

СОДЕРЖАНИЕ

Том 67, номер 5, 2022

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Хиральность как симметричная основа самоорганизации биомакромолекул

*В.А. Твердислов, А.Э. Сидорова, О.Е. Багрова, Е.В. Белова, В.С. Быстров,
Н.Т. Левашова, А.О. Луценко, Е.В. Семенова, Д.К. Шпигун* 837

16S рРНК *E. coli* значительно стимулирует трансляцию репортерной мРНК
в бесклеточной эукариотической системе

Н.В. Зырина, С.Ч. Агаларов 859

Структура и аффинность комплексов между ДНК-связывающим
доменом белка Swi4 и ДНК

*Д.А. Афонин, О.В. Гераськина, Т.В. Лосева, М.П. Кирпичников,
В.М. Студитский, А.В. Феофанов* 868

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Динамика процессов в тилакоидных мембранах водорослей *in vivo*, изучаемая
в моделях фотосистемы II и тилакоида по измерениям индукции флуоресценции

*Н.Е. Беляева, А.А. Булычев, В.З. Пащенко, К.Е. Клементьев,
П.А. Ермаченко, И.В. Конюхов, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин* 877

Изменение конформации и распределения гемоглобина в эритроците
при ингибировании Na^+/K^+ -АТФазы

*О.В. Слатинская, П.И. Зарипов, Н.А. Браже,
И.Ю. Петрушанко, Г.В. Максимов* 897

Защитный эффект пероксида водорода при гемолизе эритроцитов
наночастицами серебра

В.В. Войнаровский, Г.Г. Мартинович 906

Действие астаксантина на функциональное состояние митохондрий
мозга крыс при сердечной недостаточности

*Р.Р. Крестинин, Ю.Л. Бабурина, И.В. Одинокова,
Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина* 917

Оценка окрашивания ткани мозга экстрактом чая улун с особым вниманием
к гладкому эндоплазматическому ретикулуму

Е.А. Шишкова, И.В. Краев, В.В. Рогачевский 926

Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом
на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония,
высвобождающимися из этих комплексов

А.Ф. Ванин, В.И. Телегина, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев, С.В. Васильева 938

Полиакрилаты благородных металлов – цитотоксичность в отношении
опухолевых клеток, резистентных к цисплатине и доксорубину

*Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Ю.А. Хоченкова,
Н.В. Блюхтерова, К.А. Абзаева* 947

Селенит натрия как возможный адъювант в терапии Covid-19

Т.М. Гусейнов, Р.Т. Гулиева, С. Н. Джафарова, Н.Х. Джафар 956

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Эффекты хлорида никеля на сократительные параметры миокарда активных сусликов с различным ответом на гипотермию	
<i>А.С. Аверин, Н.М. Захарова, Д.А. Игнатьев</i>	962
Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка	
<i>А.В. Шиповалов, А.Ф. Ванин, О.В. Пьянков, Е.Г. Багрянская, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев, Н.А. Асанбаева, В.Я. Попкова</i>	969
Роль катиона нитрозония в механизме противоопухолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа	
<i>А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина</i>	982
Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ солидной карциномы Эрлиха и реакции кожи у мышей в ранние и отдаленные сроки	
<i>О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, Н.С. Стрельникова, А.Е. Шемяков, А.В. Смирнов</i>	991
Влияние Кустодиола на сохранность изолированного сердца крысы при газовой гипотермической консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода	
<i>А.Е. Гурин, Е.Л. Гагаринский, Е.Е. Фесенко (мл.)</i>	1002
Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и других областях, отраслях и разделах медицины	
<i>В.П. Реутов, Л.А. Давыдова, Е.Г. Сорокина</i>	1009
Эволюционная оптимальность признаков организма. видовая продолжительность жизни как продукт эволюции	
<i>Л.Л. Овсянников</i>	1030

Contents

Vol. 67, No. 5, 2022

Molecular Biophysics

Chirality As a Symmetric Basis of Self-Organization of Biomacromolecules

*V.A. Tverdislov, A.E. Sidorova, O.E. Bagrova, E.V. Belova, V.S. Bystrov,
N.T. Levashova, A.O. Lutsenko, E.V. Semenova, and D.K. Shpigun* 837

16S rRNA Significantly Stimulates Translation of a Reporter mRNA
in a Eucaryotic Cell-Free System

N.V. Zyrina and S.Ch. Agalarov 859

Structure and Affinity of Complexes between DNA-Binding Domain of Swi4 and DNA

*D.A. Afonin, O.V. Geras'kina, T.V. Loseva, M.P. Kirpichnikov,
V.M. Studitsky, and A.V. Feofanov* 868

Cell Biophysics

Dynamics of *in vivo* Membrane Processes in Algal Thylakoids as Analyzed from Chlorophyll
Fluorescence Induction Using the Photosystem II and Thylakoid Models

*N.E. Belyaeva, A.A. Bulychev, V.Z. Paschenko, K.E. Klementiev, P.A. Ermachenko,
I.V. Konyukhov, G. Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin* 877

Changes in Conformation and Distribution of Hemoglobin in the Erythrocyte
during Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase Activity

*O.V. Slatinskaya, P.I. Zaripov, N.A. Brazhe,
I. Yu. Petrushanko, and G.V. Maksimov* 897

Protective Effect of Hydrogen Peroxide during Erythrocyte Hemolysis
by Silver Nanoparticles

V.V. Voinarovski and G.G. Martinovich 906

The Effect of Astaxanthin on the Functional State of Rat Brain Mitochondria
in Heart Failure

*R.R. Krestinin, Yu.L. Baburina, I.V. Odinkova,
L.D. Sotnikova, and O.V. Krestinina* 917

Evaluation of Oolong Tea Extract Staining of Brain Tissue
with Special Reference to Smooth Endoplasmic Reticulum

E.A. Shishkova, I.V. Kraev, and V.V. Rogachevsky 926

Cytostatic Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione on *Escherichia coli* Cells
Is Related to Nitrosonium Cations Released from These Complexes

A.F. Vanin, V.I. Telegina, V.D. Mikoyan, N.A. Tkachev, and S.V. Vasilieva 938

Noble-Metal Polyacrylates: Cytotoxicity against Cisplatin
and Doxorubicin-Resistant Tumor Cells

*L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, Yu.A. Khochenkova,
N.V. Bluhterova, and K.A. Abzaeva* 947

Sodium Selenite as a Potential Adjuvant Therapy for COVID-19

T.M. Huseynov, R.T. Guliyeva, S.H. Jafarova, and N.H. Jafar 956

Complex Systems Biophysics

Effects of Nickel Chloride on Myocardial Contractile Parameters in Active Ground Squirrels with Different Responses to Hypothermia <i>A.S. Averin, N.M. Zakharova, and D.A. Ignatiev</i>	962
Antiviral Activity of Nitrosonium Cations against SARS-CoV-2 on a Syrian Hamster Model <i>A.V. Shipovalov, A.F. Vanin, O.V. Pyankov, E.G. Bagryanskaya, V.D. Mikoyan, N.A. Tkachev, N.A. Asanbaeva, and V.Ya. Popkova</i>	969
Role of the Nitrosonium Cation in Mechanism Underlying Antitumor Effects of Drugs in Combination with Dinitrosyl Iron Complexes <i>A.F. Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, N.V. Bluhterova, V.A. Rykova, and M.M. Fomina</i>	982
Early and Remote Sequence Effect of Neutron and Proton Irradiation on the Tumor Response of Solid Ehrlich Carcinoma and Skin Reactions in Mice <i>O.M. Rozanova, E.N. Smirnova, T.A. Belyakova, N.S. Strelnikova, A.E. Shemyakov, and A.V. Smirnov</i>	991
Influence of Custodiol on Preservation of the Isolated Rat Heart during Hypothermic Storage in a High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen <i>A.E. Gurin, E.L. Gagarinsky, and E.E. Fesenko (Jr.)</i>	1002
Tissue-Engineered Constructions in Biophysics, Neurology and Other Fields and Branches of Medicine <i>V.P. Reutov, L.A. Davydova, and E.G. Sorokina</i>	1009
The Evolutionary Optimality of the Body's Features. Species Life Span as a Product of Evolution <i>L.L. Ovsyannikov</i>	1030

УДК 577.3

ХИРАЛЬНОСТЬ КАК СИММЕТРИЙНАЯ ОСНОВА САМООРГАНИЗАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

© 2022 г. В.А. Твердислов*, А.Э. Сидорова*[‡], О.Е. Багрова*, Е.В. Белова*, В.С. Быстров**,
Н.Т. Левашова*, А.О. Луценко*, Е.В. Семенова*, Д.К. Шпигун*

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

[‡]E-mail: sky314bone@mail.ru

**Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики
им. М.В. Келдыша РАН, ул. проф. Виткевича, 1, Пушкино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 18.03.2022 г.

Принята к публикации 27.05.2022 г.

Представлен обзор материалов в рамках концепции хиральности как симметричной основы самоорганизации в биомолекулах. Рассмотрены: методы определения хиральности регулярных и нерегулярных структур белков, распределения спиральных и суперспиральных структур в полипептидных цепях, модель формирования трехмерной структуры правой α -спирали из цепочки левых аминокислотных остатков, модель образования правой α -спирали белка на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса. Обсуждаются прикладные аспекты концепции хиральности в фармакологии и биоинженерии – хиральность лекарственных препаратов с биоактивными энантиомерами и механизмы самосборки спиральных структур фенилаланиновых и дифенилаланиновых нанотрубок разной хиральности. Обозначены базовые представления о молекулярных машинах как о хиральных иерархических конструкциях.

Ключевые слова: хиральность, белки, структурные иерархии, самоорганизация, нанотрубки.

DOI: 10.31857/S0006302922050015, EDN: JIDANW

Иерархичность биологических систем, подобно дискретности и термодинамической неравновесности, является одним из важнейших принципов существования земных форм жизни. Биологические иерархии сопрягают разномасштабные в пространстве и времени структуры и функции живых систем. Вместе с тем, даже на базовом молекулярно-биологическом уровне этот признак не формулируется системно, а вместо него используется химическая классификация или перечисление характерных признаков соответствующих структур. В белках и нуклеиновых кислотах выделяют первичные, вторичные и т.д. структуры, однако универсального физического критерия, отражающего общий принцип подобной стратификации, в молекулярной биологии ранее не предлагалось.

Авторами предложен и разрабатывается новый подход к решению этой проблемы, основанный на представлениях о цепочке нарушений симметрии – иерархически сопряженной смене знака

хиральности на структурных уровнях субмолекулярных и надмолекулярных структур [1–3]. Ожидается, что подход позволит выполнить единую сквозную классификацию структурных уровней белков и нуклеиновых кислот, позволяющую с общих симметричных позиций продолжить развитие биофизической концепции молекулярных машин, а также рассмотреть пути разрешения парадокса Левинтала в проблеме фолдинга белков и нуклеиновых кислот.

Описана системная молекулярно-биологическая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода, в дезоксирибозе и аминокислотах прослежена тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L («правый»-«левый»-«правый»-«левый») для ДНК и L-D-L-D («левый»-«правый»-«левый»-«правый») для белков [1, 2]. Частным случаем хиральности выступает спиральность.

Хиральная асимметрия распространена в молекулярно-биологических системах много шире, чем традиционно обсуждается в литературе. К примеру, помимо левых аминокислот в белках, а

Сокращения: PDB – Protein Data Bank, PNT – пептидные нанотрубки.

также правых углеводов рибозы и дезоксирибозы в нуклеиновых кислотах, кроме вообще всех правых углеводов, включенных в основной метаболизм, различные липиды также составляют гомохиральные классы соединений у организмов разных таксономических рангов. Хиральные молекулы служат основой образования более крупных хиральных молекулярных и надмолекулярных конструкций, обладающих выделенными степенями свободы, необходимыми для формирования и функционирования молекулярных машин: от отдельных машин-ферментов до интегрирующей всю клетку системы машин — цитоскелета.

Начиная с работ Л. Полинга, Р. Кори и К. Линдерстрём-Ланга, классификация структур основывалась на описании их типов, химического состава и химических связей. Однако полное термодинамическое описание структурной иерархии подразумевает не только прямой учет внутримолекулярных физических взаимодействий, отраженных преимущественно в энтальпийном члене, но и факторов, связанных с энтропийной составляющей. Особо интересен поиск возможности описать единым физическим параметром иерархию структур белковых молекул в представлениях «нарушений симметрии», связанных с энтропией системы. Иначе говоря, «чередой симметрий» или чередой нарушений симметрии мы стараемся описать стратифицированную структуру белковой макромолекулы. В настоящем обзоре мы представляем рассмотрение структурных деталей и иерархий различных белковых структур на основе единого физико-химического симметричного принципа — их хиральности. Представлены модели формирования структуры α -спирали как трехмерной распределенной активной среды и на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса. В качестве прикладных приложений хиральности рассмотрены роль хиральности в формировании специфичности лекарственных препаратов и в структурообразовании пептидных нанотрубок.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯРНЫХ И НЕРЕГУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Важным звеном подтверждения смены знака хиральности в иерархии белков [1, 2] является разработанный авторами метод оценки хиральности регулярных и нерегулярных структур белков. Вопрос меры хиральности включает две взаимосвязанные линии: количественная оценка степени хиральности молекулярных конструкций и их знака при одном типе симметрии, и количественная оценка степени хиральности конструкций разного типа симметрии.

На протяжении не одного десятка лет было создано много методов анализа хиральности спиральных структур. Однако, как правило, эти методы не позволяют однозначно оценивать знак хиральности, часто узкоспециализированы и требуют больших вычислительных затрат [4–23]. Метод двугранных углов Рамачандрана [24] позволяет определять преобладающую конформацию элементов вторичной структуры биомолекул (однако оказалось, что возможно существование конформаций полипептидной цепи и вне разрешенных областей карты Рамачандрана). Наиболее целостная концепция оценки хиральности была разработана М. Петитжаном [25], согласно которой мера хиральности должна быть непрерывной характеристикой, а индекс хиральности не должен зависеть от способа выбора зеркального отображения. Разработанные ранее методы оценки хиральности суперспиралей основаны на определении знака хиральности coiled coil через шаг, радиус суперспирали, сдвиг вдоль оси суперспирали [26, 27], «поверхностную кривую» составляющих α -спиралей [28]. Однако эти методы не позволяют однозначно оценивать хиральность суперспиралей. К основным подходам распознавания и моделирования нерегулярных структур можно отнести следующие: использование параметров петель и поворотов, схожих по длине и геометрии конечных точек [29], двугранных углов на картах Рамачандрана для вычисления β -поворотов [30–36], нейронных сетей для распознавания γ -поворотов [37], определение структурных мотивов поворотов в больших базах данных белков [38], в частности, посредством анализа боковых цепей. [39, 40]. Подробные обзоры этих методов были изложены авторами ранее [41–44].

Для реализации метода, позволяющего оценивать хиральность регулярных и нерегулярных структур белков, используется взаимное расположение α -углеродов ($C\alpha$) [41–45], что позволяет на порядок снизить количество обрабатываемой информации и является явным преимуществом при обработке больших массивов данных. На рис. 1 представлено графическое построение векторов \mathbf{v}_i для расчета смешенного векторного произведения регулярных спиральных структур белков. На рис. 2 представлено графическое построение векторов \mathbf{v}_i для расчета смешенного векторного произведения нерегулярных структур белков.

Оценка знака хиральности вторичных спиральных структур происходит посредством суммирования смешанных произведений для троек векторов (\mathbf{v}_i), построенных между последовательными опорными точками $C\alpha$ [42–44]:

$$\chi_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{n-3} ([\mathbf{v}_i, \mathbf{v}_{i+1}], \mathbf{v}_{i+2}), \quad (1)$$

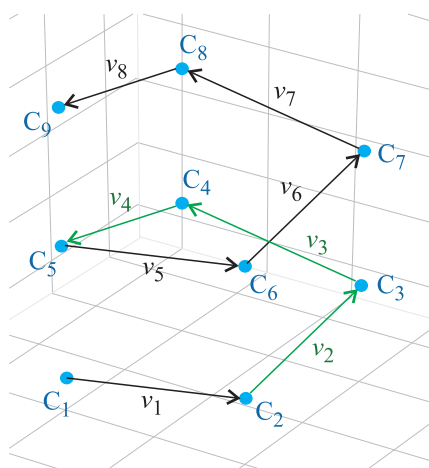


Рис. 1. Графическое построение векторов v_i для расчета смешанного векторного произведения регулярных спиральных структур белков [42]. C_i – атомы α -углеродов – опорных точек в спиралях.

где исходные векторы рассчитываются с учетом координат C_α , представленных в базе данных Protein Data Bank (PDB):

$$([v_1, v_2], v_3) = (y_1 z_2 - y_2 z_1)x_3 + (z_1 x_2 - z_2 x_1)y_3 + (x_1 y_2 - x_2 y_1)z_3.$$

Для правой тройки векторов знак смешанного произведения положительный и структура определяется как правая (D), для левой – отрицательный, и спираль левая (L). Нормированное значение хиральности спиральных структур белков рассчитывается [42–44] как:

$$\chi_{\text{norm}} = \sum_{i=1}^{n-3} \frac{([v_i, v_{i+1}], v_{i+2})}{C_i}, \quad (2)$$

где нормировочный множитель $C_i = \left(\frac{1}{3} \sum_{j=0}^2 |v_{i+j}|\right)^k$, $k = 5$.

Проведен анализ хиральности 26150 спиральных структур: 21702 α -спиралей, 4360 3_{10} -спиралей и 88 π -спиралей (все π -спирали взяты из работы [47]). Исследование показало, что большинство изученных спиральных структур являются правыми: 21689 правых α -спиралей (максимальное содержание левых α -спиралей в изученном подмножестве обнаружено в структурах белков эндо- и экзоцитоза [43]), 4160 правых 3_{10} -спиралей [42, 43] и 88 правых π -спиралей [44]. В соответствии с формулой (2) представлена карта нормированной хиральности для рассмотренных спиральных структур белков (см. рис. 3). Расчетные параметры хиральности спиральных структур представлены в наших работах: для α - и 3_{10} -спиралей – в работе [43], для π -спиралей – в работе [44].

Оценка хиральности нерегулярных структур на примере β - и α -поворотов и Ω -петель проводится в соответствии с вышеизложенным методом. Оценка хиральности α -поворотов (см.

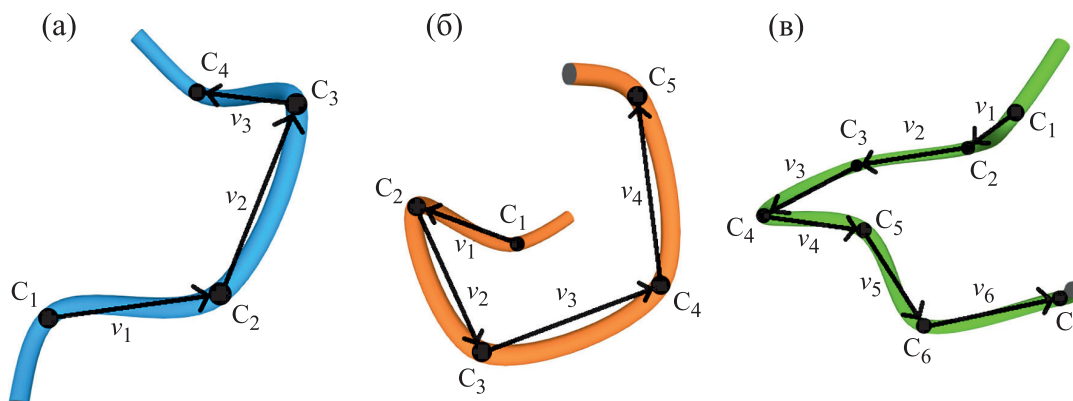


Рис. 2. Графическое построение векторов v_i для расчета смешанного векторного произведения нерегулярных структур белка 2ACT [46]: (а) – β -поворот, (б) – α -поворот, (в) – Ω -петля. C_i – атомы α -углеродов (опорные точки).

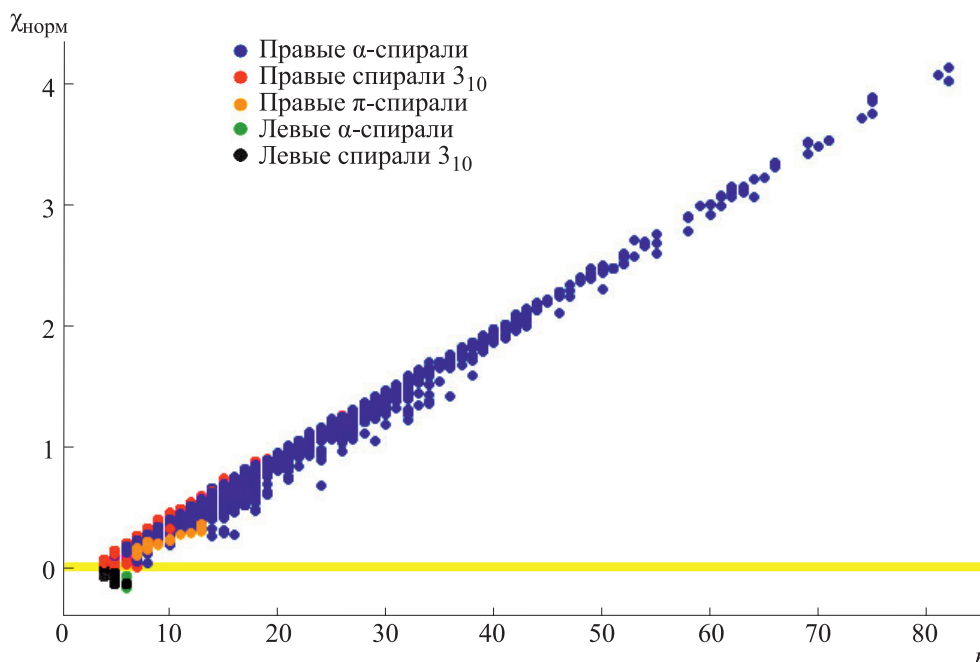


Рис. 3. Карта нормированной хиральности спиральных структур белков. По оси абсцисс — длина вторичной структуры в аминокислотных остатках, по оси ординат — нормированное значение хиральности.

рис. 4а) проведена на базе данных, представленных в работе [48], где все α -повороты разделены на типы в зависимости от значения торсионных углов (φ , ψ). Из наших результатов следует, что большая часть этих типов имеет определенные значения хиральности, характерные для каждого типа α -поворотов. Для β -поворотов была составлена база данных в соответствии с кодом, представленным в работе [49] (см. рис. 4а). Рассмотрен-

но 78 α -поворотов и 850 β -поворотов из 20 белков [50] и построена карта хиральности α - и β -поворотов [44]. Поскольку все рассмотренные β -повороты состоят из четырех аминокислотных остатков, а α -повороты — из пяти остатков, на карте хиральности они располагаются параллельно оси Y (см. рис. 4а). Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что для всех рассмотренных белков мера хиральности ($\chi_{\text{норм}}$) поворо-

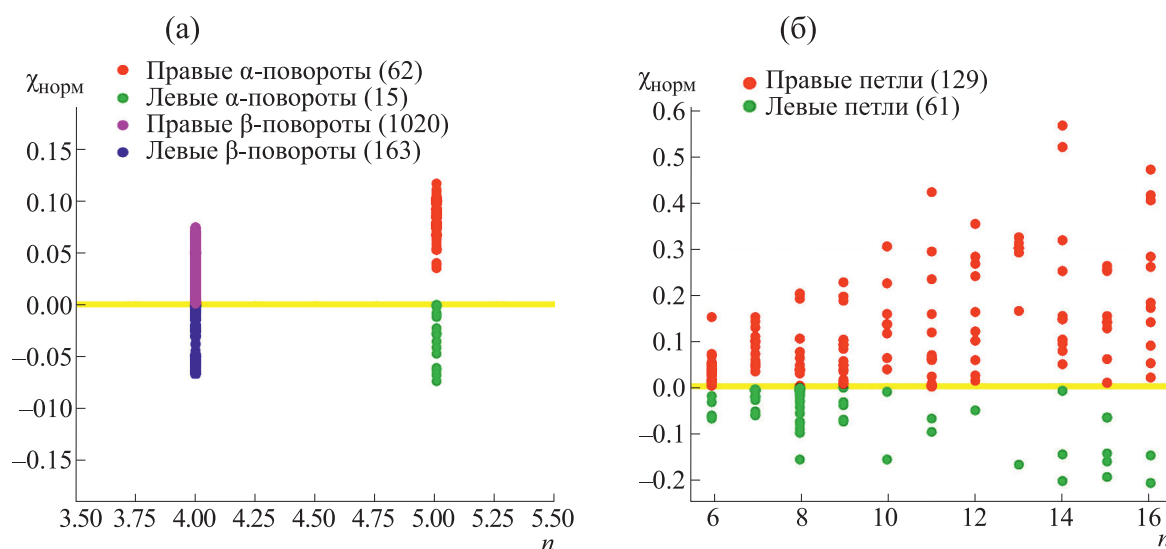


Рис. 4. Карта нормированной хиральности нерегулярных структур: а) α - и β -повороты; б) Ω -петли. По оси абсцисс — длина вторичной структуры в аминокислотных остатках, по оси ординат — нормированное значение хиральности.

тов нелинейно зависит от числа атомов в этих структурах (см. рис. 4а), что подтверждается диапазонами значения хиральности для определенных типов α - и β -поворотов [44] и полностью согласуется с нашим методом определения меры хиральности. Расчетные параметры α - и β -поворотов, включая средние значения и стандартные отклонения хиральности, представлены в работе [44].

Для расчета хиральности Ω -петель (см. рис. 4б) использованы данные работы [51]. Пространственная ориентация петель влияет на количественные значения хиральности этих структур на каждом этапе: в зависимости от количества последовательных остатков, взятых для расчета, хиральность может изменяться как по знаку, так и по величине [44]. Поэтому для петель не выявлена линейная зависимость меры хиральности от числа атомов в этих структурах. Расчетные параметры 190 Ω -петель представлены в работе [44].

Аналогично вышеизложенному методу для спиральных и нерегулярных структур в разработанном нами методе определения знака хиральности суперспиральных белковых структур в качестве начальных условий используется информация о взаимном расположении α -углеродов в аминокислотных остатках цепи. В основе метода лежит определение направления закрутки α -спиралей относительно оси суперспирали. Критерием определения этого направления является угол между осью суперспирали и осями образующих спиралей. Ориентация этого угла относительно оси суперспирали служит показателем для определения знака хиральности суперспирали. Для определения ориентации угла используется свойство векторного произведения давать результаты разного знака для правой и левой тройки векторов [42, 43].

