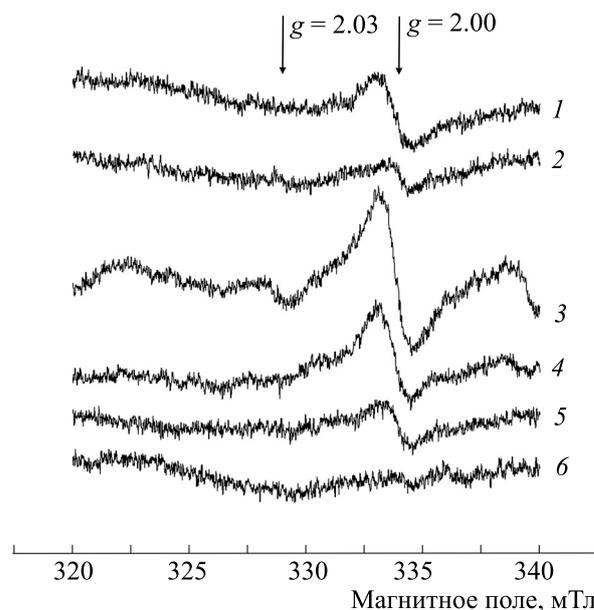


Рис. 2. Спектры ЭПР замороженных образцов ткани органов и цельной крови крыс, полученных через 1 ч после сублингвального введения препарата ДНКЖ-Ацц: 1 – сердце, 2 – легкое, 3 – печень, 4 – почка, 5 – скелетная мышца, 6 – кровь. Температура – жидкий азот.

норме, а уже начиная с 40-й минуты немного снижалось, достигая 135 ± 7 мм рт. ст. на 50-й минуте и 123 ± 10 мм рт. ст. на 60-й минуте эксперимента. ЧСС при этом повышалось до 426 ± 28 уд./мин.

Следовательно, в ходе опытов регистрировались лишь небольшие изменения АД_{ср} и ЧСС, но никаких достоверных изменений величин этих параметров в результате введения ДНКЖ-Ацц не обнаружено, таким образом, оно не оказывало заметного влияния на общую гемодинамику организма. Вероятно, при таком способе введения препарата не происходит существенного увеличения уровня свободного NO и/или его стабилизированных форм в кровотоке животного, из-за чего выраженный гипотензивный эффект также отсутствует. Вместе с тем нельзя исключить, что при сублингвальном введении ДНКЖ-Ацц его перенос в организме в значительной степени осуществляется лимфотоком [16, 17], а в кровотоке содержание этих комплексов и/или вторичных продуктов их распада невелико и недостаточно для инициирования заметного снижения среднего АД.

Кроме того, проводили анализ ткани органов и цельной крови методом ЭПР, при этом исследовались образцы, замороженные через 1 ч после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц экспериментальным животным. Характерные спектры ЭПР исследуемых образцов представлены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что в образцах

ткани регистрировались свободнорадикальные сигналы ($g = 2.00$), которые представляют собой суперпозицию спектров убисемихинона и флаво-семихинонов [19].

Из рис. 2 также видно, что в спектре замороженной ткани печени (сигнал 3) при $g = 2.03$ регистрировалась компонента, соответствующая ДНКЖ с белковым тиолсодержащим лигандом, в то время как на других спектрах на этом рисунке она отсутствовала. При этом в контрольной группе животных такие компоненты при $g = 2.03$ также отсутствовали в образцах сердца, легких, почки и скелетной мышцы, а в пробах ткани печени при $g = 2.03$ наблюдали лишь очень слабый сигнал, соответствующий базальным ДНКЖ с белковыми лигандами (данные не приведены), который был существенно меньше, чем наблюдаемый в этом органе после сублингвального введения ДНКЖ-Ацц (спектр 3, см. рис. 2). Полученный результат заставляет думать о том, что в результате такого введения ДНКЖ-Ацц происходит превращение этих комплексов в ДНКЖ, связанные с белками, и накопление последних в ткани печени, в то время как в других исследуемых органах такие соединения не регистрируются.

Из этого рисунка также видно, что после введения ДНКЖ-Ацц в спектре крови сигнал при $g = 2.03$ отсутствовал, что может свидетельствовать об отсутствии регистрируемого количества парамагнитных ДНКЖ в кровотоке. Кроме того, в этом случае не регистрировался сигнал от комплексов NO с железом гемовой группы гемоглобина (нитрозилHb) [3], что может указывать на отсутствие избытка свободного NO в кровотоке после введения ДНКЖ-Ацц.

В другой части работы в обеих экспериментальных группах проводили оценку общего уровня NO с применением метода ЭПР и использованием спиновой ловушки Fe-DETC₂. Как известно [20], эта ловушка обладает гидрофобными свойствами и способна эффективно взаимодействовать как со свободным NO, так и с его депонированными формами, с образованием стабильных парамагнитных спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂, регистрируемых методом ЭПР.

На рис. 3 представлены характерные спектры ЭПР образцов ткани исследуемых органов, полученных через 20 мин после введения компонентов этой ловушки в организм. Из этого рисунка видно, что в исследуемых образцах также регистрировали свободнорадикальные сигналы ЭПР, а также компоненты, принадлежащие комплексам молибдена в высокопольной части спектров. Следует отметить, что во всех случаях в спектрах

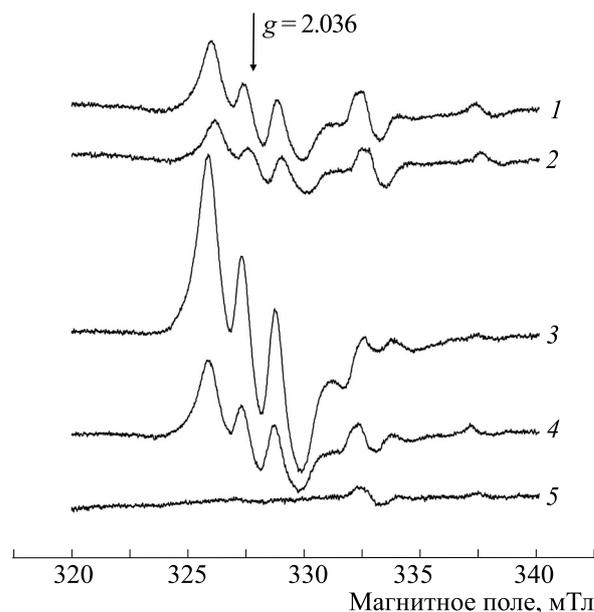


Рис. 3. Спектры ЭПР замороженных образцов ткани органов крыс, полученных через 20 мин после введения животным компонентов спиновой ловушки Fe-DETC₂, т.е. через 1 ч 20 мин после введения препарата ДНКЖ-Ацц: 1 – сердце, 2 – легкое, 3 – печень, 4 – почка, 5 – скелетная мышца. Температура – жидкий азот.

присутствовали узкие эквидистантные триплетные сигналы, принадлежащие спиновым аддуктам NO-Fe-DETC₂ ($g = 2.036$). Содержание этих монокислородных комплексов, как отмечалось выше, отражает уровень NO, включая его депонированные формы.

Исходя из этих сигналов, оценивали содержание NO-Fe-DETC₂ во всех образцах ткани как количество парамагнитных центров в образце с нормировкой на массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра. Для оценки эффекта вводимого сублингвально ДНКЖ-Ацц на общий уровень NO в ткани органов, на рис. 4 представлены значения содержания NO-Fe-DETC₂, соответствующие животным, получавшим ДНКЖ-Ацц (параметр $N_{+ДНКЖ-Ацц}$) с нормировкой на аналогичные параметры, соответствующие контрольной группе ($N_{контр}$). Из этого рисунка видно, что в результате действия ДНКЖ-Ацц во всех органах экспериментальных животных регистрировалось увеличение общего уровня NO. При этом для сердца и печени данные различия являются достоверными, а наиболее существенный эффект наблюдался для ткани печени животного.

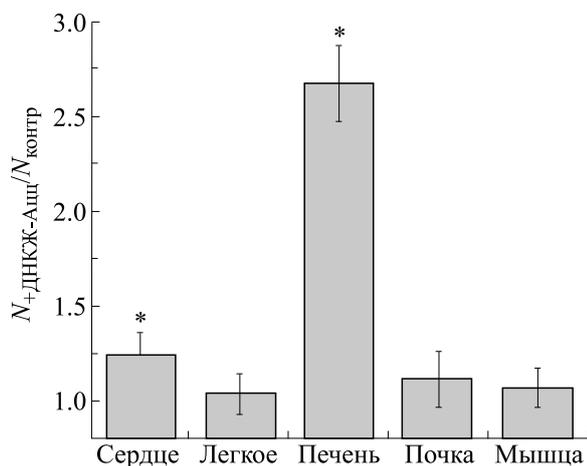


Рис. 4. Значения содержания парамагнитных спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂ в образцах ткани органов животных (параметр $N_{+ДНКЖ-Ащц}$), получавших препарат ДНКЖ-Ащц, с нормировкой на аналогичные величины, соответствующие контрольным животным ($N_{контр}$); * – $p < 0.05$ по сравнению с величиной данного отношения, равной единице.

Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с данными более ранней работы [17], где было показано, что вводимые крысам трансдермально ДНКЖ-Ащц приводили к незначительному снижению $АД_{ср}$, но вызывали рост общего уровня NO в ткани легких и печени. В то же время полученный эффект ДНКЖ-Ащц существенно отличался от действия вводимого с помощью инъекций ДНКЖ-Глт, которые оказывали выраженное гипотензивное действие [15, 16].

Таким образом, препарат ДНКЖ-Ащц, как стабилизированная форма NO, может осуществлять перенос NO в организм при его сублингвальном введении. В результате его введения в ткани печени регистрируется образование и накопление комплексов ДНКЖ с белковыми лигандами. Кроме того, в результате действия ДНКЖ-Ащц регистрируется достоверное увеличение общего уровня NO в ткани сердца и печени, причем наиболее существенный эффект установлен для печени животного.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. А.Ф. Ванину за ценные советы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были выполнены в соответствии с директивой 2010/63/eu Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и принципами национального стандарта ГОСТ Р 53434-2009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y.-J. Chen, W.-C. Ku, L.-T. Feng, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (33), 10929 (2008).
2. C.-H. Ke, C.-H. Chen, M.-L. Tsai, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **139** (1), 67 (2017).
3. K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, A. A. Timoshin, et al., *Methods Enzymol.* **436**, 445 (2008).
4. K. B. Shumaev, A. L. Dudylyina, M. V. Ivanova, et al., *BioFactors* **44** (3), 237 (2018).
5. Y. Suryo Rahmanto, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, et al., *J. Biol. Chem.* **287** (10), 6960 (2012).
6. M.-L. Tsai, C.-C. Tsou, and W.-F. Liaw, *Acc. Chem. Res.* **48**, 1184 (2015).
7. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
8. A. F. Vanin, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **54**, 15 (2016).
9. S.-C. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55** (18), 9383 (2016).
10. А. А. Тимошин, Д. Ю. Дроботова, О. В. Циктишвили и др., *Докл. РАН* **432** (3), 416 (2010).
11. К. Б. Шумаев, А. А. Губкин, С. А. Губкина и др., *Биофизика* **51** (3), 472 (2006).
12. К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская, Д. И. Грачев и др., *Биомед. химия* **67** (2), 162 (2021).
13. К. Б. Шумаев, А. А. Губкин, В. А. Сerezhenkov, et al., *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **18**, 37 (2008).
14. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., *Биофизика* **64** (1), 108 (2019).
15. А. А. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 525 (2015).
16. А. А. Тимошин, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **162** (8), 169 (2016).
17. А. А. Тимошин, К. Б. Шумаев, В. Л. Лакомкин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **170** (9), 290 (2020).
18. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., *Биофизика* **66** (1), 183 (2021).
19. А. А. Timoshin, O. I. Pisarenko, V. L. Lakomkin, et al., *Exp. Clin. Cardiol.* **5** (2), 59 (2000).
20. A. F. Vanin and A. A. Timoshin, In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, New York, 2011), Vol. 704, pp. 135–149.

Action of Dinitrosyl Iron Complexes with *N*-Acetyl-L-Cysteine-Bearing Ligand after Sublingual Administration in Rats

A.A. Timoshin*, K.B. Shumaev*, **, V.L. Lakomkin*, A.A. Abramov*, and E.K. Ruuge*, ***

*Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

**Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

***Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The objective of this research was to study action of a stabilized NO form of dinitrosyl iron complexes with *N*-acetyl-L-cysteine-bearing ligand after sublingual administration in rats. By means of EPR spectroscopy, it was found that sublingual administration led to the formation and accumulation of dinitrosyl iron complexes with protein ligands in rat liver tissues. Furthermore, dinitrosyl iron complexes with *N*-acetyl-L-cysteine caused a significant increase in the total NO level in heart and liver tissues of rats but demonstrated a more pronounced effect in the animal liver.

Keywords: N-acetyl-L-cysteine, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, spin trap, sublingual administration, electron paramagnetic resonance

УДК 573.1

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЛУКТУАЦИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ СИММЕТРИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ ВЕРХНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Л.В. Мезенцева

*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, 125315, Москва, Балтийская ул., 8**E-mail: l.v.mezentseva@mail.ru*

Поступила в редакцию 07.04.2022 г.

После доработки 07.04.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Предложена новая расчетно-экспериментальная методика оценки устойчивости колебательных процессов в системе регионарного кровообращения, основанная на анализе флуктуаций показателей микроциркуляции крови симметричных областей верхних конечностей человека. Синхронные измерения показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей проведены у пяти здоровых добровольцев методом лазерной доплеровской флоуметрии. Датчики фиксировали на наружной поверхности симметричных областей нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Представлены регрессионные уравнения, описывающие взаимосвязи между синхронными изменениями показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей и их исходными значениями левой и правой сторон измерения. Установлено, что изменения амплитуд флуктуаций микрокровотока симметричных областей верхних конечностей зависят от исходных значений этих показателей не только одноименной, но и противоположной стороны наблюдения. Показано, что изменения показателей микроциркуляции коррелируют отрицательно с мгновенными значениями перфузии той же стороны измерения и положительно с мгновенными значениями перфузии противоположной стороны измерения. Рассчитаны диапазоны числовых значений параметров модели, при которых имеют место устойчивые режимы функционирования системы регионарного кровообращения. Результаты исследований могут найти применение в медицинской практике, так как модель позволяет оценивать состояние системы регионарного кровообращения у пациента и прогнозировать вероятности перехода этой системы в патологические режимы и критические состояния.

Ключевые слова: микроциркуляция, асимметрия, лазерная доплеровская флоуметрия, математическая модель, устойчивость.

DOI: 10.31857/S000630292203019X, EDN: APVZOX

Флуктуации параметров физиологических систем являются условием их нормального функционирования, а результаты их адекватного математического анализа открывают возможности для построения математических моделей, описывающих регуляторные процессы в этих системах. В настоящее время для анализа процессов флуктуации перфузии в различных органах и тканях наряду со стандартными статистическими подходами широко применяются различные математические методы: корреляционно-спектральный и вейвлет-анализ, методы нелинейной динамики (оценка таких показателей, как энтропия, экспонента Ляпунова, индекс Хёрста, показатель Хаусдорфа и др.) [1–5]. Однако совершенствование математических методов обработки и анализа

экспериментальных записей лишь позволяют накапливать описательные знания об изучаемых объектах. Но для понимания физиологических механизмов, лежащих в основе изучаемых явлений, этого недостаточно. Понять механизм процесса — значит построить математическую модель, описывающую регуляцию его основных параметров, оценить диапазоны ее устойчивости и критические точки перехода в неустойчивые состояния. В практической медицине проблема прогнозирования течения того или иного заболевания, четкой формулировки условий, при которых возможны переходы из нормы в патологию различной степени тяжести вплоть до критических состояний, является особенно актуальной. Для этого в распоряжении исследователя должна быть не сумма разрозненных экспериментальных данных, а математическая модель изучаемого яв-

Сокращение: ЛДФ — лазерная доплеровская флоуметрия.

ления и точные математические методы оценки ее устойчивости. В настоящее время предпринимаются попытки построения математических моделей, описывающих колебательные процессы в сердечно-сосудистой системе [6–11], однако при их формулировке не учитываются обнаруженные разными исследователями в последние годы фундаментальные закономерности лево-правосторонней асимметрии [12–17]. Установлено, что в механизмах регуляции колебательных процессов перфузии в различных органах и тканях важную роль играют корреляционные взаимосвязи между показателями микроциркуляции симметричных областей [13–17]. Показано [17], что реакция показателей микроциркуляции верхних конечностей на возмущающее воздействие в виде асимметричных физических нагрузок зависит от исходных значений показателей микроциркуляции не только одноименной, но и противоположной стороны измерения. При этом оказалось, что исходные и возмущенные временные ряды микроциркуляции характеризуются и инверсной динамикой лево-правосторонней асимметрии геометрических форм аттракторов [18].

Однако механизмы, лежащие в основе этих процессов, не ясны, также как не сформулирована математическая модель, позволяющая рассчитывать критические точки перехода системы в неустойчивые состояния и патологические режимы.

Целью настоящего исследования явилась разработка математической модели, описывающей экспериментальные закономерности лево-правосторонней асимметрии колебательных процессов в системе микроциркуляции, и исследование условий устойчивости этой модели.

МЕТОДИКА

Измерения показателей микроциркуляции проводились у пяти здоровых добровольцев (мужчины 50–70 лет, правши) методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью двухканального прибора ЛАКК-02 (ООО НПП «ЛАЗМА», Москва) [20]. Датчики ЛДФ-сигнала фиксировали на наружной поверхности симметричных областей нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Синхронные измерения показателей микроциркуляции слева ($ПМ_{лев}$) и справа ($ПМ_{прав}$) выполняли в дневное время суток через каждые три часа (5 измерений в день) в течение пяти дней. Записи ЛДФ-сигнала проведены с частотой 20 Гц в течение 1 мин с интервалом отсчетов 0.05 с. Далее методом множественного регрессионного анализа изучали взаимосвязи между изменениями перфузии каждой из сторон наблюдения и исходными значениями перфузии

как одноименной, так и противоположной стороны наблюдения. С этой целью для каждого испытуемого рассчитывались параметры $a_0, a_1, a_2, b_0, b_1, b_2$ регрессионных уравнений

$$\begin{cases} \Delta x_1 = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2, \\ \Delta x_2 = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2. \end{cases} \quad (1)$$

Значимость результатов регрессионного анализа оценивали стандартными статистическими методами. Полученная регрессионная модель была положена в основу математической модели, сформулированной в виде системы линейных дифференциальных уравнений (см. описание ниже).