На рис. 5 рассмотрен белок 1BB1, состоящий из трех α -спиралей. Поскольку в α -спирали на один виток в среднем приходится 3.6 аминокислотных остатков, в качестве условного центра витка спирали взят геометрический центр четырех последовательных атомов углерода, через которые проводятся оси α -спиралей (см. рис. 5а). Ось суперспирали ($S_1 - S_n$) и оси α -спиралей (см. рис. 5б) являются изогнутыми линиями в трехмерном пространстве, но поскольку для двух полных витков α -спиралей оси можно рассматривать как прямые линии, это позволяет строить для них векторы направления. Угол между направлением оси суперспирали (\mathbf{v}_s) и направлениями осей составляющих спиралей (\mathbf{v}_{c1} , \mathbf{v}_{c2} , \mathbf{v}_{c3}) позволяет определять знак хиральности суперспирали (см. рис. 5в): если вектор \mathbf{v}_{ci} отклонен относительно вектора \mathbf{v}_s вправо, суперспираль левая; если вектор \mathbf{v}_{ci} отклонен влево — суперспираль правая. Ве-

личина угла между \mathbf{v}_{si} (вектор от оси суперспирали к оси i -й спирали) и \mathbf{v}_{pi} (векторное произведение \mathbf{v}_{ci} и \mathbf{v}_s) определяется с помощью скалярного произведения, которое для тупых углов отрицательно, для острых — положительно (см. рис. 5г). Более подробно этапы метода определения знака хиральности суперспиральных структур рассмотрены в работах [42, 43].

Знак хиральности суперспиралей рассчитывается с помощью усреднения значения косинуса соответствующего угла для всех спиралей, образующих суперспираль [43]:

$$\chi_{\text{норм}} = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \cos(\beta_i), \quad (3)$$

где β_i — угол между направлением оси i -й α -спирали и направлением оси суперспирали.

Метод опробован на 116 суперспиралях coiled coil. Все суперспирали coiled coil, составленные из правых α -спиралей, согласно методу определены как левые. Данные расчетных параметров оценки хиральности структур coiled coil представлены в работе [43]. Как известно, в коллагенах левые спирали образуют правые суперспирали. Расчеты согласно представленному методу полностью подтвердили это положение. Были рассмотрены коллагеновые суперспирали, состоящие из трех левых спиралей: 1BKV, 1CAG, 1CGD, 1NAY, 2DRT, 2DRX, 3WN8, 4AXY, 4Z1R, 6HG7, 6W46, 6W47. Карта хиральности coiled coil и коллагеновых суперспиралей представлена на рис. 6.

Расчеты хиральности регулярных и нерегулярных структур белков проводили с использованием баз данных PDB [50] и CC+ [54].

Достоверность карт хиральности регулярных спиральных и нерегулярных вторичных, а также суперспиральных структур белков подтверждается анализом реальных структур. Полученные результаты соответствуют научным данным и концепции смены знака хиральности при переходе белковых структур на следующий уровень иерархии. Разработаны компьютерные программы для оценки хиральности спиральных (ECPHS) и суперспиральных (ECSSP) структур (свидетельства о государственной регистрации для ЭВМ: № 2021613546 от 10.03 2021 г.; № 2021665783 от 11.10.2021 г.).

РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ И СУПЕРСПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР В ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЯХ

Структура белка определяет его функцию и роль в биологической системе, однако, несмотря на многочисленные данные о функциях различных белков, значение некоторых из них по-преж-

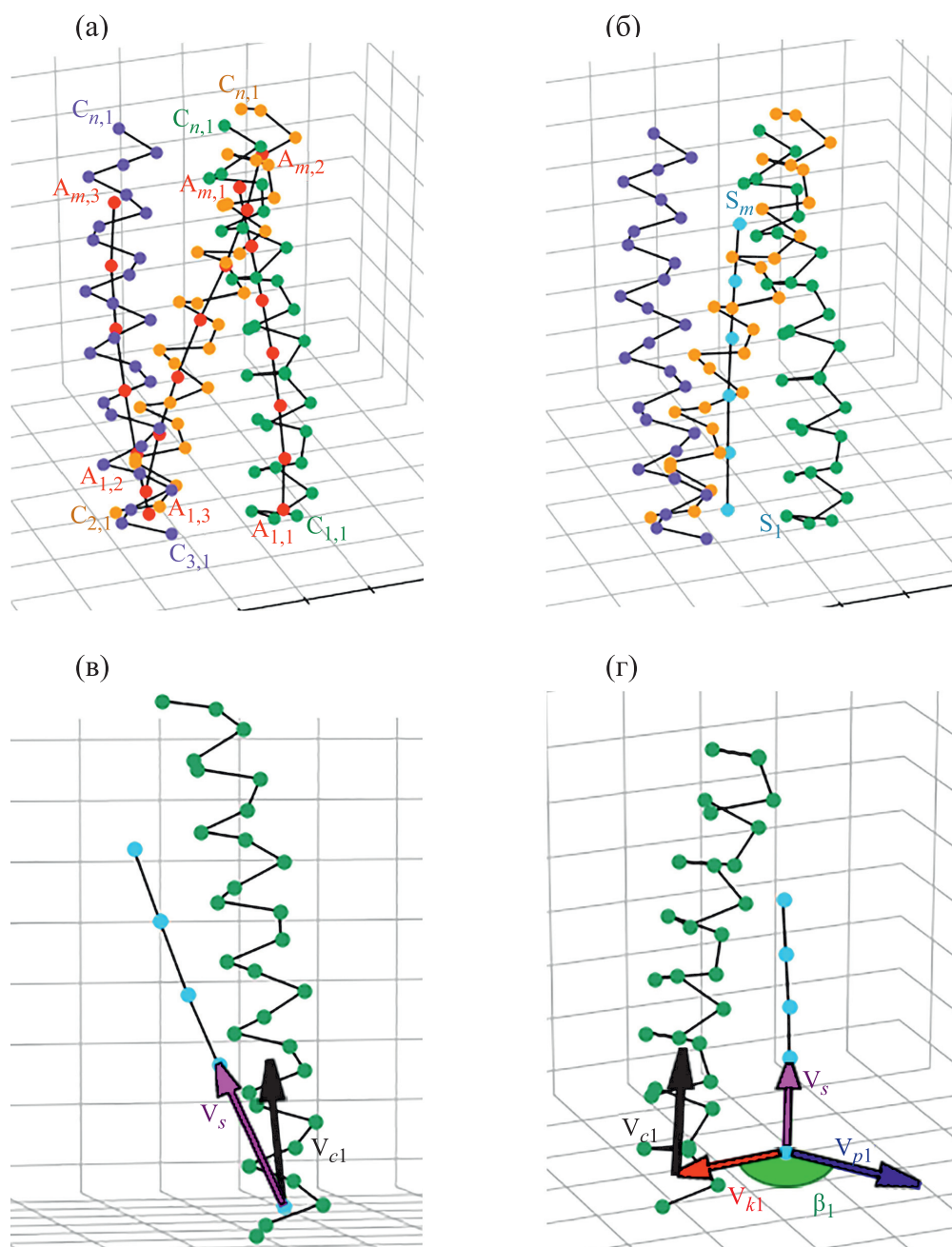


Рис. 5. Схема этапов (а–г) метода определения знака хиральности на примере структуры типа coiled coil [42]: v_{pi} – векторное произведение v_{ci} и v_{si} , v_{Si} – вектор от оси суперспирали к оси i -й спирали. Белок 1BV1 [52].

нему остаются невыясненными. Одним из методов определения соответствия структуры и функции белка и его роли в метаболизме является метод сравнения с уже известными, схожими по структуре белками. В работах [3, 53] рассмотрены закономерности в распределении вторичных структур и суперспиралей по полипептидной цепи, образующих динамичный каркас белковых молекул.

Проведен анализ распределения вторичных структур и суперспиралей coiled coil в полипептидных цепях белков восьми функциональных классов: белки вирусов, шапероны, оксидоредуктазы, гидролазы, структурные белки, белки экзо- и эндоцитоза и белки транспорта электронов. Подборку белков проводили с использованием баз данных PDB [50] и CC+ [54]. Были рассмотрены белки, в структурах которых отмечено нали-

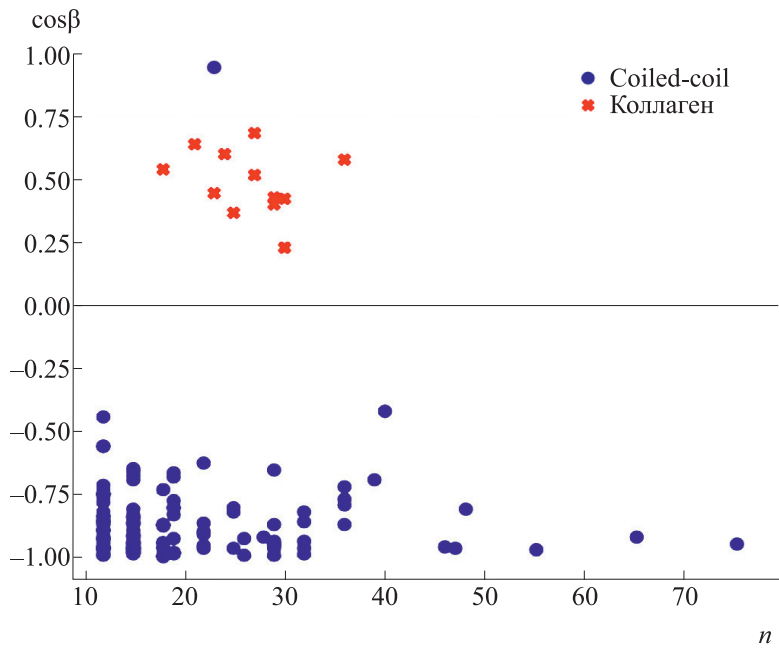


Рис. 6. Карта хиральности суперспиральных структур белков.

чие суперспирали coiled coil (согласно базе данных СС+ [54]). Число рассмотренных полипептидных цепей в каждом классе определялось количеством и доступностью структур в упомянутых базах данных. Для обработки текстовых файлов формата (pdb) был разработан специальный алгоритм, реализованный посредством программ на языках С++ и Python. Результаты анализа представлены в виде диаграмм распределения вторичных структур и суперспиралей coiled coil по полипептидной цепи.

Диаграммы распределения структур строились следующим образом: длина каждой полипептидной цепи из подборки для данного класса нормировалась на 100. Каждой координате от 1 до 100 на диаграмме соответствует частота встречаемости

выбранной структуры. Приведены диаграммы усредненных распределений исследуемых структур по полипептидной цепи, где каждой координате в относительных единицах присваивалось усредненное по 10 координатам значение количества структур (см. рис. 7). Более детальные диаграммы представлены в работах [53, 55].

Общим свойством изученных белков восьми функциональных классов является преобладание нерегулярных структур на концах полипептидных цепей (5% с каждого конца). В структурных белках обнаружено высокое содержание α -спиралей на протяжении всей цепи белка. Частота встречаемости α -спиральных структур на участке, без учета 5% с каждого конца цепи, лежит в диапазоне от 0.46 до 1.00, а на концах минималь-

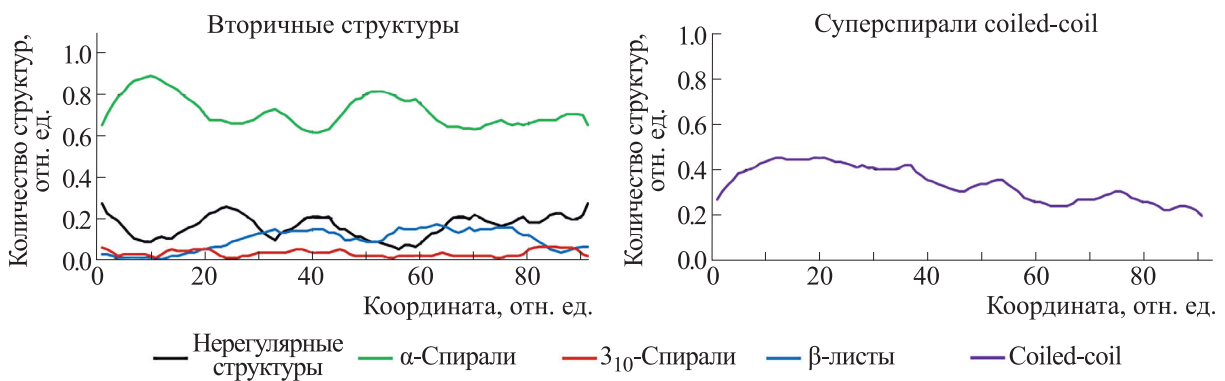


Рис. 7. Диаграммы усредненных распределений вторичных структур (слева) и суперспиралей coiled coil (справа) по полипептидным цепям структурных белков. По оси ординат отложена частота встречаемости структур в относительных единицах, по оси абсцисс – нормированная координата в относительных единицах.

ное значение составляет 0.23. Содержание β -листов и 3_{10} -спиралей не превышает 0.23. Частота встречаемости нерегулярных структур в основной части цепи не превышает 0.46 и достигает максимального значения равного 0.69 на концах цепи. Содержание суперспиралей coiled coil не превышает 0.55. Наличие довольно длинных α -спиралей естественно согласуется с функциональными особенностями рассмотренных белков. Большое количество спиралей обеспечивает жесткую структуру всей молекулы, что, безусловно, важно для структурных белков, отвечающих за механическую прочность клетки. Несколько минимумов частоты встречаемости α -спиралей, совпадающих с максимальными значениями частот встречаемости нерегулярных структур, могут обеспечивать необходимую локальную механическую подвижность молекул – каркасные функции. Для структурных белков частота встречаемости суперспиралей coiled coil постепенно снижается ближе C-концу. Для всех рассмотренных классов рассчитаны медианные значения частот встречаемости структур: для нерегулярных структур – 0.15, для α -спиралей – 0.69, для β -листов – 0.08, для 3_{10} -спиралей – 0.00, для coiled coil – 0.36.

Также на основе полученных распределений отмечены и другие общие для всех исследуемых классов свойства. Наблюдается равномерное распределение 3_{10} -спиралей (на основе анализа усреднений по 10%). По литературным данным 3_{10} -спирали чаще расположены на концах α -спиралей, однако построенные диаграммы не демонстрируют подобную закономерность [56]. Равномерного распределения суперспиралей по полипептидной цепи не обнаружено (на основе анализа усреднений по 10%). Все исследованные спирали являются правозакрученными. Также была проведена статистическая обработка распределений непараметрическими методами. В результате были обоснованы следующие гипотезы: а) участок цепи влияет на количество нерегулярных структур и α -спиралей; б) функция белков связана с количеством нерегулярных структур, α -спиралей, β -листов и 3_{10} -спиралей.

МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ПРАВОЙ α -СПИРАЛИ ИЗ ЦЕПОЧКИ ЛЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

В работах [1, 2] сформулированы общие правила структурообразования гомохиральных систем. Гомохиральная система с запасом свободной энергии способна эволюционировать в пределах иерархического уровня, сохраняя тип симметрии и знак преобладающей хиральности. При прохождении точек бифуркации такая система имеет тенденцию к спонтанному формиро-

ванию последовательности новых иерархических уровней с чередующимся знаком хиральности заново образующихся структур. Процесс рацемизации – перехода гомохиральных L-элементов аминокислот (в белках) в D-элементы может осуществляться двумя способами [57] – «горизонтально» (спонтанный переход L \rightarrow D, например, для аспартата в долгоживущих белках или при патологических процессах) и «вертикально» (набор L-аминокислот образует новую конструкцию большего масштаба с другим знаком хиральности, например, правую α -спираль). В отличие от гомохиральности, гетерохиральность – «вертикальная рацемизация» – возникает за счет формирования более крупных молекулярных структур противоположного знака хиральности из гомохиральных элементов. Симметричные аспекты формирования иерархии белковых структур связаны с изменением свободной энергии. Так, α -спирали возникают в тех локусах первичной структуры, где аминокислоты способны стерически уложиться в α -спираль и образовать водородные связи, что соответствует энтальпии свободной энергии. А переход на следующий уровень структурной иерархии сопровождается сменой типа симметрии и знака хиральности (энтропийный член свободной энергии) [2].

Основные свойства активных сред применительно к спиральным структурам белков можно охарактеризовать следующим образом [57]. Формирование α -спирали начинается в рибосоме из полипептидной цепочки белков – термодинамически неравновесной системы с распределенным по всей длине ресурсом. Распределенный ресурс свободной энергии, запасенной в левой гомохиральной левой полипептидной цепи аминокислот, способен реализоваться в ходе формирования следующего уровня структурной иерархии – правой спирали. Этот ресурс утилизируется в результате взаимодействия нелинейных локальных (соседних) трансформаторов энергии. В пределах одного иерархического уровня белковые структуры (в условиях самоорганизации) сохраняют тип симметрии и знак преобладающей хиральности, а после прохождении точек бифуркации такие структуры способны формировать новые иерархические уровни с чередующимся знаком хиральности. Поэтому полипептидную цепочку белков можно рассматривать в качестве одномерной активной среды с распределенным ресурсом свободной энергии, а начиная с уровня образования α -спирали – в качестве трехмерной распределенной активной среды – следующего уровня иерархии [57].

Моделированию формирования спиральных структур посвящено немало как общетеоретических работ в области физики, химии, биологии ([58–63] и др.), так и узкоспециализированных в области моделирования спиральных электриче-

ских волн в сердечной ткани ([64, 65] и др.), в нейроне и головном мозге ([66, 67] и др.), волн в химически возбудимой среде ([68] и др.), в биологических системах ([69, 70] и др.), при описании феномена эха ([71, 72] и др.). Однако нами не отмечено наличие исследований, в которых формирование спиральных структур белков рассматривается как автоволновой процесс в трехмерном пространстве.

Для построения автоволновой модели формирования α -спирали используются следующие условия: взаимное расположение α -углеродов C_α (рассмотрено в разделе «МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯРНЫХ И НЕРЕГУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ»), вектор направления и сумма векторных произведений [57, 75]. В соответствии с этим методом для n атомов углерода получаем $(n-1)$ векторов между соседними атомами $C_{(n-1)}^\alpha C_n^\alpha$, сумма которых – «вектор направления» \mathbf{d} , направленный от первого атома к последнему (см. рис. 8) [57, 76]:

$$\mathbf{v}_1 + \mathbf{v}_2 + \dots + \mathbf{v}_{n-1} = \sum_{i=1}^{n-1} \mathbf{v}_i = \mathbf{d}. \quad (4)$$

Отсюда сумма векторных произведений рассчитывается как

$$\sum_{i=1}^{n-2} [\mathbf{v}_i \times \mathbf{v}_{i+1}] = \mathbf{s}. \quad (5)$$

$$\varphi(x, y, z) = \begin{cases} \frac{1}{2}R^2 - (x - x_i)^2 - (y - y_i)^2 - (z - z_i)^2, & \text{если } \frac{1}{2}R^2 - (x - x_i)^2 - (y - y_i)^2 - (z - z_i)^2 > 0, \\ 0, & \text{если } \frac{1}{2}R^2 - (x - x_i)^2 - (y - y_i)^2 - (z - z_i)^2 \leq 0. \end{cases} \quad (7)$$

Согласно расчетам в работе [57], угол, образованный векторами \mathbf{v}_i и \mathbf{v}_{i+1} между каждыми тремя последовательными атомами углерода ($C_i^\alpha, C_{i+1}^\alpha, C_{i+2}^\alpha$), в среднем равен 87° . Определяем для аминокислотных остатков радиус описанной окружности (r) с центром на гипотенузе прямоугольного треугольника. Начало координат в центр первого аминокислотного остатка – $\mathbf{r}_1 = \{0, 0, 0\}$. Поскольку угол подъема спирали равен 26° , а расстояние между центрами соседних трех остатков $r = 3.5\text{\AA}$, радиус-вектор центра вто-

Также для представления автоволнового процесса формирования правых α -спиралей из левой цепочки аминокислотных остатков необходимо учитывать пространственные характеристики (3.6 аминокислотных остатка на виток, шаг спирали – 0.54 нм на виток, угол подъема спирали – 26° , диаметр молекулы аминокислоты – 0.5 нм (5\AA) [73, 74].

Исходя из пространственных характеристик α -спирали, решается трехмерное уравнение автоволнового процесса формирования α -спиралей [57]:

$$\Delta u = u(u - \varphi(x, y, z))(u - R^2), \quad (x, y, z) \in D, \quad (6)$$

где u – функция стационарных состояний автоволны в правых α -спиралях, формируемых из левых аминокислотных остатков; активатор – набор аминокислот, которые могут создать α -спираль; D – расчетная область в форме куба, величина объема которого должна быть такой, чтобы краевые эффекты не влияли на формирование структуры; $R = 5\text{\AA}$ – диаметр молекулы аминокислоты. Начальные условия: наличие в иерархических системах макромолекул белков хиральной диссимметрии влечет исходное запасание в этих системах свободной энергии

На границах куба имеем однородные условия Неймана [57]:

рого аминокислотного остатка определяется как $\mathbf{r}_2 = \mathbf{v}_1 = \{r \cos(26^\circ), 0, r \sin(26^\circ)\}$. Координаты центра третьего остатка – сумма векторов $\mathbf{v}_1 + \mathbf{v}_2$, где \mathbf{v}_2 получен путем поворота \mathbf{v}_1 на угол $(180^\circ - \gamma)$ против часовой стрелки в плоскости OXY (см. рис. 9).

C_1 – матрица поворота на угол $(180^\circ - \gamma)$ ($\gamma \approx 87^\circ$) против часовой стрелки в плоскости OXY [57]:

$$C_1 = \begin{pmatrix} \cos(\pi - \gamma) & -\sin(\pi - \gamma) & 0 \\ \sin(\pi - \gamma) & -\cos(\pi - \gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \gamma & -\sin \gamma & 0 \\ \sin \gamma & -\cos \gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (8)$$

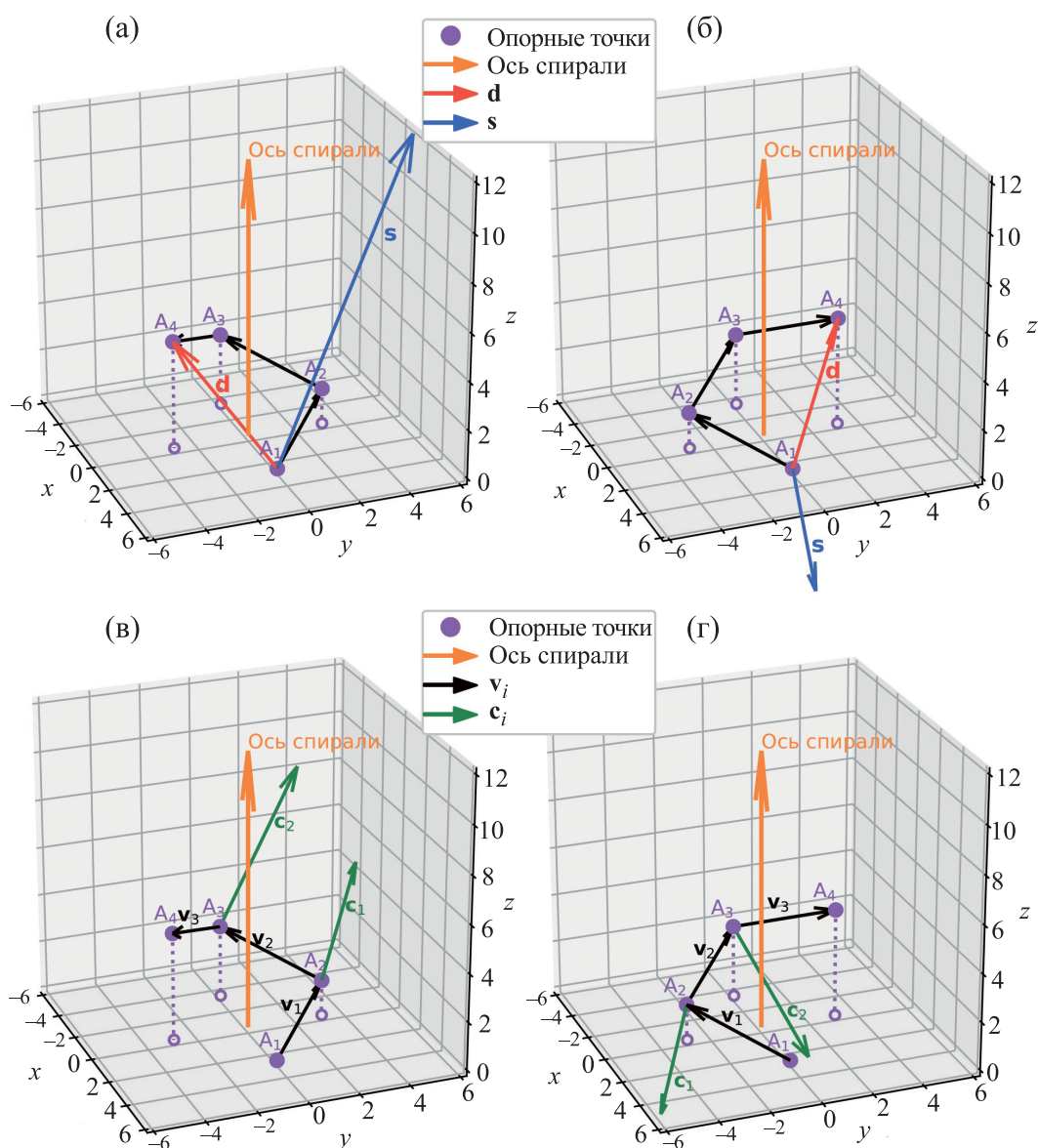


Рис. 8. Этапы моделирования (а–г): v_i – векторы между соседними атомами α -углеродов, d – вектор направления, s – сумма векторных произведений.