Дальнейшие исследования решений этой системы и их устойчивости проводили с использованием известных математических методов [20]. Расчеты проводили в условных (перфузионных) единицах с помощью программного обеспечения, входящего в пакеты прикладных программ Statistica и Excel for Windows (v. 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Регрессионный анализ. На рис. 1 представлены временные ряды, отражающие динамику синхронных измерений показателей микроциркуляции слева ($x_1 = ПМ_{лев}$) и справа ($x_2 = ПМ_{прав}$) у одного из испытуемых. Можно видеть, что флуктуации показателей микроциркуляции слева и справа – это разные, взаимно не накладывающиеся стохастические процессы. Статистический анализ этих процессов, выполненный для всех пяти испытуемых, показал, что среднее значение величины ПМ слева (6.97 ± 0.94) немного выше, чем справа (5.48 ± 0.89), но эта разница была не достоверна. Достоверных различий между средними значениями изменений Δx_1 и Δx_2 этих показателей слева и справа также не выявлено. Следующим этапом исследований явилось изучение количественных закономерностей изменений показателей микроциркуляции слева и справа, т. е. временных рядов $\{\Delta x_1[i]\}$ и $\{\Delta x_2[i]\}$, $i = 1, 2, 3, \dots, 100$. Для этой цели был использован метод множественного регрессионного анализа: была выполнена оценка коэффициентов регрессии $a_0, a_1, a_2, b_0, b_1, b_2$ системы уравнений (1) для всех фрагментов периодограмм по каждому испытуемому. Результаты расчетов представлены в табл. 1. Из этой таблицы можно видеть, что расчетные значения величин коэффициентов регрессии a_2 у всех испытуемых достоверно отличаются от 0 ($p < 0.05$). Это свидетельствует о том, что изменения показателя микроциркуляции слева ($\Delta x_1 = \Delta ПМ_{лев}$) зависят не только от исходных значений этого показателя слева ($x_1 = ПМ_{лев}$), но также и от величины этого показателя справа

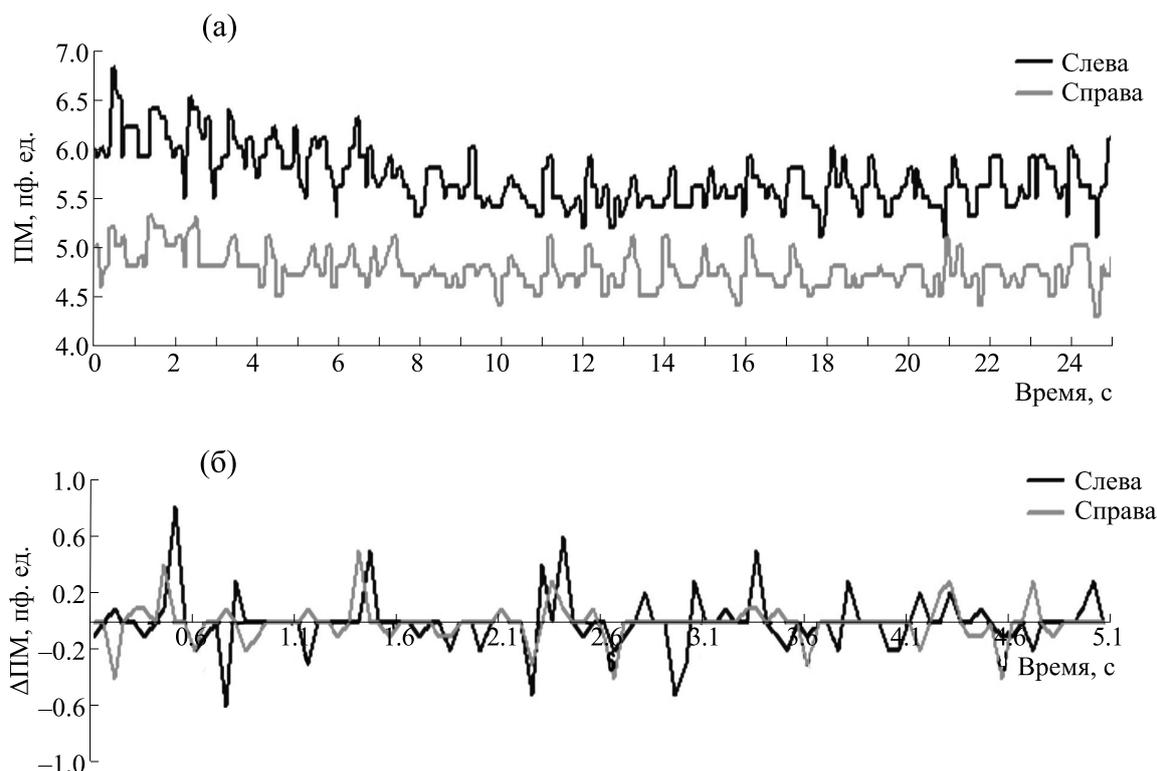


Рис. 1. Динамика изменений у одного испытуемого: (а) – показателей микроциркуляции слева ($x_1 = ПМ_{\text{лев}}$) и справа ($x_2 = ПМ_{\text{прав}}$), (б) – их изменений Δx_1 и Δx_2 .

($x_2 = ПМ_{\text{прав}}$). Аналогичная закономерность имеет место и для правой стороны наблюдения: расчетные значения величин коэффициентов регрессии b_1 у всех испытуемых достоверно отличаются от 0 ($p < 0.05$). Это свидетельствует о том, что изменения показателя микроциркуляции справа ($\Delta x_2 = \Delta ПМ_{\text{прав}}$) зависят не только от исходных значений этого показателя справа ($x_2 = ПМ_{\text{прав}}$), но также и от величины этого показателя слева

($x_1 = ПМ_{\text{лев}}$). Таким образом, результаты регрессионного анализа свидетельствуют о том, что изменения амплитуд флуктуаций микрокровотока симметричных областей верхних конечностей зависят от исходных значений этих показателей не только одноименной, но и противоположной стороны наблюдения.

На рис. 2 показаны примеры исходных и расчетных согласно регрессионным уравнениям (1)

Таблица 1. Расчетные значения средних величин коэффициентов регрессии ($M \pm m$) для пяти испытуемых

Коэффициент регрессии, усл.	№ испытуемого				
	1	2	3	4	5
a_2	$0.143 \pm 0.064^*$	$0.187 \pm 0.043^*$	$0.139 \pm 0.053^*$	$0.135 \pm 0.051^*$	$0.184 \pm 0.037^*$
a_1	-0.294 ± 0.021	-0.366 ± 0.027	-0.317 ± 0.048	-0.426 ± 0.032	-0.282 ± 0.018
a_0	1.024 ± 0.289	1.313 ± 0.222	1.651 ± 0.225	1.940 ± 0.342	0.534 ± 0.219
b_2	-0.363 ± 0.023	-0.318 ± 0.027	-0.303 ± 0.063	-0.284 ± 0.031	-0.307 ± 0.025
b_1	$0.132 \pm 0.031^{**}$	$0.104 \pm 0.024^{**}$	$0.135 \pm 0.044^{**}$	$0.151 \pm 0.037^{**}$	$0.078 \pm 0.021^{**}$
b_0	0.990 ± 0.110	1.421 ± 0.182	0.305 ± 0.059	1.305 ± 0.215	0.859 ± 0.193

Примечание. * – $a_2 > 0, p < 0.05$; ** $b_1 > 0, p < 0.05$.

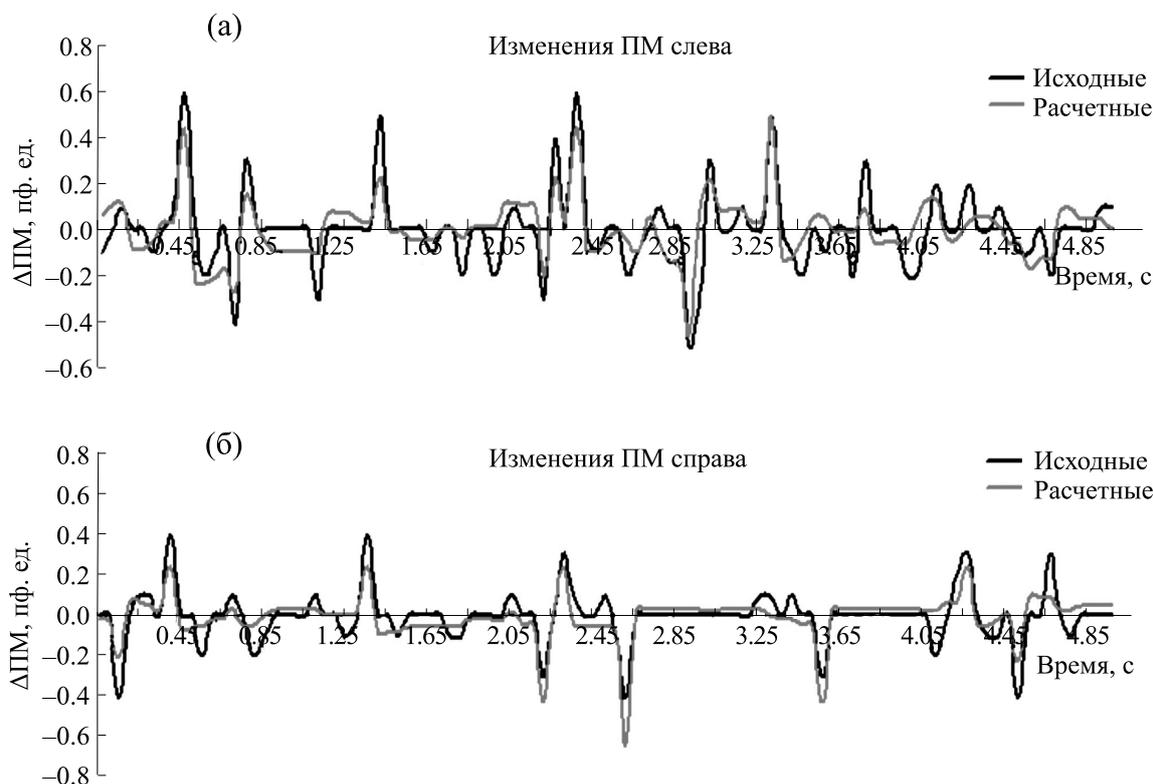


Рис. 2. Исходные и расчетные временные ряды, описывающие мгновенные значения изменений Δx_1 и Δx_2 показателей микроциркуляции для одного испытуемого.

и (2) временных рядов, описывающих мгновенные значения изменений Δx_1 и Δx_2 показателей микроциркуляции для одного из испытуемых. Можно видеть, что расчетные кривые изменений Δx_1 расч и Δx_2 расч достаточно хорошо описывают исходные кривые изменений показателей микроциркуляции. Дальнейшая проверка с помощью *F*-критерия Фишера показала статистическую достоверность выбранной регрессионной модели у всех пяти испытуемых. Таким образом, используемая в настоящем исследовании расчетно-экспериментальная методика позволила сформулировать статистически значимую эмпирическую регрессионную модель, описывающую динамику синхронных изменений показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека.

Другая отличительная особенность, обнаруженная в настоящем исследовании, касается величин регрессионных коэффициентов a_1 и b_2 . Результаты расчетов показали, что для всех испытуемых эти коэффициенты были отрицательные ($a_1 < 0$, $b_2 < 0$). Результаты регрессионного анализа, выполненного по всем фрагментам выборки ($N = 1250$) показали, что коэффициенты a_2 и b_1 в большинстве случаев были положительные ($a_2 >$

0 , $b_1 > 0$). Следует также отметить, что абсолютная величина коэффициента a_2 была, как правило, меньше, чем величина коэффициента a_1 , а абсолютная величина коэффициента b_1 — меньше, чем величина коэффициента b_2 . Таким образом, можно заключить, что изменения амплитуд флуктуаций микрокровотока коррелируют отрицательно с мгновенными значениями амплитуд микрокровотока той же стороны измерения и положительно с мгновенными значениями амплитуд микрокровотока противоположной стороны измерения. При этом с одноименной стороны наблюдения имеет место более сильное влияние, чем с противоположной стороны.

Результаты проведенных исследований также показали, что геометрические области экспериментальных значений коэффициентов (a_1 , a_2) и (b_1 , b_2) совпадают, что позволило их представить на одной фазовой плоскости. Это можно видеть на рис. 3, на котором показаны типичные примеры геометрических областей экспериментальных значений коэффициентов (a_1 , a_2) и (b_1 , b_2) для одного испытуемого. Подобная закономерность наблюдалась у всех пяти испытуемых. Указанная особенность позволяет сделать предположение, что регрессионные коэффициенты $\{a_1, a_2\}$ и

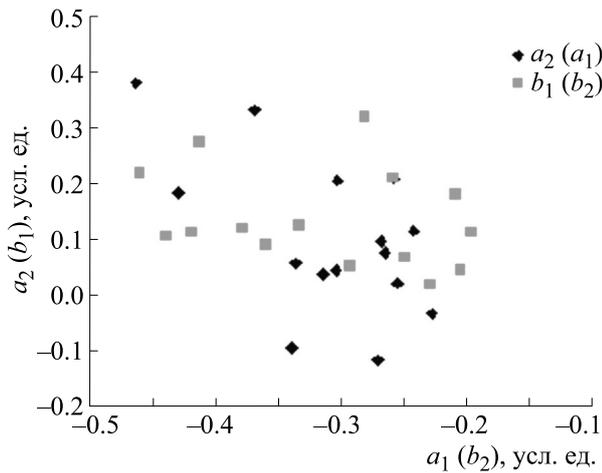


Рис. 3. Пример геометрических областей экспериментальных значений коэффициентов (a_1, a_2) и (b_1, b_2) для одного испытуемого.

$\{b_1, b_2\}$, возможно, не являются независимыми. Для выяснения характера этих взаимосвязей требуются дальнейшие исследования.

Математическая модель. Закономерности изменения показателей микроциркуляции, описываемые системой регрессионных уравнений (1), дают основание полагать, что при малых изменениях $\{\Delta x_1[i]\}$ и $\{\Delta x_2[i]\}$ (а это действительно имело место, поскольку интервал отсчета периодограммы $\Delta t[i] = 0.05$ с), систему регрессионных уравнений (1) можно заменить аналогичной системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} dx_1 / dt = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2, \\ dx_2 / dt = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2. \end{cases} \quad (2)$$

Эта система дифференциальных уравнений была положена в основу математической модели. Числовые значения регрессионных коэффициентов, определяющие параметры модели, представлены в табл. 1. Известно [20], что решение системы дифференциальных уравнений первого порядка с постоянными коэффициентами может быть получено путем сведения этой системы к одному линейному дифференциальному уравнению более высокого порядка

$$(T_1 p^2 + T_2 p + 1)x_2 = K, \quad (3)$$

где p – оператор дифференцирования, а коэффициенты T_1, T_2 и K равны соответственно:

$$T_1 = 1/(a_1 b_2 - b_1 a_2), \quad (4)$$

$$T_2 = (b_2 + a_1)/(b_1 a_2 - a_1 b_2), \quad (5)$$

$$K = (b_1 a_0 - a_1 b_0)/(a_1 b_2 - b_1 a_2), \quad (6)$$

а поведение системы будет определяться корнями характеристического уравнения

$$(T_1 \lambda^2 + T_2 \lambda + 1)x_2 = 0. \quad (7)$$

Таким образом, математическая модель позволяет получить общее решение $\{x_1(t), x_2(t)\}$ системы линейных дифференциальных уравнений (2), описывающих процессы регуляции показателей микроциркуляции в симметричных областях парных органов человека.

Устойчивость процессов кровообращения в микроциркуляторном русле. Одним из важных вопросов, возникающих при исследовании физиологических систем, является вопрос о механизмах обеспечения устойчивости их функционирования. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что функционирование системы микроциркуляции в симметричных отделах парных органов человека подчиняется строгим математическим закономерностям, описываемым системой линейных дифференциальных уравнений (2), поэтому исследование условий устойчивости этой системы может быть выполнено стандартными математическими методами. Согласно критерию Гурвица [20], исследование на устойчивость системы линейных дифференциальных уравнений n -го порядка сводится к нахождению условий отрицательности действительных частей соответствующего характеристического уравнения. Применительно к нашему случаю все корни характеристического уравнения (7) будут отрицательные, и система дифференциальных уравнений (2) будет иметь устойчивые решения в том случае, если

$$T_1 = 1/(a_1 b_2 - b_1 a_2) > 0, \quad (8)$$

$$T_2 = -(b_2 + a_1)/(a_1 b_2 - b_1 a_2) > 0. \quad (9)$$

При этом величины T_1 и T_2 связаны условием:

$$\zeta = T_2/2T_1 < 1. \quad (10)$$

Это условие означает, что корни характеристического уравнения (7) являются комплексными. Поскольку система дифференциальных уравнений (2) описывает колебательный процесс, характеристики которого зависят от конкретных числовых значений параметров $a_0, a_1, a_2, b_0, b_1, b_2$, то в зависимости от величины ζ возможны разные варианты поведения исследуемой колебательной системы. С ростом ζ колебательность переходного процесса уменьшается, исчезая совсем при $\zeta = 1$.

Таким образом, математическая модель позволяет оценить устойчивость процессов кровообращения в микроциркуляторном русле. В ходе настоящих исследований нами были проведено тестирование всех испытуемых на устойчивость системы микроциркуляции. С этой целью для всех испытуемых были рассчитаны числовые значения параметров T_1, T_2 и ζ и выполнена проверка выполнения условий (8)–(10). Результаты те-

Таблица 2. Числовые значения коэффициентов регрессии $\{a_1, a_2, b_1, b_2\}$, параметров $\{T_1, T_2, \xi\}$, а также результаты проверки математической модели на устойчивость для всех испытуемых

№ испытуемого	Коэффициенты регрессии				Условия устойчивости					
	a_1	a_2	b_1	b_2	T_1	$T_1 > 0$	T_2	$T_2 > 0$	ξ	$T < i$
1	-0.294	0.143	0.132	-0.363	11.384	TRUE	7.479	TRUE	0.329	TRUE
2	-0.366	0.187	0.104	-0.318	10.316	TRUE	7.056	TRUE	0.342	TRUE
3	-0.317	0.139	0.135	-0.303	12.939	TRUE	8.022	TRUE	0.310	TRUE
4	-0.426	0.135	0.151	-0.284	9.940	TRUE	7.058	TRUE	0.355	TRUE
5	-0.282	0.184	0.078	-0.307	13.846	TRUE	8.155	TRUE	0.295	TRUE

стирования представлены в табл. 2, из которой можно видеть, что величины регрессионных коэффициентов у всех испытуемых удовлетворяли условиям устойчивости, неустойчивые состояния не обнаружены.

Упрощенная модель. Результаты настоящего исследования показали, что геометрические области экспериментальных значений коэффициентов (a_1, a_2) и (b_1, b_2) совпадают, что позволило сделать предположение о наличии взаимосвязи между регрессионными коэффициентами. Проверка этого предположения была выполнена методом регрессионного анализа. Результаты анализа подтвердили это предположение. Оказалось, что коэффициент a_2 связан линейной зависимостью с коэффициентом b_1 , а коэффициент a_1 связан линейной зависимостью с коэффициентом b_2 . Эти зависимости описываются регрессионными уравнениями

$$a_2 = -0.82b_1 + 0.26, \quad (11)$$

$$a_1 = -1.16b_2 - 0.70. \quad (12)$$

Уравнения (11) и (12) позволяют упростить модель. Снизив точность оценок коэффициентов путем их округления, получим:

$$a_2 = -b_1 + 0.3, \quad (13)$$

$$a_1 = -b_2 - 0.7. \quad (14)$$

Уравнения (13) и (14) положены в основу упрощенной модели. В этом случае условие устойчивости (8) $T_1 > 0$ сводится к неравенству

$$a_1(a_1 - 0.7) - a_2(a_2 + 0.3) > 0. \quad (15)$$

Если ввести обозначение $F_2 = a_2(a_2 + 0.3)$, то нахождение области устойчивости, удовлетворяющей условию (15), сводится к нахождению корней квадратного уравнения

$$a_1^2 - 0.7a_1 - F_2 = 0. \quad (16)$$

Поэтому имеем:

$$a_{1(1 \text{ и } 2)} = 0.35 \pm 1/2 \sqrt{(0.49 + 4F_2)}. \quad (17)$$

Это уравнение определяет две ветви парабол в плоскости переменных $\{a_2, a_1\}$. Из них вторая парабола является не значимой, так как находится вне диапазона реальных экспериментальных значений коэффициентов. Поэтому она не участвует в дальнейших расчетах. Для окончательного формирования области устойчивости в плоскости переменных $\{a_2, a_1\}$ помимо первой параболы необходимо учитывать дополнительные ограничения

$$-0.65 < a_1 < 0 \text{ и } a_2 > -0.3, \quad (18)$$

которые следуют из (10) и (15). Окончательный контур области устойчивости в плоскости переменных $\{a_2, a_1\}$ с учетом всех ограничений показан на рис. 4а. Аналогично рассчитываются контуры геометрических областей устойчивости в плоскости переменных $\{b_2, b_1\}$. Подставляя (13) и (14) в (8), получим, что условие устойчивости $T_1 > 0$ сводится к нахождению корней квадратного уравнения

$$b_1^2 - 0.3b_1 - FF_2 = 0, \quad (19)$$

где мы ввели обозначение

$$FF_2(b_2) = b_2^2 + 0.7b_2. \quad (20)$$

Поэтому имеем

$$b_{1(1 \text{ и } 2)} = 0.15 \pm 1/2 \sqrt{(0.15 + 4FF_2)}. \quad (21)$$

Это уравнение определяет две ветви парабол в плоскости переменных $\{b_2, b_1\}$. Для окончательного формирования области устойчивости в

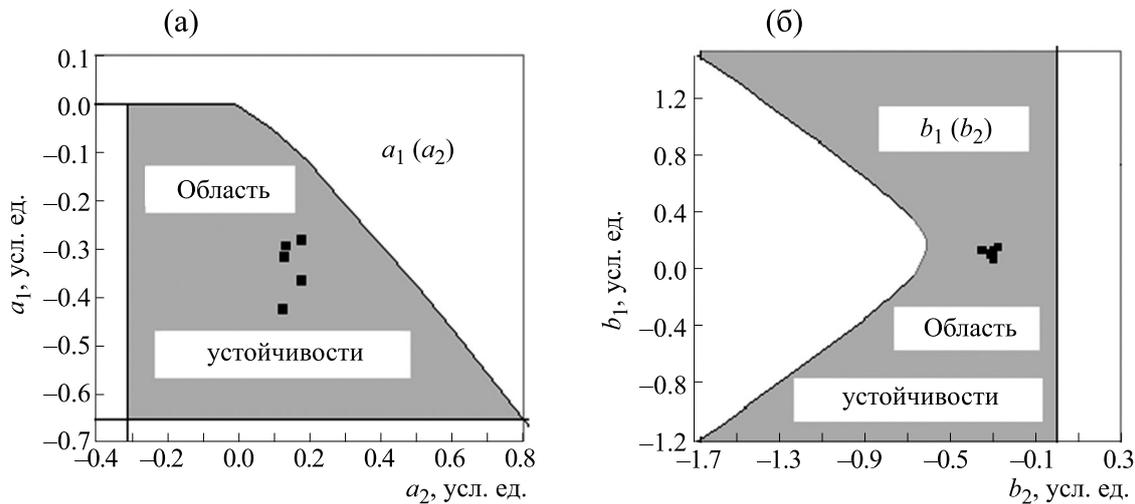


Рис. 4. Области устойчивости параметров математической модели; (а) – в плоскости параметров (a_2, a_1) , (б) – в плоскости параметров (b_2, b_1) .

плоскости переменных $\{b_2, b_1\}$ необходимо также учитывать дополнительные ограничения

$$b_2 < 0 \text{ и } |b_2| < 1.7, \quad (22)$$

которые следуют из условий (10) и (15). Окончательный контур области устойчивости в плоскости переменных $\{b_2, b_1\}$ с учетом всех ограничений показан на рис. 4б. Результаты тестирования на устойчивость упрощенной модели показали, что величины регрессионных коэффициентов у всех испытуемых находились внутри областей устойчивости, что можно видеть из рис. 4. На рис. 4а показаны локализации точек коэффициентов $\{a_1, a_2\}$ по каждому испытуемому (табл. 1), а на рис. 4б – аналогичные локализации точек коэффициентов $\{b_1, b_2\}$. Можно видеть, что все коэффициенты находятся в пределах контуров расчетных геометрических областей устойчивости, неустойчивые состояния не обнаружены.

Таким образом, разработанная нами математическая модель позволяет определить количественные критерии, разделяющие нормальные (устойчивые) и патологические (неустойчивые) режимы функционирования системы микроциркуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что определяющим фактором в поддержании устойчивости функционирования системы регионарного кровообращения человека является не величина перфузии на той или другой стороне измерения, а право-левосторонний баланс кровоснабжения симметричных регионов. Степень сбалансированности кровоснабжения симмет-

ричных регионов микроциркуляторного русла определяется параметрами математической модели, описываемой системой дифференциальных уравнений (2). Сформулированные нами критерии взаимосвязи между числовыми значениями этих параметров, выраженные в соотношениях (8)–(10), определяют условия устойчивости функционирования целостной системы микроциркуляции. Результаты настоящих исследований подтверждают ранее сформулированный в работах С.П. Ногиной (см. работу [21]) принцип право-левого гемодинамического баланса, определяющий пространственно-временную организацию гемодинамической системы и выявляющий ее интегративную роль в отношении снабжаемых органов. Ею было показано, что гемодинамическая система представляет собой самоорганизующуюся систему, устойчивость которой обеспечивается право-левым гемодинамическим балансом и пространственно-временной организацией сосудистого русла. Сформулированный С.П. Ногиной принцип право-левого гемодинамического баланса тесно связан с другим фундаментальным свойством гемодинамической системы – свойством хиральности. Это одно из основополагающих свойств живых организмов, проявляющихся на различных уровнях их организации, как на системном уровне, так и на регионарном. Оказалось, что хиральность регионарного кровотока у животных проявляется с самого рождения и на всех дальнейших этапах их онтогенетического развития [15]. Полученные нами результаты, сформулированные в виде математической модели, не только подтверждают теоретическую концепцию С.П. Ногиной об определяющей роли право-левого гемодинамического баланса в обеспечении устойчивости функцио-

нирования гемодинамической системы человека и животных, но и содержат практические рекомендации по оценке устойчивости системы регионарного кровообращения исследуемых органов.

Результаты настоящего исследования могут найти применение в практической медицине, так как с помощью модели можно проводить персонализированные оценки состояния системы микроциркуляции у различных групп населения и прогнозировать вероятности перехода этой системы в патологические режимы и критические состояния.

ВЫВОДЫ

1. Впервые сформулированы регрессионные уравнения, описывающие флуктуации показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека.

2. Установлено, что изменения амплитуд флуктуаций микрокровоотока симметричных областей верхних конечностей зависят от исходных значений этих показателей не только одноименной, но и противоположной стороны наблюдения.

3. Показано, что изменения амплитуд флуктуаций микрокровоотока коррелируют отрицательно с мгновенными значениями амплитуд микрокровоотока той же стороны измерения и положительно с мгновенными значениями амплитуд микрокровоотока противоположной стороны измерения.

4. Впервые сформулирована математическая модель, описывающая флуктуации показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека.

5. Показано, что устойчивость функционирования системы регионарного кровообращения человека определяется параметрами математической модели и сформулированы критерии взаимосвязи между числовыми значениями этих параметров.

6. Впервые показано, что функционирование системы регионарного кровообращения описывается строгими математическими уравнениями, определяющими сбалансированность кровоснабжения правого и левого микроциркуляторного русла, направленную на поддержание устойчивости всей системы.

7. Результаты исследования могут быть использованы в медицинской практике для разработки методов персонализированной оценки нарушений системы микроциркуляции и дифференцированных подходов к лечению пациентов с заболеваниями сердца и сосудов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Крупаткин, В. В. Сидоров и И. А. Кутепов. Регионарное кровообращение и микроциркуляция **8** (3), 21 (2009).
2. А. Н. Герасимов, Л. А. Михайличенко и М. И. Шпитанков, в кн. *Исследование операций (модели, системы, решения)* (ВЦ РАН, М., 2008), сс.140–146.
3. L. A. Mikhailichenko and D. D. Matsievskii. *Bull. Exp. Biol. Med.* **152** (3), 382 (2012).
4. A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **46** (10), 1230 (1999).
5. M. Thanaj, A. J. Chipperfield, and G. F. Clough. *Comput. Biol. Med.* **102** (1), 157 (2018).
6. А. А. Гриневич, Регионарное кровообращение и микроциркуляция **17** (68), 11 (2018).
7. A. Grinevich, A. Tankanag, I. Tikhonova, and N. Chemeris, *Microvasc. Res.* **126**, 103889 (2019).
8. A. J. Chipperfield, M. Thanaj, and G. F. Clough, **105** (9), 1452 (2020).
9. M. Thanaj and A. J. Chipperfield, in *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* (2019), p. 2281.
10. O. Forouzan, X. Yang, J. M. Sosa, et al., *Microvasc. Res.* **84** (2), 123 (2012).
11. A. Goltsov, A. Anisimova, A. Zakharkina, et al., *Front. Physiol.* **8** (160), 1 (2017).
12. M. Benedicic, A. Bernjak, A. Stefanovska, and R. Bosnjak, *Microvasc. Res.* **7** (1), 45 (2007).
13. Л. А. Михайличенко, Регионарное кровообращение и микроциркуляция **28** (4), 71 (2008).
14. L. A. Mikhailichenko and I. A. Tikhomirova, *Bull. Exp. Biol. Med.* **151** (1), 16 (2011).
15. L. A. Mikhailichenko and L. V. Mezentseva, *Bull. Exp. Biol. Med.* **158** (3), 308 (2015).
16. L.V. Mezentseva and S. S. Pertsov. *Bull. Exp. Biol. Med.* **166** (3), 301 (2019).
17. L. V. Mezentseva and S. S. Pertsov, *Human Physiol.* **46** (6), 671 (2020).
18. L. V. Mezentseva, *Biophysics* **66** (1), 149 (2021).
19. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*, под ред. А. И. Крупаткина и В. В. Сидорова (Медицина, М., 2005).
20. Л. Э. Эльсгольц, *Дифференциальные уравнения и вариационное исчисление* (Наука, М., 1969).
21. Л. В. Мезенцева, *Евразийский союз ученых* **11** (56), 21 (2018).

Regression Analysis and Mathematical Modeling of Fluctuations in Microcirculation Parameters of Symmetrical Regions of the Human Upper Limbs

L.V. Mezentseva

P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Baltyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

A new computational and experimental technique for assessing the stability of oscillatory processes in the regional circulatory system based on the analysis of fluctuations in blood microcirculation indices of symmetrical regions of the human upper limbs is proposed. Synchronous measurements of microcirculatory parameters of the symmetrical regions of the upper limbs in 5 healthy volunteers were carried out by laser Doppler flowmetry. Sensors were fixed to the symmetrically located landmarks on shoulders (the anterior regions of right and left upper arms) 3 cm from the point of the elbow bend. Regression equations are formulated that describe the relationship between microcirculation parameters that changed synchronously for the symmetrical regions of the upper limbs and the initial measured values for the left and right shoulders. It is shown that changes in the amplitudes of fluctuations in the microcirculatory flow in the symmetrical regions of the upper limbs are caused not only by the processes in one shoulder but also by the processes in the other. It is shown that changes in the microcirculation parameters are negatively correlated with instantaneous perfusion response of one shoulder under observation but positively correlated with that of the other. The ranges of numerical values of the model parameters are found; within these ranges, stable modes of functioning of the regional blood circulation system are seen. The results of the research can be used in medical practice since the model allows us to assess the state of the regional circulatory system in a patient and predict the likelihood of the transition of this system to pathological regimes and critical conditions.

Keywords: microcirculation, asymmetry, laser Doppler flowmetry, mathematical model, stability

ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ДИАФРАГМЫ МЫШИ В УСЛОВИЯХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ

© 2022 г. А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин

Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 11.01.2022 г.

Принята к публикации 24.01.2022 г.

В экспериментах *in vitro* на полоске диафрагмальной мышцы мыши методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлена роль синаптической модуляции в процессах адаптации двигательной единицы к аллергии. Различия в сократительной активности мышцы под влиянием экзогенной АТФ у интактных и сенсibilизированных яичным альбумином животных демонстрируют участие пуринаргических механизмов в развитии приспособительных изменений. В процессе сенсibilизации взаимодействие АТФ-зависимых механизмов как пост-, так и пресинаптической мембраны обеспечивает адекватную перестройку сократительной функции дыхательных мышц к бронхоконстрикции.

Ключевые слова: *m. diaphragma*, мышца, АТФ, белковая сенсibilизация, аллергия.

DOI: 10.31857/S0006302922030206, EDN: APYFUH

Механизмы адаптации поперечнополосатых мышц, обеспечивающих внешнее дыхание, при бронхиальной астме остаются до конца не изученными. Актуальность этой проблемы определяется как широким распространением аллергических заболеваний, так и вопросами спортивной медицины. В частности, хорошо известно, что среди участников олимпийских сборных скандинавских стран по зимним видам спорта встречается много астматиков [1, 2]. При обструкции воздухоносных путей в условиях повышения внешней нагрузки и развития вслед за этим гипоксии дыхательная мускулатура для компенсации возникающей кислородной недостаточности вынуждена работать интенсивнее. За счет чего происходит эта интенсификация, до конца не ясно. В предыдущих исследованиях нами было показано, что адаптация дыхательных мышц в условиях сенсibilизации обеспечивается АТФ-зависимыми механизмами, реализуемыми на постсинаптической мембране [3]. При белковой сенсibilизации АТФ как медиатор синаптической передачи нервно-мышечного соединения в значительной степени определяет динамику сократительной функции поперечнополосатых мышц. В этих работах показана роль постсинаптического звена реализации механизмов адаптации, на котором определяется его чувствительность к холиномиметику. В частности, различия в изменении силы сокращения на карбахоллин *in vitro* при

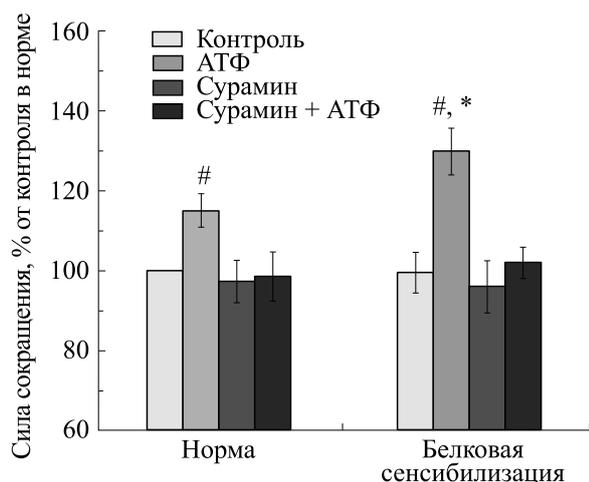
влиянии экзогенной АТФ на мышцы интактных и сенсibilизированных животных коррелируют с вектором изменения тока некантовой секреции ацетилхолина [3]. Пресинаптические структуры не могут оставаться непричастными к процессу адаптации, однако их вовлеченность в описанных условиях остается совершенно неизученной.

Цель данной работы заключалась в изучении роли пуринаргической синаптической модуляции диафрагмы (*m. diaphragma*) мышцы в адаптации к аллергической перестройке.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Эксперименты проводили на изолированных препаратах *m. diaphragma* 24 белых мышей обоего пола массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. Мышей сенсibilизировали яичным альбумином [3]. В качестве контроля использовали несенсibilизированных животных. Для эксперимента мыши были обескровлены под анестезией (этаминал натрия, 40 мг/кг), после чего из центральной части левой *m. diaphragma* выделяли полоску шириной 2–3 мм и длиной 15–18 мм.

Условия проведения экспериментов по регистрации параметров сокращения. Мышечный



Сила сокращений *m. diaphragma* мышцы, вызванных электрической стимуляцией интактных («Норма», $n = 14$) и сенсibilизированных («Белковая сенсibilизация», $n = 10$) животных в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; # – $p < 0.05$ от контроля в норме, * – $p < 0.05$ от эффекта АТФ в норме.

препарат помещали вертикально в термостатируемую ванночку объемом 10 мл. Один конец мышцы был зафиксирован, другой конец при помощи лигатуры крепили к датчику механической активности. Ванночку заполняли модифицированным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄·7H₂O – 1.18, глюкоза – 11.0, pH 7.4 ± 0.1. Условия изометрии достигались растяжением препарата мышцы в ванночке в течение 20 мин с силой 0.5 г при постоянной перфузии раствором при температуре 37°C. Сократительную реакцию изолированной мышцы вызывали при помощи электрического стимулятора MultiStim D330 (Digitimer, Великобритания) [2, 3]. Прямоугольные электрические импульсы частотой 0.1 Гц и длительностью 0.5 мс наносили в течение двух минут (двенадцать пиков). Среднее значение силы всех двенадцати сокращений анализировали как один результат. Силу сокращения оценивали в граммах. Ответы записывали с помощью изометрического механического датчика FSG-01 (Linton Instrumentation, Великобритания) и аналого-цифрового преобразователя MP100WSW (Biopack, США) [4, 5]. Результаты исследования наблюдали на мониторе и сохраняли на персональном компьютере.

Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов. В начале эксперимента сократительные ответы диафрагмы на электрическую стимуляцию регистрировали дважды с интервалом 5 мин (для оценки стабилизации ответов). Затем в ван-

ночку с раствором Кребса добавляли раствор АТФ в концентрации 100 мкМ, через 10 мин инкубации записывали сократительные ответы на электрическую стимуляцию. Далее ткань промывали несколько раз и инкубировали в течение 20 мин антагонистом (сурамином в концентрации 100 мкМ). После этого добавляли агонист (АТФ 100 мкМ) и повторно записывали сократительные ответы. Все сократительные ответы вычисляли в процентах от исходных сокращений.

Достоверность различий. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы статистической обработки SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривались как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электростимуляция полоски *m. diaphragma* сенсibilизированного животного практически не вызывала изменения силы ее сокращения в сравнении с контролем. Если у последних она составляла 542 ± 24 мг ($n = 14$), то в случае белковой сенсibilизации – 538 ± 27 мг ($n = 10$). Влияние экзогенного АТФ на мышцы обеих групп показало следующую динамику. У несенсibilизированных мышцей сила сокращения повышалась до 623 ± 23 мг, т.е. до $115.1 \pm 4.2\%$ ($n = 14$), а в условиях белковой сенсibilизации – до 703.5 ± 31.4 мг, т.е. до $129.8 \pm 5.8\%$ ($n = 10$). Более выраженное потенцирование сокращения дыхательной мышцы после влияния АТФ у второй группы в сравнении с первой (115.1% против 129.8%; $p < 0.05$) (см. рисунок) свидетельствует об участии пуринергических механизмов пресинаптических образований в адаптации *m. diaphragma* к белковой сенсibilизации. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе показана возможность комплексного подхода к изучению адапционных механизмов, которые развиваются в дыхательной мышце в условиях экспериментальной патологии. Дана дифференцированная оценка степени участия АТФ-зависимых механизмов в различных отделах мионеврального соединения. Используемая экспериментальная модель позволяет выявлять преимущественно пресинаптические эффекты пуринов, постсинаптические

эффекты становятся более выражены в условиях гипотермии [4–7].

Результаты исследований показали, что у диафрагмальной мышцы мыши в ходе аллергической перестройки при электростимуляции в присутствии экзогенной АТФ механизмы реализации сократительной функции претерпевают существенные изменения. Как известно, кроме выполнения в организме роли макроэрга АТФ является комедиатором синаптической передачи [8]. В предыдущих работах нами было показано, что в этих условиях пуринергические механизмы участвуют в изменении чувствительности постсинаптической мембраны диафрагмальной мышцы к холин timerметике [9]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что АТФ-зависимые процессы, локализованные и в пресинаптическом образовании, также вносят свой вклад в реализацию механизмов адаптации в условиях белковой сенсibilизации.

Если сама белковая сенсibilизация не оказывает значимого действия на силу сокращения диафрагмы, то инкубация с экзогенной АТФ приводила к росту этого показателя, причем у животных сенсibilизированной и контрольной групп степень этого увеличения существенно различалась. Обнаружено возрастание этого показателя у сенсibilизированных животных по сравнению с контрольными, что свидетельствует об участии пуринергических механизмов в процессах адаптации мышцы к условиям белковой сенсibilизации.

Различие динамики показателей, характеризующих пресинаптическое образование демонстрирует комплексную картину участия пуринов в адаптации мионеврального соединения к аллергической перестройке организма.

Диафрагмальная мышца во время подготовки к перспективной бронхоконстрикции внешне практически не меняет своих сократительных свойств. Однако начинают развиваться механизмы, которые в перспективе обеспечат повышение ее работоспособности. Участие АТФ как комедиатора в работе и пре-, и постсинаптической мембраны свидетельствует о сложных взаимоотношениях между этими процессами в различных частях мионеврального соединения, что регулирует сократительную деятельность дыхательной мышцы при аллергических реакциях.

Как известно, клетками-мишенями первого порядка в анафилактическом сокращении скелетных мышц теплокровных являются тучные клетки как источник гистамина, необходимого для реализации анафилактического сокращения мышц. Чувствительность скелетных мышц к гистамину регулируется нейротрофическим контролем; блокада аксонального транспорта аппликацией колхицина на седалищный нерв, сохраня-

ющая импульсацию по аксону, не приводит к появлению гиперчувствительности к гистамину, что делает невозможным ее сокращение на этот медиатор. Действие трофических факторов и импульсная активность мотонейрона регулирует синтез белков гистаминовых рецепторов по независимым механизмам [10]. Вероятно, таким образом белковая сенсibilизация изменяет функциональные характеристики мионеврального перехода за счет увеличения чувствительности постсинаптической терминали к холин timerметике и гистамину. Кроме этого, в немногочисленных источниках говорится о частичном изменении гистохимического профиля белкового состава мышц в результате белковой сенсibilизации, которое заключается в небольшом увеличении «быстрых» мышечных волокон [11, 12].

Описанные механизмы определяют способность организма противостоять гипоксии при ожидаемом снижении проходимости воздухоносных путей. Очевидно, что при реализации функции внешнего дыхания АТФ-зависимые механизмы в различных отделах мионеврального соединения взаимно дополняют друг друга. Этим в условиях необходимого роста работоспособности обеспечивается адаптация сократительных структур диафрагмы. Таким образом, поддерживается адекватный режим внешнего дыхания в условиях аллергической перестройки, что в свою очередь позволяет организму заранее подготовиться к предстоящим изменениям.