Координаты центра третьего аминокислотного остатка определяются как $r_3 = C_1 v_1 + r_2$, где $v_1 = r_2 - r_1$; π_1 – плоскость, в которой лежат первые три аминокислотных остатка (см. рис. 9б); четвертый остаток лежит в плоскости π_2 . Угол $\delta \approx 55^\circ$ (согласно работе [77]) между векторами s_{12} и s_{23} , где $s_{12} =$

$= [v_1, v_2]$, $s_{23} = [v_2, v_3]$, $v_2 = r_3 - r_2$, $v_3 = r_4 - r_3$. Координаты центра четвертого остатка – сумма $v_2 + v_3$, где v_3 получен путем поворота v_2 на 90° против часовой стрелки плоскости OYZ , а затем поворота в плоскости Oxz на угол δ против часовой стрелки. C_2 – матрица преобразования этих поворотов [57]:

$$C_2 = \begin{pmatrix} \cos \delta & 0 & -\sin \delta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \delta & 0 & \cos \delta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \delta & -\sin \delta & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ \sin \delta & \cos \delta & 0 \end{pmatrix}. \quad (9)$$

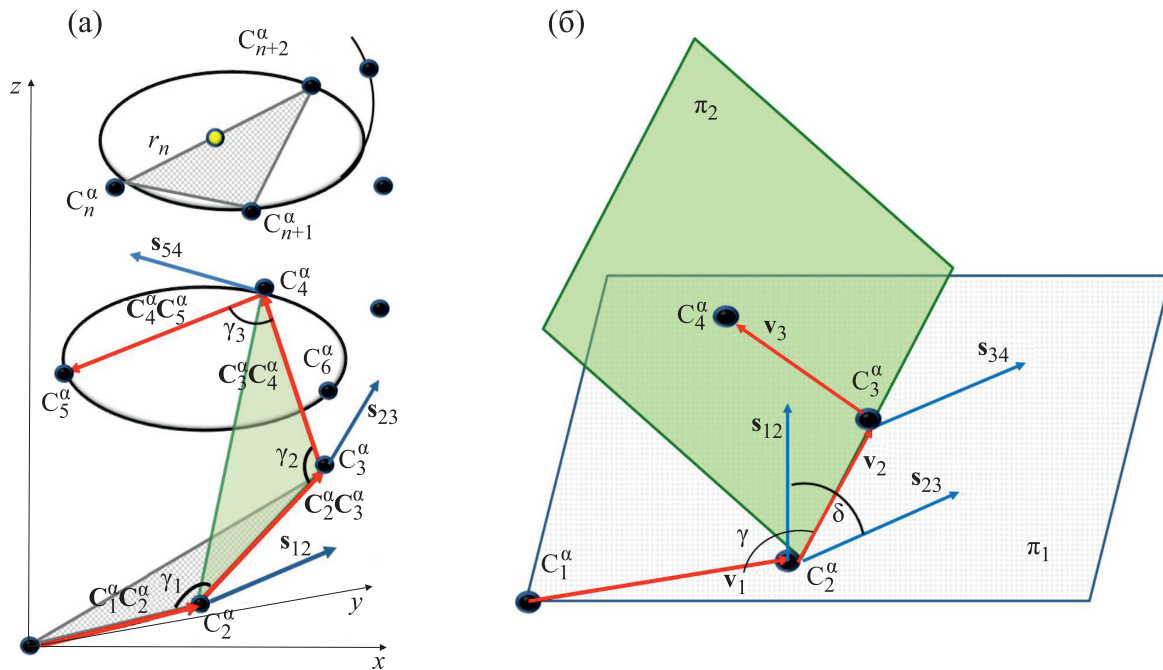


Рис. 9. Формирование α -спирали в трехмерном пространстве [57]: (а) – α -спираль с углами между последовательно расположенными атомами углерода, (б) – плоскости с аминокислотными остатками.

Отсюда координаты центра четвертого остатка – $\mathbf{r}_4 = C_2\mathbf{v}_2 + \mathbf{r}_3$. Координаты центров последующих остатков рассчитываются рекуррентно:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_{2n+1} &= C_1\mathbf{v}_{2n-1} + \mathbf{r}_{2n}, \text{ где } \mathbf{v}_{2n-1} = \mathbf{r}_{2n} - \mathbf{r}_{2n-1}, \\ \mathbf{r}_{2n+2} &= C_2\mathbf{v}_{2n} + \mathbf{r}_{2n-1}, \text{ где } \mathbf{v}_{2n} = \mathbf{r}_{2n+1} - \mathbf{r}_{2n}, n = 2, 3, \dots \end{aligned} \tag{10}$$

Полученные результаты демонстрируют поэтапное формирование правой α -спирали, сформированной из левой цепочки аминокислотных остатков (рис. 10), что подтверждает концепцию смены знака хиральности при переходе на следующий уровень структурно-функциональной организации белков в ходе самоорганизации. Во-вторых, представленная модель демонстрирует процесс перехода полипептидной цепочки белков – одномерной активной среды с распределенным ресурсом свободной энергии – в трехмерную структуру распределенной активной среды (α -спираль).

Модель подтверждает концепцию, согласно которой, в ходе иерархической самоорганизации гомохиральные системы, обладающие запасом свободной энергии, способны структурно эволюционировать в пределах одного иерархического уровня, сохраняя тип симметрии и знак преобладающей хиральности, а после прохождении точек бифуркации способны формировать новые иерархические уровни с чередующимся знаком хиральности.

МОДЕЛЬ ОБРАЗОВАНИЯ α -СПИРАЛИ БЕЛКА НА ОСНОВЕ ДВУХЧАСТИЧНОЙ МОДЕЛИ ДВИЖЕНИЯ В ПОТЕНЦИАЛЕ ЛЕННАРДА-ДЖОНСА

Диполь-дипольное взаимодействие наиболее часто моделируется при помощи различных модификаций потенциала Леннарда-Джонса [78] (обзор моделей представлен в работе [79]). В настоящей работе представлена крупнозернистая модель процесса последовательного перестроения линейной цепочки аминокислотных остатков, образующей первичную структуру в рибосомах, при выходе через рибосомный тоннель в виде правозакрученной α -спирали. Модель образования α -спирали разработана на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса с учетом пространственного расположения атомов α -углеродов C^α в α -спиралях белков и значений углов, образованных векторами, соединяющими центры каждых трех последовательных атомов углерода [57]. Аминокислотные остатки в модели представлены в виде шаров, положения центров которых определяются координатами атомов α -углеродов [80].

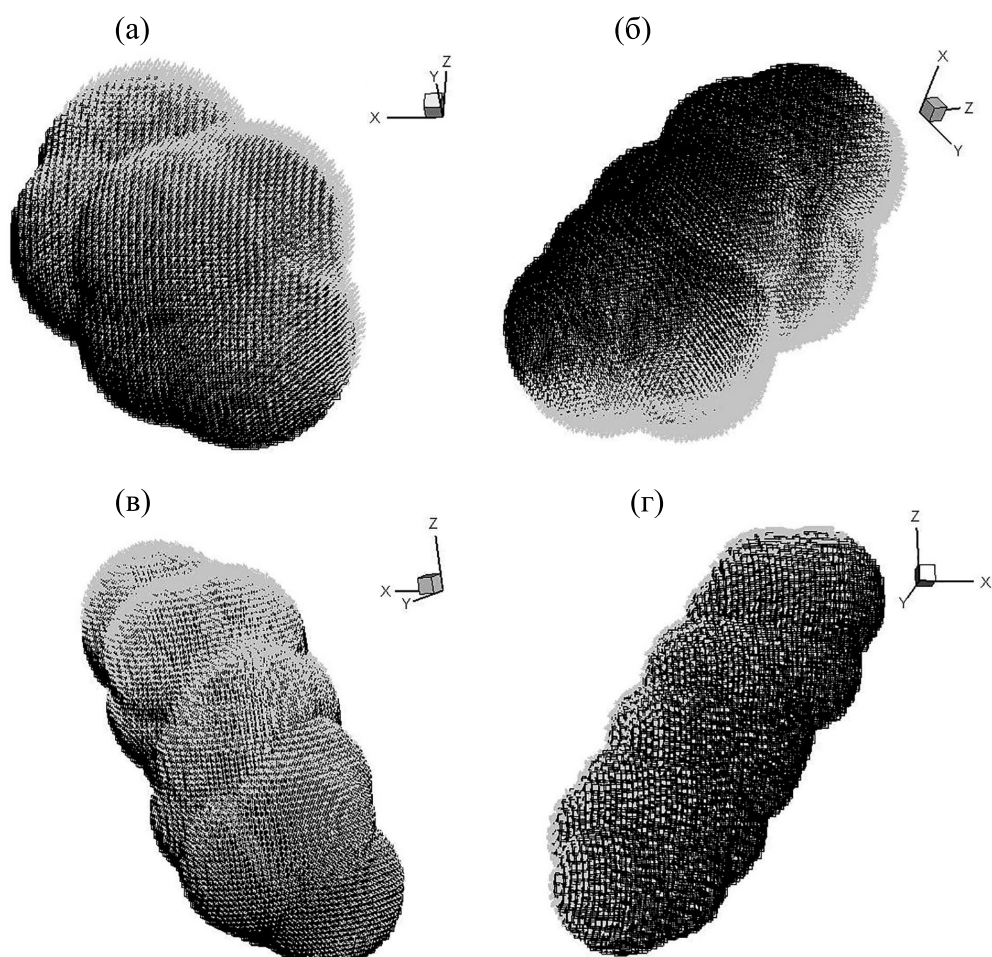


Рис. 10. Стационарные состояния автоволокн в правых α -спиралях, формируемых из левых аминокислотных остатков: (а) — структура из восьми аминокислотных остатков, б) — структура из двенадцати аминокислотных остатков, (в) — структура из шестнадцати аминокислотных остатков, (г) — структура из двадцати аминокислотных остатков [57]. Графическое изображение получено Н.Т. Левашовой в программе «Tecplot 360» Численный расчет проводили с использованием компилятора Open CL.

Предложенная модель описывает формирование вторичной белковой структуры, состоящей из двух участков: нерегулярной и регулярной спиральной (правозакрученная α -спираль). Каждый из участков состоит из 20 частиц — аминокислотных остатков в виде шаров диаметром 5\AA . В модели движение каждого последующего аминокислотного остатка происходит в поле диполь-дипольного взаимодействия между этой частицей и «эффективной» частицей (уже сформировавшейся спиральной частицей). Масса и скорость эффективной частицы совпадают с массой и скоростью ранее сформированного спирального участка цепи, движущегося как единое целое. Координаты

радиус-вектора эффективной частицы (см. раздел «МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ПРАВОЙ α -СПИРАЛИ») задаются как координаты центра последнего присоединенного к цепи аминокислотного остатка. Уравнения движения в центральном поле двух частиц — эффективной с радиус-вектором \mathbf{r}_1 , и вылетающей из рибосомы, с радиус-вектором \mathbf{r}_2 — записываются для радиальной и азимутальной координат в плоскости, перпендикулярной моменту импульса \mathbf{L} относительного движения двух частиц (см. рис. 11), и имеют вид

$$\dot{r} = \pm \sqrt{\frac{2}{\mu}(E - U_{\text{eff}}(r))}, \quad r(0) = 2R_c, \quad (1) \quad \varphi(t) = \frac{L}{\mu} \int \frac{dt}{r^2(t)}, \quad (11)$$

где r – модуль вектора $\mathbf{r} = \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2$; R_c – радиус аминокислотного остатка; E – энергия относительного движения; $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ – эффективная масса системы двух частиц – вылетающего аминокислотного остатка с массой m_2 и эффективной частицы с массой m_1 , а эффективная потенциальная энергия определяется как

$$U_{\text{eff}}(r) = U(r) + \frac{L^2}{2\mu r^2}. \quad (12)$$

Здесь $\mathbf{L} = \mu[\mathbf{r}, \dot{\mathbf{r}}]$ – момент импульса относительного движения двух частиц, $U(r)$ – потенциал Леннарда-Джонса:

$$U(r) = 4\epsilon \left(\left(\frac{a}{r} \right)^{12} - \left(\frac{a}{r} \right)^6 \right). \quad (13)$$

Параметры модели: энергия образования пептидной связи $\epsilon = 10^{-20}$ Дж [78]; расстояние, на котором должны находиться частицы в полипептидной цепи – $a \approx 2R_c$; средняя масса аминокислоты [81] – $m_1 = 110$ Да $18.266 \cdot 10^{-26}$ кг.

В модели используется предположение, что в момент присоединения каждого последующего аминокислотного остатка к ранее сформированной части цепи система рассматриваемых частиц достигает минимума суммарной энергии

$$\sum_{i=1}^N \frac{m_i \dot{\mathbf{r}}_i^2}{2} + \sum_{i=1}^{N-1} U(|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i+1}|), \quad (14)$$

где N – количество вышедших из рибосомы частиц, \mathbf{r}_i – радиус-вектор i -й частицы, $\dot{\mathbf{r}}_i$ – модуль

ее скорости, а функция $U(r)$ определяется выражением (3).

Средняя скорость удлинения полипептидной цепи, согласно работе [82], составляет 20 аминокислот за одну секунду. Считая диаметр аминокислотного остатка равным 5\AA , получим, что скорость удлинения цепи имеет порядок 10^{-8} м/с. Полагая белковую цепь непрерывной, считаем, что скорость относительного движения соседних аминокислотных остатков по порядку величины совпадает со скоростью удлинения цепи:

$\dot{r} \approx 10^{-8} \frac{M}{c}$, откуда следует, что подкоренное выражение в правой части уравнения (1) должно быть порядка $10^{-16} \text{ м}^2/\text{с}^2$, что возможно при $E - U_{\text{eff}} \approx 10^{-42}$ Дж и соответствует движению частиц вблизи минимума потенциальной ямы в потенциале Леннарда-Джонса (см. рис. 2). Будем считать $E = U_{\text{eff}}(r_0 + \theta)$, где r_0 – значение аргумента функции $U_{\text{eff}}(r)$, при котором эффективная потенциальная энергия достигает минимума, $r = r_0 + dr$, а θ – максимально допустимое отклонение величины r от r_0 . Учитывая малость величин dr и θ , можно представить подкоренное выражение в уравнении (11) по формуле Тейлора, оставив только слагаемые второго порядка малости. Тем самым можно прийти к линейному дифференциальному уравнению, решая которое, получим следующее выражение для модуля радиус-вектора квазичастицы в плоскости, перпендикулярной моменту импульса \mathbf{L} (см. рис. 11) [83]:

$$r(t) = \theta \sin \left(\sqrt{\frac{1}{\mu} \cdot \frac{\partial^2 U_{\text{eff}}}{\partial r^2}(r_0)} (\theta^2 - (r - r_0)^2) \cdot t \right) + r(0). \quad (15)$$

На рис. 12 представлены этапы процесса формирования белковой структуры, полученные в результате численных расчетов согласно модели.

Относительно быстрое образование спирального участка полипептидной цепи связано с быстрым кооперативным формированием блока водородных связей в α -спиральном фрагменте. В настоящее время существуют экспериментально обоснованные представления о том, что синтез и сворачивание полипептидной цепи, по крайней мере частично, происходит в рибосомном туннеле – «устье» общего канала длиной 10 нм.

Ограничения: представленные модели описывают формирование правой α -спирали из цепочки левых аминокислотных остатков. Отличительные особенности модели: рассмотрение движе-

ния на дне потенциальной ямы, что позволило упростить алгоритм; применение данных о пространственном расположении атомов C_α в α -спиральных белковых структурах; алгоритм формирования вторичной белковой структуры построен на условии наличия двух участков – нерегулярного и регулярного; движение каждого последующего аминокислотного остатка происходит в поле диполь-дипольного взаимодействия между этой частицей и «эффективной» частицей – сформированной частью молекулы; расчет проводится только для попарного диполь-дипольного взаимодействия двух соседних частиц; считаем, что в уже сформированной части молекулы положение аминокислотных остатков жестко закреплено водородными связями, т.е. «эффективная» частица движется как единое целое; модель

не связана с местом локализации описываемого процесса. Эти особенности позволили смоделировать белковые структуры типа «бусы», в то время как в литературе чаще встречаются структуры типа «облако». Развиваемый подход, основанный на использовании потенциала Леннарда-Джонса, позволяет существенно дополнить физическим содержанием энергетический и геометрический анализ конформационных превращений пептидной цепи при фолдинге. Модель не предполагает описание пространственно-временной самоорганизации макромолекулы, но обозначает пространственные позиции молекулярной инфраструктуры, что и есть тема биофизики белкового фолдинга. Впервые модель подобного типа основана на принципе хиральности белковых структур.

Модели образования трехмерной структуры правой α -спирали и формирования α -спиральных белковых структур на основе двухчастичной

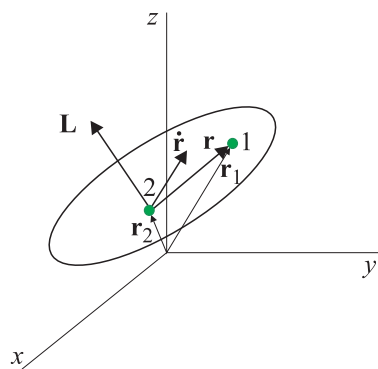


Рис. 11. Взаимное расположение векторов \mathbf{r} , $\dot{\mathbf{r}}$, \mathbf{r}_1 , \mathbf{r}_2 и \mathbf{L} для пары частиц. Частицы отмечены цифрами 1 и 2.

модели движения в потенциале Леннарда-Джонса подтверждают теорию формирования знакопеременных хиральных уровней белков.

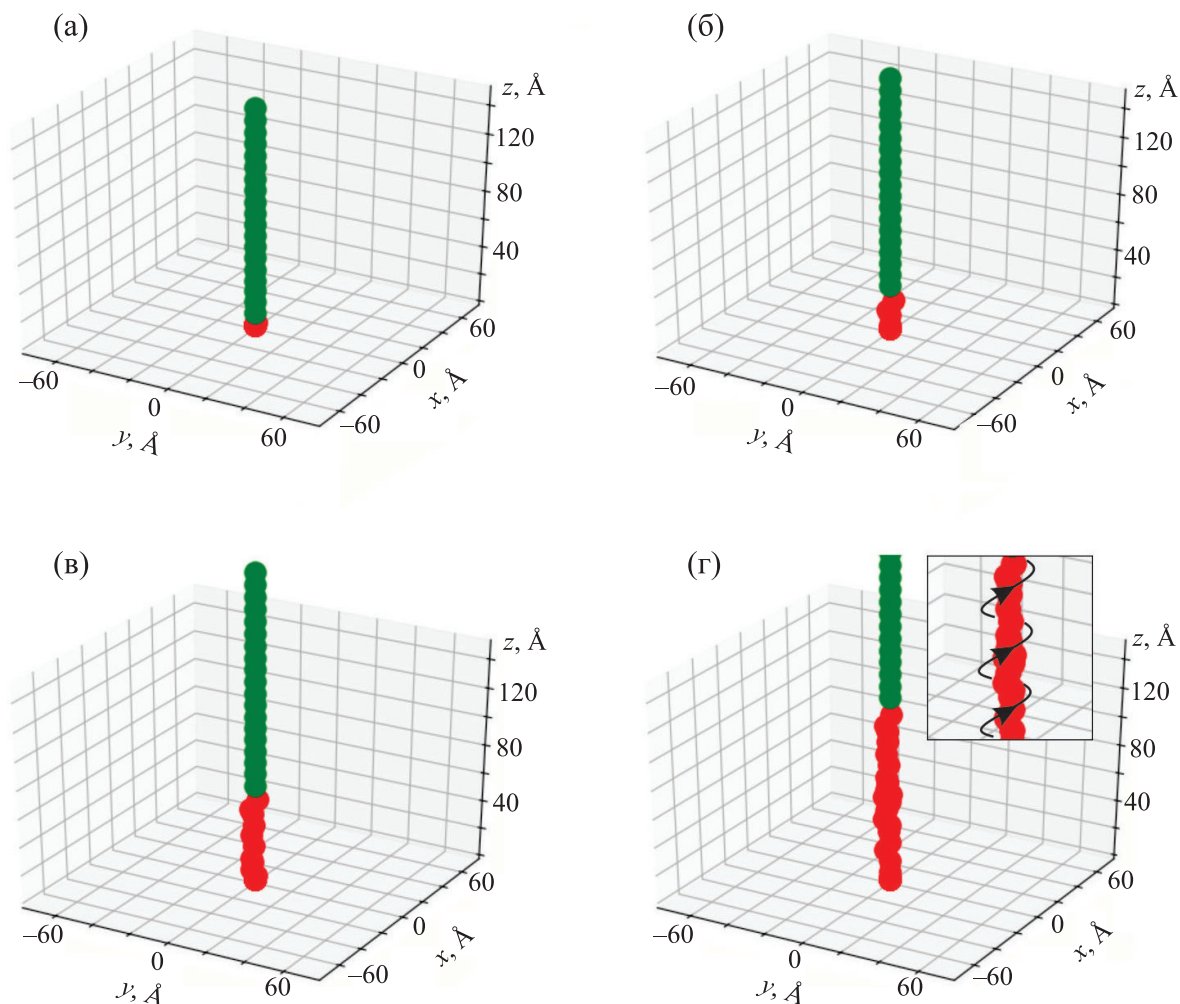


Рис. 12. Результат численного моделирования (а–г) последовательных этапов формирования вторичной структуры белка. Зеленым цветом показаны нерегулярные участки, красным — спиральные [83].

ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ КОНЦЕПЦИИ ХИРАЛЬНОСТИ В ФАРМАКОЛОГИИ И БИОИНЖЕНЕРИИ

Хиральность лекарственных препаратов. Прикладные аспекты концепции о роли хиральности в структурообразовании биомакромолекул могут быть рассмотрены на примере корреляций во взаимосвязи между хиральной формой лекарственного средства и ее биоактивностью. Хиральность играет важную роль в фармакологии, поскольку больше половины используемых в настоящее время лекарственных средств являются хиральными [84]. В организме хиральное вещество вступает во взаимодействия с его асимметричными молекулами, и эти стереоспецифические взаимодействия, по всей вероятности, наряду с комплементарностью, определяют действие препарата: один энантиомер лекарственного средства может обладать терапевтическим эффектом, а другой может не усваиваться, быть менее активным или оказывать совершенно другое действие, которое может быть как желательным, так и нежелательным для организма. Поэтому учет стереоспецифичности взаимодействия лекарства и молекулы-мишени крайне важен при создании лекарственных препаратов.

На основании предложенной классификации [85, 86] рассмотренные нами лекарственные средства разделены на три группы: лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером, лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером, лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами.

Лекарственные препараты с биоактивным «левым» S-энантиомером. Препараты этой группы подразделяются на две подгруппы: «правый» R-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и «правый» R-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается. Примерами первой подгруппы являются клопидогрел и фенфлурамин. Клопидогрел обладает антиагрегационным действием, то есть снижает склонность тромбоцитов к агрегации. Для фармацевтического использования пригоден только S-клопидогрел, поскольку R-клопидогрел не проявляет антиагрегационной активности, а также вызывает судороги в экспериментах на животных [87]. S-фенфлурамин подавляет аппетит, в то время как R-фенфлурамин не имеет такого эффекта и вызывает много побочных эффектов [88]. Из второй подгруппы рассмотрены бисопролол и ибупрофен. Бисопролол относится к кардиоселективным β_1 -адреноблокаторам и, как и большинство β -блокаторов, выпускается на рынок в виде рацемической смеси его энантиомеров. При этом S-бисопролол примерно в 30–80 раз более активен, чем R-бисопролол [89]. Ибупрофен – нестероидный проти-

вовоспалительный препарат, применяется в качестве противовоспалительного и анальгезирующего лекарственного средства. Энантиомеры ибупрофена обладают разной фармакодинамикой и фармакокинетикой: S-ибупрофен является более фармакологически активным, чем R-энантиомер, а также клиренс R-энантиомера данного препарата выше, чем у его антипода [90]. Использование чистого S-энантиомера ибупрофена приводит к уменьшению дозировки, но, несмотря на это, данный препарат представлен на рынке в виде рацемата [91].

Лекарственные препараты с биоактивным «правым» R-энантиомером. Препараты этой группы подразделяются на две подгруппы: «левый» S-энантиомер отвечает за побочные эффекты, и «левый» S-энантиомер обладает меньшим терапевтическим эффектом или его терапевтический эффект не наблюдается. Из первой подгруппы рассмотрены тербуталин и сальбутамол. R-энантиомер тербуталина избирательно возбуждает β_2 -адренорецепторы, а S-тербуталин практически не имеет сродства к β_2 -адренорецепторам, но использование S-энантиомер приводит к гиперреактивности дыхательных путей и сердечным расстройствам [92]. Такое действие S-энантиомера препарата связано с его способностью активировать мускариновые рецепторы. Сальбутамол – селективный агонист β_2 -адренорецепторов короткого действия. Как правило, препарат представлен в виде рацемической смеси несмотря на то что R-изомер сальбутамола имеет в 150 раз большее сродство к β_2 -рецептору по сравнению с S-изомером [93]. Кроме того, S-сальбутамол косвенно антагонизирует положительные эффекты R-сальбутамола и может давать воспалительные эффекты. Из второй подгруппы рассмотрены баклофен и депренил. Баклофен является стереоселективным агонистом ГАМК-рецептора, оказывающим миорелаксирующее и антиспастическое действие. Баклофен продается и используется в качестве рацемической смеси, хотя R-энантиомер является более активным, чем S-энантиомер [94]. Депренил является селективным и необратимым ингибитором B-изоформы фермента моноаминоксидазы. Его оптические изомеры обладают различной фармакологической активностью. R-изомер депренила (селегилин) обладает наибольшей активностью и используется при лечении болезни Паркинсона [95].

Лекарственные препараты с двумя биоактивными энантиомерами. Примером лекарственного средства данной группы является мirtазапин – антидепрессант двойного действия. Он антагонизирует адренергические α_2 -ауторецепторы и α_2 -гетерорецепторы и блокирует 5-HT₂- и 5-HT₃-рецепторы [96]. Миртазапин представляет собой рацемическую смесь двух фармакологически активных энантиомеров. S-энантиомер отвечает за

антагонизм 5-HT₂ и α ₂-рецепторов, а R-энантиомер блокирует 5-HT₃-рецепторы. Пропафенон — широко используемый антиаритмический препарат, назначаемый в виде рацемической смеси R- и S-энантиомеров [97]. Оба энантиомера одинаково активны в блокировании натриевых каналов, но у S-пропафенона наблюдается большая блокирующая β -адренорецепторы активность. Таким образом, R-пропафенон может подавлять аритмии без блокирования β -адренорецепторов, а значит, может быть использован для лечения пациентов, подверженных риску развития β -опосредованных побочных эффектов [98]. В свою очередь, S-энантиомер может привести к большому подавлению аритмии у тех пациентов, у которых желателен комбинированный эффект блокады натриевых каналов и β -адренорецепторов.

Сформирована база данных хиральных лекарственных препаратов и их специфичности на основании доступных литературных источников [85, 86]. Проведена классификация лекарственных средств по биоактивности R/S-энантиомеров, (+)/(-)-изомеров, типу лекарственного средства и мишени воздействия. Установлены преобладающие формы активных энантиомеров для лекарственных средств подборки. Полученные результаты могут быть использованы для разработки 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.

Пептидные нанотрубки. Пептидные нанотрубки (PNT) [99] на основе дифенилаланина уже давно находятся в центре внимания многих исследователей из-за их выдающихся механических, оптических и электрических свойств, перспективных для различных приложений в микроэлектронике, медицине и т.д. Одним из важных направлений этих исследований является компьютерное моделирование и изучение структурных и физических свойств этих нанотрубок. Важную роль в мотивации таких исследований играет наблюдаемая у PNT способность аминокислот и коротких пептидов к самосборке в разнообразные сложные биомолекулярные наноструктуры и возможность моделирования этих процессов. Формирующиеся при такой самосборке молекулярные образования, как правило, это трубчатые и спиральные структуры разных уровней иерархической организации в зависимости от хиральности исходных блоков аминокислот и пептидов [100, 101]. В прикладном аспекте хиральные эффекты оказываются в этом случае особенно важ-

ными при взаимодействии природных биополимеров с искусственно созданными структурами, которые могут иметь любую хиральность. Такие биомиметические структуры могут пребывать в рацемической смеси и иметь в своем составе энантиомеры обоих типов хиральности — L и D, что обуславливает их различную биологическую активность.