ВЫВОДЫ

Адаптация дыхательных мышц при аллергической перестройке обеспечивается пуринергическими механизмами и заключается в готовности противостоять перспективной гипоксии, возникающей вследствие бронхоспастического синдрома. Рост работоспособности *m. diaphragma* мышцы, компенсирующей кислородную недостаточность при обструкции воздухоносных путей, обеспечивается АТФ-опосредованными процессами как на уровне пре-, так и постсинаптических структур этой мышцы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Kippelen, F. Friemel, and P. Godard, *Rev. Mal. Respir.* **20** (3), 385 (2003).
2. L. P. Boulet and P. M. O'Byrne, *New Engl. J. Med.* **372** (7), 641 (2015).
3. A. Y. Teplov, S. N. Grishin, M. A. Mukhamedyarov, et al., *Exp. Physiol.* **94** (2), 264 (2009).
4. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., *Muscle & Nerve* **55** (3), 417 (2017).
5. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle & Nerve* **59** (4), 509 (2019).
6. A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics* **64**, 812 (2019).
7. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics* **65**, 858 (2020).
8. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6423 (2020).
9. А. Ю. Теплов, А. М. Фархутдинов, В. И. Торшин и др., *Вестн. новых мед. технологий* **21**, 6 (2014).
10. V. V. Valiullin and A. M. Devyataev, *Allergy* **50**, 381 (1995).
11. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biophysics* **53** (6), 592 (2008).
12. A. M. Devyataev and V. V. Valiullin, *Bull. Exp. Biol. Med.* **117** (2), 194 (1994).

Purinergic Mechanisms in the Adaptation of Mouse Diaphragm to Allergic Disorders

A.E. Khairullin, A.Yu. Teplov, S.N. Grishin, and A.U. Ziganshin

Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

In vitro study of a muscle strip from mouse diaphragm, while performing isometric contractions using mechanomyography during the application of electrical stimulation, revealed that synaptic modulation contributes to the processes of adaptation of the motor unit to allergy. Differences in muscle contractile activity under the influence of exogenous ATP in intact and egg albumin-sensitized animals demonstrate the involvement of purinergic mechanisms in the development of adaptive changes. In the process of sensitization, the interaction between pre- and postsynaptic ATP-dependent mechanisms ensures proper rearrangements in the contractile function of the respiratory muscles to bronchoconstriction.

Keywords: m. diaphragma, mouse, ATP, protein sensitization, allergy

СВЯЗЬ МОМЕНТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У ЖИВОТНЫХ В ПЕРИОД ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ С ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ФЛУКТУАЦИЙ ВТОРИЧНОГО КОСМИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2022 г. М.Е. Диатроптов*, А.И. Ануфриев**, М.В. Рутовская*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071, Ленинский просп., 33

**Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, 677980, Якутск, просп. Ленина, 41

E-mail: diatrom@inbox.ru

Поступила в редакцию 26.10.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 31.01.2022 г.

Сопоставлены моменты кратковременной нормотермии в период зимней спячки между ежами, находящимися в Московской области, и сусликами в Якутске. Метод наложенных эпох показал, что несмотря на расстояние между местами наблюдений примерно в 5000 км и систематическую удаленность животных, между моментами восстановления температуры тела ежей и сусликов наблюдается связь: максимальное число кратковременных восстановлений температуры тела у ежей наблюдается в те же дни, когда пробуждаются суслики. Во внутрисуточной динамике пробуждений установлен четырехчасовой биоритм: максимальное число эпизодов начала восстановления температуры тела как у ежей, так и у сусликов регистрируется по местному солнечному времени в интервалы времени 0–1, 4–5, 8–9, 12–13, 16–17 и 20–21 ч. Показана связь моментов восстановления температуры тела с интенсивностью флуктуаций вторичного космического излучения, регистрируемого нейтронным монитором. С выраженностью флуктуаций нейтронного счета коррелирует и интенсивность шумов кремниевого транзистора и температурных датчиков, которые имеют малые размеры, чтобы на них непосредственно влияли крайне низкие вариации космических лучей. Мы полагаем, что величина флуктуаций скорости счета нейтронного монитора является только маркером пока невыявленного биотропного агента.

Ключевые слова: гибернация, спонтанные пробуждения, внешние синхронизаторы, флуктуации скорости счета нейтронного монитора, млекопитающие.

DOI: 10.31857/S0006302922030218, EDN: ASIGTP

Принято считать, что наиболее вероятным синхронизатором как инфраничных (период 3–30 сут) так и ультрацичных (период < 23 ч) биологических ритмов являются квазиритмические колебания геомагнитного поля [1–6]. Нами также показана связь геомагнитных пульсаций Pс5 с ритмикой температуры тела на частотах 1.6, 2.3 и 3.1 мГц [7]. Однако дальнейшие эксперименты по пассивному экранированию с использованием пермаллового экрана, ослабляющего общее магнитное поле Земли в 35 раз, а в исследуемом диапазоне не менее чем в 5 раз, не привело к каким-либо изменениям характеристик ритмики температуры тела в диапазоне 4–20 мин и степени их синхронизации между опытной и контрольной группой лабораторных мышей [8]. В качестве альтернативного фактора, связанного с колебаниями температуры тела экспериментальных живот-

ных, была предложена динамика изменения скорости счета нейтронного монитора (НМ), которая не хуже, чем геомагнитное поле, синхронизована с исследуемым биологическим показателем [8]. Нужно отметить, что также возможным биотропным фактором, связанным с крупномасштабными Pс5-пульсациями геомагнитного поля, является напряженность электрического поля атмосферы, анализ которой мы пока не проводили.

Ранее нами у лабораторных крыс было проведено сопоставление параметров 100–400-минутных колебаний температуры тела, отражающих в этом диапазоне периодов ритмику активность/покой, с динамикой флуктуаций вторичного космического излучения у поверхности Земли, оцениваемого по показателю интенсивности счета НМ [9]. Сравнение спектров мощности, рассчитанных методом быстрого преобразования Фурье, для одновременных и сдвинутых по вре-

Сокращение: НМ – нейтронный монитор.

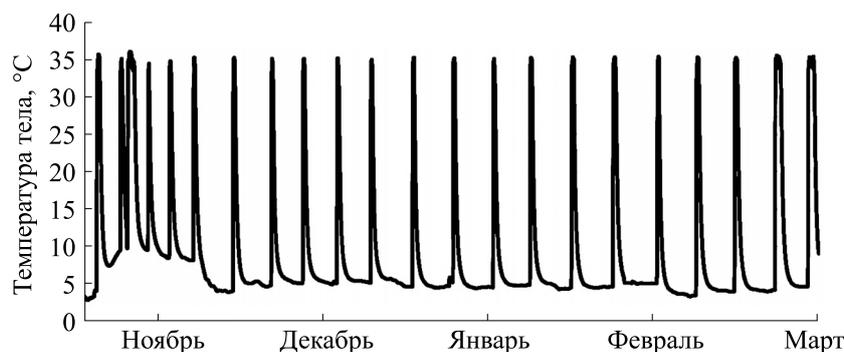


Рис. 1. Пример динамики температуры тела ежа в течение спячки зимой 2019–2020 гг.

мени колебаний температуры тела и интенсивности флуктуаций скорости счета НМ показало их взаимосвязанность только при одновременных измерениях. Следовательно, гипотеза о случайном совпадении этого физического фактора с биологическим параметром не состоятельна. Наблюдали совпадение не только спектральных характеристик исследуемого биологического и физического параметра, но и их фазы, что подтверждает предположение о стимулирующем влиянии увеличения интенсивности флуктуаций нейтронного счета на активность животных. Однако этот факт не доказывает прямого действия интенсивности флуктуаций НМ на организм. Интенсивность флуктуаций НМ можно рассматривать только как маркер реального биотропного квазиритмического фактора внешней среды.

Установлена связь и параметров инфраничных биологических ритмов с интенсивностью флуктуаций вторичного космического излучения [10]. Наблюдается статистически значимая положительная корреляционная связь между среднесуточной величиной ежеминутных изменений температуры тела мелких млекопитающих и уровнем флуктуаций показателя НМ. Также положительная корреляция выявлена между среднесуточной величиной ежеминутных изменений скорости счета НМ и среднесуточной двигательной активности животных и уровнем глюкокортикоидных гормонов. Причем, в ноябре-декабре разных лет проявляется преимущественно четырехсуточный ритм как анализируемых биологических параметров, так и флуктуаций НМ, а июле — трехсуточный. Факт одновременного изменения или нарушения периода в динамике биологического и физического параметра также указывает на их связанность.

Исходя из вышеперечисленных работ, в диапазоне периодов от 4 мин до 4 сут выявлена связь динамики ряда биологических процессов, обусловленных увеличением симпатических воздействий автономной нервной системы, с интенсивностью флуктуаций скорости счета НМ.

Изменение баланса тонуса симпатического/парасимпатического отделов вегетативной нервной системы вовлечено в механизм выхода из состояния гибернации [11, 12]. При входе в состояние оцепенения у животных наблюдается преобладание тонуса парасимпатической нервной системы, а при выходе — симпатической. В период зимней спячки на фоне температуры тела, близкой к нулю, облигатные гибернаторы периодически пробуждаются на короткие интервалы времени (рис. 1). Для состояния гибернации характерно снижение всех жизненных функций организма и в том числе: активности коры головного мозга, метаболизма, синтеза гормонов [13, 14]. Снижение перечисленных функций в период гибернации позволяет с меньшим количеством помех изучать активирующее влияние факторов внешней среды на нервную систему организма. Период между двумя последовательными кратковременными пробуждениями не постоянен и зависит от вида животного, интенсивности метаболизма, температуры среды, жировых запасов, начала или окончания всего периода гибернации, индивидуальных особенностей и др. [15]. Животное в состоянии гибернации можно рассматривать как детектор к внешним активирующим воздействиям, однако его чувствительность к ним не постоянна и помимо уже перечисленных факторов зависит от временного интервала от последнего пробуждения. Иными словами гибернирующий еж или суслик это детектор, но с постоянно изменяющейся чувствительностью. Тем не менее, группу животных в состоянии гибернации уже можно рассматривать как некий детектор биотропных факторов среды с усредненной и относительно постоянной чувствительностью.

Цель работы — установить возможную связь кратковременных моментов пробуждения животных в период их зимней спячки с интенсивностью флуктуаций вторичных космических лучей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были белогрудые ежи (*Erinaceus roumanicus*) и суслики (арктические (*Spermophilus parryi*) и длиннохвостые (*Spermophilus undulatus*)). Данные по динамике температуры тела при спячке были получены у 32 ежей (26 самцов и 6 самок) в том числе: зимой 2017–2018 г. ($n = 7$), 2018–2019 г. ($n = 7$), 2019–2020 г. ($n = 14$), 2020–2021 г. ($n = 4$). Температурные кривые у сусликов были получены от 25 животных на протяжении периода с 2005 по 2020 гг.

Белогрудые ежи были отловлены летом в Спасском районе Рязанской области. Масса их тела в сентябре колебалась от 880 до 1520 г. Ежей кормили куриным фаршем, смешанным с сырым яйцом. Животные зимовали в условиях, максимально приближенных к естественным. В открытой вольере, разделенной на сектора, были подготовлены искусственные норы для спячки. Нора представляла собой земляную яму около 40 см в глубину, сверху прикрытую пластиковым ящиком, с длиной сторон 90 см. Внутри все плотно заполнено сеном, с боков прикопано, сверху укрыто лапником и, впоследствии, снегом.

Длиннохвостые суслики были отловлены в окрестностях г. Якутска в радиусе 100 км. Арктических сусликов отлавливали в с. Батагай (Верхоянский хребет), в окрестностях животноводческой фермы Ютях. До начала сезона зимней спячки сусликов содержали в помещении вивария ИБПК СО РАН, на территории Ботанического сада в черте г. Якутска, в индивидуальных клетках-террариумах. Сусликов кормили вдоволь: зерно, комбикорм, семена подсолнечника, овощи. В середине сентября животных переводили в подвальное помещение вивария с укороченным световым днем и температурой среды, близкой к наблюдаемой в соответствующий сезон в почве, на глубине месторасположения зимовальных нор сусликов. С конца декабря температура в зимовальном подвале понижалась до значений ниже нуля, и на протяжении сезона спячки поддерживалась на уровне минус 3–5°C. Зимой 2018–2019 г. суслики зимовали в мерзлотной шахте института мерзлотоведения им. П.И. Мельникова СО РАН на глубине 16 м.

Температуру тела ежей измеряли внутрибрюшинно при помощи датчиков ДТНЗ-28 («ЭМБИ РЕСЕРЧ», Новосибирск), запрограммированных на ее измерение с частотой 1 раз в 20 мин. Операцию по внутрибрюшинному введению датчиков проводили за месяц до начала зимней спячки. В качестве анестетика использовали золетил («Vigbac Sante Animale», Франция) внутримышечно в дозе 15 мг/кг массы тела. Температуру среды контролировали таким же датчиком, установленным в искусственной норе без животного.

Наблюдения за температурой тела длиннохвостых и арктических сусликов проводили с использованием термохронов – температурных накопителей DS-1922 L, которые хирургически имплантировали в брюшную полость зверькам [15]. Для единообразия экспериментов использовали только молодых самцов обоих видов.

Для оценки величины флуктуаций космических лучей использовали данные станции нейтронного мониторинга ИЗМИРАНа (г. Троицк, Московской области; <http://cr0.izmiran.ru/mosc>), расположенной в 90 км от места исследования спячки ежей (база «Черноголовка»). Величиной флуктуации вторичных космических лучей считали усредненный за одни сутки показатель модуля ежеминутных изменений скорости нейтронного счета, скорректированного на величину атмосферного давления. Аналогичное значение получается при вычислении отношения величины ежеминутных изменений скорости счета НМ к общему некорректированному на атмосферное давление потоку.

При исследовании динамики шумовых сигналов использовали кремниевый транзистор П701А, обладающий высоким уровнем фликкер-шума. Шумовой сигнал после усиления операционным усилителем поступал на двухполупериодный выпрямитель и частотный фильтр, формирующий полосу пропускания от 0.1 до 1 Гц. Выпрямленное напряжение, пропорциональное амплитуде шума в указанной полосе частот регулировало длительность межимпульсных интервалов, поступающих на входы компьютерного регистратора. Для преобразования амплитуды в частоту регистрируемых компьютером импульсов использовали варикап. Устройство находилось в шкафу-термостате при температуре 31°C. Данные любезно предоставлены А.Г. Пархомовым.

Полученные данные статистически обрабатывали в программе Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). С целью выявления подобия динамик исследуемых биологических и физических параметров рассчитывали коэффициент их корреляции по Спирмену (r). Также был применен метод наложенных эпох, позволяющий выявлять связь между негармоническими процессами, когда значения показателей одного процесса накладываются относительно определенных моментов другого процесса. Спектры мощности колебаний вычисляли методом быстрого преобразования Фурье. Статистическая значимость различий числа случаев восстановления температуры тела животных в определенный день периода по сравнению со средним уровнем, или между соседними значениями оценивали по непараметрическому критерию: χ -тесту для оценки двух выборочных долей (SigmaStat). Результаты расчетов считали статистически значимым при $p < 0.05$.

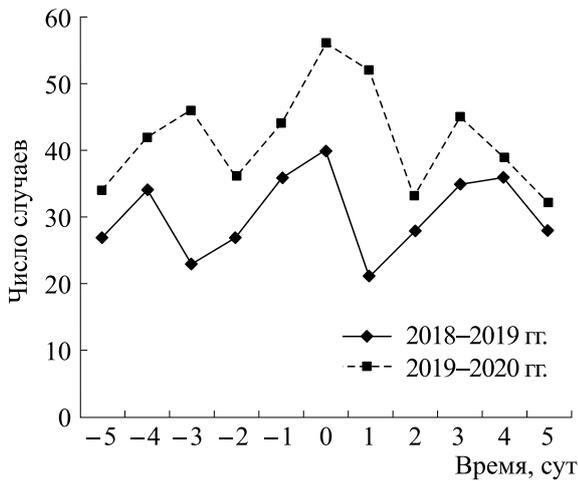


Рис. 2. Распределение методом наложенных эпох числа случаев восстановления температуры тела ежей (Московская обл.) относительно календарных дат пробуждения сусликов (Якутия) в период зимней спячки 2018–2019 и 2019–2020 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зимой 2018–2019 гг. нами было проведено параллельное исследование динамики температуры тела у ежей в Московской области и сусликов в г. Якутске, зимовавших на расстоянии около 5000 км между собой. С целью оценки согласованности моментов пробуждения у ежей и сусликов методом наложенных эпох было проведено распределение числа случаев восстановления температуры тела ежей относительно календарных дат пробуждения сусликов (рис. 2). Зимой

2018–2019 гг. в календарные даты выхода из гипотермии сусликов наблюдали максимальное число пробуждений у ежей (40 случаев), тогда как за 2 суток до и после рассматриваемых моментов наблюдали только по 27–28 событий. Аналогичное распределение наблюдали в период спячки 2019–2020 гг.: 56 случаев пробуждения ежей совпадали с пробуждением сусликов и по 33–36 событий происходили в период за 2 суток до и после этого момента. В сумме за два сезона исследования процент совпадений пробуждения ежей и сусликов статистически значимо превышал процент остальных событий ($p < 0.001$ по тесту сравнения выборочных долей). За 3–4 дня до и через 3–4 дня после пика также регистрировали высокое число пробуждений. Вероятно, данное распределение обусловлено совпадением по фазе около четырехсуточного ритма у ежей и сусликов. Следовательно, моменты пробуждений ежей совпадают с моментами пробуждений сусликов.

На рис. 3 представлен пример динамики пробуждений группы ежей в соответствии с изменением интенсивности флуктуаций НМ. Рассмотрение нами не абсолютных величин физического фактора, а его изменения определяется более вероятной реакцией организма именно на изменение параметров окружающей среды. Распределение методом наложенных эпох моментов пробуждения ежей относительно резких (>4 имп/мин) ежесуточных изменений интенсивности флуктуаций НМ представлено на рисунке 4. В день резкого увеличения интенсивности флуктуаций НМ наблюдается подавляющее большинство моментов кратковременных пробуждений животных (109 случаев), тогда как в период за одни-двое суток до и после таких мо-

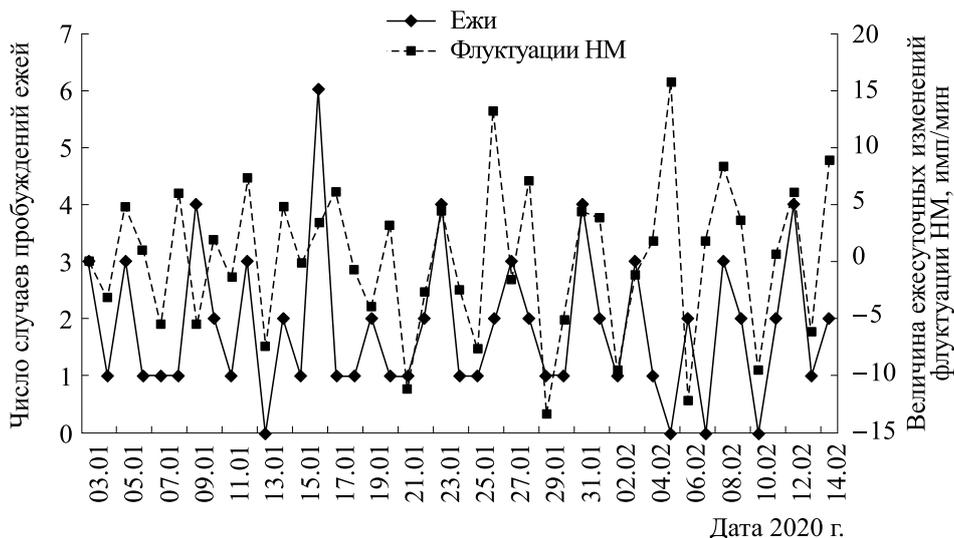


Рис. 3. Общее число случаев пробуждений ежей исследуемой группы ($n = 14$) в соответствии с величиной ежесуточного изменения среднесуточной интенсивности флуктуаций нейтронного монитора за период 3 января–14 февраля 2020 г.

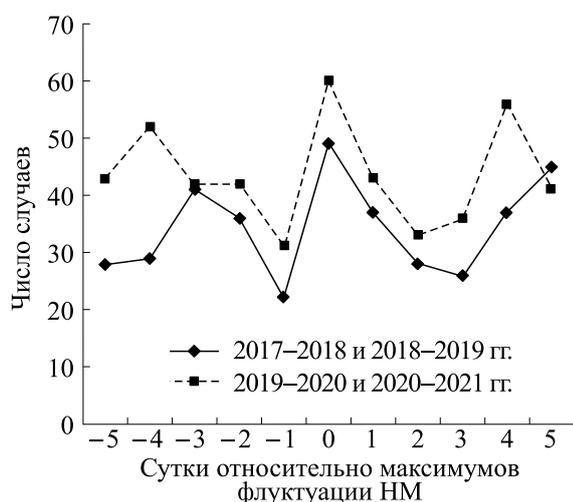


Рис. 4. Распределение методом наложенных эпох числа случаев восстановления температуры тела ежей относительно резких увеличений (> 4 имп/мин) среднесуточных значений интенсивности флуктуаций НМ.