PNT на основе разных аминокислот и дипептидов [102, 103] являются характерными самоорганизующимися молекулярными структурами. К их числу относятся пептидные нанотрубки на основе аминокислоты фенилаланина (Phe или F) и ее дипептида — дифенилаланина (FF), образующие более сложные спиральные структуры (helix-like structures), несколько отличаются от α -спиралей белковых структур. Дипептид фенилаланина (Phe-Phe или FF) и пептидные нанотрубки на его основе (FF PNT) являются биосовместимыми и демонстрируют отличную механическую и химическую стабильность в биомедицинских применениях. При моделировании дипептидов дифенилаланина двух типов хиральности (L-FF и D-FF) структура дифенилаланина (FF) рассматривается на основе как конформаций исходной молекулы аминокислоты F в виде α -спирали (alpha-helix) или левой α -спирали (left-hand alpha helix), так и ее изомеров различной хиральности L-F и D-F (см. рис. 13) [104, 105]. Дипептиды (FF или (Phe)₂) в ходе самосборки способны формировать пептидные нанотрубки, причем разной хиральности, противоположной хиральности исходных молекул F: это было показано и моделированием и экспериментально [104–108] (см. рис. 14а,б). Аналогично и сами молекулы F способны в процессе самосборки образовывать самособранные наноструктуры типа спиральных пептидных нанотрубок. Это было также показано недавно прямым моделированием такой самосборки методами молекулярной динамики. При этом также было получено различие в хиральности самособранных наноструктур: из левых L-F собирались правые D-спиральные D-PNT и наоборот — из правых D-F собирались преимущественно левые L-PNT. На рис. 14в показан пример такой самособранной «левой» спиральной нанотрубки L-PNT из 100 D-F (или D-Phe) молекул.

Полная энергия оптимизированных наноструктур, основанных на дипептидах L-FF и D-FF, а также их полные дипольные моменты примерно одинаковы, но ориентация дипольных моментов — разная (см. рис. 13). Эти различия векторов дипольных моментов играют важную роль в структурных композициях следующих уровней при самосборке молекул L-FF и D-FF в более сложные модельные структуры — кольца, витки спирали и пептидные нанотрубки. Последующее периодическое повторение этой структу-

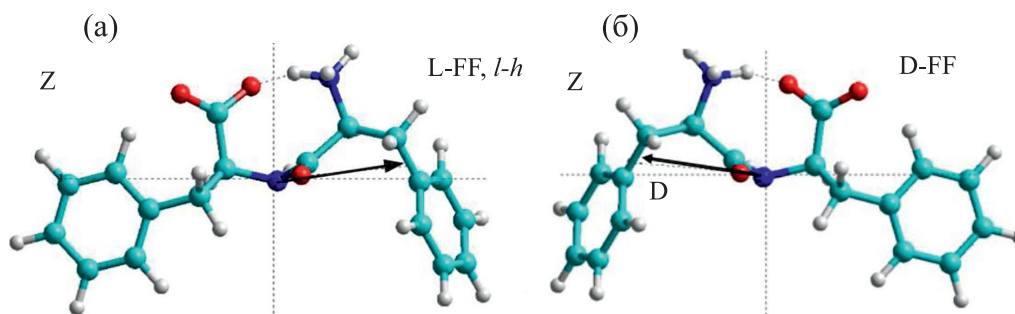


Рис. 13. Молекулярные модели дифенилаланина (конформация α -спирали) различных изомерных форм: (а) – L-FF с хиральностью L (конформация левой α -спирали), (б) – D-FF с хиральностью D (конформация α -спирали). Эти конформации соответствуют экспериментальным самосборным нанотрубкам [105]. Пунктирными линиями обозначена водородная связь NH...O. Цветами обозначены атомы: красный – O, синий – N, голубой – C, серый – H).

ры двойных витков вдоль оси приводит к образованию нанотрубок с соответствующим винтом вращения или хиральностью. Это приводит к различной ориентации пептидных нанотрубок – L-FF и D-FF. Однако самосборка нанотрубок на основе L-FF и D-FF, имеющих различные наборы векторов отдельных дипептидов, вдоль витков формирующихся спиральных структур приводит к различной ориентации пептидных нанотрубок и их разной хиральности – D-PNT на основе L-FF и L-PNT на основе D-FF. Эта прямая связь винта и хиральности образующихся пептидных нанотрубок с последовательностью векторов дипольных моментов \mathbf{D}_i отдельных дипептидов вдоль линии спирали таких нанотрубок, позволяет применить здесь подход смешанного произведения векторов для оценки хиральности таких

спиральных нанотрубок на основе этих векторов дипольных моментов.

По методике, аналогичной оценке величины и знака хиральности спиральных структур белков [42, 43], был проведен расчет величины и знака их хиральности дифенилаланиновых [45] и фенилаланиновых спиральных структур разной хиральности [44]. Расчет проводился на основе смешанного произведения векторов дипольных моментов из ряда последовательных молекул фенилаланина, образующих этот виток спирали фенилаланиновой нанотрубки с учетом ее хиральности. Абсолютное значение дипольного момента \mathbf{D}_i определяется как

$$D_i = |\mathbf{D}_i| = \sqrt{D_{x,i}^2 + D_{y,i}^2 + D_{z,i}^2}, \quad (16)$$

где $D_{x,i}$, $D_{y,i}$, $D_{z,i}$ – компоненты i -го вектора \mathbf{D}_i в декартовых координатах. Начало векторов \mathbf{D}_i бе-

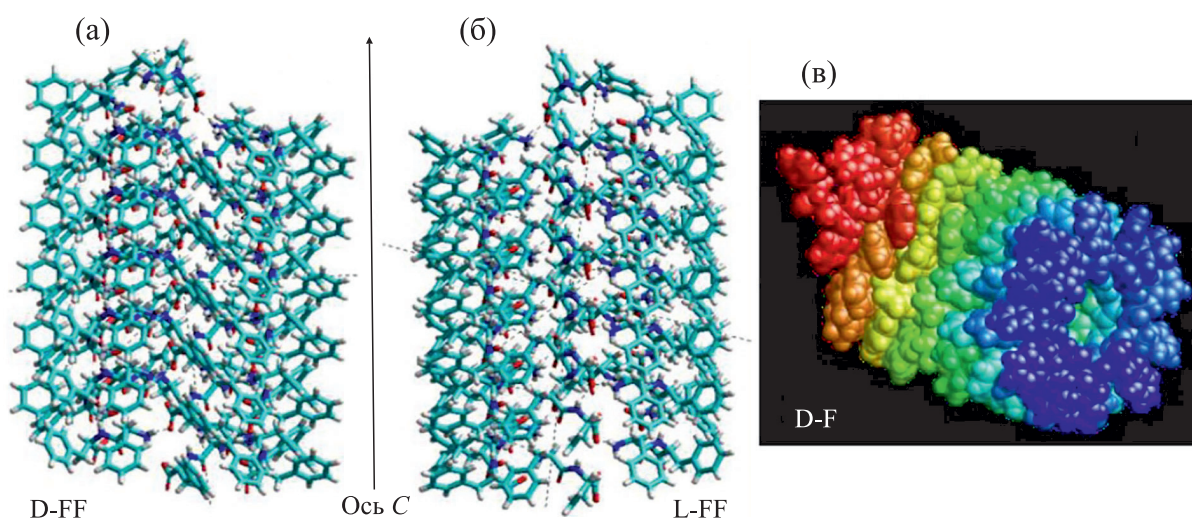


Рис. 14. Молекулярные модели пептидных нанотрубок: (а) – «левая» нанотрубка L-PNT на основе «правых» дипептидов D-FF, (б) – «правая» нанотрубка D-PNT на основе «левых» дипептидов L-FF [109], (в) – «левая» нанотрубка L-PNT (или L-Phe-нанотрубка) из 100 аминокислотных остатков «правого» фенилаланина D-F (D-Phe) [110].

Таблица 1. Данные дипольных моментов пептидных нанотрубок L-FF PNT и D-FF PNT

#	L-FF PNT			D-FF PNT		
	Dx	Dy	Dz	Dx	Dy	Dz
1	+14.576	-15.420	-11.261	-12.228	-15.267	-11.167
2	-6.313	-18.923	-10.513	+7.302	-18.014	-11.072
3	-18.646	-3.636	-11.849	+19.234	-2.597	-11.125
4	-11.564	+14.461	-12.573	+11.905	+15.905	-11.29
5	+7.554	+17.308	-12.123	-6.613	+17.478	-12.7601
6	+18.767	+2.568	-12.303	-19.82	+4.382	-12.531
Σ/n	-4.36	-3.641	-70.622 / 6	-0.218	+1.888	-69.945/6
c_{total} , Debye ³	16034.82			-14 497.03		
c_{norm}	1.37			-1.23		

Примечание. Применен расчет с использованием метода QM PM3 RHF для двухвитковой модельной структуры. Значения дипольных моментов приведены в единицах Дебая (данные для одного верхнего витка спирали, содержащего шесть молекул FF, из двойных витков типа α -спирали [45]).

рется относительно центра масс соответствующих молекул. Аналогично уравнению (1) [42, 43], сумма скалярных тройных произведений дипольных моментов, связанных с хиральностью PNT (суммирование по i в диапазоне от 1 до $n-2$, поскольку, в отличие от белковых спиралей, в супрамолекулярных спиральных нумеруются отдельные молекулы вместо атомов C α), определяется как:

$$c_{total} = \sum_{i=1}^{n-2} ([D_i, D_{i+1}], D_{i+2}). \quad (17)$$

Для получения меры хиральности нанотрубок производится нормализация по среднему значению полного дипольного момента витков

$$\text{нанотрубки PNT, } D_{av} = \frac{1}{12} \sum_{i=1}^{12} D_i:$$

$$c_{norm} = \frac{c_{total}}{D_{av}^3}. \quad (18)$$

В табл. 1 представлены данные расчета хиральности для дипептидных нанотрубок разной хиральности.

Полученные результаты расчетов показали, что хиральность спиральной нанотрубки на основе исходной левой аминокислоты L-F – правая (D), а хиральность спиральной нанотрубки на основе правой D-F – левая (L), аналогично смене знака хиральности белковых структур при пере-

ходе на следующий уровень организации пространственной структуры [1, 2].

Определены режимы формирования фенилаланиновых и дифенилаланиновых нанотрубок. Реальные структуры, полученные экспериментально, отражают структуры нанотрубок, содержащие во внутренней полости молекулы воды. В дифенилаланиновых структурах нанотрубок D-FF и L-FF PNT внутренняя водная среда приобретает особые полярные и хиральные свойства, которые образуются в результате процесса самоорганизации. Этот процесс модулируется и индуцируется в нанотрубках значительным электрическим полем, создаваемым сильно ориентированными дипольными моментами дипептидов D-FF и L-FF, различных для каждого типа хиральности. Созданные модельные структуры двух типов хиральности L-FF и D-FF PNT – пептидные нанотрубки, не содержащие и содержащие воду во внутренней полости, не равновесны и не находятся в минимуме энергии, что полностью соответствует термодинамике реальных структур.

Открытие ряда физических свойств дипептид фенилаланина (Phe-Phe или FF) и пептидных нанотрубки (FF PNT) на его основе (пироэлектрических, пьезоэлектрических, электронных и оптических) сделали FF PNT перспективными кандидатами для различных датчиков, исполнительных механизмов, накопительных конденсаторов, электрооптических модуляторов и оптиче-

ских волноводов. В частности, управление эффектами, связанными с поляризацией (пироэлектричество, пьезоэлектричество и генерация второй гармоники) в FF PNT создает новые возможности для разработки интеллектуальной микроэлектроники следующего поколения и различных микромеханических устройств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес физиков к проблеме хиральности в молекулярной биологии исторически более всего ориентирован на разрозненный поиск механизмов исходного нарушения симметрии. Не менее значимой фундаментальной проблемой является выяснение «биологического смысла» и физических механизмов функционирования знакопеременных хиральных подсистем в иерархиях живой природы. Показана общая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах, прослежена тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L («правый»—«левый»—«правый»—«левый») для ДНК и L-D-L-D («левый»—«правый»—«левый»—«правый») для белков. Этому биофизическому аспекту молекулярной биологии и биологии клетки посвящена настоящая работа — представлен обзор материалов в рамках концепции хиральности как симметричной основы самоорганизации в биомакромолекулах.

Рассмотрены методы определения хиральности регулярных и нерегулярных структур белков, распределения спиральных и суперспиральных структур в полипептидных цепях, автоволновая модель образования α -спирали, модель образования α -спирали белка на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса и прикладные аспекты концепции хиральности в фармакологии и биоинженерии — хиральность лекарственных препаратов с биоактивными энантиомерами и механизмы самосборки спиральных структур фенилаланиновых и дифенилаланиновых нанотрубок разной хиральности.

Полученные результаты служат обоснованием гипотезы о существовании сквозной физической инфраструктуры в молекулярной и клеточной биологии, связанной с симметричными характеристиками элементов, составляющих живые системы — *знакопеременного хирального инварианта*. Подобная инфраструктура естественным образом сопряжена с термодинамическими и синергетическими особенностями живых систем. Конкретным инструментом системности в многомерном пространстве молекулярной биологии, построенном иерархически, служит использование хиральных структур и переключений. Исследования по выявлению закономерностей и соответствий между «хиральным» строением белка и

его функциями могут позволить глубже понять тонкие механизмы конформационных подвижек в глобулах белков при их функционировании, в частности, посредством анализа структуры их полипептидной цепи. Представление о хиральности биомакромолекул может существенным образом дополнить и расширить достижения теоретической молекулярной биологии, биоинженерии и математического моделирования, ориентированного на описание процессов фолдинга и докинга.

Фундаментальным биофизическим обобщением развиваемого подхода является разработка новой физической концепции молекулярных биологических машин как иерархических хиральных конструкций. Как клетка является основным биологическим признаком известных нам земных форм жизни, так и молекулярная машина является главным физическим признаком и механизмом функционирования живых систем [2, 111]. По своему существу любая машина, в том числе молекулярная, работает в однопольном циклическом режиме, а потому является хиральным объектом по определению. Молекулярная машина, как и всякая другая машина, с необходимостью есть иерархический объект, поскольку, как минимум, в ней должны иметься структурно и функционально сопряженные управляющие и исполнительские элементы конструкции. Задачей молекулярной машины в биологической системе является совершение «полезной работы», которая как раз и является биологической функцией, путем преобразования формы энергии, вещества и информации. Спирали и суперспирали внутри- и надмолекулярных уровней организации образуют «выделенные (квази)механические степени свободы» молекулярных машин. Таким образом, молекулярная машина есть иерархическое устройство, циклически сопрягающее преобразование формы энергии, необходимое для совершения полезной работы, и череду преобразований симметрии в конструктивных элементах («рабочем теле»), составляющих «выделенные (квази)механические степени свободы» при самосборке и переключающих их при функционировании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» в рамках проектов 21-2-9-42-1 (стипендиат Е.В. Семенова) и 21-2-1-14-1 (стипендиат О.Е. Багрова), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

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

- V.A. Tverdislov, *Biophysics*, **58** (1), 159 (2013).
- V. A. Tverdislov and E. Malyshko, *Physics – Uspekhy* **62** (4), 354 (2019).
- Е. В. Малышко, О. Е. Багрова и В. А. Твердислов, *Биофизика*, **65** (3), 439 (2020).
- P. A. Guye, *Compt. Rendus*, **116**, 1451 (1893).
- E. Ruch and A. Schönhofer, *Theor. Chim. Acta*, **10** (2), 91 (1968).
- M. Randic, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **10**, 213 (1991).
- X. L. Peng, et al., *Molecules*, **9** (12), 1089 (2004).
- Y. Du, et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **42** (5), 993 (2002).
- D. Yaffe and Y. J. Cohen, *Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41** (2), 463 (2001).
- E. S. Goll and P. C. Jurs, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **39** (6), 1081 (1999).
- H. E. McClelland and P. C. Jurs, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40** (4), 967 (2000).
- A. R. Katritzky, S. Sild, and M. J. Karelson, *Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38** (5), 840 (1998).
- T. Zhao, Q. Zhang, H. Long, and L. Xu, *PLoS One*, **9** (7), (2014).
- M. Randic, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41** (3), 639 (2001).
- A. B. Buda, T. A. der Heyde, and K. Mislow, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **31** (8), 989 (1992).
- P. G. Mezey, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **455** (2–3), 183 (1998).
- G. Gilat and L. S. Schulman, *Chem. Phys. Lett.* **121** (1–2), 13 (1985).
- H. Zabrodsky, S. Peleg, and D. Avnir, *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (20), 7843 (1992).
- M. Pinsky, C. Dryzun, D. Casanova, et al., *J. Comput. Chem.*, **29** (16), 2712 (2008).
- V. E. Kuz'min, I. B. Stel'mach, M. B. Bekker, and D. V. Pozigun, *J. Phys. Org. Chem.*, **5** (6), 295 (1992).
- P.W. Fowler, *Symmetry: Culture and Science*, **16** (4), 321 (2005).
- A. V. Luzanov and D. J. Nerukh, *Math. Chem.* **41** (4), 417 (2007).
- G. Raos, *Macromol. Theor. Simul.* **11** (7), 739 (2002).
- G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.*, **7** (1), 95 (1963).
25. M. Petitjean, *Entropy*, **5**, 271 (2003).
- R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, *Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, (Acad. Press, NY, USA).
- G. N. Phillips, *Proteins*, **14**, 425 (1992).
- S. Neukirch, A. Goriely, A.C. Hausrath, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 038105 (2008).
- S. W. Robinson, A. M. Afzal, and D. P. Leader, In *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, Ed. by S. Padmanabhan (Acad. Press, NY, USA, 2014), pp. 259–287.
- J. S. Richardson, *Adv. Prot. Chem.*, **34**, 167 (1981).
- P. N. Lewis, F. A. Momany, and H. A. Scheraga, *Isr. J. Chem.*, **11**, 121 (1973).
- C. Wilmot and J. Thornton, *J. Mol. Biol.*, **203**, 221 (1988).
- A. G. de Brevern, *Sci. Rep.*, **6**, 33191 (2016).
- E. G. Hutchinson and J. Thornton, *Prot. Sci.* **3**, 2207 (1994).
- D. Ting, G. Wang, M. Shapovalov, et al., *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000763 (2010).
- M. Shapovalov, V. Slobodan, R. L. Dunbrack, *PLoS Comput. Biol.*, **15**, e1006844 (2019).
- C. Fang, Y. Shang, and N. Xu, *Sci. Rep.*, **8**, 15741 (2018).
- M. U. Johansson, V. Zoete, O. Michielin, and N. Guex, *BMC Bioinform.* **13**, 173 (2012).
- W. J. Duddy, J. W. M. Nissink, F. H. Allen, and E. J. Milner-White, *Prot. Sci.*, **13**, 3051 (2008).
- N. Eswar and C. Ramakrishnan, *Prot. Eng. Des. Sel.*, **12**, 447 (1999).
- A. E. Sidorova, E. V. Malyshko, A. R. Kotov, et al., *Bul. Rus. Acad. Sci.: Physics*, **83** (1), 85 (2019).
- A. E. Sidorova, A. O. Lutsenko, D. K. Shpigun, et al., *Biophysics*, **66**, 357 (2021).
- A. Sidorova, E. Malyshko, A. Lutsenko, et al., *Symmetry*, **13**, 879 (2021).
- A. Sidorova, V. Bystrov, A. Lutsenko, et al., *Nanomaterials*, **11** (12), (2021).
- V. Bystrov, A. Sidorova, A. Lutsenko, et al., *Nanomaterials*, **11**, 2415 (2021).
- <https://www.rcsb.org/structure/2ACT>
- M. Fodje and S. Al-Karadaghi, *Prot. Eng. Des. Sel.*, **15**, 353 (2002).
- D. V. Nataraj, N. Srinivasan, R. Sowdhamini, and C. Ramakrishnan, *Curr. Sci.*, **69**, 434 (1995).
- M. Shapovalov, V. Slobodan, and R. L. Dunbrack, *PLoS Comput. Biol.*, **15**, e1006844 (2019).
- RCSB PDB. Available online: <https://www.rcsb.org>
- J. F. Leszczynski and G. D. Rose, *Science*, **234**, 849 (1986).
- <https://www.rcsb.org/structure/1BB1>
- A. E. Sidorova, E. V. Malyshko, A. O. Lutsenko, et al., *Symmetry*, **13** (5) (2021).
- CC+ Database. Available online: <http://coiled-coils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/> (accessed on 15 January 2022).
- Е. В. Малышко, О. Е. Багрова и В. А. Твердислов, *Биофизика*, **65** (3), 439 (2020).
- А. С. Иванов, *Биомед. химия*, **57** (1), 31 (2011).

57. A. E. Sidorova, N. T. Levashova, E. V. Malyshko, and V. A. Tverdislov, *Moscow Univ. Physics Bul.*, **74** (3), 213 (2019).
58. Y. B. Zeldovich and D. A. Frank-Kamenetsky, *Acta Physicochim.*, **9**, 341 (1938).
59. A. Zaikin and A. Zhabotinsky, *Nature*, **225**, 535 (1970).
60. В. А. Васильев, Ю. М. Романовский и В. Г. Яхно, *Автоволновые процессы* (Наука, М., 1987).
61. R. A. FitzHugh, *Biophys. J.*, 445 (1961).
62. R. R. Aliev and A. V. Panfilov, *Chaos, Solitons & Fractals*, **3**, 293 (1996).
63. Yu. E. Elkin, V. N. Biktashev, and A. V. Holden, *Chaos Solitons & Fractals*, **9** (9), 1597 (1998).
64. Y. Kuramoto and T. Tsuzuki, *Theor. Phys.*, **54**, 687 (1975).
65. J. M. Davidenko, A. V. Pertsov, R. Salomonsz, et al., *Nature*, **355**, 349 (1992).
66. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, *J. Physiol.*, **117**, 500 (1952).
67. D. Marquardt, *SIAM J. Appl. Math.*, **11** (2), 431 (1963).
68. A. M. Zhabotinsky and A. N. Zaikin, *J. Theor. Biol.*, **40**, 45 (1973).
69. Г. Р. Иваницкий, В. И. Кринский и Е. Е. Сельков, *Математическая биофизика клетки* (Наука, М., 1978).
70. Дж. Марри, *Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии* (Мир, М., 1983).
71. В. И. Кринский и А. В. Холопов, *Биофизика*, **12**, 524 (1967).
72. О. А. Морнев, И. М. Цыганов, О. В. Асланиди и М. А. Цыганов, *Письма в ЖЭТФ* **77** (6), 319 (2003).
73. L. Pauling and R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **37**, 235 (1951).
74. А. В. Финкельштейн и О. Б. Птицын, *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами* (Книжный дом «Университет», М., 2012).
75. A. E. Sidorova, E. V. Malyshko, A. R. Kotov, et al., *Bul. Rus. Acad. Sci.: Physics*, **83** (1), 85 (2019).
76. A. E. Sidorova, E. V. Malyshko, A. R. Kotov, et al., *Biophysics*, **64** (2), 155 (2019).
77. H. M. Berman, et al., *Nucl. Acids Res.*, **28**, 235 (2000).
78. Ю. А. Овчинников, *Биоорганическая химия* (Промсвещение, М., 1987).
79. K. A. Zuev, N. T. Levashova, E. V. Malyshko, et al., *Moscow Univ. Physics Bul.*, **76** (4), 226 (2021).
80. K. A. Zuev, N. T. Levashova, E. V. Malyshko, et al., *Moscow Univ. Physics Bul.*, **76** (4), 226 (2021).
81. Д. Нельсон и М. Кокс, *Основы биохимии Ленинджера*, в 3 т., Т. 1 (БИНОМ. Лаборатория знаний, М., 2011).
82. R. Young and H. Bremer, *Biochem. J.*, **160**, 185 (1976).
83. K. A. Zuev, N. T. Levashova, E. V. Malyshko, et al., *Moscow Univ. Physics Bul.*, **76** (4), 226 (2021).
84. L. A. Nguyen, H. He, and C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2** (2), 85 (2006).
85. Е. В. Семенова, Е. В. Малышко и В. А. Твердислов, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **6** (1), 142 (2021).
86. E. V. Malyshko, E. V. Semenova, O. E. Bagrova, et al., *Biophysica*, **1** (1), 22 (2021).
87. R. Vardanyan and V. Hruby, *Synthesis of Best-Seller Drugs* (Acad. Press, 2016).
88. R. Pool, *Fat: Fighting the Obesity Epidemic* (Oxford Univ. Press, Oxford, 2001).
89. Y. Horikiri, T. Suzuki, and M. Mizobe, *J. Pharm. Sci.*, **87** (3), 289 (1998).
90. H. Alkadi and R. Jbeily, *Infect. Disord. Drug Targets*, **18** (2), 88 (2018).
91. A. M. Evans, *Clin. Rheumatol.*, **20** (Suppl. 1), S9 (2001).
92. H. Beng, H. Zhang, R. Jayachandra, et al., *Chirality*, **30**, 759 (2018).
93. G. A. Jacobson, S. Raidal, K. Robson, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **83**, 1436 (2017).
94. M. Singh, P. Malik, and R. Bhushan, *J. Chromatogr. Sci.*, **54** (5), 842 (2016).
95. E. Szökő, H. Kalász, and K. Magyar, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24** (4), 315 (1999).
96. S. A. Anttila and E. V. Leinonen, *CNS Drug Rev.*, **7** (3), 249 (2001).
97. Q. Zhou, T. W. Yao, and S. Zeng, *World J. Gastroenterol.* **7** (6), 830 (2001).
98. H. K. Kroemer, C. Funck-Brentano, D. J. Silberstein, et al., *Circulation*, **79** (5), 1068 (1989).
99. C. H. Gorbitz, *Acta Cryst.*, **74**, 311 (2018).
100. M. Calvin, *Chemical evolution. Molecular evolution, towards the origin of living system on the Earth and elsewhere* (Clarendon Press, Oxford, 1969).
101. A. L. Lehninger, *Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function* (Worth Publishers Inc., New York, 1972).
102. V. Bystrov, *Computer Simulation Nanostructures: Bioferroelectric Amino Acids. Bioferroelectricity: Peptide nanotubes and thymine nucleobase* (LAMBERT Acad. Publ., 2020).
103. V. S. Bystrov, I. K. Bdikin, and B. Singh, *Nanomaterials Sci. Engineer.*, **2** (1), 11 (2020).
104. В. С. Быстров и С. В. Филиппов, *Компьютерное моделирование и численные исследования пептидных нанотрубок на основе дифенилаланина* (Препринт ИПМ № 78, М., 2021).
105. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *Math. Biol. Bioinform.*, **14** (1), 94 (2019).
106. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *J. Mol. Mod.*, **25** (199), 18 (2019).
107. P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, S. Kopyl, et al., *Cryst. Growth Des.*, **19**, 6414 (2019).
108. V. Bystrov, J. Coutinho, P. Zelenovskiy, et al., *Nanomaterials*, **10** (10), 1999 (2020).
109. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *Math. Biol. Bioinform.*, **14** (1), 94 (2019).
110. И. В. Лихачев и В. С. Быстров, *Мат. биология и биоинформатика*, **16** (2), 244 (2021).
111. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко и С. А. Ильченко, *Изв. РАН. Сер. физ.*, **79** (12), 1728 (2015).