ментов только по 68 случаев. Сравнение такого распределения по тесту сравнения выборочных долей статистически значимо: $p < 0.001$. Таким образом, существует достоверная связь между увеличением интенсивности флуктуаций НМ и пробуждением ежей. Также не случайный характер исследуемого процесса подтверждается сходством кривых распределения данных пробуждения ежей, полученных за период 2017–2019 гг. и 2019–2021 гг. ($r = 0.58$; $p = 0.057$). Нужно отметить, что, как и при распределении методом наложенных эпох моментов пробуждения ежей относительно сусликов, при распределении пробуждений животных относительно резких увеличений флуктуаций НМ в периоды за 3–4 сут до и после исследуемого момента наблюдали также увеличение числа пробудившихся особей.

Распределение начал восстановления температуры тела по часам суток выявило, что у ежей в первую половину суток заметен 4-часовой ритм, а у сусликов более выраженные 4-часовые колебания наблюдаются во второй половине суток (рис. 5). Распределение моментов начала восстановления температуры тела как ежей, так и сусликов по 4-часовому периоду показало, что в 0, 4, 8, 12, 16, 20 часов по местному солнечному времени в сумме их число составило 372, а во все остальные часы четырехчасового периода отмечено 249 случаев восстановления температуры (рис. 5б). Статистическая разница между показателями в максимуме по сравнению со средним уровнем достоверна (z -тест для оценки двух выборочных долей: $p = 0.006$ и $p = 0.008$ соответственно для ежей и сусликов). Следовательно, и у сусликов, и у ежей в динамике восстановления

температуры тела существует около четырехчасовая ритмичность, приуроченная к местному времени.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показана непосредственная связь между моментами кратковременных пробуждений сусликов в Якутии и ежей в Московской области. Учитывая, что расстояние между пунктами исследования около 5000 км, одновременные пробуждения животных в этих пунктах нельзя объяснить ни погодными условиями (к примеру, колебаниями атмосферного давления), ни другими местными факторами, а только глобальными. Учитывая, что исследованные виды животных относятся к разным семействам и имеют разные адаптационные стратегии, в том числе и разную среднюю частоту пробуждений, нельзя объяснить выявленный феномен случайным совпадением ритмики пробуждений.

Внутрисуточное распределение моментов пробуждения животных выявляет около 4-часовую ритмичность, проявляющуюся не по глобальному, а по местному времени. Необходимо учитывать, что гены циркадианной системы организма в период гибернации не функционируют [16–18], следовательно, этот ритм нельзя считать производным от циркадианного. Более того, другими авторами было показано, что ультрадианные ритмы активности животных относительно автономны от циркадианной системы организма [19, 20]. Следовательно, и внутрисуточное распределение частоты пробуждений следует рассматривать как влияние внешнего активирующего/раздражающего агента. Нужно отметить, что у человека именно в эти часы суток по местному времени наблюдается активация симпатoadrenalовой системы [21, 22].

Приуроченность большинства моментов пробуждения животных к периоду резкого увеличения интенсивности флуктуаций НМ указывает на его связь с внешним фактором, вызывающим активацию симпатического звена автономной нервной системы и/или угнетение парасимпатических влияний. Однако, на наш взгляд, данный феномен нельзя объяснить непосредственным влиянием вторичного космического излучения на животных, даже при предположении его активного взаимодействия с организмом. Общий поток вторичных галактических лучей примерно равен 10000 событий за 1 мин через 1 м^2 , а величина ежеминутных изменений потока в среднем 150 имп/мин. В пересчете на площадь зверька интенсивность флуктуаций составляет не более полутора событий при общем потоке 100 событий в минуту.

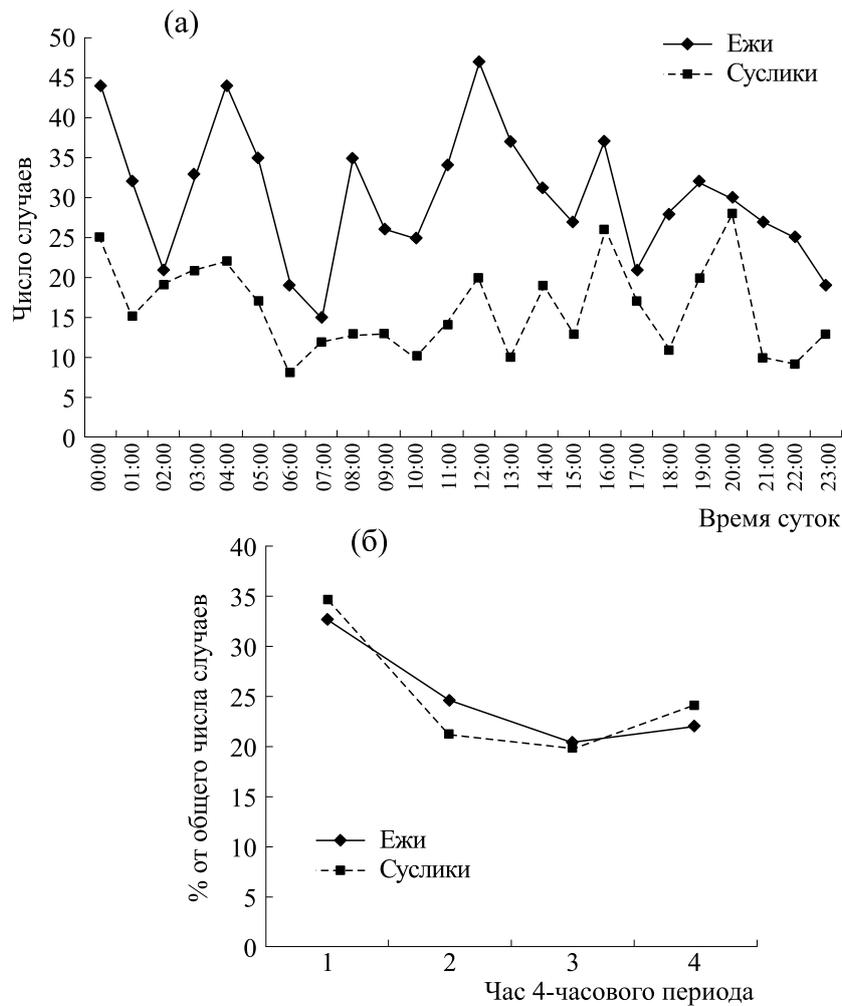


Рис. 5. Распределение моментов начала восстановления температуры тела у ежей и сусликов по времени суток (а) и по часам четырехчасового периода (б). К первому часу отнесены значения за интервалы 0:00–1:00, 4:00–5:00, 8:00–9:00, 12:00–13:00, 16:00–17:00 и 20:00–21:00, ко второму – за интервалы 1:00–2:00, 5:00–6:00, 9:00–10:00, 13:00–14:00, 17:00–18:00 и 21:00–22:00, к третьему – за интервалы 2:00–3:00, 6:00–7:00, 10:00–11:00, 14:00–15:00, 18:00–19:00 и 22:00–23:00, к четвертому – за интервалы 3:00–4:00, 7:00–8:00, 11:00–12:00, 15:00–16:00, 19:00–20:00 и 23:00–00:00. Данные представлены в процентах от общего числа случаев пробуждений.

При проверке адекватности применяемых в работе [7] методов регистрации незначительных колебаний температуры тела животных мы провели регистрацию температуры датчиками, помещенными в термостат при 37°C и в выключенный холодильник при комнатной температуре. Оказалось, что в обоих случаях и особенно при сниженном заряде аккумулятора датчика в ежеминутных изменениях показателя наблюдаются шумоподобные колебания на 1–3 единицы разрешения датчика. Эти колебания примерно в десять раз ниже зарегистрированных у животных, однако их характер заставляет задуматься над причиной их вызывающей. На рис. 6 приведен фрагмент динамики интенсивности ежеминутных изменений показаний температуры (среднее по 9 датчикам) и

НМ, усредненных в плавающем окне 30 мин. Для каждого двухсуточного отрезка исследования были вычислены коэффициенты кросс-корреляции спектров мощности колебаний измеренной датчиками температуры и интенсивности флуктуаций НМ для диапазона периодов 99–360 мин. На рис. 7 представлены результаты этих вычислений для одновременных и сдвинутых на двое суток временных рядов. Между значениями коэффициентов корреляции спектров, вычисленных для одновременных и сдвинутых на двое суток данных, наблюдается статистически значимое различие ($p = 0.013$). Это подтверждает частотную связь между шумом применяемых температурных датчиков и флуктуациями НМ, наблюдаемую в реальном времени, а не обусловленную случайным

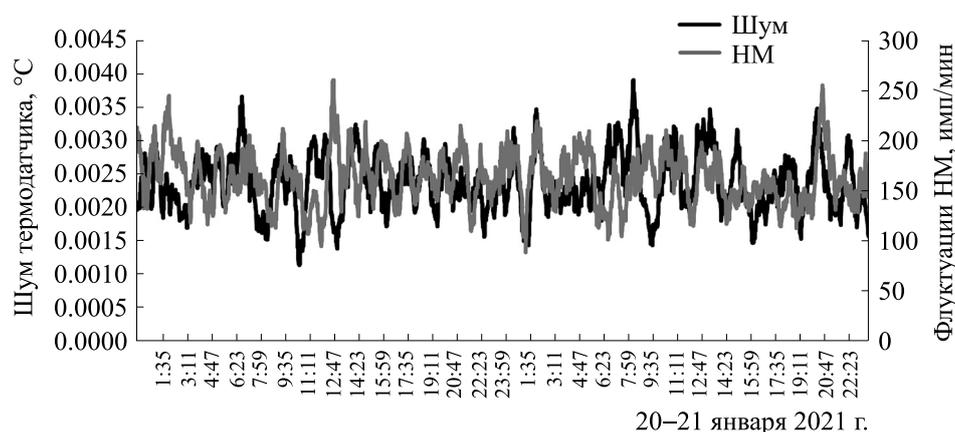


Рис. 6. Динамика интенсивности модуля ежеминутных изменений показаний температурных датчиков (среднее по девяти датчикам) и аналогичного параметра нейтронного монитора, усредненных в плавающем окне 30 мин.

совпадением одинаковых гармоник, характерных для обоих процессов. Пусть даже детектором является весь датчик площадью не более 0.5 см^2 , то ежеминутная разница между числом попаданий в него частиц вторичного космического излучения составит 0.008 событий. Следовательно, как и в случае с живыми объектами, интенсивность флуктуаций НМ является только маркером реально действующего агента.

Температурный датчик сложно устроен и включает в себя саму термопару, антенну для передачи информации, элемент питания, аналого-цифровой преобразователь и другие электронные элементы. Поэтому мы провели сопоставление

интенсивности шума кремниевого транзистора, помещенного в термостат при 31°C с интенсивностью флуктуаций НМ. Анализировали изменения среднесуточных значений интенсивности шума в транзисторе и флуктуаций НМ. Данные расчета коэффициента корреляции по двухмесячным интервалам приведены в таблице. В сумме за 14 месяцев коэффициент корреляции между ежесуточными изменениями шума транзистора и интенсивностью флуктуаций НМ составил 0.22 со статистической значимостью $p = 0.00005$. Интересно отметить, что также как и с биологическими параметрами, лучшую взаимную корреляцию

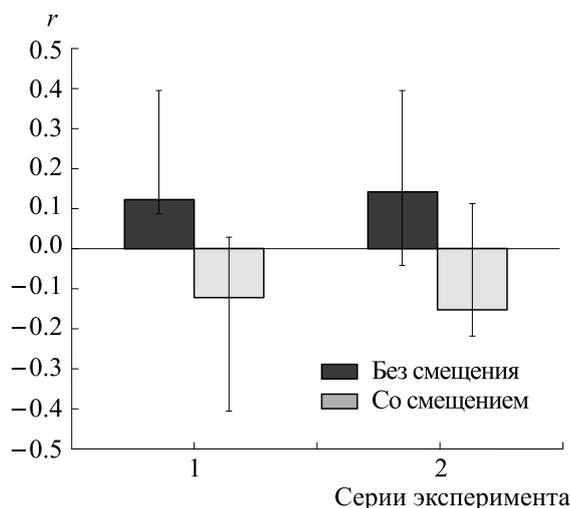


Рис. 7. Коэффициент кросскорреляции (r) спектров мощности в диапазоне 99–360 мин интенсивности шума термодатчиков (среднее по девяти датчикам) и флуктуаций нейтронного монитора. Представлены медианы и интерквартильный размах значений коэффициента корреляции, рассчитанных для двухсуточных интервалов при анализе одновременных данных и со смещением на двое суток. Серия 1 – с 14 по 25 января 2021 г. (число анализируемых интервалов – 6); серия 2 – с 25 февраля по 8 марта 2021 г. (число анализируемых интервалов – 6).

Рассчитанные коэффициенты корреляции между изменениями среднесуточных значений интенсивности шума кремниевого транзистора и флуктуаций НМ

Интервал исследования	Коэффициент корреляции r	Статистическая значимость
Ноябрь – декабрь 2002	0.30	0.023
Январь – февраль 2003	0.09	0.58
Март – апрель 2003	0.28	0.035
Май – июнь 2003	0.14	0.36
Июль – август 2003	0.10	0.43
Сентябрь – октябрь 2003	0.31	0.017
Ноябрь – декабрь 2003	0.28	0.030
Ноябрь 2002 – декабрь 2003	0.22	0.00005

имеют ежесуточные изменения параметров, а не их абсолютные ежесуточные значения.

Основным из неучтенных параметров окружающей среды, влияющим на интенсивность шумов в полупроводниках, является ионизирующая радиация. В интенсивности дегазации радона двумя независимыми коллективами установлена около четырехсуточная ритмичность [23, 24]. Необходимо экспериментально проверить динамику колебаний естественного радиоактивного фона и оценить ее интенсивность, чтобы принять или опровергнуть гипотезу такой взаимосвязи. Однако крайне маловероятно, чтобы настолько малые дозы радиации от приземного радона вызвали выявленные эффекты как в этой статье, так и в других наших исследованиях [7–10], где лабораторные животные находились на девятом этаже, где концентрация радона еще более низкая. Следует отметить, что при косвенном выявлении связи между биологическими и физическими процессами всегда нужно помнить, что ритмические изменения активности животных имеют периоды, выявляемые в флуктуациях самых разных процессов: собственных колебаний Земли, пульсаций геомагнитного поля, колебаний электрической напряженности атмосферы, микрофлуктуаций атмосферного давления, флуктуаций потока тепловых нейтронов и т.д. [25].

Не имея достаточной компетенции, детально мы не рассматриваем возможные механизмы связи интенсивности флуктуаций НМ с уровнем шу-

ма в приборах, а также и активностью животных. Однако, на наш взгляд, существуют две принципиальные возможности: 1) флуктуации потока вторичных космических лучей порождают колебания другого биотропного фактора среды, что, вероятно, может происходить на уровне ионизации верхних слоев атмосферы; 2) учитывая, что устройство НМ исключает внутренние шумы такого масштаба, существует дополнительный агент, который определяет как интенсивность флуктуаций скорости счета НМ, так и шумы в детекторах, а также сам влияет на активность животных.

Ритмичность проявления биологических параметров по местному времени дает дополнительную информацию при поиске не установленного биотропного фактора. Ранее нами было показано, что в двух группах мышей, изолированных от внешних световых ориентиров цикла смены день/ночь наличием постоянного освещения и разнесенными в долготном направлении (Москва-Ульяновск), фазы ритмов активности имеют синхронное проявление по местному, а не глобальному времени [26].

Дальнейшие поиски причины, вызывающей такие флуктуации НМ, или агента вызванного флуктуациями НМ позволят найти внешний фактор среды, в значительной степени влияющий на нервную систему животных, что приблизит нас к разработке способа немедикаментозного метода влияния на нервную систему организма

с целью коррекции ряда заболеваний, в том числе и нарушений сна.

ВЫВОДЫ

1) Несмотря на значительное расстояние (5000 км) между местами наблюдений за динамикой температуры тела сусликов и ежей, а также их принадлежности к разным семействам, выявлена закономерность: максимальное число моментов восстановления температуры тела ежей наблюдается в дни, когда выходят из состояния гипотермии суслики. Этот факт указывает на существование внешнего глобального фактора, вызывающего сдвиг баланса автономной нервной системы в сторону преобладания симпатических влияний, приводящего к пробуждению животных.

2) Установлена связь моментов кратковременных восстановлений температуры тела животных в период сна с возрастанием интенсивности флуктуаций скорости счета НМ. Из-за крайне малой величины флуктуаций потока вторичного космического излучения, на наш взгляд, нельзя рассматривать этот фактор как биотропный. Вероятно, интенсивность флуктуаций НМ является только маркером искомого биотропного фактора среды, влияющего на баланс вегетативной нервной системы.

3) Факты положительной корреляционной связи интенсивности шумов кремниевого транзистора с флуктуациями НМ и приуроченность к местному времени внутрисуточного около четырехчасового ритма в моментах пробуждения животных позволяет феноменологически точнее охарактеризовать искомый биотропный фактор, что поможет в его дальнейших поисках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работу с ежами проводили в ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих» на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН (Ногинский р-н Московской области).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИПЭЭ РАН 0089-2021-0004 «Экологические и эволюционные аспекты поведения и коммуникации животных».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными руководствовались Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Страсбург, 1986 г.). На проведение экспериментальной работы было получено положительное заключение этической комиссии ИПЭЭ РАН № 14 от 15.01.2018 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. М. Владимирский, В. Я. Нарманский и Н. А. Темуриянц, *Биофизика* **40** (4), 749 (1995).
2. В. С. Нарманский и Н. А. Темуриянц, *Геофизические процессы и биосфера* **8** (1), 36 (2009).
3. Т. А. Зенченко, А. А. Медведева, Н. И. Хорсева и Т. К. Бреус, *Геофизические процессы и биосфера* **12** (4) 74 (2013).
4. R. McCraty, M. Atkinson, V. Stolc, et al., *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **14** (7), 770 (2017).
5. S. Monto, S. Palva, J. Voipio, and J. M. Palva, *J. Neurosci.* **28**, 8268 (2008).
6. S. J. Palmer, M. J. Rycroft, and M. Cermack, *Surv. Geophys.* **27**, 557 (2006).
7. М. Е. Диатроптов, Н. В. Ягова, Д. В. Петровский и А. В. Суров, *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* **171** (5), 639 (2021).
8. М. Е. Диатроптов и М. А. Диатроптова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **171** (6), 777 (2021).
9. М. А. Диатроптова и М. Е. Диатроптов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **172** (7), 125 (2021).
10. М. Е. Диатроптов и М. А. Диатроптова // *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **172** (11), 632 (2021).
11. M. B. Harris and W. K. Milsom, *J. Exp. Biol.* **198**, 931 (1995).
12. W. K. Milsom, M. B. Zimmer, and M. B. Harris, *Comp. Biochem. Physiol. (A)* **124**, 383 (1999).
13. N. V. Shvareva and Z. G. Nevretdinova, *Zh. Evol. Biochim. Fiziol.* **24** (2), 188 (1988).
14. D. Zivadinović, M. Marjanović, and R. K. Andjus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1048**, 60 (2005).
15. А. И. Ануфриев *Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии* (СО РАН, Новосибирск, 2008).
16. C. T. Williams, M. Radonich, B. M. Barnes, et al., *J. Comp. Physiol.* **187** (5-6), 693 (2017).
17. Williams, B. M. Barnes, M. Richter, et al., *Physiol. Biochem. Zool.* **85** (4), 397 (2012).
18. T. Ikeno, C. T. Williams, C. L. Buck, et al., *J. Biol. Rhythms* **32** (3), 246 (2017).
19. B. J. Prendergast, Y. M. Cisse, E. J. Cable, and I. Zucker, *J. Biol. Rhythms* **27** (4) 287 (2012).
20. E. J. Waite, M. McKenna, Y. Kershaw, et al., *Eur. J. Neurosci.* **36** (8), 142 (2012).