Chirality As a Symmetric Basis of Self-Organization of Biomacromolecules

V.A. Tverdislov*, A.E. Sidorova*, O.E. Bagrova*, E.V. Belova*, V.S. Bystrov**, N.T. Levashova*,
A.O. Lutsenko*, E.V. Semenova*, and D.K. Shpigun*

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

**Institute of Mathematical Problems of Biology, ul. Professora Vitkevicha 1, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

We present a review of materials within the framework of the concept of chirality as a symmetry basis of self-organization in biological macromolecules. The following methods are considered: methods for determining the chirality of regular and irregular protein structures, the distribution of helical and coiled-coil structures in polypeptide chains, a model for the formation of a three-dimensional structure of a right-handed α -helix from a polypeptide chain of left-handed amino acids, a model for α -helix formation based on a two-particle model of motion in the Lennard-Jones potential. Applied aspects of the chirality concept in pharmacology and bioengineering are discussed – the chirality of drugs with bioactive enantiomers and the mechanisms of self-assembly of helical structures of phenylalanine and diphenylalanine nanotubes of different chirality. The basic concepts of molecular machines as chiral hierarchical structures are designated.

Keywords: chirality, proteins, structural hierarchies, self-organization, nanotubes

16S рРНК *E. coli* ЗНАЧИТЕЛЬНО СТИМУЛИРУЕТ ТРАНСЛЯЦИЮ РЕПОРТЕРНОЙ мРНК В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

© 2022 г. Н.В. Зырина*, **, #, С.Ч. Агаларов*

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

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: zyrina.nv@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 20.07.2022 г.

Методом мониторинга люминесценции в режиме реального времени обнаружен эффект существенной стимуляции трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе WGE (бесклеточная эукариотическая система на основе экстракта зародышей пшеницы) при добавлении 16S рибосомной РНК *E. coli*. Эффект стимуляции трансляции мРНК люциферазы оказался специфичным именно для бесклеточной системы WGE и проявлялся вне зависимости от природы 5'-нетранслируемой области репортерной мРНК. Определен класс нетранслируемой РНК, не оказывающий стимулирующего эффекта. На величину эффекта стимуляции трансляции репортерных мРНК в системе WGE влияли концентрация и тип 5'-нетранслируемой области репортерной мРНК, а также момент внесения 16S РНК в работающую систему. Изучение явления стимуляции трансляции позволит оптимизировать бесклеточную систему WGE для применения в методах с использованием репортерных генов и решения различных научно-прикладных задач.

Ключевые слова: биолуминесценция, трансляция, бесклеточная система WGE

DOI: 10.31857/S0006302922050027, EDN: J1DBYR

Бесклеточные системы трансляции — одна из фундаментальных технологий, которая открывает широкие возможности в области изучения механизмов биосинтеза белка, функциональной геномики, скрининга и масштабного получения активных белков, разработки лекарственных препаратов, изучения метаболических путей и др. [1–3]. Для решения различных задач с применением этих систем разработан ряд методов на основе репортерных мРНК. Одним из таких методов является метод мониторинга синтеза фермента люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) в режиме реального времени в бесклеточных системах трансляции, впервые предложенный в нашей лаборатории для изучения механизмов биосинтеза белка [4]. В основе метода лежит катализ люциферазой реакции окисления люциферина, сопровождаемой излучением кванта света в области 540–600 нм [5, 6]. Окисляемый субстрат добавляется непосредственно в реакционную смесь, активность синтеза люциферазы характеризуют

количественно, измеряя люминесценцию непосредственно во время трансляции мРНК люциферазы в системе. Анализ крайне чувствителен, так как реакция имеет высокий квантовый выход при отсутствующей фоновой люминесценции [7]. Так, в оптимальных условиях реакции можно обнаружить около 10 фг люциферазы [8].

Проводя мониторинг синтеза люциферазы в бесклеточной эукариотической системе трансляции на основе экстракта зародышей пшеницы (система WGE) мы обнаружили неожиданный эффект стимуляции трансляции репортерной мРНК люциферазы при добавлении в систему нетранслируемой 16S рибосомной РНК *E. coli*. Целью настоящей работы было определение факторов, влияющих на обнаруженный эффект.

МЕТОДЫ

Плазмиды и получение матриц для транскрипции. Плазмиды pTZ10OmegaLuc [9], pSP36Tβ-globin-Luc-GAPDH-A50 [10] и pCrPV-Fluc [11], содержащие кодирующую последовательность лю-

Сокращение: 5'-НТО — 5'-нетранслируемая область.

Таблица 1. ДНК и репортерные мРНК

Плазмидный вектор	мРНК	5'-НТО (лидеры)	Способ инициации трансляции	Размер транскрипта, п.о.
pTZ10Omega-Luc-TMV	5'UTR _{Omega} -Luc-3'UTR _{TMV}	5'-НТО РНК ВТМ (омега-лидер)	Кэп- и eIF4F-независимый	2049
pSP36T-β-globin-Luc-GAPDH-A50	5'UTR _{βGlobin} -Luc-3'UTR _{GAPDH-A50}	5'-НТО мРНК белка –глобина лягушки <i>Xenopus</i>	Кэп-зависимый	1866
pCrPV-Fluc	5'UTR _{CrPV} -Luc-3'UTR _{A50}	Межгенная последовательность геномной РНК вируса паралича сверчка (CrPV IRES)	IRES-опосредованный (кэп- и фактор независимый)	2089

циферазы светлячка (*Photinus pyralis*) и различные 5'-НТО (табл. 1) нарабатывали в *E. coli* DH5α (ThermoFisher Scientific, США) и выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Для дальнейшего использования в транскрипции плазмиду pTZ10OmegaLuc расщепляли эндонуклеазой рестрикции Bsp120I (Psp OMI) (ThermoFisher Scientific, США), плазмиду pSP36T-β-globin-Luc-GAPDH-A50 – эндонуклеазой HpaI (ThermoFisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителями. Плазмиду pCrPV-Fluc использовали в качестве матрицы для синтеза ДНК-фрагмента с 5'-НТО вируса паралича сверчка CrPV в ПЦР (см. табл. 1). Праймеры для реакции – T7 (прямой) 5'CGCCGTAATAC-GACTCACTATAGGGAAAGCAAAAATGTGATC-TTGCTTG, последовательность промотора T7 РНК-полимеразы подчеркнута) и FLA50a (обратный) 5'(T)₄₈AACTTGTTTATTGCAGCTTAT) – были синтезированы Научно-производственной компанией «Синтол» (Россия). Реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 1.6 нг/мкл плазмиды, 0.3 мкМ каждого из праймеров, 0.025 ед/мкл Taq-полимеразы (Roche, Германия), 0.2 мМ каждого из дНТФ, 2.5 мМ MgCl₂ и 1× буфер High Fidelity Buffer (Roche, Германия), помещали в амплификатор Biometra Personal Cyler (Analytik Jena, Германия) и амплифицировали целевой ДНК-фрагмент в режиме: стартовая денатурация (1 мин), 3 цикла денатурации (15 сек, 94°C), отжига (30 сек, 50°C) и элонгации (72°C, 2 мин), 29 циклов денатурации (15 сек, 94°C), отжига (30 сек, 65°C) и элонгации (72°C, 2 мин) и финальная элонгация (7 мин).

После расщепления плазмидные ДНК или продукт ПЦР очищали фенольной депротеинизацией с последующим спиртовым осаждением. Все этапы работы контролировали электрофорезом в 1%-й агарозе в нативных условиях с визуализацией бромистым этидием. Концентрацию

ДНК (при A₂₆₀ нм), а также дополнительную оценку чистоты препарата (соотношение A₂₆₀/A₂₈₀) определяли на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad).

Получение мРНК. Матричные РНК, кодирующие люциферазу светлячка (*Photinus pyralis*) 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV}, и 5'UTR_{CrPV}-Luc-3'UTR_{A50}, были получены транскрипцией соответствующих ДНК (см. табл. 1) с использованием РНК-полимеразы фага T7 (NEB) в условиях, рекомендованных производителем фермента, добавляя MgCl₂ до 22 мМ и 1 ед/мкл ингибитора РНКазы RiboLock™ (ThermoFisher Scientific, США). Концентрация каждого NTP составляла 4 мМ, линейаризованной плазмиды pTZ10Omega-Luc или очищенного продукта ПЦР pCrPV-Fluc – 0.02 мкг/мкл. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч, после этого сразу проводили депротеинизацию смесью фенол с pH 5.5 : хлороформ (1 : 1) и ряд спиртовых осадений с использованием насыщенного раствора хлорида лития (1/3 объема) 4 М NH₄OAc (1/2 объема) и 3 М NaOAc с pH 5.5 (1/10 объема). Для получения мРНК 5'UTR_{cap-βGlobin}-Luc-3'UTR_{GAPDH-A50} проводили реакцию с РНК полимеразой фага SP6 (ThermoFisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителем фермента. Концентрации добавленных MgCl₂, и других компонентов реакции, а также время инкубации и очистка были такими же, как указано выше. Кэпирование полученной мРНК проводили с помощью набора ScriptCap™m7G Capping System (CellScript), после этого мРНК экстрагировали смесью фенол: хлороформ 1 : 1 и очищали на колонке Illustra MicroSpin G50 (GE Healthcare) согласно рекомендациям производителя.

Качество полученного препарата РНК анализировали в 1%-й агарозе в 0.5× ТВЕ с визуализацией бромистым этидием, а также в 6% ПААГ с

7 М мочевиной и окрашиванием толуидиновым синим.

Препараты РНК и ДНК. 16S и 23S рибосомные РНК выделяли из препаратов 30S и 50S субчастиц рибосом *E. coli* MRE600. К препаратам добавляли двукратный объем деионизированной воды и 0.2%-й раствор SDS в объемном соотношении 1:5 при интенсивном перемешивании. После этого проводили депротеинизацию РНК с использованием фенола с рН 5.5 на первой стадии. Экстрагированную РНК осаждали из водной фазы, добавляя 3М NaOAc и этанол, осадок растворяли в деионизированной воде и хранили при -20°C . При выделении 23S РНК не отделяли 5S РНК.

В работе использовали тотальную нетранслируемую РНК (тРНК) *E. coli* MRE600 40 мкг/мл (Roche, Германия), РНК фага MS2 0.8 мкг/мл (Roche, Германия) и ДНК тимуса теленка, обработанную ультразвуком до фрагментов размером 200–6000 п.о., с конц. 500 мкг/мл (Cytiva). К 100 мкг каждого препарата добавляли MgCl_2 до 10 мМ, переводили в буфер, содержащий 10 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl_2 (рН 7.5) и очищали на колонке NAPTM5 (Amersham, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. РНК и ДНК осаждали добавлением 3М NaOAc и этанола, осадок растворяли в деионизированной воде и хранили при -20°C .

Трансляция в бесклеточных системах с непрерывным мониторингом синтеза люциферазы. Трансляцию в бесклеточной системе на основе экстракта зародышей пшеницы WGE проводили в стационарном режиме при 25°C : 10 мкл реакционной смеси содержали 1× буфер для трансляции WGE (25 мМ HEPES-КОН (рН 8.0), 0.4 мМ GTP, 1 мМ АТФ, 0.1 мМ спермидина, 0.05 мг/мл тотальной тРНК дрожжей, 1.5 мМ дитиотреитола), 0.2 мМ каждой аминокислоты (смесь), 1.5 мМ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ (до 3 мМ с учетом магния экстракта WGE), 0.02 мМ KOAc (до 65 мМ с учетом магния экстракта WGE), 2% глицерина, 0.15 мМ спермидина, 0.01 мМ NP40, 16 мМ креатинфосфата, 30% экстракта зародышей пшеницы, 0.1 мг/мл креатинфосфокиназы (Boehringer Mannheim, Германия), 0.5 ед/мкл ингибитора РНКаз RiboLockTM (ThermoFisher Scientific, США). Для непрерывного мониторинга синтеза люциферазы реакционная смесь содержала 0.10 мМ люциферина. Конечные концентрации мРНК, а также добавленных 16S и других РНК указаны в разделе «Результаты». Экстракт зародышей пшеницы (WGE) получали, как описано в работе [12]. Трансляцию мРНК люциферазы 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV} проводили также в бесклеточной системе на основе лизата ретикулоцитов кролика (RRL) с использованием набора Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega, США) при 30°C

по протоколу производителя. Приготовление экстракта S-100 *E. coli* и трансляцию в бесклеточной системе на его основе 0.5 мкг/мкл мРНК люциферазы 5'UTR_{SD}-Luc-3'UTR_{N64} (5'-НТО Шайн–Дальгарно) проводили по ранее опубликованным протоколам [12, 13].

Все компоненты системы, кроме мРНК, смешивали при 4°C , предварительно инкубировали при температуре реакции в течение 2 мин, затем добавляли мРНК, помещали микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью в термостабируемую ячейку 12-ячеечного роторного люцинометра Хемилум-12 (Россия) и инкубировали в течение часа. Мониторинг синтеза люциферазы проводили, регистрируя интенсивность биолюминесценции в непрерывном режиме в течение указанного времени с автоматическим выводом потока данных в виде кинетической кривой. Каждое измерение проводили в трех повторностях.

Обработка данных. Активность трансляции репортерной мРНК оценивали по максимальной скорости синтеза люциферазы, которую определяли как максимальное значение производной по времени на участке от конца лаг-периода до начала выхода кривой на плато. Обработку и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8 SR0, результаты представляли в виде среднего арифметического (*Mean*) и среднеквадратичного отклонения (*SD*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект стимуляции трансляции репортерной мРНК люциферазы в присутствии 16S РНК *E. coli*. Проводя мониторинг синтеза люциферазы в бесклеточной системе WGE, транслирующую небольшие количества (0.35–0.70 мкг/мкл) мРНК люциферазы с омега-лидером вируса табачной мозаики 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV}, мы обнаружили любопытное явление: внесение в бесклеточную систему выделенной из экстракта зародышей пшеницы тотальной РНК значительно стимулировало трансляцию (рис. 1а). Известно, что около 80% тотальной РНК WGE составляет рибосомная РНК. Мы решили проверить, будет ли рибосомная РНК из другого организма стимулировать подобным образом трансляцию мРНК люциферазы при внесении в таких же количествах, что и в первоначальных экспериментах с тотальной РНК из WGE, т.е. в диапазоне 0.38–2.25 мкг/мкл. Оказалось, что добавление 16S РНК *E. coli* стимулировало синтез люциферазы в бесклеточной системе WGE так же существенно и не менее эффективно (рис. 1б), значительно увеличивая накопление активной люциферазы. Максимальный стимулирующий эффект достигался при добавлении 0.75 мкг/мкл 16S РНК, при

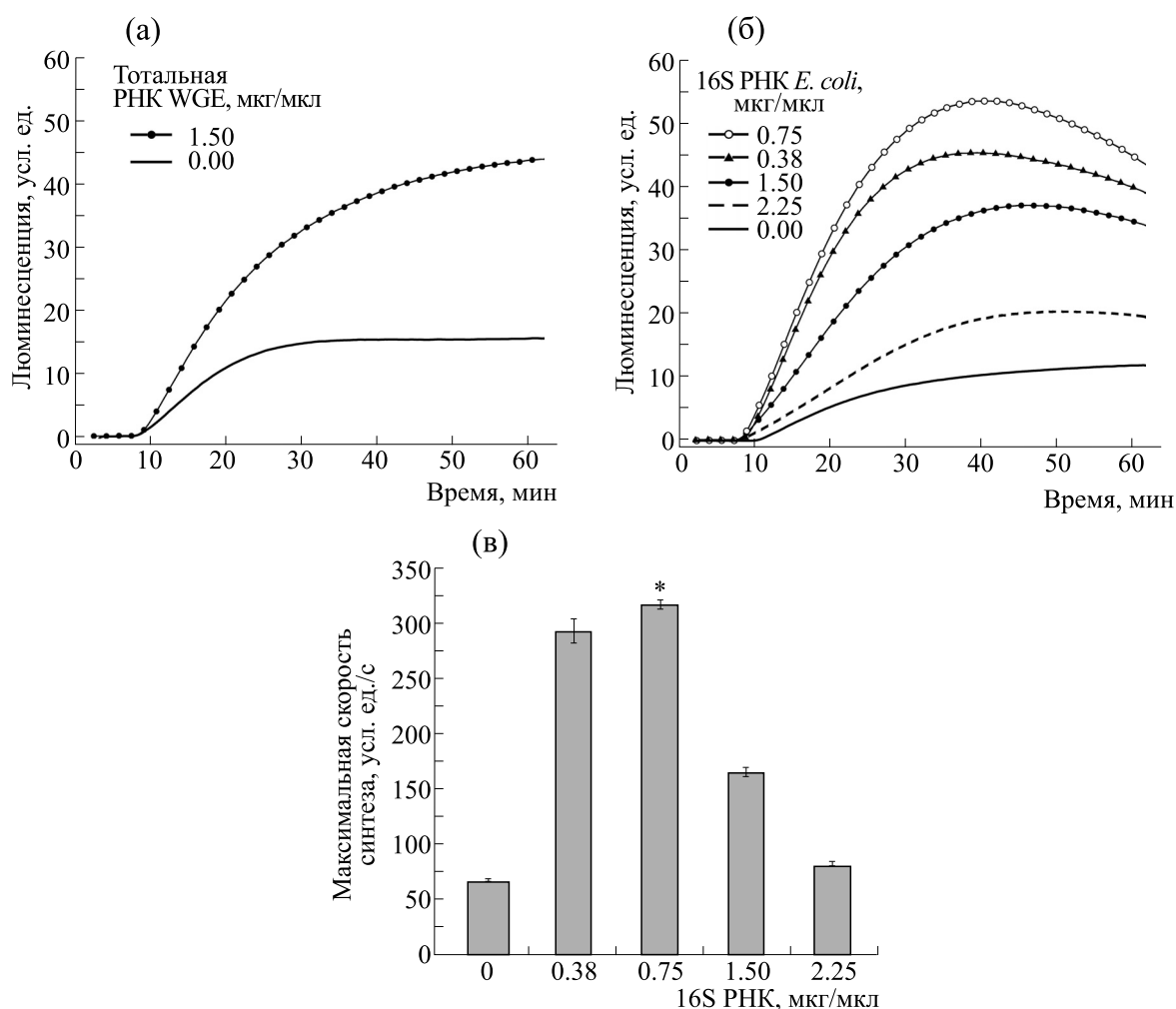


Рис. 1. Присутствие тотальной РНК из WGE и 16S РНК *E. coli* стимулирует синтез люциферазы в бесклеточной системе трансляции на основе экстракта зародышей пшеницы: (а) – эффект внесения тотальной РНК из WGE; (б) – кинетические кривые накопления активной люциферазы при добавлении разных концентраций 16S РНК *E. coli*; (в) – максимальная скорость синтеза люциферазы в присутствии разных концентраций 16S РНК. Звездочкой отмечен максимальный эффект стимуляции, данные представлены в виде $Mean \pm SD$. Трансляция мРНК люциферазы в концентрации 0.70 мкг/мкл с омега-лидером 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV}.

этом максимальная скорость синтеза люциферазы увеличивалась в 4.8 раз (рис. 1в). Дальнейшее увеличение концентрации 16S РНК приводило к снижению стимулирующего эффекта, и внесение 16S РНК в концентрации 2.25 мкг/мкл стимулировало скорость синтеза белка лишь на 20% (рис. 1в).

Для того чтобы определить, обладают ли другие РНК способностью стимулировать синтез люциферазы, были проверены 23S рРНК и тРНК *E. coli*, так как РНК этих классов содержатся в тотальной РНК WGE. Кроме того, в качестве образца еще одного класса РНК (геномной) была взята РНК бактериофага MS2. Для проверки возможности ДНК стимулировать трансляцию синтез люциферазы провели также в присутствии ДНК тимуса теленка. Эти эксперименты показали, что

добавление 23S рРНК оказало стимулирующее влияние на трансляцию репортерной мРНК, сопоставимое с 16S РНК (рис. 2а,в). Внесение РНК фага MS2 тоже стимулировало трансляцию репортерной мРНК, однако эффект был значительно менее выражен (рис. 2б,в). Так, внесение РНК фага MS2 в максимальной стимулирующей концентрации 0.75 мкг/мкл вызывало увеличение скорости синтеза люциферазы на 70%. В то же время внесение 23S РНК, так же как и 16S РНК, увеличивало максимальную скорость синтеза более чем в четыре раза. Добавление тРНК и ДНК в указанных концентрациях в реакционную смесь не стимулировало трансляцию, а приводило к увеличению времени лаг-периода и уменьшению максимальной скорости синтеза люциферазы (данные не представлены).

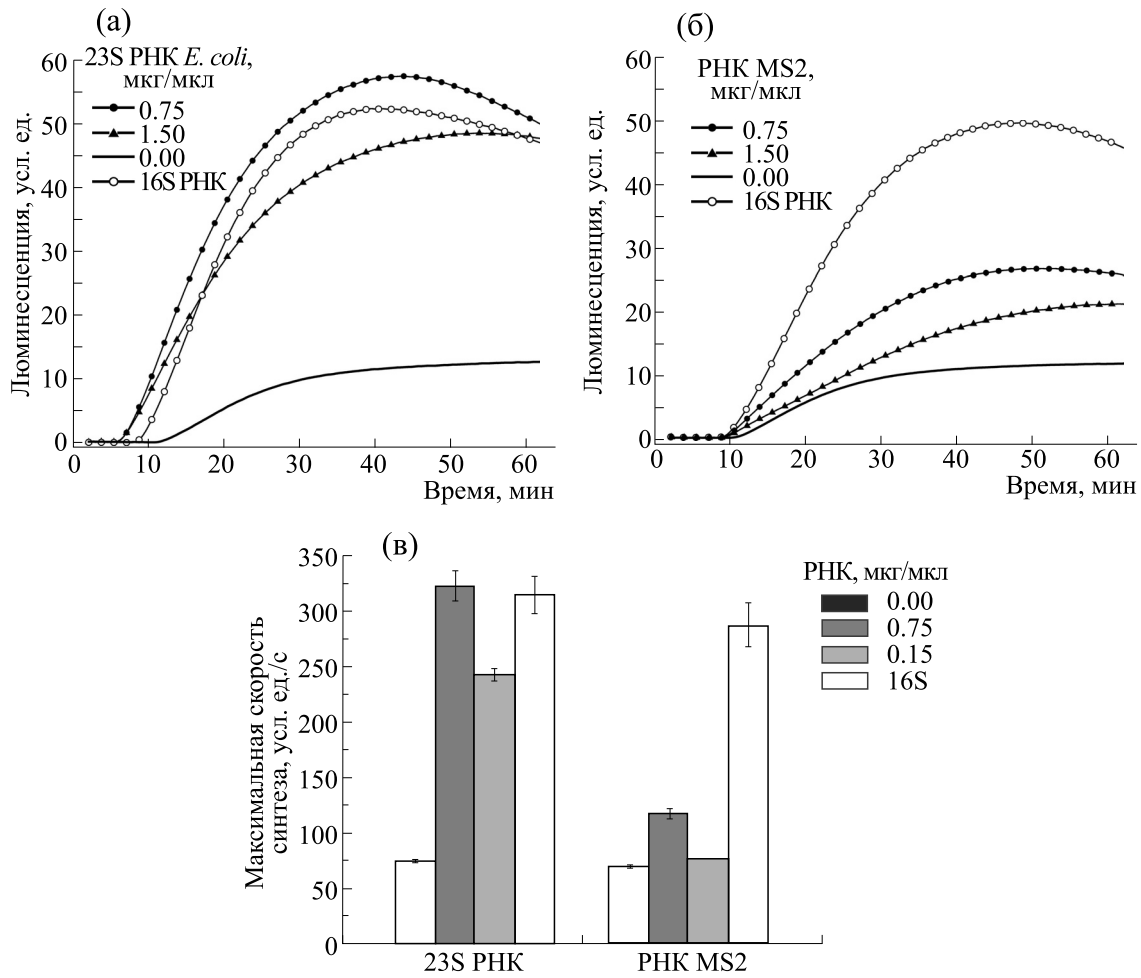


Рис. 2. 23S РНК и РНК фага MS2 также стимулируют трансляцию. Трансляция мРНК люциферазы в концентрации 0.70 мкг/мл с 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV} при добавлении: (а) – 23S рРНК *E. coli*; (б) – РНК фага MS2; (в) – максимальная скорость синтеза люциферазы в отсутствие (черные столбики) и в присутствии разных концентраций 23S РНК и РНК фага MS2 (указаны в легенде), концентрация 16S РНК – 0.75 мкг/мл.

Трансляция мРНК люциферазы с разными способами инициации. Напомним, что в экспериментах, описанных выше, эффект стимуляции был обнаружен при трансляции небольших количеств некэпированной мРНК. На следующем этапе работы необходимо было установить, как внесение 16S РНК будет влиять на трансляцию мРНК с разными типами 5'-НТО и, следовательно, отличающихся по способу инициации (см. табл. 1). Для этого, кроме мРНК люциферазы с омега-лидером, в системе WGE транслировали мРНК с классическим кэпированным лидером мРНК глобина, а также с 5'-НТО IRES (табл. 1). Эти мРНК транслировали в WGE в трех концентрациях («низкой», «средней» и «высокой») и добавляли 16S РНК до конечной концентрации 0.38–2.25 мкг/мл в реакционной смеси.