21. Л. Я. Глыбин, В. А. Святуха и Г. Ш. Цициашвили, Биофизика **40** (4), 829 (1995).
22. А. А. Михайлис и Н. И. Микуляк, Современные проблемы науки и образования. **2**, (2015).
23. О. И. Аптикаева, К. А. Костенко, Е. И. Селюков и др., в *Атлас временных вариаций природных, антропогенных и социальных процессов* (Янус-К, М., 2013), сс. 255–266.
24. М. В. Сухоруков и А. А. Спивак, Успехи соврем. естествознания **1**, 94 (2017).
25. В. А. Панчелюга и М. С. Панчелюга, Биофизика **60** (2), 395 (2015).
26. М. Е. Диатроптов, С. М. Слесарев и Т. А. Зенченко, Бюл. эксперим. биологии и медицины **172** (7), 87 (2021).

A Connection between the Episodes of Normothermic Levels of Body Temperature in Animals during Hibernation and Secondary Cosmic Ray Intensity Fluctuations

M.E. Diatroptov*, A.I. Anufriev**, and M.V. Rutovskaya*

*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

**Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lenina, 41, Yakutsk, 677980 Russia

The episodes of normothermic levels of body temperature over a short time during hibernation in hedgehogs that live in the territory of the Moscow region and ground squirrels inhabiting Yakutsk were compared. The results of superposed epoch analysis have shown that although the distance between the observing sites is about 5000 km and hedgehogs and ground squirrels live in different places, there exists a connection between the episodes of normothermic levels of body temperature in the animals under study: the maximum number of the episodes of short-term normothermia in hedgehogs is observed on the same days when ground squirrels wake up. In the diurnal dynamics of wakefulness, a 4-hour biorhythm is created: the maximum amount of the episodes when body temperature starts to return to normothermia, both in hedgehogs and ground squirrels, is recorded according to local solar time within the time intervals 0–1 a.m., 4–5 a.m., 8–9 a.m., 12 a.m.–1 p.m., 4–5 p.m., 8–9 p.m. It has been shown that the episodes of normothermia in animals under study are associated with intensity fluctuations of secondary cosmic rays recorded by a neutron monitor. The intensity of the noise of the silicon transistor and temperature sensors, which are small in size so that they are directly affected by extremely low variations of cosmic rays, correlates with the severity of fluctuations in the neutron count. We believe that the magnitude of fluctuations counting rate of the neutron monitor is only a marker of a biotropic agent that has not yet been identified.

Keywords: hibernation, spontaneous arousal, external synchronizers, fluctuations in the neutron monitor counting rate, mammals

УДК 577.3

МЕТОД МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЛУЦЕНТИС И ЭЙЛЕА, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ НОВООБРАЗОВАНИЮ СОСУДОВ

© 2022 г. Л.М. Балашова*, **, Н.А. Бакунина*, **, В.А. Намиот***, И.И. Колесниченко****, Ю.Д. Кузнецова*, **, С.В. Лесовой**, Ж.М. Салмаси*, С.Н. Удальцов*****

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
E-mail: blm1962@yandex.ru

**НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей, 119034, Москва, ул. Пречистенка, 29/14

***Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

****Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 31/4

*****ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.

После доработки 14.10.2021 г.

Принята к публикации 06.12.2021 г.

Электрохимическим методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии изучена возможность определения препаратов «Луцентис» и «Эйлеа», препятствующих новообразованию сосудов. Показано, что метод пригоден для определения указанных препаратов. Рассмотрена динамика изменения их концентрации. Таким образом, расширен ряд органических веществ, которые определяются данным методом.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, анти-VEGF препараты, эйлеа, луцентис.

DOI: 10.31857/S000630292203022X, EDN: ASMEPN

Среди электрохимических методов анализа, одним из наиболее информативных является метод инверсионной вольтамперометрии. Этот метод широко используется при анализе неорганических веществ, в частности тяжелых металлов. Однако реализация метода инверсионной вольтамперометрии требует тщательной пробоподготовки, заключающейся в удалении из анализируемой пробы органических веществ, которые существенным образом влияют на вид аналитических вольтамперограмм. С другой стороны, способность органических веществ изменять поведение электрохимической системы, содержащей катионы различных металлов, также может быть использована для анализа соответствующих объектов. В Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Москва) с целью электрохимического анализа органических веществ был разработан метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии [1]. Этим ме-

тодом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами. Метод позволяет осуществлять идентификацию различных веществ на основании анализа характерных изменений вольтамперных кривых, происходящих в результате введения различных веществ в исходную тест-систему. Измерения можно проводить на одном индикаторном электроде, что является преимуществом по сравнению с мультисенсорными методами, требующими применения набора электродов.

Ранее метод экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии был опробован нами для ранней диагностики глаукомы по сыворотке крови [2]. В дальнейшем работоспособность и эффективность метода была показана нами, в частности, при определении ряда

офтальмологических препаратов — визомитина [3, 4], ланостерола [5], бетоптика и его дженериков [6, 7], а также местноанальгезирующих препаратов — наропина, хирокаина и лидокаина [8].

В данной работе была оценена возможность применения метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии для экспресс-определения препаратов «Луцентис» (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария) и «Эйлеа» (Ветгер Фарма-Фертигунг ГмбХ Байер, Германия).

Оба препарата используются в офтальмологии для лечения влажной формы возрастной макулярной дегенерации. Ранибизумаб (активное вещество препарата луцентиса) избирательно связывается с изоформами эндотелиального фактора роста сосудов и предотвращает их взаимодействие с их рецепторами на поверхности клеток эндотелия, что приводит к подавлению неоваскуляризации и пролиферации сосудов. Подавляя рост новообразованных сосудов хориоидеи в сетчатку, ранибизумаб останавливает прогрессирование экссудативно-геморрагической формы возрастной макулярной дегенерации и макулярного отека при сахарном диабете и окклюзии (тромбоз) вен сетчатки. Афлиберцепт (активное вещество препарата эйлеа) связывает сосудистый эндотелиальный фактор роста А с более высокой аффинностью, чем естественные рецепторы или другие препараты, в частности, ранибизумаб). Также афлиберцепт является единственным препаратом, способным связывать плацентарный фактор роста, вовлеченный в патогенез заболеваний сетчатки. Эйлеа имеет увеличенный период выведения из глаза, и это позволяет говорить о его более длительном клиническом эффекте. Согласно опубликованным данным продолжительность супрессии внутриглазного VEGF после интравитреального введения эйлеа в два раза превышает данный показатель у луцентиса. Большая продолжительность действия препарата является важным фактором, способствующим снижению общего количества требуемых инъекций для терапии хронических заболеваний сетчатки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования препаратов эйлеа и луцентис осуществляли с помощью электрохимического мультисенсорного анализатора ЭЛ-02 (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва). Общий вид анализатора и схема планарной электродной системы были представлены в работах [2–2]. Были использованы планарные электроды (ООО «КолорЭлектроник», Москва), представляющих собой пропиленовую пластину с нанесенными электродами (углеродный материал) и хлорсеребряным электродом сравнения. Схема планарного электрода была представлена в работе [2]. Так как пла-

нарные электроды являются одноразовыми, производить подготовку поверхности индикаторного электрода не требовалось. Сформированная на индикаторном электроде матрица сенсоров в нашем случае обеспечивала работу прибора в формате «Электронный язык» [9].

Вольтамперограммы, получаемые методом инверсионной вольтамперометрии, имеют характерный вид и хорошо воспроизводимы. Они представляют собой зависимости тока от потенциала рабочего электрода, меняющегося по линейному закону во времени. Известно, что состав фоновых электролитов заметно влияет как на величину токов растворения металлов, так и на потенциалы пиков. В данной работе в качестве электрохимической тест-системы использовали раствор электролита, содержащий катионы ряда металлов, обладающих способностью образовывать комплексные соединения с органическими веществами: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Hg^{2+} [1]. Введение в тест-систему анализируемых органических веществ приводит к изменению спектра вольтамперограмм. Эти изменения характерны для каждого из органических веществ (или смеси веществ), что позволяет проводить их идентификацию. При электрорастворении металлов с поверхности электрода потенциалы пиков токов растворения являются определяющей характеристикой растворяющегося металла, а их амплитуда зависит от количества электрорастворенного металла. Возрастание прочности образовавшихся комплексов приводит к увеличению высоты пика тока растворения металла и соответственно к уменьшению его ширины [10].

При проведении испытаний на планарные электроды наносили 50 мкл тест-системы, содержащей ионы металлов в одинаковых концентрациях ($5 \cdot 10^{-5}$ М), и регистрировали фоновую инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов -1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой потенциала до 0.3 В. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и 5 мкл исследуемых препаратов в различной концентрации и снова регистрировали инверсионные вольтамперограммы.

Всего было взято 15 проб. Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны фоновая вольтамперограмма и вольтамперограммы, полученные для препарата луцентиса в различных концентрациях *in vitro*. Можно видеть, что в присутствии луцентиса токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от

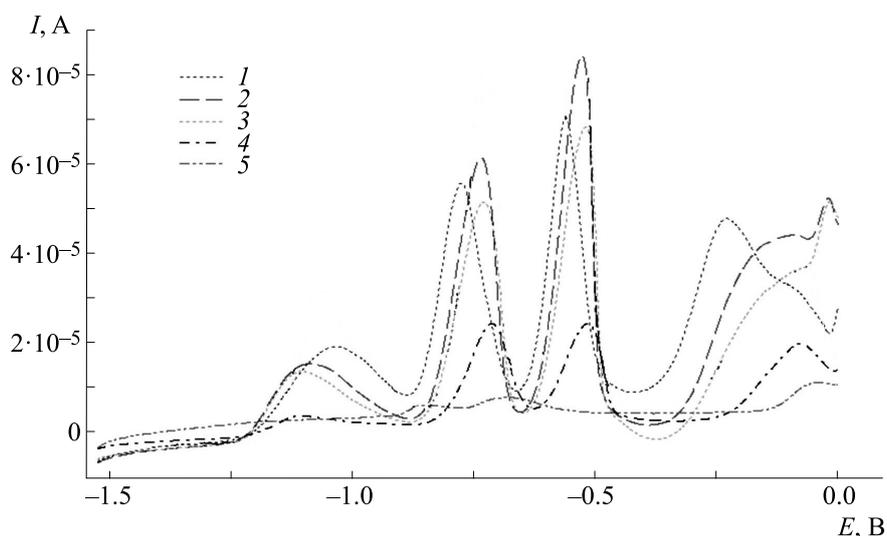


Рис. 1. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с луцентисом в различных концентрациях: 1 – тест-система, 2 – 10%, 3 – 20%, 4 – 40%, 5 – 60%.

концентрации препарата. Данные по воздействию луцентиса на тест-систему приведены в табл. 1.

Аналогичным образом было изучено влияние на тест-систему препарата эйлеа в различных концентрациях. Соответствующие вольтамперо-

граммы представлены на рис. 2, данные приведены в табл. 2.

Оказалось, что влияние обоих препаратов наблюдается в основном на токи таких металлов как медь и свинец; токи этих металлов уменьшаются от 32 до 6 мкА для меди и от 58 до 20 мкА – для свинца в случае луцентиса и немного менее – в

Таблица 1. Влияние луцентиса на тест-систему

	Концентрация луцентиса	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	–	16	45	58	32	40	80
Луцентис	10%	21	42	55	10	30	50
	20%	15	30	45	11	25	40
	40%	10	25	30	9	20	25
	60%	10	15	20	6	7	10

Таблица 2. Влияние эйлеа на тест-систему

	Концентрация эйлеа	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	–	16	45	58	32	40	80
Эйлеа	10%	10	40	54	25	21	70
	20%	10	30	45	15	15	60
	30%	9	25	35	10	10	45
	40%	9	20	30	10	13	30

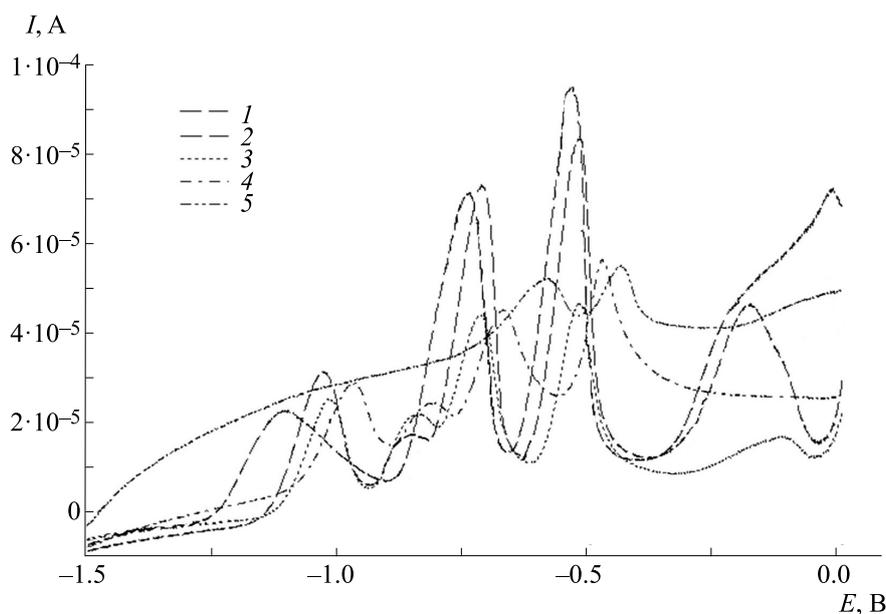


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с эйлеа в различных концентрациях: 1 – тест-система, 2 – 10%, 3 – 20%, 4 – 30%, 5 – 40%.

случае эйлеа (рис. 1, кривые 2–5; рис. 2, кривые 2–5). Заметный эффект исследуемые препараты оказывают также и на токи кадмия, кобальта и ртути. Несущественным и в случае эйлеа, и в случае луцентиса оказалось только действие на ток растворения цинка.

Нужно отметить, что препарат эйлеа по сравнению с луцентисом очень быстро (в течение полутора часов) разлагается при взаимодействии с тест-системой используемого состава. Влияние луцентиса на тест-систему регистрируется значительно дольше – более шести часов. Следовательно, по отношению к использованной тест-системе эйлеа – это менее стойкий препарат во внешней среде по сравнению с луцентисом.

Таким образом, можно сделать вывод, что метод инверсионной вольтамперометрии может быть использован и для оценки содержания данных препаратов в слезной жидкости при осуществлении офтальмологических воздействий, что требует дальнейших исследований. Однако с учетом того факта, что из фармакопических описаний препаратов луцентиса и эйлеа следует, что эйлеа имеет увеличенный период выведения из глаза, эти исследования потребуют кроме тщательной подготовки (в плане стерильности) к отбору проб слезной жидкости после инъекций препаратов также отработки оптимального времени отбора проб и, возможно, изменения ионного состава используемой тест-системы.

ВЫВОДЫ

Показано, что при взаимодействии используемой тест-системой препаратов луцентис и эйлеа, тормозящих рост эндотелия сосудов и используемых как антиVEGF-препараты, влияние наблюдается наиболее значительно на токи таких металлов как медь и свинец; токи этих металлов уменьшаются от 32 до 6 мкА для меди и от 58 до 20 мкА для свинца.

Влияние препарата эйлеа на тест-систему уменьшается через полтора часа, тогда как влияние луцентиса регистрируется значительно дольше – более шести часов. Следовательно, по отношению к тест-системе эйлеа – менее стойкий препарат по сравнению с луцентисом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и др., Патент на изобретение № 2375705 от 22.08.2008.
2. И. И. Колесниченко, А. Л. Клюев, В. М. Ганшин и др., Физикохимия поверхности и защита материалов **50** (4), 440 (2014).

3. И. И. Колесниченко, Е. П. Кантаржи и А. Н. Доронин, в сб. *Труды 6-й Всероссийской науч.-практич. конф. «Измерения в современном мире – 2017»* (СПбПУ, СПб., 2017), сс. 33–37.
4. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология* **23** (9–10), 6 (2017).
5. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **63** (4), 825 (2018).
6. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика* **64** (6), 1088 (2019).
7. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzhii, *Am. J. Anal. Chem.* **7** (7), 588 (2016).
8. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **65** (6), 1211 (2020).
9. Г. К. Будников, В. Н. Майстренко и М. Р. Вяслев, *Основы современного электрохимического анализа* («Мир», М., 2003).
10. Г. Л. Шлефер, *Комплексообразование в растворах* («Химия», М., 1964).

Multisensor Stripping Voltammetry in Analysis of Ophthalmic Drugs Lucentis and Eylea Used to Stop Neovascularization

L.M. Balashova^{*, **}, N.A. Bakunina^{*, **}, V.A. Namiot^{***}, V.I. Kolesnichenko^{****},
Yu.D. Kuznetsova^{*, **}, S.V. Lesovoy^{**}, G.M. Salmasi^{*}, and S.N. Udaltsov^{*****}

^{*}*Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

^{**}*International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, ul. Prechistenka 29/14, Moscow, 119034 Russia*

^{***}*Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

^{****}*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 31/4, Moscow, 119071 Russia*

^{*****}*Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

This paper is devoted to multisensor stripping voltammetry as electrochemical technique applied for determination of antiVEGF drugs Lucentis and Eylea that suppress the growth of abnormal new blood vessels. It is shown that this method can be used for this purpose. The dynamics of changes in their concentration over time is considered. As a result, more organic substances have been added into the list of organic substances that are determined by this method.

Keywords: multisensor stripping voltammetry, planar electrodes, antiVEGF drugs, Eylea, Lucentis

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ФИОЛЕТОВО-СИНИМ СВЕТОМ ДИНАМИКИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ОРГАНИЗМЕ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

© 2022 г. Е.С. Жукова*, Т.Г. Щербатюк*, **, И.А. Чернигина***, В.В. Чернов****, А.Б. Гапеев*****

*Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, 603005, Нижний Новгород, ул. Семашко, 20

**Пуцинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пушино Московской области, просп. Науки, 3

***Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

****ФИЦ «Институт прикладной физики РАН», 603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46

*****Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: evgenya_plekhanova@mail.ru; a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 26.02.2022 г.

С использованием модели холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 на крысах линии Sprague Dawley исследовано действие фотобиомодуляции фиолетово-синим светом ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ нм, 4.6 Дж/см²; $\lambda_2 = 460 \pm 20$ нм, 3.2 Дж/см²) на опухолевый рост и параметры свободнорадикальных процессов в организме-опухоленосителе. Показано, что эффективность транскутанного воздействия электромагнитного излучения со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль ранних сроков роста зависит от индивидуальных особенностей организма, а именно, от исходного уровня ориентировочно-исследовательской активности лабораторных животных в тесте «открытое поле» и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей. Обнаружено, что воздействие озонированного изотонического 0.9% раствора хлорида натрия с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л модулирует действие излучения оптического диапазона, в значительной степени изменяя динамику опухолевого роста.

Ключевые слова: фотобиомодуляция, фиолетово-синий свет, тест «открытое поле», прооксидантно-антиоксидантный баланс, озон, экспериментальная холангиоцеллюлярная карцинома.

DOI: 10.31857/S0006302922030231, EDN: ASPCJR

Эпидемиологические данные по заболеваемости, смертности и инвалидизации человека по причине злокачественных новообразований [1] свидетельствуют об актуальности поиска альтернативных подходов в лечении онкопатологий, для финансовой поддержки которых в Национальном Институте рака (National Cancer Institute, США) была создана отдельная программа «Provocative Questions» (<https://provocativeques->

Сокращения: ФБМ – фотобиомодуляция, ЭМИ – электромагнитное излучение, ОИА – ориентировочно-исследовательская активность, ОФР – озонированный физиологический раствор, ДНФГ – динитрофенилгидразоны, ТБК – тиобарбитуровая кислота, ТБК-АП – ТБК-активные продукты, АСР – общая свободнорадикальная активность, СОД – супероксиддисмутаза.

[tions.nci.nih.gov](https://provocativeques-)). Фотобиомодуляция (ФБМ), ранее известная также как низкоинтенсивная лазерная или световая терапия, лазерная фототерапия, лазерная биостимуляция, холодная лазеротерапия, – нетепловое неразрушающее воздействие монохроматическим (лазерным) и квазимонохроматическим (светодиодным) излучением в оптической области от видимого до ближнего инфракрасного диапазона [2, 3]. Однако развитие ФБМ в онкологии затруднено из-за открытого вопроса о безопасном применении электромагнитного излучения (ЭМИ) данной области спектра для противоопухолевой терапии.

Большинство исследований проведены с использованием ЭМИ красного и ближнего инфракрасного диапазонов и были получены

противоречивые данные: прямое противоопухолевое действие фототерапии (635 нм, 128 и 256 Дж/см², *in vitro*; 632.8 нм, 60 Дж/см², *in vivo*) [4, 5], отсутствие влияния на рост клеток неоплазии (660 нм, 4 и 6 Дж/см², *in vitro* и *in vivo*) [6, 7], а также стимуляция пролиферации опухолевых клеток (630 нм, 2, 4, 6 и 10 Дж/см², *in vitro*) [8]. Не удалось выяснить, почему в некоторых случаях происходит стимулирование роста опухоли. Этот эффект может быть связан как с режимами ФБМ (разнообразие используемых источников излучения с различными длинами волн или спектральными максимумами, интенсивностью излучения, длительностью экспозиции и кратностью облучения при указании неполных, неточных и/или непроверенных параметров), так и с биологическими особенностями опухоли.

Высокая эффективность света в красном и ближнем ИК диапазонах может объясняться наличием терапевтического окна прозрачности в этой области. Однако процесс поглощения излучения и последующая фотодиссоциация компонентов биоткани вносит значительный вклад в механизмы действия фототерапии. Преобразование световой энергии компонентами крови происходит через фотодиссоциацию комплексов гемоглобина с лигандами [9]. Анализ литературных данных по спектрам поглощения гемоглобина и меланина показал, что наиболее высокие значения коэффициента поглощения находятся в области 400–470 нм [10]. Предположительно, воздействие ЭМИ фиолетово-синей области спектра может иметь более высокий противоопухолевый потенциал по сравнению с длинноволновым диапазоном в связи с тем, что при коротковолновом излучении уровень эндогенной генерации активных форм кислорода значительно выше [11]. Однако исследования противоопухолевого действия ЭМИ фиолетово-синей области спектра немногочисленны. Показано, что излучение в фиолетово-синем диапазоне приводит к ингибированию пролиферации и прогрессии опухолевых клеток мочевого пузыря (450 нм, 4 и 8 Дж/см², линии T24 и EJ) [12], гибели клеток глиобластомы A-172 (405 нм, 15–882 Дж/см²) [13], подавлению инвазивности CD133+ стволовых клеток колоректального рака (470 нм, 3 Дж/см²) [14], торможению роста или дистрофическим изменениям клеток лимфосаркомы Плисса (460–475 нм) [15] и регрессии ксенотрансплантата SK-BR-3 (360, 450 и 475 нм) [16]. В сравнительных исследованиях *in vitro* на линиях опухолевых клеток человека было протестировано действие низкоинтенсивного светодиодного излучения синей (455 ± 11 нм, 19 Дж/см²; 465 нм, 9.4 Дж/см²), зеленой (520 ± 20 нм, 19 Дж/см²; 525 нм, 9.4 Дж/см²) и красной (630 ± 9 нм, 19 Дж/см²; 635 нм, 4.7 Дж/см²) областей спектра и показано снижение жизнеспособ-

ности клеток злокачественной меланомы A375, карциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и колоректального рака HT29 и HCT116 после воздействия синим светом по сравнению с темновым контролем. При этом не было зарегистрировано влияния на пролиферацию тестируемых опухолевых клеток ЭМИ красного (630 ± 9 нм, 19 Дж/см²; 635 нм, 4.7 Дж/см²) и зеленого (520 ± 20 нм, 19 Дж/см²; 525 нм, 9.4 Дж/см²) света [17, 18].

Известно, что опухоль состоит не только из собственно опухолевых клеток, но и канцер-ассоциированных фибробластов, эндотелиальных, иммунных и стволовых клеток, которые присутствуют во всех тканях или рекрутируются в область развития неоплазии [19]. При ФБМ нужно учитывать влияние и на эти компоненты опухолевого микроокружения. Так, после облучения красным светом (636 нм; 5, 10 и 20 Дж/см²) изолированных раковых стволовых клеток (cancer stem cells, CSCs) линии A549, для которой не было зарегистрировано действие света со спектральным максимумом 630 нм в работе [17], наблюдалась их биостимуляция и усиление пролиферации [20]. На фибробластах кролика (клеточная линия ALC) показано, что облучение красным (630 нм, 9.5 Дж/см²) и зеленым (530 нм, 9.8 Дж/см²) светодиодным светом приводит к стимуляции пролиферации клеток по сравнению с контролем, что не наблюдалось при воздействии синим (460 нм, 27 Дж/см²) светом. При этом действие ЭМИ красного и зеленого спектра вызывало значительное увеличение экспрессии инсулиноподобного фактора роста, трансформирующего фактора роста-бета (TGF-β1) и коллагена I, а действие синего света, наоборот, приводило к снижению экспрессии коллагена по сравнению с контролем. Кроме того, ЭМИ со спектральными максимумами 630 и 530 нм не влияло на экспрессию актина и интегрин, а с 460 нм снижало ее [21]. Так как фибробласты составляют большую часть микроокружения опухоли и оказывают непосредственное влияние на ее прогрессию и метастазирование, можно предположить, что стимуляция этого компонента может привести к активизации развития неоплазии. В недавней работе это было подтверждено на модели меланомы B16F10 у мышей при воздействии диодным лазером (660 нм; 150, 450 или 1050 Дж/см²). При дозе ≥450 Дж/см² было продемонстрировано увеличение содержания коллагеновых волокон в строме и опухолевом микроокружении и объема опухоли [22].

Таким образом, противоопухолевая эффективность низкоинтенсивного ЭМИ оптического диапазона зависит и от прямого влияния на опухолевые клетки, и от опосредованного действия на другие клеточные составляющие микроокру-

жения неоплазии. Вышеизложенное свидетельствует о том, что действие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на опухолевый рост является малоисследованным, но этот биофизический подход может быть перспективным для разработки альтернативных методов противоопухолевой терапии.

Ранее в исследованиях *in vitro* в ходе комплексной оценки действия ЭМИ со спектральными максимумами 400, 460 и 660 нм на активность свободнорадикальных процессов в клетках опухолевой ткани и в крови в норме и в условиях роста экспериментального холангиоцеллюлярного рака РС-1 нами было показано, что эффект ФБМ зависит как от длины волны ЭМИ, так и от стадии развития опухолевого процесса [23]. На основании анализа литературных данных было выдвинуто предположение о том, что механизмы действия ЭМИ синего диапазона (460 ± 20 нм) могут быть связаны с фотодиссоциацией нитрозильных комплексов гемоглобина и фотодинамическим усилением оксидативных процессов в опухолевых клетках, а также показано, что ЭМИ со спектральным максимумом 400 нм в большей степени оказывает влияние на антиоксидантную систему защиты организма. Противоопухолевый эффект можно усилить за счет изменения интенсивности и направленности окислительных процессов в организме-опухоленосителя при действии озона [24]. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в оценке совместного влияния низкоинтенсивного ЭМИ со спектральными максимумами 400 и 460 нм на динамику роста экспериментальной опухоли *in vivo* в ранние сроки развития и зависимости действия ЭМИ оптического диапазона от показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проведены в летне-осенний период на аутбредных крысах-самцах линии Sprague Dawley (масса 250 ± 25 г, возраст 3 месяца), приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Московская обл.). Животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм («Лабораторкорм», Москва) и без ограничений питьевую водопроводную воду.

Все крысы ($n = 105$) были протестированы в тесте «открытое поле» [25] в ранее предложенной модификации [26]. Определяли горизонтальную и вертикальную двигательную активность, ориентировочно-исследовательскую активность (ОИА), эмоциональность и уровень тревожности. Полученные данные применяли при формировании репрезентативных экспериментальных групп.

В качестве модели неоплазии использовали солидную холангиоцеллюлярную карциному крыс РС-1, полученную из Банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). Карцинома РС-1 — это медленно растущая неметастазирующая неоплазия с длительным латентным периодом, не превышающим 10 суток, и экспоненциальной фазой роста. Продолжительность жизни животных с опухолями, перевитыми под кожу, составляет обычно два-три месяца [27, 28]. Инокулом РС-1 вводили крысам подкожно в область левого бедра ($n = 91$).

Животные были распределены по группам: 1) «РС-1» ($n = 29$) — животные-опухоленосители без воздействия; 2) «РС-1 + ЭМИ» ($n = 33$) — животные-опухоленосители, которым проводили фотобиомодуляцию; 3) «РС-1 + ОФР + ЭМИ» ($n = 29$) — животные-опухоленосители, которым перед фотобиомодуляцией проводили процедуры введения озонированного изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия; 4) «Интактные» ($n = 14$) — здоровые крысы, которые не подвергались никаким воздействиям.

Схема воздействия. Воздействие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на экспериментальную опухоль проводили на тринадцатые сутки после трансплантации — начальный этап экспоненциального роста РС-1. При фотобиомодуляции использовали экспериментальные генераторы низкоинтенсивного ЭМИ ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ нм, $\lambda_2 = 460 \pm 20$ нм), разработанные в Федеральном исследовательском центре «Институт прикладной физики РАН» (Нижний Новгород). Генераторы — портативные приборы на основе светоизлучающих диодов с номинальным током потребления 350 мА, световым потоком 20 Лм и выходной мощностью 50 мВт и 34.6 мВт для спектральных максимумов 400 и 460 нм соответственно. Мощностные характеристики используемых светоизлучающих диодов контролировались при помощи детектора 3A-IS (Calibrated Integrating Sphere LED Power Meter, Ophir, Израиль). Рабочая полоса детектора 350–1100 нм, диапазон измеряемой мощности 1 мкВт — 3 Вт, апертура 12 мм. Параметры спектров применяемых светоизлучающих диодов контролировали с помощью спектрометра «QE Pro» (Ocean Optics, США) с соответствующим программным обеспечением. Ширина входной щели спектрометра, установленной на апертуре диаметром 8 мм, составляла 5 мкм. Время интегрирования составляло 100 мс.

Облучение осуществляли транскутанно непосредственно в область растущей опухоли и на кровь посредством воздействия на проекцию кровеносных сосудов брюшка в области паха. Шерсть на этих участках кожи предварительно депилировалась. Воздействие проводили однократно, одновременно облучая опухоль ($\lambda = 460$ нм) и брюшко

($\lambda = 400$ нм) по 15 мин на каждую область (доза падающего излучения составляла 3.2 и 4.6 Дж/см² соответственно, непрерывный режим работы, площадь облучаемой поверхности 9.6 см²).

Для модуляции свободнорадикального гомеостаза в организме животных-опухоленосителей использовали медицинский озон [29]. Действие озона осуществляли трехкратным введением озонированного изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия (ОФР) с интервалом в 48 ч, начиная с седьмых суток после перевивки солидной опухоли. Для этого внутривенно вводили по 0.5 мл ОФР с концентрацией озона в озон-кислородной смеси 400 мкг/л [30]. Введение животным ОФР осуществляли в течение 5 мин после барботирования. Озонирование осуществляли с использованием медицинского кислорода с помощью медицинского озонатора «ТЕОЗОН» (РФЯЦ ВНИИЭФ, Саров, Нижегородская область) [31].

Методы оценки опухолевого роста. Динамику роста опухоли оценивали по изменению объема опухолевого узла V (см³), который рассчитывали по следующей формуле:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2} \right)^3, \quad (1)$$

где d_1 и d_2 — два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (в см) [32]. После подкожной трансплантации пальпацию и измерение объема опухолевого узла начинали проводить с шестых суток. Наблюдение за ростом опухоли проводили на протяжении 150 суток.

Методы оценки параметров свободнорадикального окисления. На четырнадцатые сутки после трансплантации опухоли часть животных из каждой опытной группы ($n = 11-16$) и всех интактных животных ($n = 14$) выводили из эксперимента декапитацией под ингаляционным наркозом с последующим обескровливанием, затем проводили вскрытие с извлечением и фиксацией органов в жидком азоте [33]. Для исследований использовали кровь, плазму, эритроциты, а также гомогенаты тканей печени, которые получали механическим перетиранием в жидком азоте керамическим пестиком в ступке.

Оценку изменения параметров свободнорадикального окисления, вызванного ростом опухоли и ФБМ, проводили на уровне ДНК, белков, липидов, а также учитывали общую свободнорадикальную активность и работу ферментативного звена антиоксидантной системы.

Уровень повреждений ДНК оценивали с помощью щелочной версии метода ДНК-комет в лейкоцитах периферической крови крыс [34, 35]. Полученные препараты окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green I (Sigma, США)

и затем анализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Corporation, Япония), совмещенного с цифровой камерой DS-Fi2 (Nikon Corporation, Япония). Полученные изображения обрабатывали с помощью специализированного программного обеспечения, разработанного В.Н. Степановым [36]. Для каждого образца крови готовили микроскопные слайды в двух технических повторах. Получали средние значения уровня повреждений ДНК после анализа за 50 «комет». Для количественной оценки уровня повреждений ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (%ТДНК).

Степень окислительной модификации белков плазмы крови исследовали модифицированным методом по уровню карбонильных производных, регистрируемых с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность образовавшихся альдегидных и кетонных 2,4-динитрофенилгидразонов (альдегид- и кетон-ДНФГ) при спонтанном и металл-индуцированном окислении регистрировали при длинах волн 270 и 363 нм [37]. Содержание общего белка определяли биуретовым методом с использованием коммерческого набора «Общий белок Ольвекс» (ООО «Ольвекс диагностика», Россия) согласно инструкции. Уровень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных к 1 мг белка.

Определение продуктов перекисного окисления липидов осуществляли по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [38]. Оптическую плотность образовавшихся ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) регистрировали при длине волны 532 нм. Содержание ТБК-АП выражали в мкМ, при расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции хромогена, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида с ТБК, равного $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Интенсивность общей свободнорадикальной активности (АСР) оценивали косвенно методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции на биохемилуминометре БХЛ-06М (Россия) [39].

Состояние антиоксидантной системы защиты оценивали по активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в эритроцитах и гомогенатах тканей. Об активности СОД судили по реакции восстановления нитросинего тетразолия, каталазы — на основе изменения оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [38]. Концентрацию гемоглобина в эритроцитах определяли гемоглобинцианидным методом с помощью коммерческого набора «Гемоглобин Агат» (ООО «Агат-Мед», Россия). Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г гемоглобина или ткани.

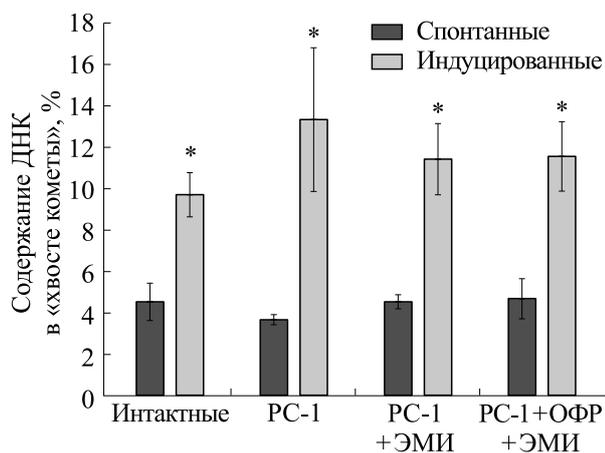


Рис. 1. Уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови интактных животных и животных-опухоленосителей (РС-1) без и после воздействия ЭМИ фиолетово-синего диапазона; * – достоверные отличия относительно уровня спонтанных повреждений в каждой соответствующей группе по критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса, $p < 0.02$.

Статистический анализ. Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Нормальность распределения данных оценивали по тесту Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка или $Me [25\%; 75\%]$, где Me – медиана регистрируемого параметра, а 25% и 75% – интерперцентильный размах. При распределении подопытных животных по типу поведенческой активности использовали кластерный анализ – метод k -средних. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных.

Для парного сравнения групп данных использовали U -критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» среди подопытных животных ($N = 105$) были выделены три типа: 1) с активным поведением ($n = 34$); 2) со средним уровнем ориентировочно-исследовательской активности ($n = 41$); 3) с пассивным поведением ($n = 30$) (метод k -средних, $p < 0.001$). При формировании исследовательских групп крысы всех трех типов были равномерно распределены по группам.

В связи с тем, что ЭМИ фиолетово-синей области спектра находится на границе с ультрафиолетовым светом, необходимо было проконтролировать уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс. Было показано, что спонтанные уровни повреждений ДНК на четырнадцатые сутки роста холангиоцеллюлярной карциномы как без воздействия, так и через 24 ч после действия ЭМИ не превышали значений у интактных крыс. Уровень индуцированных повреждений ДНК во всех опытных группах также не отличался от уровня у интактных животных (рис. 1). Это свидетельствует об отсутствии генотоксичности выбранных параметров ФБМ в условиях онкогенеза.

Исследование окислительной модификации белков как высокочувствительного маркера ранних этапов патологического процесса показало, что на экспоненциальной фазе роста РС-1 как без воздействий, так и после облучения ЭМИ происходило статистически значимое увеличение содержания альдегид- и кетон-ДФГ при металл-катализируемом окислении (табл. 1). Эти данные указывают на снижение устойчивости белков к деградации, что может возникать как при возрастании концентрации активных форм кислорода и азота, так и в условиях начавшегося истощения компонентов антиоксидантной системы в плазме крови [40]. Поглоще-

Таблица 1. Содержание альдегид-ДФГ и кетон-ДФГ в плазме крови крыс при спонтанном и металл-катализируемом окислении

Группа животных	Содержание альдегид-ДФГ, ед. опт. пл./1 мг белка		Содержание кетон-ДФГ, ед. опт. пл./1 мг белка	
	Спонтанное окисление	Металл-катализируемое окисление	Спонтанное окисление	Металл-катализируемое окисление
«Интактные»	0.18 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0.72 \pm 0.02
«РС-1»	0.20 \pm 0.02	0.66 \pm 0.02*	0.30 \pm 0.02	0.81 \pm 0.01*
«РС-1+ЭМИ»	0.19 \pm 0.02	0.67 \pm 0.03*	0.30 \pm 0.02	0.82 \pm 0.02*
«РС-1 + ОФР + ЭМИ»	0.19 \pm 0.01	0.63 \pm 0.05	0.27 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02*

Примечание. * – $p < 0.01$ по сравнению с интактными животными по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

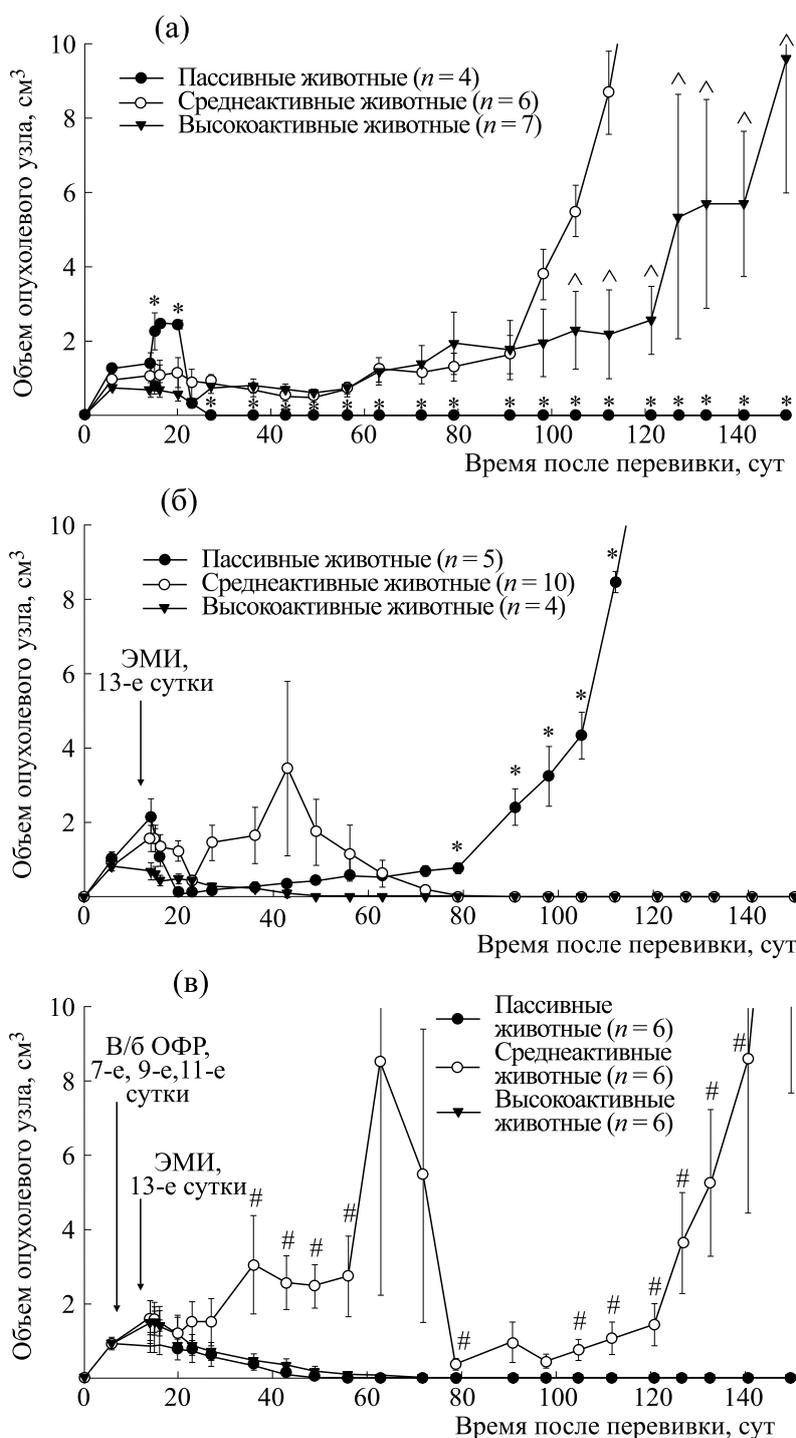


Рис. 2. Зависимость роста экспериментальной холангиоцеллюлярной карциномы РС-1 от типа поведенческой активности крыс в тесте «открытое поле» (а), изменение динамики роста опухоли после воздействия ЭМИ фиолетово-синей области спектра (б) и комбинировании этого воздействия с предварительным введением озонированного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия (в); * и ^ – $p < 0.05$ по сравнению со среднеактивными животными, # – $p < 0.05$ по сравнению с пассивными крысами по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

ние антиоксидантов характерно для опухолей. При этом стоит отметить, что предварительное введение ОФР до воздействия ЭМИ снижало чувствительность белков к повреждению.