Эксперименты показали, что стимуляция трансляции мРНК люциферазы в экстракте WGE происходила вне зависимости от природы ее 5'-НТО (или способа инициации) (рис. 3). Однако величина эффекта зависела от 5'-НТО и концентрации репортерных мРНК. В случае трансляции «низкой» концентрации (0.35 мкг/мл) мРНК люциферазы с омега-лидером добавление 16S РНК вызывало такой же эффект стимуляции, как описано выше (рис. 3б,в), с увеличением максимальной скорости синтеза люциферазы в 8.6 раз. Иной эффект вызывало добавление 16S РНК на трансляцию «средней» и «высокой» концентрации – 1.04 и 1.74 мкг/мл мРНК соответственно. Во-первых, стимулирующий эффект 16S РНК был заметно слабее. Так, максимальная скорость синтеза белка при внесении 0.38 мкг/мл 16S РНК превышала всего лишь в 2.6 и 1.2 раза

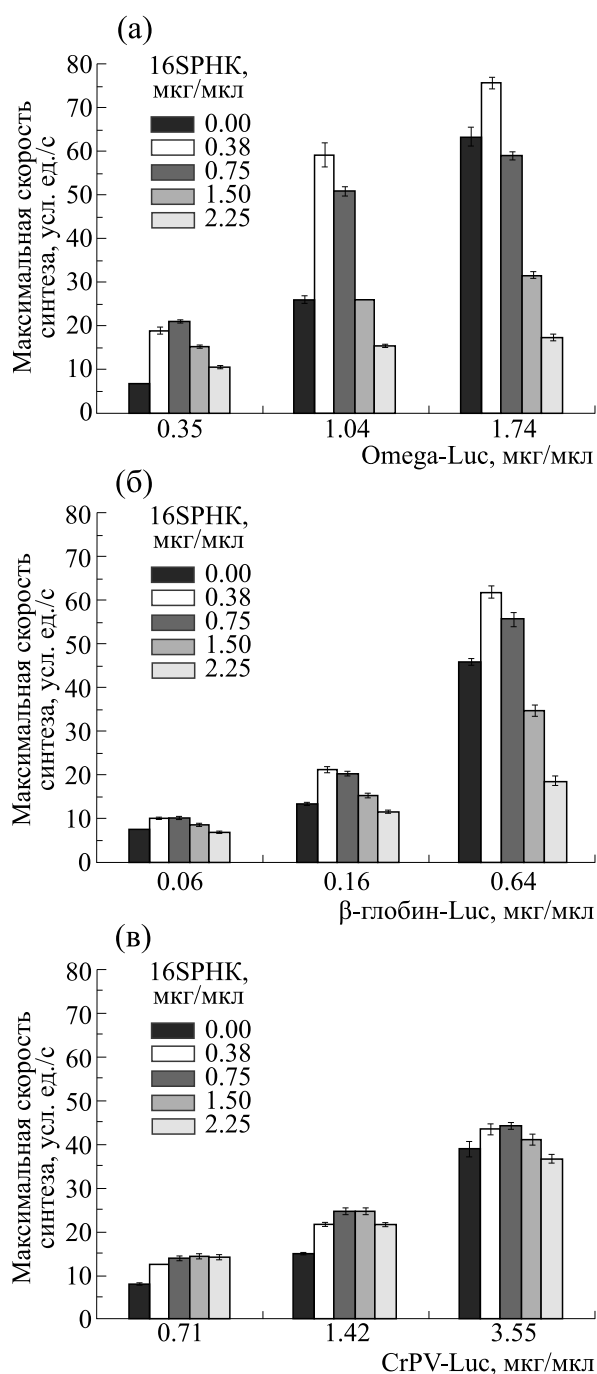


Рис. 3. Трансляция мРНК люциферазы с различными 5'НТО при внесении разных концентраций 16S РНК *E. coli*. Максимальная скорость синтеза люциферазы: (а) – мРНК с омега-лидером 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV}; (б) – мРНК с глобиновым лидером 5'UTR_{βGlobin}-Luc-3'UTR_{GAPDH-A50}; (в) – мРНК с CrPV IRES 5'UTR_{CrPV}-Luc-3'UTR_{A50}. Данные представлены в виде *Mean* ± *SD*.

«контрольную» (рис. 3а). Во-вторых, увеличение 16S РНК в системе WGE до 1.50 мкг/мкл или практически не влияло, или сильно замедляло

максимальную скорость синтеза белка, а дальнейшее увеличение концентрации 16S РНК замедляло скорость синтеза люциферазы в 2–5 раз (рис. 3а). Кроме того, в WGE, транслирующей 1.74 мкг/мкл репортерной мРНК, максимальная скорость синтеза начинала уменьшаться уже при внесении 0.75 мкг/мкл 16S РНК.

Иным было влияние добавления 16S РНК на трансляцию мРНК с экпированным лидером мРНК глобина (рис. 3б). Проявление ингибирующего влияния 2.25 мкг/мкл 16S РНК начиналось уже с малых концентраций (0.06 мкг/мкл) мРНК. Стимулирующий эффект на трансляцию мРНК с глобиновым лидером был менее выраженным по сравнению с мРНК с омега-лидером. Так, максимальная скорость реакции увеличивалась в лучшем случае в 1.9 раза (см. 0.06 и 0.16 мкг/мкл мРНК и 0.38 мкг/мкл 16S РНК, рис. 3б).

В отличие от предыдущих мРНК, трансляция всех концентраций мРНК с 5'-НТО IRES стимулировалась всеми концентрациями 16S РНК (рис. 3в). Лишь внесение 2.25 мкг/мкл замедляло скорость синтеза люциферазы на 10% при максимальном количестве мРНК 3.55 мкг/мкл (рис. 3в). Максимальное увеличение скорости синтеза белка (в 3.3 раза) наблюдали также при трансляции «низкой» концентрации 0.71 мкг/мкл мРНК при добавлении 1.5 мкг/мкл 16S РНК в систему WGE.

Таким образом, мы выявили, что добавление 16S РНК влияет по-разному на трансляцию репортерной мРНК в зависимости от 5'-НТО и ее концентрации в системе WGE. Однако эффект стимуляции синтеза люциферазы не является специфическим свойством мРНК с омега-лидером, а проявляется вне зависимости от природы 5'-НТО мРНК. Максимальный стимулирующий эффект наблюдали при внесении 16S РНК в систему WGE при трансляции небольших количеств репортерных мРНК. Наибольший эффект стимуляции внесение 16S РНК оказывало на трансляцию некэпированной мРНК с омега-лидером.

Изменение хода кинетической кривой трансляции при внесении 16S РНК на разных этапах работы системы. Для определения зависимости эффекта стимуляции трансляции мРНК люциферазы от момента внесения 16S рРНК в систему WGE, мы добавляли 0.75 мкг/мкл 16S РНК на разных этапах работы системы: перед лаг-периодом, на линейном участке кинетической кривой, а также на этапе начала выхода кинетической кривой на плато (рис. 4). Лаг-период соответству-

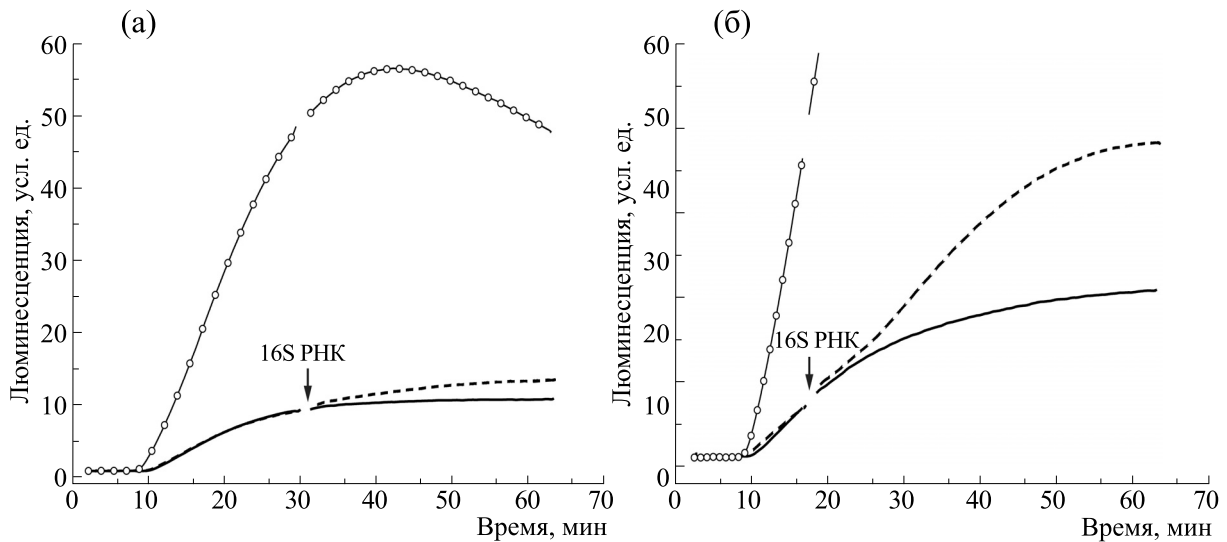


Рис. 4. Изменение хода кинетической кривой трансляции при внесении 16S РНК. Трансляция 0.70 мкг/мкл мРНК люциферазы 5'UTR_{Omega}-Luc-3'UTR_{TMV} и внесение 0.75 мкг/мкл 16S РНК *E. coli* в момент начала выхода кинетической кривой на плато (а) и на линейном участке кинетической кривой (стрелка) (б). Кривая с кружками – 16S РНК добавлена в начале реакции, пунктирная кривая – 16S РНК добавлена на определенном этапе реакции, сплошная кривая – контроль, добавлена деионизированная вода.

ет так называемому времени пробега (transit time), в течение которого происходит инициация трансляции и синтез полноразмерной люциферазы, линейный участок кинетической кривой соответствует максимальной синтетической активности трансляционного аппарата, а начало выхода кинетической кривой на плато соответствует замедлению процессов синтеза люциферазы при условии избытка субстратов реакции и отсутствии процессов дегградации/агрегации фермента.

Анализ изменения хода кинетических кривых синтеза позволил выявить, что добавление 16S рРНК на всех этапах работы системы WGE вызывало стимуляцию трансляции (рис. 4, пунктирные кривые). Однако максимальный эффект наблюдали при добавлении 16S РНК в момент начала реакции (рис. 4а,б, кривые со светлыми кружками). Добавление 16S рРНК в реакцию при начинающемся выходе кинетической кривой на плато проявлялось лишь в незначительном увеличении люминесценции (рис. 4а). Внесение 16S РНК на линейном участке кинетической кривой влияло на ход синтеза люциферазы иначе (рис. 4б, пунктирная кривая). Оказалось, что сначала реакция в течение 6–7 мин продолжала идти в линейном режиме с такой же с максимальной скоростью (46 усл. ед./с), как до внесения 16S рРНК. После этого происходил скачок люминесценции и реакция снова продолжала идти в линейном режиме в течение 13 мин с большей максимальной скоростью (59 усл. ед.). В то же время кинетиче-

ская кривая контрольной реакции после продолжала свой ход как обычно, со скоростью 46–48 усл. ед./с, после чего происходило замедление и выход на плато. Временной интервал между добавлением 16S РНК и скачком люминесценции приблизительно соответствует времени пробега, что позволило сделать вывод о стимуляции трансляции на стадии инициации, тем самым исключив влияние на процесс элонгации.

Влияние 16S РНК на синтез люциферазы в других бесклеточных системах трансляции. Для ответа на вопрос, универсально ли обнаруженное влияние 16S РНК на синтез люциферазы во всех бесклеточных системах трансляции или же является специфическим свойством системы WGE, была проведена трансляция соответствующих репортерных мРНК в системах, полученных из клеток бактерий (*E. coli*) и млекопитающих (ретикулоцитов кролика). Оказалось что внесение 16S РНК в диапазоне 0.38–2.25 мкг/мкл в обе эти бесклеточные системы подавляло трансляцию репортерных мРНК пропорционально внесенному количеству (данные не представлены). Эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК оказался специфичным именно для бесклеточной системы WGE.

Таким образом, метод мониторинга люминесценции синтеза люциферазы в режиме реального времени позволил обнаружить эффект существенной стимуляции трансляции репортерной мРНК в бесклеточной эукариотической системе WGE при добавлении 16S РНК *E. coli*. Определен класс нетранслируемой РНК (тРНК), не оказы-

вающий стимулирующего эффекта. В данной работе удалось определить ряд факторов, влияющих на эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК в системе WGE: количество добавляемой 16S РНК, концентрация и тип 5'-НТО репортерной мРНК, а также момент внесения 16S рРНК в работающую систему WGE. Максимальный стимулирующий эффект оказывало добавление 16S РНК при трансляции малых концентраций репортерных мРНК вне зависимости от природы 5'-НТО. Резкий подъем люминесценции, наблюдаемый через промежуток времени, соответствующий времени пробега, позволяет утверждать о влиянии добавленной 16S РНК на стадию инициации трансляции. Интересно, что среди протестированных нами бесклеточных систем трансляции, эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК наблюдался только в системе WGE.

В системе из зародышей пшеницы эффекты ускорения синтеза белка были показаны и ранее [9, 14]. Однако в работе [9] авторами подробно был изучен эффект «разгона белкового синтеза», происходящий только при высоких концентрациях некэпированной мРНК, транслирующейся в системе. В работе [14] было описано явление взаимной стимуляции трансляции «в одной пробирке» двух разных транслируемых матриц. В отличие от этой работы, в рамках нашего исследования показано, что рибосомная РНК, которая считается нетранслируемой, значительно стимулирует трансляцию мРНК с 5'-НТО различной природы. Иными словами, обнаружено явное влияние нетранслируемой РНК на трансляцию репортерной мРНК. Ранее небольшой эффект добавления нетранслируемой РНК (некэпированная РНК с глобиновым лидером) был показан в работе [15].

Обнаруженные факты позволяют предполагать, что в основе возможного механизма эффекта стимуляции синтеза люциферазы при добавлении 16S РНК может лежать следующее. Предположительно, в экстракте зародышей пшеницы содержатся неспецифические РНК-связывающие белки, ингибирующие трансляцию. Находясь в системе, 16S РНК как бы «вытитровывает» эти белки и тем самым снимает ингибирование и стимулирует трансляцию [14]. Для выяснения молекулярного механизма эффекта стимуляции трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе WGE в присутствии 16S РНК необходимы дальнейшие исследования. Понимание этого механизма позволит оптимизировать бесклеточную систему WGE для применения в методах с использованием репортерных мРНК, а также решения различных научно-прикладных задач.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят зав. лабораторией механизмов биосинтеза белка Института белка РАН В.А. Колба за поддержку, постоянный интерес к работе и обсуждение результатов, а также сотрудников лаборатории: К.С. Василенко — за предоставление плазмиды рTZ10OmegaLuc, А.А. Коммера и И.Г. Дашкову — за предоставление 30S и 50S субчастиц рибосом *E. coli*, экстракта S-100 *E. coli* и мРНК люциферазы 5'UTR_{SD}-Luc-3'UTR_{N64}.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная работа не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. E. Gregorio, M. Z. Levine, and J. P. Oza, *Methods Protoc.*, **2** (1), 24 (2019).
2. Y. Endo, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, **97** (5), 261 (2021).
3. M. L. Fogeron, L. Lecoq, L. Cole, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 639587 (2021).
4. V. A. Kolb, E. V. Makeyev, and A. S. Spirin, *EMBO J.*, **13** (15), 3631 (1994).
5. J. W. Hastings, and C. H. Johnson, in *Methods in Enzymology*, Ed. by G. Marriott and I. Parker (Acad. Press, 2003), V. **360**, pp. 75–104.
6. S. M. Marques and J. C. Esteves da Silva, *IUBMB Life*, **61** (1), 6 (2009).
7. K. V. Wood, *Promega Notes*, **28** (1990).
8. K. V. Wood, Y. A. Lam, and W. D. McElroy, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4** (1), 289 (1989).
9. O. M. Alekhina, K. S. Vassilenko, and A. S. Spirin, *Nucleic Acids Res.* **35** (19), 6547 (2007).
10. D. N. Lyabin, I. A. Eliseeva, L. P. Ovchinnikov, *PLoS One*, **7** (12), e52527 (2012).
11. I. V. Prokhorova, K. A. Akulich, D. S. Makeeva, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 27720 (2016).
12. V. A. Shirokov, A. Kommer, V. A. Kolb, et al., in *Methods Mol. Biol.*, Ed. by G. Grandi (Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007), V. **375**, pp. 19–55.
13. L.M. Gold and M. Schweiger, in *Methods in Enzymology*, Ed. by K. Moldave and L. Grossman (Acad. Press, 1971) **20**, pp. 537–542.
14. Е. А. Согорин и С. Ч. Агаларов, *Молекулярная биология*, **52** (1), 19 (2018).
15. Е. А. Согорин, С. С. Агаларов, and А. С. Spirin, *Sci. Rep.*, **6**, 24518 (2016).

16S rRNA Significantly Stimulates Translation of a Reporter mRNA in a Eucaryotic Cell-Free System

N.V. Zyrina*, ** and S.Ch. Agalarov*

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

** *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Puschino, Moscow Region, 142290 Russia*

Real-time monitoring of bioluminescence in a cell-free system originated from wheat germ extracts (WGE) revealed significant stimulation of reporter mRNA translation after addition of 16S rRNA *Escherichia coli*. The effect observed was specific to WGE cell-free system and did not depend on the 5'-UTR of the reporter mRNA. A class of untranslated RNA (tRNA) that does not have a stimulating effect has been identified. The magnitude of an effect of translation stimulation of reporter mRNAs in the WGE system depended on the concentration and the type of 5'-UTR of a reporter mRNA and on a particular moment in time when 16S RNA was added to the system during translation. Further research of translation stimulation is required to optimize the use of the WGE cell-free system for reporter gene technology and find solutions to different applied research challenges.

Keywords: bioluminescence, translation, WGE cell-free system

УДК 577.322

СТРУКТУРА И АФФИННОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕЖДУ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ БЕЛКА Swi4 И ДНК

© 2022 г. Д.А. Афонин^{*,*}, О.В. Гераськина^{*}, Т.В. Лосева^{*}, М.П. Кирпичников^{*}, В.М. Студитский^{*,**}, А.В. Феофанов^{*}

^{*}Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

^{**}Центр исследований рака Фокс Чейз, просп. Коттмана, 333, Филадельфия, Пенсильвания, 19111, США

[#]E-mail: afoninmsu@outlook.com

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Получен рекомбинантный ДНК-связывающий домен белка Swi4, входящего в состав транскрипционного фактора SBF почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. По данным спектроскопии кругового дихроизма в структуре этого домена содержится 29% α -спиралей, 22% β -складчатых листов, 21% β -поворотов и 28% неупорядоченной структуры. Исследовано взаимодействие домена с ДНК, содержащей сайт связывания SBF SCB (Swi4 Cell-cycle Box). Образование комплексов сопровождается конформационной перестройкой в белке, которая затрагивает не менее десяти пептидных связей и приводит к 6%-му увеличению содержания α -спиралей с сопутствующим снижением содержания β -складчатых листов. По данным спектроскопии флуоресценции конформационные перестройки и межмолекулярные взаимодействия не затрагивают области локализации остатков Trp68 и Trp112, находящихся вблизи границ ДНК-связывающего мотива «спираль–поворот–спираль». Установлено, что константа диссоциации комплекса ДНК-связывающего домена белка Swi4 с ДНК составляет 20 ± 3 нМ.

Ключевые слова: SBF, Swi4, SCB, константа диссоциации, круговой дихроизм, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0006302922050039, EDN: JIDJWB

SBF – транскрипционный фактор, который вместе с паралогом MBF контролирует разные ветви транскрипционного ответа при G1-S-переходе клеточного цикла у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. SBF и MBF гетеродимерны, они содержат общую субъединицу Swi6 и различаются ДНК-связывающими субъединицами – Swi4 и Mbp1, которые связывают промоторы, содержащие специфичные для них сайты – SCB (Swi4 Cell-cycle Box) и MCB (*MluI* Cell-cycle Box) соответственно. SBF ответственен за экспрессию генов, управляющих морфогенезом и почкованием, в то время как MBF контролирует гены репликации и репарации при переходе в S-фазу клеточного цикла [1]. Помимо этого, SBF являет-

ся компонентом сети активации транскрипции у нескольких сложно регулируемых промоторов, в частности промотора гена эндонуклеазы *HO*, контролирующего переключение типа спаривания [2].

Несмотря на то, что SBF является объектом интенсивных *in vivo* исследований [3–5], молекулярные механизмы, определяющие преимущественное связывание SBF с сайтом SCB, изучены недостаточно [6]. Опыты по ограниченному протеолизу N-концевого фрагмента Swi4 в комплексе со специфичной ДНК позволили определить границы его ДНК-связывающего домена. Было установлено, что минимальный ДНК-связывающий домен Swi4 включает около 140 аминокислотных остатков и локализован в области с остатка 32 по остаток 172 [7].

Структура комплекса Swi4 с ДНК неизвестна. Анализ кристаллической структуры комплекса ДНК-связывающего домена белка PCG2 (ортологичного ДНК-связывающему домену Mbp1) из фитопатогенных грибов *Magnaporthe oryzae* с ДНК показал, что PCG2 использует для распо-

Сокращения: dSwi4 – ДНК-связывающий домен Swi4 с заменой C50A, слитый на N-конце с полипептидом GSSHH-NHHSSGENLYFQSHM; TCEP – трис(2-карбоксивинил)фосфин; SCB_R – олигонуклеотид gTTTTcTggCACCC; SCB_F – олигонуклеотид [Cy5]ggTACCACg-AAAAC; SCB-ДНК – двуцепочечный 14 п.н. олигонуклеотид, образованный SCB_R и SCB_F, КД – круговой дихроизм.

знавания сайта связывания ДНК спирали α A и α B структурного мотива «спираль—поворот—спираль», а также дополнительные неканонические структуры полипептидной цепи [8]. Несмотря на присутствие аналогичного мотива «спираль—поворот—спираль» у Swi4, использование структуры dPCG2-ДНК для анализа взаимодействий Swi4 с SCB затруднено из-за палиндромности сайта связывания MCB (5'-ACGCGT-3'), которая приводит к образованию двух типов комплекса PCG2-ДНК. Остается неясным, какой тип комплекса следует ожидать в случае взаимодействия Swi4 с ассиметричным сайтом SCB (5'-CACGAAA-3). Ключевые аминокислоты PCG2 (Q82 и Q89), ответственные за распознавание сайта MCB, присутствуют также и у Swi4, что ставит вопрос о механизме специфичного взаимодействия Swi4 с SCB.

Для исследования взаимодействия Swi4 с ДНК, была разработана методика получения рекомбинантного ДНК-связывающего домена Swi4 (dSwi4). Изучено взаимодействие dSwi4 с фрагментом ДНК, содержащим SCB (SCB-ДНК) и определена константа диссоциации комплексов. Методом спектроскопии кругового дихроизма проведен сравнительный анализ структуры dSwi4 в свободном и связанном состоянии. С помощью спектроскопии флуоресценции изучено микроокружение Trp68 и Trp112, фланкирующих ДНК-связывающий мотив «спираль—поворот—спираль», в свободном и связанном dSwi4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия ДНК-связывающего домена Swi4. Фрагмент гена Swi4 *S. cerevisiae*, кодирующий ДНК-связывающий домен (32–173) [7], амплифицировали с помощью прямого (gCAAACATATgTCAAACCATCCAgTgATTgAAATAgCTACg) и обратного (gCAAACCTCgAgTTATgTTTATTgTAGCTCgATggAgAAgTTATCTTCg) праймеров, в которых подчеркнуты вносимые сайты рестрикции. Полученный ампликон клонировали в вектор для бактериальной экспрессии pET-15b (Novagen, Merck KGaA, Германия) обработкой эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI с последующим лигированием. Вектор был предварительно модифицирован вставкой дополнительного мини-цистрона для улучшения экспрессии [9]. Полученный конструктор (*pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]*) был проверен секвенированием по Сэнгеру в ЦКП «Геном» (Россия).

Поскольку ДНК-связывающий домен Swi4 склонен к димеризации в растворе из-за образования межмолекулярной дисульфидной связи (данные не показаны), было решено заменить Cys50 (здесь и далее используется нумерация аминокислотных остатков в полноразмерном белке) на аланин.

Для сайт-направленного мутагенеза Cys50 на аланин использовали измененный прямой праймер (gCAAACATATgTCAAACCATCCAgTgATTgAAATAgCTACgTATTCAgAAACCCgATgTATACgAAG-CgTATATACgTggg). Ампликон, содержащий мутацию, клонировали в вектор pET-15b, а полученную плазмиду проверили секвенированием в ЦКП «Геном» (*pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]:C19A*). Данная плазмиды кодировала ДНК-связывающий домен Swi4 с мутацией C50A, у которого на N-конце находилась полигистидиновая метка (6×His), слитая с белком с помощью линкера (здесь и далее dSwi4, рис. 1).

Плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* экспрессионного штамма Rosetta 2(DE3) (Novagen). Трансформированные клетки выращивали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина и 24 мкг/мл хлорамфеникола, в течение 4 ч при 37°C до оптической плотности (на длине волны 600 нм) 0.6–0.8 опт. ед./см. После добавки изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозида (1 мМ) клетки инкубировали 4 ч при 37°C, осаждали при 3200 g (30 мин), промывали 50 мл фосфатно-солевого буфера и осаждали 15 мин при 8000 g. Осадок замораживали и хранили при –80°C.

Выделение белка. Клетки разрушали ультразвуковой обработкой (Sonic Dismembrator FB120, Fisher Scientific, США) в буфере А (20 мМ фосфатно-солевого буфера, pH 7.0, 500 мМ NaCl, 0.3% Triton X-100, 1 мМ трис(2-карбокситил)фосфина (ТСЕР)) с добавкой 25 мМ имидазола, 2 мМ фенолметансульфонилфторида и 1 таблетки коктейля ингибиторов протеаз (Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Швейцария).

Лизат клеток центрифугировали при 18500 g (4°C) в течение 40 мин. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили со скоростью 2 мл/мин на хроматографический картридж HiTrap Chelating HP (5 мл), предварительно уравновешенный буфером А с 25 мМ имидазола. Картридж промывали 50 мл буфера А с 25 мМ имидазола и затем 50 мл буфера А с 80 мМ имидазола. Белок элюировали 10 мл буфера А с 400 мМ имидазола, разводили в 10 раз буфером Б (50 мМ буфера Бизин, pH 9.0, 1 мМ ТСЕР), наносили со скоростью 1 мл/мин на картридж HiTrap SP HP (1 мл), который затем промывали 10 мл буфера Б. Белок элюировали с картриджа буфером Б, повышая концентрацию NaCl до 800 мМ с помощью хроматографа АКТА Purifier (GE, США). Фракции, содержавшие dSwi4 по данным электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, объединяли, диализовали 14 ч при 4°C против буфера В (50 мМ HEPES, pH 7.8, 200 мМ KCl, 1 мМ ТСЕР) с помощью диализной мембра-

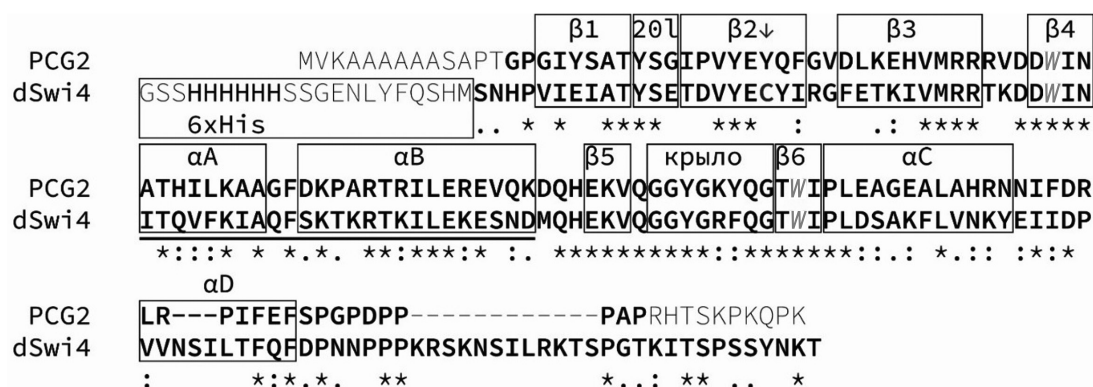


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ДНК-связывающих доменов Swi4 и его гомолога PCG2 (82–219) из *Magnaporthe oryzae*, для которого установлена структура в комплексе с ДНК [8]. Кодированный экспрессионным вектором линкер, содержащий полигистидиновую метку (6xHis), выделен в начальной части последовательности dSwi4 рамкой. Жирным шрифтом выделены последовательность ДНК-связывающего домена Swi4 (32–172) [7] и фрагмент PCG2 (95–209), структура которого установлена с высоким разрешением [8]. На основе разрешенной структуры комплекса PCG2 с ДНК (PDB:4UX5) рамками отмечены элементы вторичной структуры, а также «крыло» и петля (20), участвующие в связывании PCG2 с ДНК. Подчеркнут ДНК-связывающий мотив «спираль–поворот–спираль». Подвергнутый мутагенезу Cys50 dSwi4 обозначен стрелкой. Триптофаны Trp68 и Trp112 Swi4, а также гомологичные им Trp129 и Trp173 PCG2 выделены серым цветом и курсивом. Символами “*”, “:” и “.” отмечены соответственно совпадающие, слабо и сильно отличающиеся аминокислотные остатки в сравниваемых белках.

ны Spectra/Por (CE), отсекающей белки >10 кДа. При анализе методом электрофореза в полиакриламидном геле в качестве маркеров использовали реагенты PageRuler Prestained Protein Ladder 10–180 kDa и PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, США), смешанные с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Gold (Invitrogen, США).

Ретентант концентрировали до объема ~500 мкл с помощью центрифужного концентратора Amicon Ultra-4 (10 кДа, Merck, Германия), затем центрифугировали при 16100 g (4°C) 30 мин и полученный супернатант очищали методом гель-фильтрации с помощью хроматографа AKTA Purifier и колонки Superdex 75 10/300 GL (Cytiva, Швеция) при скорости потока 500 мкл/мин.

Фракции, содержавшие чистый dSwi4 по данным денатурирующего белкового электрофореза, объединяли. Концентрацию белка (расчетная молекулярная масса – 18825.2 Да) измеряли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{280\text{ нм}} = 21400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Чистоту dSwi4 и отсутствие геномной ДНК *E. coli* дополнительно подтверждали спектрофотометрически по соотношению поглощений на длинах волн 260 и 280 нм, которое составляло < 0.6.

Получение комплексов dSwi4 с ДНК. Для получения комплексов dSwi4 с ДНК использовали короткие (14 п.н.) олигонуклеотиды, синтезированные компанией Lumiprobe (Москва, Россия): SC-

B_R (gTTTTCgTggCACC) и SCB_F ([Cy5]ggTAC-CACgAAAAC), меченый по 5'-концу флуоресцентной меткой Cy5.

В опытах по подбору условий формирования двухцепочечной ДНК (SCB-ДНК) SCB_F и SCB_R смешивали в концентрации 10 мкМ в дистиллированной воде категории Milli-Q и либо инкубировали 1 ч при 4°C, либо подвергали двухминутному плавлению при 80°C и инкубировали 1 ч при 30, 37 или 42°C. Образцы подвергали электрофорезу и анализу, как описано ниже. В качестве маркера длин ДНК использовали реагент GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, США), смешанный с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Gold (Invitrogen, США).

Для измерения спектров кругового дихроизма (КД) смешивали по 21 мкМ олигонуклеотидов SCB_F и SCB_R и 20 мкМ dSwi4 в буфере, содержащем 12.5 мМ HEPES (pH 8.0), 50 мМ KCl, 250 мкМ TCEP, и инкубировали 1 ч при 4°C. Для измерения спектров флуоресценции смешивали по 200 нМ SCB_F и SCB_R с 190 нМ dSwi4 и инкубировали 1 ч при 4°C.

Для измерения константы диссоциации K_d комплекса dSwi4 с SCB-ДНК смешивали 5 нМ SCB_F и 6 нМ SCB_R без dSwi4 или с возрастающими концентрациями dSwi4 (10–80 нМ) в буфере, содержащем 20 мМ PIPES, 30 мМ KOH (pH 7.3), 120 мМ KCl, 100 мкМ TCEP, 100 мкг/мл

бычьего сывороточного альбумина, 10% (масса/объем) сахарозы. Полученные смеси инкубировали 1 ч при 4°C. Аналогично готовили образцы dSwi4 (10–80 нМ) в смеси с 5 нМ SCB_F.

Анализ комплексообразования методом электрофореза. Смеси SCB_F, SCB_R и dSwi4 или dSwi4 и SCB_F, приготовленные как описано выше, подвергали нативному электрофорезу в полиакриламидном геле, содержащем 10 мМ HEPES-Na, pH 7.8, 0.2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 18% (масса/объем) полиакриламида (19 частей акриламида на 1 часть бис-акриламида) и 20% (объем/объем) глицерина. Электрофорез проводили при постоянном токе 5 мА в течение 3 ч. Электрофореграммы сканировали с помощью флуоресцентного сканера Amersham Typhoon RGB (Cytiva, Швеция) с возбуждением 632 нм и регистрацией флуоресценции в области 670 нм (пространственное разрешение – 25 мкм). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного пакета ImageQuant TL 1D версия 8.1 (Cytiva, Швеция), оценивая яркость полос, соответствующих SCB-ДНК, свободным олигонуклеотидам SCB_F и комплексам dSwi4 с SCB-ДНК.

По измеренным яркостям полос рассчитывали возрастание количества комплекса dSwi4 с SCB-ДНК, а также изменение количества свободных SCB-ДНК и SCB_F при образовании комплексов.

Для анализа образования комплекса строили зависимость яркости полосы комплекса $I_1(C)$ от концентрации dSwi4 (C) и описывали эти зависимости в приближении одного центра связывания формулой:

$$I_1(C) = B_{m1}C/(K_d + C), \quad (1)$$

где C – концентрация dSwi4, B_{m1} – максимальное значение, к которому стремится величина $I_1(C)$, K_d – константа диссоциации комплекса.

Для анализа образования комплекса по уменьшению яркости полосы SCB-ДНК рассчитывали параметр $I_0 - I_2(C)$, где I_0 – яркость контрольной полосы SCB_ДНК в отсутствии dSwi4, $I_2(C)$ – яркость анализируемой полосы при определенной концентрации dSwi4. Строили зависимости параметра $I_0 - I_2(C)$ от концентрации dSwi4 и описывали эти зависимости в приближении одного центра связывания формулой:

$$I_0 - I_2(C) = B_{m2}C/(K_d + C), \quad (2)$$

где B_{m2} – максимальное значение, к которому стремится величина $I_0 - I_2(C)$.

Величины K_d определяли в двух независимых экспериментах и усредняли.

Спектроскопия КД. Спектры КД измеряли с помощью спектрополяриметра Jasco-810 (Jasco, Япония): оптическая ширина щели монохроматора – 1 нм, диапазон сканирования – 190–250 нм, шаг сканирования – 0.2 нм, скорость сканирования – 20 нм/мин. Спектры усредняли по четырем повторным сканам. Для измерений использовали разборную кварцевую кювету с толщиной оптического слоя 0.1 мм (Hellma, Германия).

Из спектров КД раствора dSwi4 или его комплексов с SCB-ДНК вычитали базовую линию, измеренную соответственно от буфера или от раствора SCB-ДНК (21 мкМ). Спектры, полученные в двух независимых экспериментах, усредняли и анализировали с помощью пакета программ CDPPro, используя референсный набор белков SP43 [10].

Спектроскопия флуоресценции. Спектры флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США) в кварцевой ультра-микрокювете 2 × 10 мм (Hellma, Германия). Флуоресценцию возбуждали на длине волны 280 нм и детектировали в диапазоне 295–450 нм. Из спектров вычитали базовую линию, измеренную от буфера или от раствора олигонуклеотидов (200 нМ) в буфере (в случае комплексов Swi4 с SCB-ДНК). Спектры, полученные в двух независимых экспериментах, усредняли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного dSwi4. С использованием созданной нами плазмиды *pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]:C19A* была изучена эффективность экспрессии белка dSwi4 в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta 2(DE3) (Novagen). Значительную экспрессию dSwi4 наблюдали в штамме Rosetta 2(DE3), что определило выбор этого штамма для дальнейшей работы (рис. 2а). Повышенный уровень экспрессии dSwi4 был достигнут при выращивании клеток после индукции при 37°C. Методика выделения dSwi4 включала в себя стадии металл-аффинной и катион-обменной хроматографии, а также гель-фильтрацию (рис. 2б). Чистота полученного dSwi4 по данным хроматографического анализа превышает 99% (данные не представлены), а его выход составил 5 мг с 1 л культуры *E. coli*.

Подбор условий формирования SCB-ДНК и ее комплексов с dSwi4. Для оптимизации условий формирования комплексов dSwi4 с SCB-ДНК было проведено сравнение несколько вариантов получения SCB-ДНК из одноцепочечных олиго-

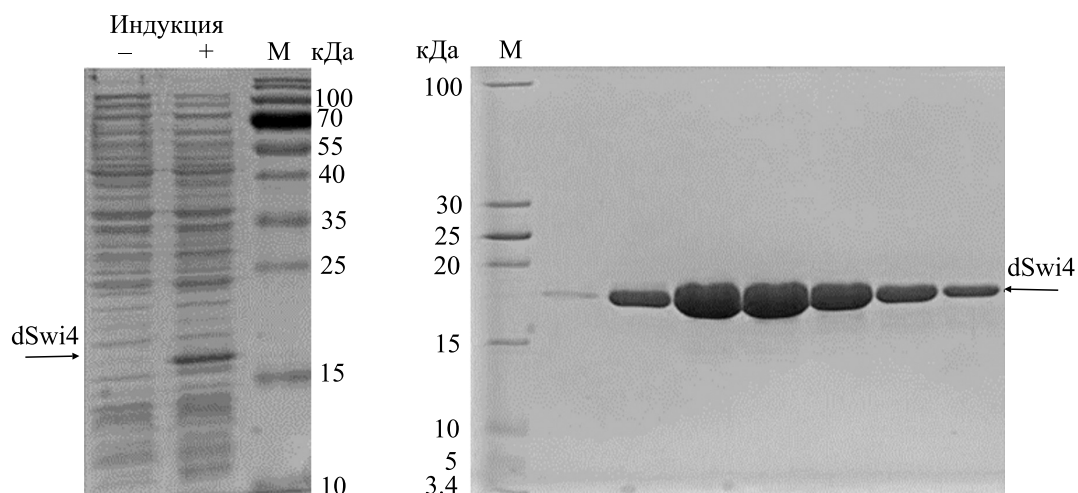


Рис. 2. Результаты гель-электрофореза в денатурирующих условиях лизатов *E. coli* до индукции и после экспрессии dSwi4 (A), а также гель-фильтрационных фракций dSwi4, объединенных для дальнейших опытов с dSwi4. М – маркер.

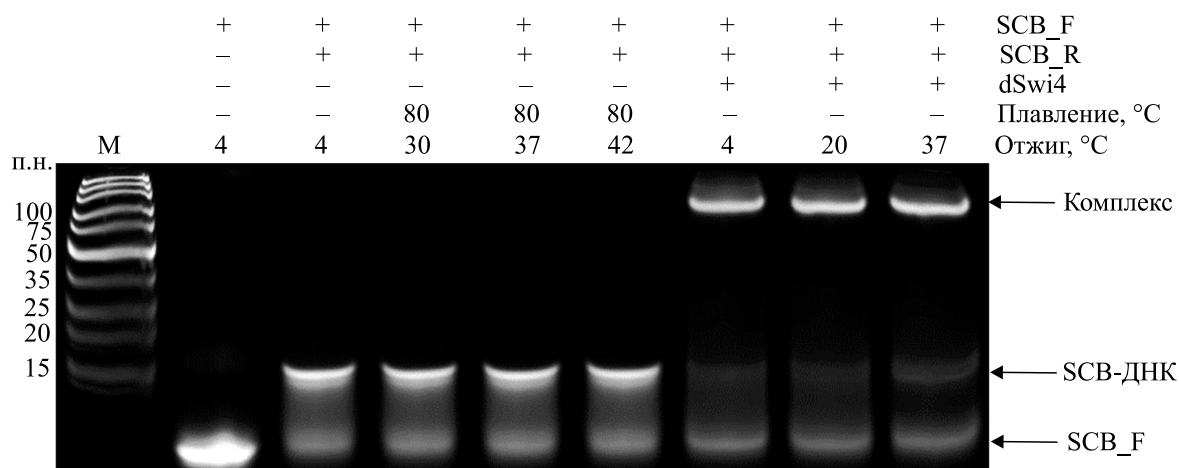


Рис. 3. Анализ формирования дуплекса SCB-ДНК из олигонуклеотидов SCB_F (10 мкМ) и SCB_R (10 мкМ) и образования комплекса SCB-ДНК (10 мкМ) с dSwi4 (10 мкМ) при различных условиях по данным нативного электрофореза в полиакриламидном геле. М – маркер.

нуклеотидов SCB_F и SCB_R. Для этого SCB_F и SCB_R смешивали в концентрации 10 мкМ каждого и либо инкубировали при 4°C, либо подвергали плавлению (2 мин, 80°C) и отжигу (1 ч) при 30, 37 или 42°C. Анализ проб методом электрофореза в полиакриламидном геле в нативных условиях показал, что эффективность образования SCB-ДНК не зависит от наличия стадий плавления и отжига (рис. 3). Во всех случаях на электрофореграмме помимо полосы SCB-ДНК присутствовала полоса одноцепочечного олигонуклеотида, и яркость этих полос была сравнима при разных условиях реакции. Можно предположить, что в смеси SCB_F и SCB_R устанавливается равновесие между двух- и одноцепочечными олиго-

нуклеотидами, и на это равновесие не оказывают влияние стадии плавления и отжига. Наблюдаемая нестабильность двуцепочечной спирали может быть связана с короткой длиной олигонуклеотидов и особенностями нуклеотидной последовательности. Учитывая полученные результаты (рис. 3), было решено формировать SCB-ДНК в упрощенных условиях при 4°C без стадий плавления и отжига. Отметим, что SCB-ДНК соответствует консенсусной последовательности сайта связывания SBF в геноме – RNNYCACgAAAA [11].

Исследована эффективность образования комплекса dSwi4 с SCB-ДНК при разных температурах инкубации смеси (рис. 3). Установлено,

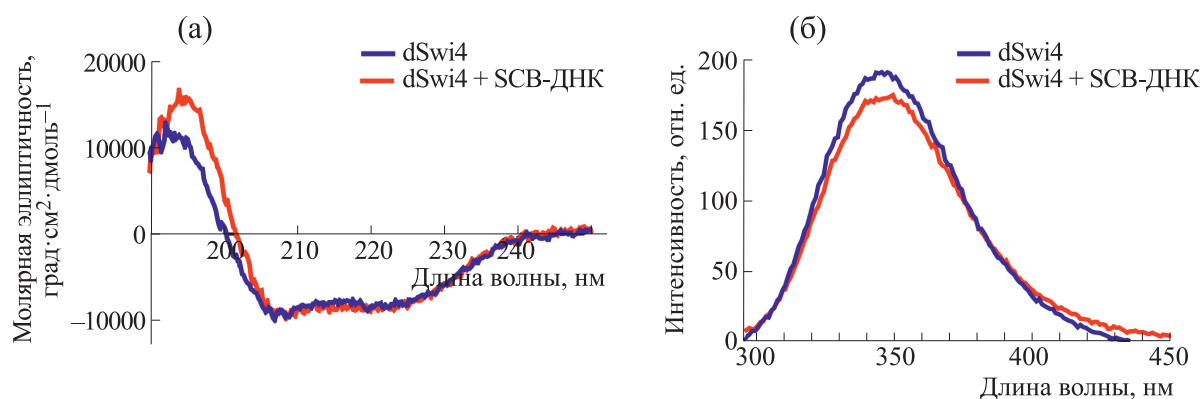


Рис. 4. Спектральный анализ dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК. Представлены спектры КД (а) и флуоресценции (б) dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК.

что эффективность образования комплекса не зависит от температуры в диапазоне 4–37°C, что позволило проводить всю пробоподготовку при 4°C.

Структурный анализ dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК. Анализ спектра КД dSwi4 (рис. 4а) показал, что во вторичной структуре белка преобладают элементы β-структур, включая β-складчатые листы (22%) и β-повороты (21%, табл. 1). В α-спиральной конформации находятся 29% аминокислотных остатков, а 28% остатков расположены в участках с неупорядоченной структурой (табл. 1). Формирование комплекса dSwi4 с SCB-ДНК приводит к изменениям в КД-спектре белка (рис. 4а). Эти изменения соответствуют небольшому увеличению доли аминокислотных остатков, формирующих α-спирали, и сопутствующему снижению доли β-складчатых структур (табл. 1). Изменения затрагивают не менее 10 пептидных связей и позволяют предположить, что образование комплекса сопровождается небольшой структурной перестройкой белка. С учетом наличия в белке ДНК-связывающего мотива «спираль–поворот–спираль» (helix–turn–helix, остатки 71–92) можно предположить, что часть структурных изменений происходит именно в

этой области вследствие стабилизации и/или формирования α-спиральных участков, участвующих в комплексообразовании.

По данным рентгеноструктурного анализа (структура PDB:4ux5) у dPCG2 в комплексе с ДНК, содержащей сайт МСВ (мода А с большим интерфейсом взаимодействия), 26% аминокислотных остатков формируют β-складчатые листы, а 33% остатков – α-спиральные структуры [8]. Хотя доля α-спиралей в структуре комплексов dPCG2 и dSwi4 с ДНК сходна (табл. 1), комплексы заметно отличаются по содержанию β-складчатых листов (табл. 1). Структурные отличия комплексов, по-видимому, во многом связаны с ограниченной гомологией dPCG2 и dSwi4, которая составляет 41% (рис. 1), и указывают на необходимость детального изучения структуры комплекса dSwi4 с ДНК, содержащей сайт SCB.

Вблизи границ ДНК-связывающего мотива dSwi4 «спираль–поворот–спираль» находятся два остатка Trp (W68 и W112, рис. 1), спектры флуоресценции которых, как известно, чувствительны к изменениям полярности микроокружения и взаимодействиям с соседними аминокислотными остатками [12, 13]. Других остатков Trp в исследуемом белке нет. Флуоресценция Trp свободного

Таблица 1. Содержание канонических типов вторичных структур (в %) в составе свободного dSwi4 и в комплексе с SCB-ДНК (по данным КД-спектроскопии)

	α-Спираль	β-Складчатый лист	β-Поворот	Неупорядоченная структура
<i>dSwi4</i>	29 ± 1	22 ± 1	21 ± 1	28 ± 1
<i>dSwi4:SCB-ДНК</i>	35 ± 3	17 ± 1	21 ± 1	27 ± 1

dSwi4 имеет максимум испускания при 345 нм (рис. 4б), что можно объяснить высокой вращательной свободой боковых цепей Trp [14]. Сравнение спектров флуоресценции Trp свободного dSwi4 и в комплексе dSwi4 с ДНК не выявило значимых отличий по форме и положению максимума (рис. 4б). Наблюдаемое небольшое снижение интенсивности флуоресценции может быть вызвано эффектом так называемого внутреннего фильтра, т.е. перепоглощения испускаемого света в кювете вследствие повышения оптической плотности раствора в присутствии ДНК. Отсутствие сдвига максимума спектра позволяет предположить, что взаимодействие с ДНК, а также конформационные перестройки в белке, вызванные образованием комплекса, не распространяются на области локализации остатков Trp68 и Trp112 и не вызывают изменений во вращательной свободе боковых цепей Trp.

Сравнение полученных результатов с данными о микроокружении гомологичных остатков Trp в комплексе dPCG2 с ДНК, содержащей сайт MCB (структура PDB:4ux5), показало, что Trp173 (гомологичен Trp112 у Swi4) образует водородную связь с Tyr169 в участке цепи, формирующем сайт специфического узнавания MCB. Этот участок, скорее всего, меняет свою конформацию при образовании комплекса, что, вероятно, сопровождается изменением микроокружения Trp173. У dSwi4 в гомологичном положении находится фенилаланин, с которым Trp112 водородную связь образовать не может. Остаток Trp129 (гомологичен Trp68 у dSwi4) находится на внешней, не связанной с ДНК, поверхности dPCG2 и не образует связей с другими аминокислотными остатками, что похоже на выявленное по спектрам флуоресценции состояние остатков Trp в dSwi4.

Анализ аффинности dSwi4 к SCB-ДНК. Исследования методом электрофореза в полиакриламидном геле показали, что комплексы dSwi4 с SCB-ДНК образуются в наномолярном диапазоне концентраций белка (рис. 5а). Анализ электрофореграмм показал, что образование комплекса сопровождается характерным увеличением яркости полосы комплекса и сопутствующим снижением яркости полосы SCB-ДНК (рис. 5в,г). Обнаружено зависящее от концентрации dSwi4 снижение яркости полосы одноцепочечного олигонуклеотида SCB_F (рис. 5д), что поставило вопрос о возможном формировании комплекса между dSwi4 и одноцепочечным олигонуклеотидом. Методом электрофореза проведено исследование предполагаемого образования комплекса между dSwi4 и SCB_F, которое не подтвердило данную гипотезу: в отсутствие комплементарно-

го олигонуклеотида яркость полосы SCB_F в диапазоне концентраций dSwi4 10–100 нМ не менялась (рис. 5б,е), и появление новой полосы, соответствующей комплексу, не обнаружено (рис. 5б). С учетом этих данных dSwi4-зависимое уменьшение яркости полосы SCB_F в случае присутствия в растворе комплементарного SCB_R можно объяснить сдвигом равновесия в сторону образования SCB-ДНК в первой реакции из двух в следующей цепи:



который, в свою очередь, происходит из-за ухода свободной SCB-ДНК в комплекс с dSwi4. Формирование дополнительной SCB-ДНК в процессе титрования способно влиять на результаты анализа комплексобразования, приводя к некоторому завышению оцениваемой величины константы диссоциации K_d комплексов dSwi4 с SCB-ДНК.

Расчеты на основе измеренных зависимостей (рис. 5в,г) с использованием формул (1) и (2) дают согласующиеся величины K_d равные 24 ± 4 и 20 ± 3 нМ, которые являются верхней оценкой константы диссоциации комплексов dSwi4 с SCB-ДНК. Полученные значения свидетельствуют о существенно большей аффинности Swi4 к SCB, чем сообщалось ранее ($K_d = 830$ нМ) [7]. Различия в полученных данных могут быть вызваны отличиями в нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. Мы исследовали ДНК, имеющую консенсусную последовательность SCB [11], а в опубликованной ранее работе [7] изучали ДНК, воспроизводящую сайт связывания SBF в одном из промоторов. Кроме того, отличия в константах могут быть частично связаны со снижением потерь катионного dSwi4 из-за неспецифической сорбции, которое было достигнуто нами за счет введения в реакционную смесь бычьего сывороточного альбумина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транскрипционный фактор *S. cerevisiae* SBF (димер Swi4 и Swi6), контролирует переход от G1-к S-фазе клеточного цикла почкующихся дрожжей, регулируя экспрессию генов, управляющих морфогенезом и почкованием. Связывание SBF с ДНК в геноме дрожжей определяется его субъединицей Swi4. Проведенные нами исследования выявили высокую аффинность ДНК-связывающего домена Swi4 (dSwi4) к консенсусной последовательности сайта связывания SBF в геноме и позволили выяснить характер структурных изменений в белке при образовании комплекса с SCB-

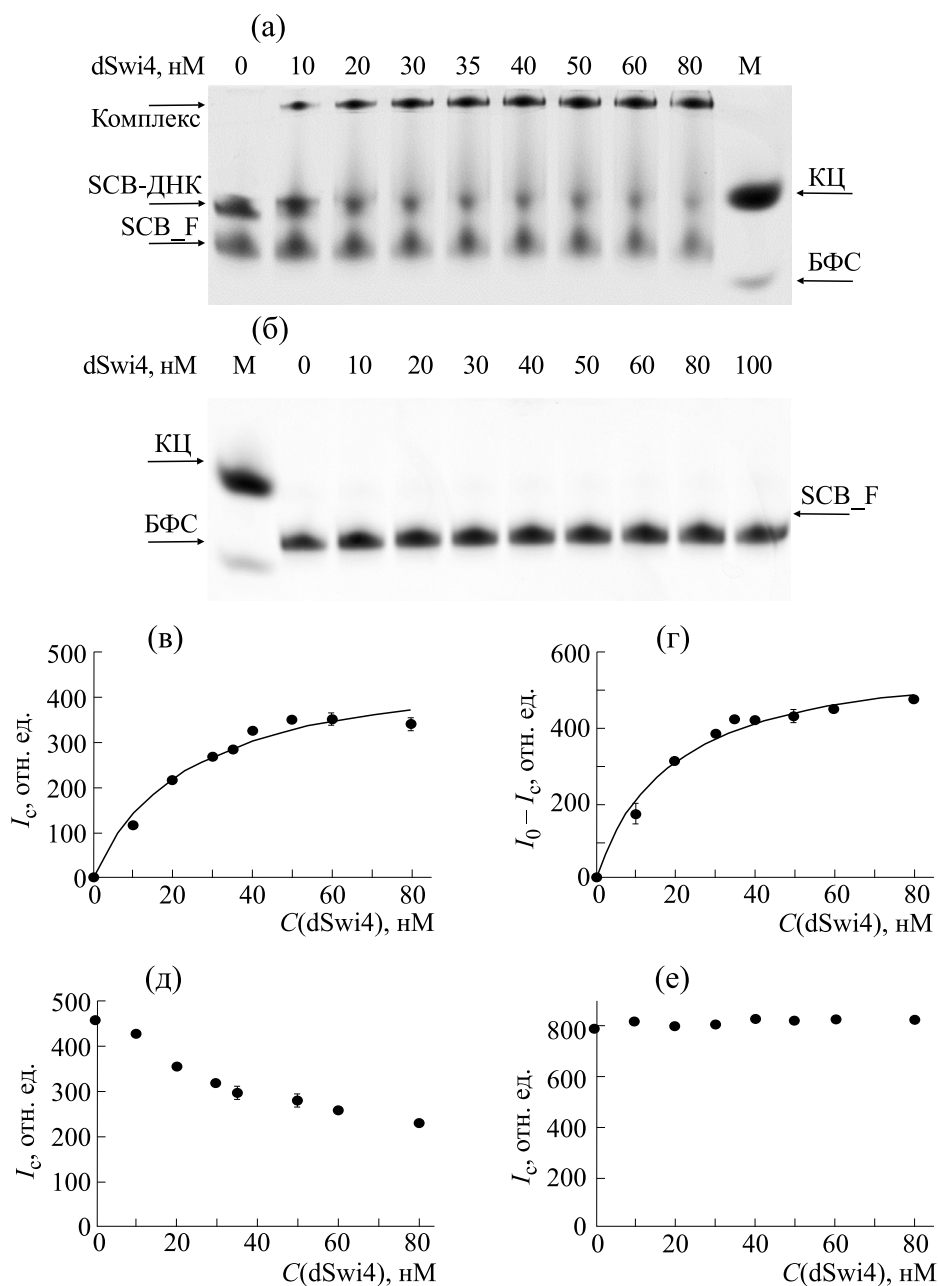


Рис. 5. Анализ взаимодействия dSwi4 с SCB-ДНК и SCB_F. (а), (б) – Нативный гель-электрофорез смесей (а) dSwi4 с SCB_F (5 нМ) и SCB_R (5 нМ), (б) dSwi4 с SCB_F (5 нМ). В качестве маркеров (М) использовали смесь растворов ксиленианола (КЦ) и бромфенолового синего (БФС). (в), (г) – Результаты усредненного денситометрического анализа электрофореграмм, пример которых приведен на рисунке (а), характеризующие образование комплекса dSwi4:SCB-ДНК по увеличению яркости полосы dSwi4:SCB-ДНК (в) и уменьшению яркости полосы SCB-ДНК (г). (д), (е) – Денситометрический анализ изменения яркости полосы SCB_F на электрофореграммах, представленных соответственно на рисунках (а) и (б).