В динамике роста трансплантированной опухоли РС-1 были выявлены взаимосвязи с поведенческой активностью животных в тесте «открытое поле». Для животных с пассивным пове-

Таблица 2. Взаимосвязь поведенческих реакций с биохимическими параметрами свободнорадикального гомеостаза организма животных

Группа животных / биохимические показатели	Исходный тип поведенческой активности крыс		
	Пассивный	Среднеактивный	Высокоактивный
<i>Интактные</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	2.32 [2.30; 2.35] ↑	1.99 [1.92; 2.04]	1.78 [1.75; 1.80] ↓
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нб	181 [178; 195]	138 [102; 189]	106 [100; 111]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	13 [7; 16]	24 [17; 30]	40 [39; 45]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.99 [0.81; 1.05] ↑	0.57 [0.49; 0.66]	0.32 [0.25; 0.40] ↓
ТБК-АП печени, мкМ	31.9 [28.3; 33.7]	27.6 [24.9; 28.1]	25.2 [22.0; 27.2]
<i>РС-1 (14 сутки роста)</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	2.13 [2.07; 2.18] ^	1.98 [1.72; 2.24]	1.86 [1.75; 1.94]
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нб	222 [198; 235] ↑ ^	140 [108; 172]	89 [43; 155]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	6 [3; 10] ↓	21.5 [19; 24]	22 [13; 38]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.17 [0.15; 0.20] ↓ ^	0.47 [0.30; 0.65]	0.53 [0.24; 0.69]
ТБК-АП печени, мкМ	18.8 [15.0; 20.6] ↓ ^	28.3 [25.2; 31.5]	24.7 [23.5; 33.0]
<i>РС-1 + ЭМИ</i>	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4
АСР плазмы крови, усл. ед.	1.96 [1.90; 2.00]*	1.92 [1.84; 1.95]	1.72 [1.63; 1.80] ↓
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нб	85 [78; 93]*	89 [67; 120]	319 [267; 330] ↑**
СОД печени, ед. акт. / г ткани	32 [26; 38]*	18 [12; 29]	29 [23; 30]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.14 [0.10; 0.18] ↓	0.45 [0.28; 0.66]	0.65 [0.58; 0.70]
ТБК-АП печени, мкМ	37.9 [35.1; 40.6]	27.4 [24.5; 31.3]	28.1 [24.5; 29.8]
<i>РС-1 + ОФР + ЭМИ</i>	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5
АСР плазмы крови, усл. ед.	1.96 [1.94; 1.97]	2.01 [1.85; 2.17]	1.97 [1.82; 2.14]
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нб	236 [191; 281]	176 [171; 184]	128 [95; 128]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	17.5 [12; 23]	23 [19; 26]	21 [21; 23]
Каталаза печени, ед. акт. / г ткани	0.41 [0.33; 0.49]	0.64 [0.41; 0.68]	0.42 [0.37; 0.43]
ТБК-АП печени, мкМ	27.9 [25.6; 30.1]	24.5 [23.2; 25.8]	29.3 [28.0; 30.8]

Примечание. ↑, ↓ – Статистически значимые отличия показателей при сравнении значений со среднеактивными животными ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); ^ – статистически значимые отличия показателей опухоленосителей по сравнению с интактными крысами с пассивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); * – статистически значимые отличия показателей по сравнению с опухоленосителями с пассивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни); ** – статистически значимые отличия показателей по сравнению с опухоленосителями с высокоактивным типом поведения ($p < 0.05$, U -критерий Манна–Уитни).

днем была характерна высокая скорость увеличения опухолевого узла до шестнадцатых суток роста РС-1: среднее значение объема опухоли составило $2.46 \pm 0.11 \text{ см}^3$ по сравнению с 1.05 ± 0.42 и $0.68 \pm 0.20 \text{ см}^3$ у средне- и высокоактивных крыс соответственно ($p < 0.007$ по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). Далее наблюдалось торможение в развитии холангиоцеллюлярной карциномы на двадцатые сутки и спонтанная регрессия опухоли к 23-м суткам после трансплантации. При наблюдении за этими животными в течение 150-ти суток после перевивки рецидива не было зафиксировано. У средне- и высокоактивных крыс карцинома РС-1 медленно развивалась до 91-х и 121-х суток соответственно с последующей интенсификацией роста неоплазии (рис. 2а).

Анализируя значения АСР, активности антиоксидантных ферментов и перекисного окисле-

ния липидов в крови и гомогенатах тканей, мы выявили особенности, связанные с поведенческими характеристиками животных (табл. 2). Пассивные интактные крысы по сравнению со здоровыми животными среднего поведенческого типа отличались более высокими значениями АСР в плазме крови (на 16.5%) ($p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни) и активности каталазы в печени (в 1.7 раза) ($p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни). Стоит также отметить тенденции более высоких показателей активности эритроцитарной СОД и содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов в печени, но низкой активности СОД в тканях этого органа. Для высокоактивных животных, наоборот, были характерны более низкие значения общей АСР в плазме крови (на 10.5%, $p < 0.04$, U -критерий Манна–Уитни) и активности каталазы в печени (в 1.8 раза, $p < 0.02$, U -критерий Манна–Уитни), а также тенденции более низкой активности СОД в

эритроцитах, но высокой — в печени по сравнению со среднеактивными крысами (табл. 2).

Пассивные животные были более чувствительными к сдвигу свободнорадикального гомеостаза при опухолевом росте. На четырнадцатые сутки после трансплантации РС-1 у этих животных произошло снижение общей АСР плазмы крови, повышение активности СОД в эритроцитах, но снижение активности СОД и каталазы в печени на фоне снижения содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждому типу поведенческой активности животных соответствует свой тип про/антиоксидантного баланса в организме. Стоит отметить, что выделение различных типов свободнорадикального баланса в организме скорее всего является общебиологическим свойством для млекопитающих в целом, что подтверждается результатами работы, в которой было показано распределение показателей общей оксидантной активности у людей на низкий, средний и высокий уровни [41]. Нами установлено, что для крыс с низким уровнем ОИА характерна более высокая интенсивность окислительных процессов в организме, для высокоактивных, наоборот, — низкая. Это впоследствии и определяет динамику роста перевивной опухоли. Высокие уровни оксидантной активности в организме способствуют активации клеточных процессов в трансплантированных опухолевых клетках на начальных этапах формирования опухоли [42]. Вместе с тем в этих клетках по сравнению с нормальными формируются высокие или очень высокие уровни генерации активных форм кислорода [43] и для дальнейшего развития солидной неоплазии необходим приток из организма-хозяина ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы [44]. Однако в организме пассивных крыс наблюдается относительный дефицит в отношении содержания антиоксидантных ферментов в тканях (табл. 2), что, видимо, является неблагоприятным фактором для прогрессии опухоли и объясняет спонтанный регресс неоплазии. Низкий уровень прооксидантных процессов у животных с высокой ОИА менее благоприятен для активации трансплантированных опухолевых клеток и является тормозящим фактором опухолевой прогрессии.

Таким образом, динамика роста подкожно трансплантированной опухоли зависит от индивидуальных особенностей крыс: исходного уровня ОИА, которая по данным литературы взаимосвязана с иммунной реактивностью [45], и установившегося прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме. Если особенности поведения — генетически обусловленный признак, то

свободнорадикальные процессы на локальном и/или системном уровнях можно корректировать за счет внешнего воздействия [46], что в перспективе можно использовать для управления опухолем ростом.

Наши исследования показали, что однократная транскутанная ФБМ со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль в экспоненциальную фазу роста может стимулировать пролиферацию клеток опухолевого очага у крыс с пассивной ОИА (рис. 2б). При этом в организме животных происходит снижение общей АСР плазмы и активности СОД в эритроцитах крови на фоне возрастания активности СОД и низкой активности каталазы в печени (табл. 2). Вероятно, ЭМИ фиолетово-синего диапазона за счет стимулирования активности СОД в тканях способствует дальнейшему развитию РС-1 у пассивных животных. Воздействие ЭМИ на животных с высокоактивным типом поведения способствовало регрессированию карциномы РС-1. При этом на фоне сниженной общей АРС в плазме происходила активация СОД в эритроцитах крови.

Предварительное внутрибрюшинное введение ОФР модифицировало эффект ФБМ (рис. 2в). У животных с пассивным типом поведения воздействие ЭМИ способствовало остановке пролиферации клеток в опухолевом очаге и последующей его регрессии. У крыс с высокой ОИА наблюдался выраженный противоопухолевый эффект, а у животных со средним уровнем поведенческой активности происходило краткосрочное торможение роста карциномы РС-1. При этом нивелировались различия по параметрам свободнорадикального окисления между животными разных типов поведения, что обусловлено действием ОФР (табл. 2). Это подтверждает зависимость биологического эффекта ФБМ от уровня свободнорадикальных процессов в организме-опухоленосителей. Системное действие озона в выбранном режиме и дозировке способно корректировать резистентность холангиоцеллюлярной карциномы ранних сроков развития к фототерапии. Однако для прогнозирования отклика неоплазии на воздействие предварительно нужно проводить комплексную оценку состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме. Для разработки персонифицированной противоопухолевой терапии на основе комбинирования ФБМ и озона важны дальнейшие неклинические исследования на разнообразных опухолевых штаммах, так как разные по происхождению опухолевые клетки в разной степени подвержены влиянию как ФБМ [17, 18], так и озона [47]. При этом для определения широты оптимального дозирования фото- и озонотерапии требуется тестирование различных доз воздействий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, методом ДНК-комет показано, что используемые параметры ФБМ фиолетово-синей частью спектра безопасны в отношении потенциальных генотоксических эффектов. Транскутанное воздействие ЭМИ со спектральными максимумами 400 нм на кровь и 460 нм на опухоль ранних сроков роста зависит от индивидуальных особенностей организма, а именно, от исходного уровня поведенческой активности, которая, в свою очередь, взаимосвязана с прооксидантно-антиоксидантным балансом в организме животных-опухоленосителей. Выявлены потенциальные риски стимулирования при ФБМ опухолевой прогрессии у животных с пассивным типом ориентировочно-исследовательской активности по тесту «открытое поле» и, соответственно, с высоким уровнем прооксидантных процессов в организме. Наиболее выражен противоопухолевый эффект ФБМ фиолетово-синей частью спектра у животных с высоким уровнем поведенческой активности и, соответственно, с низким уровнем оксидантных процессов в организме. Воздействие ЭМИ в исследуемом режиме на ранних этапах развития опухоли у животных со средним уровнем ориентировочно-исследовательского поведения приводит к торможению опухолевого роста. Мы применили озон для изменения интенсивности и направленности окислительных процессов в организме-опухоленосителя и показали, что курсовое введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л может модулировать свободнорадикальный гомеостаз организма опухоленосителя, что способствует повышению эффективности противоопухолевого действия ФБМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта 19-02-00667а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили согласно принципам и рекомендациям, установленным Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Mattiuzzi and G. Lippi, *J. Epidemiol. Glob. Health* **9** (4), 217 (2019). DOI: 10.2991/jegeh.k.191008.001
2. T. I. Karu, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **20** (2), 143 (2014). DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2273411
3. J. J. Anders, R. J. Lanzafame, and P. R. Arany, *Photomedicine and Laser Surgery* **33** (4), 183 (2015). DOI: 10.1089/pho.2015.9848
4. Y. Tian, H. Kim and H. W. Kang, *Lasers Med Sci.* **36** (3), 513 (2021). DOI: 10.1007/s10103-020-03050-x
5. C. Lu, F. Zhou, S. Wu, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **24** (5), 249 (2016). DOI: 10.1089/ars.2015.6334
6. M. D. Martins, F. M. Silveira, L. P. Webber, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **209**, 111924 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111924
7. F. M. Silveira, T. R. Schmidt, B. Neumann, et al., *Oral Dis.* **2021**, 13967 (2021). DOI: 10.1111/odi.13967
8. H. Saghaei Bagheri, S. H. Rasta, S. M. Mohammadi, et al., *J. Lasers Med. Sci.* **11** (2), 174 (2020). DOI: 10.34172/jlms.2020.29
9. Г. А. Залеская, *Биофизика* **62** (3), 604 (2017).
10. В. П. Минаев и К. М. Жилин, *Современные лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии на основе полупроводниковых и волоконных лазеров* (И. В. Балабанов, М., 2009).
11. T. Kushibiki, T. Hirasawa, S. Okawa, et al., *Photomed. Laser Surg.* **31** (3), 95 (2013). DOI: 10.1089/pho.2012.3361
12. Y. Xia, W. Yu, F. Cheng, et al., *Front. Oncol.* **11**, 701122 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.701122
13. F. Y. Ang, Y. Fukuzaki, B. Yamanoha, et al., *Lasers Med. Sci.* **27** (5), 935 (2012). DOI: 10.1007/s10103-011-1009-8
14. S. Mo, H. J. Ku, S. H. Choi, et al., *Anticancer Res.* **41** (3), 1407 (2021). DOI: 10.21873/anticancer.14898
15. К. В. Кулакова, Т. Г. Щербатюк и В. В. Чернов, *Биомедицина* **2**, 68 (2012).
16. E. V. Khaydukov, K. E. Mironova, V. A. Semchishen, et al., *Sci. Rep.* **6**, 35103 (2016). DOI: 10.1038/srep35103
17. S. L. Hopkins, B. Siewert, S. H. Askes, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **15** (5), 644 (2016). DOI: 10.1039/c5pp00424a
18. N. Matsumoto, K. Yoshikawa, M. Shimada, et al., *Anticancer Res.* **34** (9), 4709 (2014).
19. S. Manan and I. P. Witz, *Nat. Rev. Cancer* **18** (6), 359 (2018). DOI: 10.1038/s41568-018-0006-7
20. A. Crous and H. Abrahamse, *Photomed. Laser Surg.* **34** (11), 525 (2016). DOI: 10.1089/pho.2015.3979
21. Y. K. Seo, J. K. Park, C. Song, et al., *Lasers Med. Sci.* **29** (1), 245 (2014). DOI: 10.1007/s10103-013-1322-5
22. L. Frigo, J. M. Cordeiro, G. M. Favero, et al., *Lasers Med. Sci.* **33**, 1215 (2018). DOI: 10.1007/s10103-018-2461-5
23. Е. С. Жукова, Т. Г. Щербатюк, А. Л. Потапов и др., *Медицина труда и промышленная экология* **60** (9), 618 (2020). DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-9-618-623
24. А. Б. Гапеев и Т. Г. Щербатюк, *Биологические мембраны* **37** (3), 163 (2020). DOI 10.31857/S023347552002005X.

25. Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высшая школа, М., 1991).
26. Н. В. Вдовина, Е. С. Клинцева и Т. Г. Щербатюк, *Современные технологии в медицине* **2**, 12 (2010).
27. Л. Л. Малюгина, *Вопросы онкологии* **4** (5), 600 (1958).
28. N. Treshalina, V. Kobliakov, N. Raikhlin, et al., *Exp. Oncol.* **23** (2), 126 (2001).
29. Е. С. Жукова, А. Ю. Кашина и А. М. Иркаева, *Медицина труда и промышленная экология* **60** (11), 767 (2020). DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-11-767-770
30. Т. Г. Щербатюк, Е. С. Жукова (Плеханова), Ю. В. Никитина и др., *Биофизика* **65** (2), 367 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920020209
31. С. Н. Буранов, В. И. Карелин, О. А. Пименов и др., *Мед. альманах* **3** (27), 26 (2013).
32. Е. В. Ярославцева-Исаева, М. А. Каплан, Ю. С. Романко и др., *Рос. биотерапевтич. журн.* **2** (4), 19 (2003).
33. К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гушин и др., *Лабораторные животные для научных исследований* **2**, 71 (2018). DOI: 10.29296/2618723X-2018-02-08
34. Н. П. Сирота и Е. А. Кузнецова, *Радиационная биология. Радиозоология* **50** (3), 329 (2010).
35. A. V. Gapeyev, N. A. Lukyanova, and S. V. Gudkov, *Central Eur. J. Biol.* **9** (10), 915 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0326-x
36. В. Н. Степанов Дис. ... канд. техн. наук (Институт проблем управления им. В. А. Трапезникова, М., 2005).
37. О. В. Занозина, Н. Н. Боровков и Т. Г. Щербатюк, *Современные технологии в медицине* **2**, 72 (2009).
38. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма* (ИКФ «Фоллиант», СПб., 2000).
39. Е. И. Кузьмина, С. В. Ермолин и А. Ф. Учугина, *Нижегородский мед. журн.* **1**, 8 (1993).
40. М. А. Фомина и Ю. В. Абаленихина, *Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота* (ООО Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", М., 2018).
41. Л. А. Страхова, Т. В. Блинова, В. В. Трошин и др., *Медицина труда и экология человека* **2** (14), 61 (2018).
42. J. E. Le Belle, N. M. Orozco, A. A. Paucar, et al., *Cell Stem Cell* **8** (1), 59 (2011). DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.028
43. Y. Ikeda, N. Nagase, A. Tsuji, et al., *Oxygen* **1** (1), 22 (2021). DOI: 10.3390/oxygen1010004
44. Л. П. Смирнова и И. В. Кондакова, *Биомедицинская химия* **50** (6), 566 (2004).
45. Е. В. Маркова, *Поведение и иммунитет* (НГПУ, Новосибирск, 2013).
46. А. Б. Гапеев, В. С. Якушина, Н. К. Чемерис и др., *Биофизика* **42** (5), 1125 (1997).
47. J. Baeza-Noci and R. Pinto-Bonilla, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (21), 11796 (2021). doi: 10.3390/ijms222111796

Violet-Blue Photobiomodulation of the Dynamics of Tumor Growth and Prooxidant-Antioxidant Balance in the Body of Tumor Carriers

E.S. Zhukova*, T.G. Shcherbatyuk*, **, I.A. Chernigina***,
V.V. Chernov****, and A.B. Gapeyev*****

*Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Hygiene and Professional Pathology,
Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare,
ul. Semashko 20, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

**Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

****Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Ul'yanova 46, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*****Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Using the model of cholangiocellular carcinoma PC-1 on Sprague Dawley rats, this study aimed at exploring the effects of photobiomodulation mediated by violet-blue light ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ nm, 4.6 J/cm²; $\lambda_2 = 460 \pm 20$ nm, 3.2 J/cm²) on tumor growth and parameters of free radical processes in the tumor-bearing organism. It was shown that the efficacy of transcutaneous exposure to electromagnetic radiation with spectral maxima of 400 nm on blood and 460 nm on a tumor node at early growth depends on the individual characteristics of the organism, namely, on the initial level of exploratory activity of laboratory animals in the "open field" test and prooxidant-antioxidant balance in the body of tumor carriers. It was found that the treatment with ozonized isotonic 0.9% sodium chloride solution with concentration of ozone in the ozone-oxygen mixture of 400 μ g/l modulates the effect of optical radiation, significantly changing the dynamics of tumor growth.

Keywords: photobiomodulation, violet-blue light, open field test, prooxidant-antioxidant balance, ozone, experimental cholangiocellular carcinoma