ДНК. С учетом полученных ранее данных [7] можно предположить, что аффинность dSwi4 к сайту SCB существенно зависит от последовательностей нуклеотидов, фланкирующих SCB в составе промоторов. Такая зависимость может являться инструментом тонкой регуляции Swi4-

зависимой экспрессии генов. Таким образом, молекулярные аспекты сайт-специфического узнавания белком Swi4 промоторов, контролируемых фактором SBF, требуют дальнейшего детального изучения и, в том числе, установления структур высокого разрешения комплексов dSwi4 с ДНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения №075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

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. A. Hendler, E. M. Medina, N. E. Buchler, et al., *Curr. Genetics*, **64** (1), 81 (2018).
2. D. J. Stillman, *Trends Biochem. Sci.*, **38** (9), 467 (2013).
3. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *Mol. Cell*, **34** (4), 405 (2009).
4. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *EMBO J.*, **28** (21), 3378 (2009).
5. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *J. Biol. Chem.*, **286** (40), 34809 (2011).
6. J. M. Bean, E. D. Siggia, and F. R. Cross, *Genetics*, **171** (1), 49 (2005).
7. I. A. Taylor, P. B. McIntosh, P. Pala, et al., *Biochemistry*, **39** (14), 3943 (2000).
8. J. Liu, J. Huang, Y. Zhao, et al., *Nucl. Acids Res.*, **43** (2), 1231 (2015).
9. B. E. Schoner, *Methods Mol. Biol.*, **62**, 89 (1997).
10. N. W. Sreerama, *Anal. Biochem.*, **287**, 252 (2000).
11. D. J. Stillman, A. T. Bankier, A. Seddon, *EMBO J.*, **7** (2), 485 (1988).
12. J. R. Lakowicz, *Topics in fluorescence spectroscopy: biochemical applications* (Kluwer Acad. Publ., New York, 2002).
13. J. T. Vivian and P. R. Callis, *Biophys. J.*, **80** (5), 2093 (2001).
14. V. V. Khrustalev, V. V. Poboinev, A. N. Stojarov, and T. A. Khrustaleva, *Eur. Biophys. J.*, **48** (6), 523 (2019).

Structure and Affinity of Complexes between DNA-Binding Domain of Swi4 and DNA

D.A. Afonin*, O.V. Geras'kina*, T.V. Loseva*, M.P. Kirpichnikov*,
V.M. Studitsky*, **, and A.V. Feofanov*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

**Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497, USA

A recombinant DNA-binding domain of the Swi4 protein, which is the component of the transcription factor SBF of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was obtained. Based on the information derived by circular dichroism spectroscopy, a structure of the domain involves α -helices (29%), β -sheets (22%), β -turns (21%) and a random coil (28%). The interaction of the domain with DNA containing the SCB (Swi4 Cell-cycle Box) binding site for SBF was studied. The formation of complexes is accompanied by a conformational rearrangement in the protein, which affects at least 10 peptide bonds and leads to a 6% increase in the α -helical content with a concomitant decrease in the β -sheet content. Fluorescence spectroscopy revealed that conformational rearrangements and intermolecular interactions do not affect the regions of Trp68 and Trp112 residues located near the boundaries of the DNA-binding helix-turn-helix motif. It was found that the dissociation constant of the complex composed of DNA-binding domain of the Swi4 protein and DNA is 20 ± 3 nM.

Keywords: SBF, Swi4, SCB, dissociation constant, circular dichroism, fluorescence

ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ В ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАНАХ ВОДОРОСЛЕЙ *in vivo*, ИЗУЧАЕМАЯ В МОДЕЛЯХ ФОТОСИСТЕМЫ II И ТИЛАКОИДА ПО ИЗМЕРЕНИЯМ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

© 2022 г. Н.Е. Беляева^{*,#}, А.А. Бульчев^{*}, В.З. Пашенко^{*}, К.Е. Клементьев^{**}, П.А. Ермаченко^{***}, И.В. Конюхов^{*}, Г.Ю. Ризниченко^{*}, А.Б. Рубин^{*}

^{*}Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

[#]E-mail: natalmurav@yandex.ru

^{**}Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, 518172, Китай

^{***}ООО «Новые трубные технологии», ул. Щепкина, 51/4, стр. 1, Москва, 129110, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

На клетках микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) детектировали OJPSMT-паттерн сигнала индукции флуоресценции хлорофилла *a* при плотности потока квантов 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. на временах от микросекунд до 10 мин после темновой адаптации. Количественное описание быстрых и, частично, медленных OJPS(M)T-стадий индукции флуоресценции до 100 с обеспечено фитированием модели тилакоидной мембраны при достижении в расчетах адекватной динамики редокс превращений катион-радикала P700⁺. Величины параметров процессов тилакоидной мембраны найдены в решениях совместно с расчетом траекторий переменных модели тилакоидной мембраны. Динамические стадии восстановления/окисления реакционных центров фотосистемы II, пула хинонов PQ/PQH₂, комплекса Сyt *bf* и P700 реакционных центров фотосистемы I сопутствуют адаптации системы тилакоидной мембраны к свету. Анализ *in silico* показал роль комплекса Сyt *bf* в регуляции потоков электронов, когда гемы b_{L/H} в интервале 100 мс < *t* < 3 с более восстановлены при высокой освещенности, чем при умеренной. Впервые выявлена зависимость констант скоростей k_{42-49} рекомбинации разделенных зарядов Phe⁻P680⁺ и Q_A⁻P680⁺ от уровня восстановления Q_B⁽²⁾⁻ вместе с зависимостью k_{42-49} от освещенности хлоропластов. Задание динамических констант скоростей $k_{FNR}(t)$ и $k_{D-qE}(t)$ позволило сопоставить генерацию $\Delta pH_{o-i}(t) = pH_S(t) - pH_L(t)$, инициацию qE-тушения при $pH_{L,trigger} = 6.7$, активацию на свету FNR-редуктазы и достижение стационарных уровней потоков зарядов до одной-двух минут световой индукции. Фитирование модели изолированной фотосистемы II по сигналам индукции флуоресценции фитопланктона выявило близость величин параметров переноса электронов в реакционных центрах фотосистемы II у монокультур *Scenedesmus*, *Chlorella* и проб фитопланктона за исключением параметров-маркеров состояния фитопланктона: при деградации водоема в сравнении с экологически полноценным. Отличия маркеров состоят в уменьшении размеров антенн, усилении в них диссипации энергии, снижении рН люмена.

Ключевые слова: фотосистемы II и I, индукция флуоресценции хлорофилла *a*, модельные расчеты, транспорт электронов и протонов, нефотохимическое тушение.

DOI: 10.31857/S0006302922050052, EDN: JIEDQF

Детальное изучение процессов окислительного фотосинтеза в тилакоидных мембранах проводится на клетках водорослей [1, 2] и цианобакте-

рий [3], в том числе и с применением модельных исследований [1–7]. Результаты анализа фотосинтетического аппарата микроводорослей в лабораторных условиях могут применяться в иссле-

Сокращения: ТМ – тилакоидные мембраны, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, Сyt *bf* – цитохромный *b_f*-комплекс, ФЛ – флуоресценция, РЦ – реакционный центр, Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы фотосистемы II, PQ – пластохинон, PQH₂ – пластохинол, Phe – феофитин, КВК – кислородовыделяющий комплекс, Chl, Хл *a* – хлорофиллы антенны и РЦ, ЭТЦ – электронно-транспортная цепь, P680 – хлорофилл реакционного центра фотосистемы II, ИФ – индукция флуоресценции, F_0 и F_m – минимальный и максимальный выход флуоресценции, ЛПЭ – линейный перенос электронов, ЦПЭ – циклический перенос электронов, PFD – плотность потока квантов света.

дованиях природных сообществ фитопланктонных организмов (фитоценозов) [8]. Вместе с тем для изучения природы устойчивости сложных биологических систем [9] важны результаты анализа динамики трансформации энергии квантов света в тилакоидных мембранах.

Перенос фотосинтезирующего образца из темноты на свет индуцирует в системе тилакоидных мембран (ТМ) процессы, переходящие в стационарное состояние в течение десятков микросекунд–сотен секунд [5, 6, 10]. В исследованиях фотосинтезирующих образцов проводятся измерения кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в пигмент-белковых комплексах тилакоидных мембран. Сведения, полученные в эксперименте и в компьютерном моделировании (*in silico*), касаются аспектов регуляции процессов системы ТМ [5–7]. Совокупность процессов переноса электронов в переходах «темнота – свет» обладает свойством саморегуляции [9], приводящей к согласованному во времени перераспределению зарядов в редокс-кофакторах фотосистем I и II (ФС I и ФС II) и цитохромного b_6/f -комплекса (Cyt b_f).

Захват квантов света и трансформация энергии электронного возбуждения в антенных системах хлорофилла сопровождается тепловыми (диссипативными) потерями энергии и излучением флуоресценции (ФЛ). Известно, что характерные сигналы флуоресценции [1–7, 10–14] обусловлены состоянием реакционных центров (РЦ) ФС II и ФС I, а также состоянием тилакоидных мембран. Использование математических моделей [1–4, 10–20] позволяет провести количественный анализ динамики процессов, ответственных за формирование сигналов флуоресценции при разных режимах светового возбуждения.

Так, в работах [11–13] по сигналам затухания ФЛ после действия импульса света длительностью в пико- или микросекунды с помощью «малых» моделей, включающих только быстрые реакции первичного преобразования энергии света в РЦ ФС II, были определены численные значения параметров процессов возбуждения антенн, разделения и рекомбинации зарядов в РЦ ФС II, стабилизации электрона на первичном хиноне Q_A^- и переноса электрона $Q_A^- \leftrightarrow Q_B^{(-)}$ на вторичный хинон. Объединение в одной модели процессов переноса зарядов на донорной и акцепторной сторонах ФС II привело к первым разработкам кинетических моделей ФС II [16–18, 20], отражающих восстановление подвижных молекул пула хинонов/хинолов (PQ/PQH₂) в стромальном Q_B -сайте ФС II. Результаты моделирования [17–20] быстрых O-J-I-P-стадий индукции флуоресценции (ИФ) на постоянном свете качественно соот-

ветствовали измерениям ИФ [7, 14] в диапазоне времени до $t < 1-2$ с.

Известные в литературе данные, по O-J-I-P-стадиям нарастания флуоресценции в условиях высокой интенсивности света, послужили основой для формирования JIP-теста [7, 21–23]. Амплитуды отдельных O-J-I-P-стадий нарастания ИФ связаны с потоками энергии в комплексах ФС II при трансформации экситонного возбуждения антенн в поток электронов с образованием молекул PQH₂. С помощью JIP-теста выявляются более подробные характеристики образцов по сравнению с методом измерения параметров – минимальной (F_0), максимальной (F_m) интенсивностей сигналов быстрой ИФ. Результаты JIP-теста можно также связать с размерами светособирающих антенн и количеством открытых РЦ ФС II.

В то же время кинетические модели, основанные на дифференциальных уравнениях [1–4, 15–20, 24–37], дают выражения для скоростей процессов транспорта электронов.

Разработанные нами кинетические модели ФС II и тилакоидной мембраны (модель тилакоида) основаны на следующих принципах.

1. Адекватность модели и исследуемого объекта, обеспечивается фитированием результатов модельных вычислений [1–3, 20, 24, 25, 31–34] до достижения их оптимального совпадения с данными по ИФ и редокс-превращениям кофактора P700 ФС I [38–40].

2. Количественное описание энергизации мембраны основано на моделировании процессов переноса электронов (e^-) и протонов (H^+) в мембранах тилакоидов.

В общей модели тилакоида [20, 24–30] выявлялась взаимосвязь компонент трансмембранного электрохимического потенциала протонов ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$): концентраций протонов ($pH_L(t)$ – люмена, $pH_S(t)$ – стромы) и величины электрического потенциала $\Delta\Psi(t)$. Количественный анализ сигналов флуоресценции проводили в кинетических моделях фотосистемы II и тилакоида на постоянном свете [3, 20, 24–30, 32] и при воздействии световых импульсов [1, 2, 31, 33, 34]. Детальную модель тилакоидной мембраны фитировали по сигналам ИФ и P700 листа гороха до $t < 10-30$ с [24, 25], определив параметры энергетического qE-тушения в антенне РЦ ФС II и активации FNR на стромальной стороне ФС I.

В разработанной нами модели тилакоидной мембраны цианобактерий [3] учитывалось влияние qE-тушения и активации FNR, кроме того, моделировались переходы состояний 2→1 и 1→2 (State Transitions $qT_{2\rightarrow 1}$ и $qT_{1\rightarrow 2}$), регулирующие распределение энергии возбуждения между ФС II

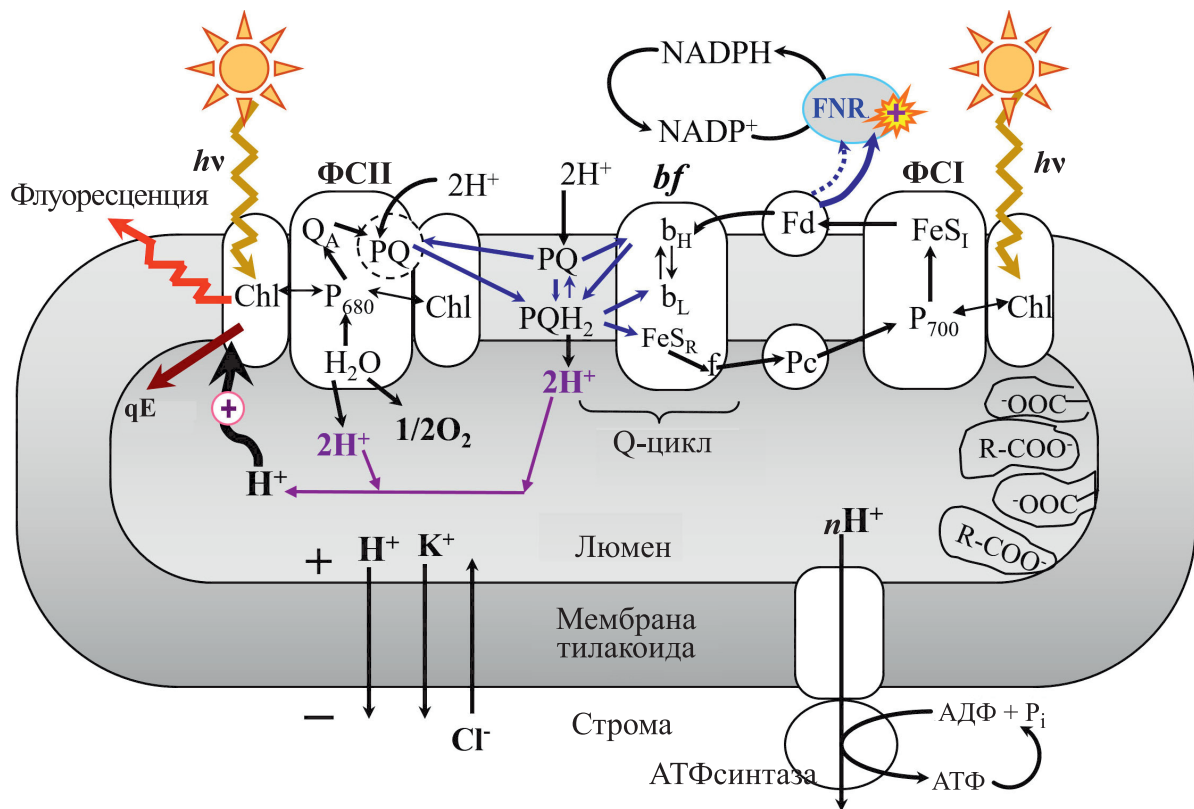


Рис. 1. Общая схема первичных процессов фотосинтеза: ФСИ, ФСII – фотосистемы I и II, *bf* – цитохромный *bf* комплекс, Chl – хлорофилл антенны, P₆₈₀ и P₇₀₀ – пигменты реакционных центров ФСII и ФСИ, Q_A – первичный хиноновый акцептор электронов, b_L и b_H – низко- и высокопотенциальный гемы *bf*, FeS_R – железосерный центр Риска, f – цитохром f, FeS_I – акцепторный комплекс ФСИ, PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол; Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин. FNR – Fd-NADP-редуктаза. R-COO⁻ – буферные группы. Зигзагообразные стрелки обозначают кванты света и флуоресценции. Тонкими стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта и потоки ионов H⁺, K⁺ и Cl⁻ через тилакоидную мембрану после включения освещения. Изогнутая стрелка со знаком «+» – запуск qE-тушения при закислении люмена.

и ФСИ [6, 35, 36, 41–45]. В результате модельные траектории [3] воспроизводили опытные кривые ИФ, детектируемые до 5 мин на клетках *Synechocystis* sp. PCC6803.

Для изучения состояния фотосинтетического аппарата с учетом процессов фиксации CO₂ необходим переход от измерений ИФ в интервале $t < 1-2$ с к детекции сигналов ИФ до минут [22, 36]. Известны модельные исследования измерений ИФ на интервале 5–10 мин [36, 37].

При освещении образца в течение 5–10 мин выявляются отличия ОИПСМТ-паттернов ИФ [41] клеток цианобактерий в сравнении с паттернами хлоропластов водорослей и листьев. Для хлоропластов характерен ОИПСМТ-паттерн ИФ, когда наблюдаются стадии быстрого ОИП–нарастания ($t < 1$ с) и медленного PSMT–спада с переходом через промежуточное SM–нарастание (или плечо) перед достижением стационарного состояния на временах от десятков секунд до минут. На клетках водоросли *Chlamydomonas rein-*

hardtii ОИПСМТ-кинетику ИФ детектировали [43] в интервале времени до 5 мин, причем фаза SM–возрастания флуоресценции до вторичного максимума «М» объяснялась переходом $qT_{2 \rightarrow 1}$ на временах 2–5 мин [43].

В работе Стирбета и Говинджи (2016) [36] для анализа данных по измерениям ИФ *Chlamydomonas* [43] была применена модель из работы [35]. В этой модели при описании процессов тилакоидных мембран в стационарном состоянии учитывали переходы состояний фотосинтетического аппарата и восстановления стромальных пулов Fd и NADPH, причем редуцированное описание процессов ФСII содержало четыре редокс-состояния РЦ ФСII. Оказалось, что полученные в работе [36] модельные кривые воспроизводили ОИПСМТ-паттерн ИФ только качественно. Очевидно, в анализе ОИПСМТ-паттерна ИФ необходимо применить модель процессов тилакоидной мембраны с детальным, а не редуцированным описанием процессов ФСII.

В настоящей работе мы поставили задачу исследования динамики индукционных процессов в фотосинтезирующей мембране тилакоида (рис. 1) в интервале времени от десятков микро-секунд до минут на основе модели [25].

Нашей целью было моделирование ОJIPSM-паттернов ИФ клеток *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*), полученных в данной работе при плотности потока квантов 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (свет умеренной и высокой интенсивности) в интервале времени до 10 мин. Фитирование модели ТМ (рис. 1–4) по измерениям ИФ *Scenedesmus* проводили на временах до 100 с, не учитывая роль State transition в кинетике ИФ, но с учетом qE-тушения и активации FNR-редуктазы. Задачу нахождения параметров модели ТМ решали путем фитирования по наборам данных ИФ, детектируемой в различных условиях эксперимента – две интенсивности освещения *Scenedesmus* или две стадии роста культуры *Chlorella* в фотобиореакторе.

Модель изолированной фотосистемы II применяли при обработке измерений ИФ проб фитопланктона, позволяя получить параметры реакций РЦ ФСII в качестве характеристик-маркеров фитоценозов природных водоемов.

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Условия выращивания клеток водорослей для измерений флуоресценции. Клетки микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*) культивировали в среде BG11 при значении pH приготовленной среды, равном 7.4 [46]. Культивирование происходило на качалке в люминостате при температуре 21 °С в режиме освещения при интенсивности света 70 мкмоль квантов/(м²с) (мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). Достижение стационарной фазы контролировали спектрофотометрически по содержанию хлорофилла. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла клеток *Scenedesmus* регистрировали на импульсном портативном флуориметре модели PSI 3000S (Photon System Instruments, Чехия), λ_{max} = 630 нм. Быструю флуоресценцию детектировали для двух интенсивностей актиничного света – 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, равных 40 и 60% от максимальной плотности фотонного потока (3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). Измерения проводили после адаптации клеток *Scenedesmus* к темноте в течение 10 мин при длительности освещения 600 с.

Культивирование в фотобиореакторе клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* (далее *Chlorella*) проводили в режиме постоянного освещения. Интенсивность освещения в культиваторе составляла 40 Вт/м² (белые светодиоды). Пробы из

биореактора отбирали через 3, 26 и 48 ч от начала культивирования, затем измеряли индукционные кривые флуоресценции клеток *Chlorella*. Интенсивность освещения при записи индукционной кривой составила 400 Вт/м² или 2000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (синий светодиод, 470 нм) [47].

Протокол измерений флуоресценции для фитоценоза природного водоема. В бассейне р. Темерник (Ростов-на-Дону) модельный водоем, средний в каскаде трех проточных прудов, в течение 10 лет ежегодно осенью осушался, а весной переводился в режим заливного луга в процессе летования, что способствовало активным процессам самоочищения и оздоровлению популяции гидробионтов. Исследование фитоценозов каскада верхнего, среднего и нижнего прудов (№№ 1, 2, 3) проведено путем анализа индукции флуоресценции, измеренной на пробах фитопланктона прудов: № 1 – в состоянии биологической деградации, № 2 – после «летования» с высокой биопродуктивностью (контроль) и № 3 – пруд с цветущей водой.

Пробы отбирали 30.05.2017 г. утром в 10.30–11.00 у дамб водохранилищ с глубины 0.3 м от поверхности. В течение двух часов пробы транспортировали в темной однолитровой таре до лаборатории. Для каждой пробы центрифугировали 6 пробирок по 90 г при 4000 об/мин в течение 5 мин. Сконцентрированный осадок в объеме 10 мл отбирали для измерений флуоресценции. Пробу ставили на яркий свет, а перед измерениями флуоресценции – на 5 мин в темноту. С помощью портативного флуорометра на интервале до 1 с измеряли ход кривых ИФ, вызываемых светом 4500 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹.

Структура модели тилакоидной мембраны. Структурная схема тилакоидной мембраны хлоропласта иллюстрирует на рис. 1 построение обобщенной модели тилакоида [3, 23–25, 30]. Комплексы антенн, ФСII, ФСI, Cyt *bf* встроены в мембраны и связаны потоками в люмене, мембране, строме, образуя подсистемы общей структуры ТМ. Примеры изучения отдельных подсистем известны и получены при описании частично замкнутого набора процессов ФСII [1, 2, 30–34], ФСI [48], Cyt *bf* [49].

Модель каталитического цикла фотосистемы II. Модель ФСII объединяет 30 компонент пигмент-белкового мембранного комплекса ФСII (рис. 3, 4). Захват фотона в антенне и перенос экситона в фотоактивный кластер P680 ведут к восстановлению феофитина (Phe) вместе с генерацией катион-радикала P680⁺. Высоко-положительный редокс-потенциал P680⁺ обеспечивает на входе системы РЦ ФСII срабатывание S_{0,1,2,3(4)}-циклов кислородовыделяющего комплекса (КВК) с подачей четырех электронов от молекулы воды на

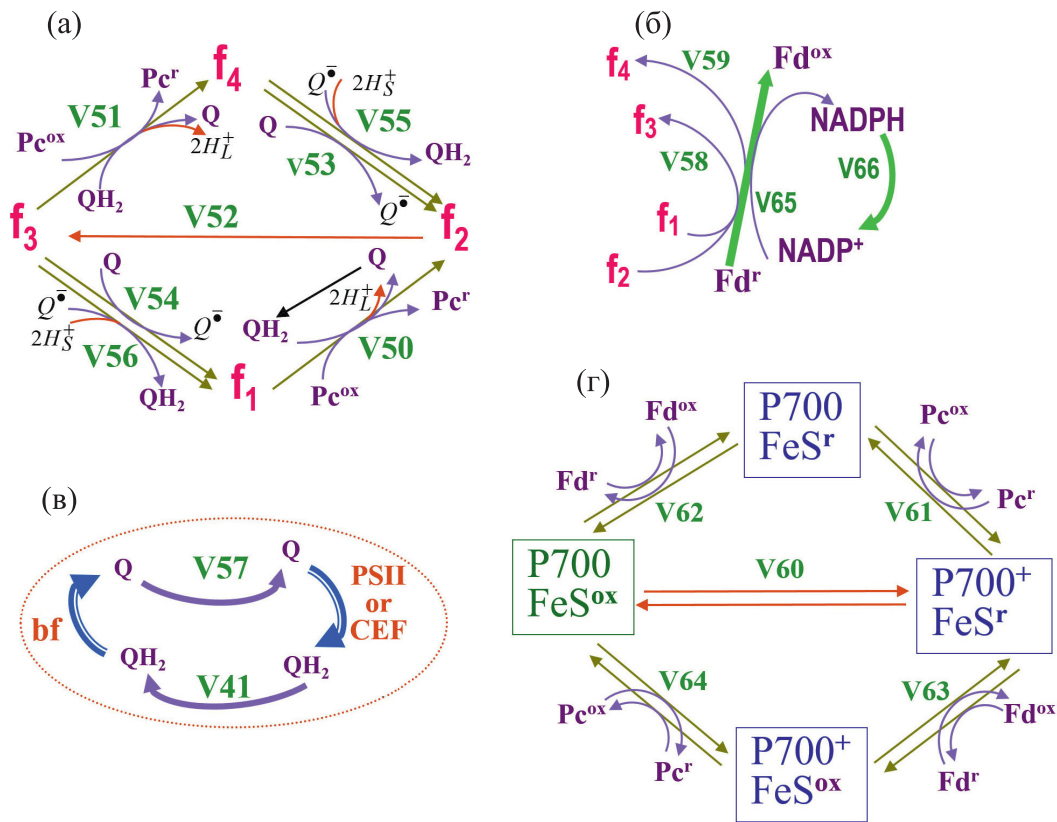
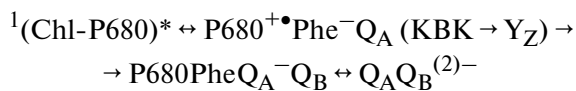


Рис. 2. Обобщенная схема потоков в подсистемах модели тилакоидной мембраны (модель тилакоида). (а) – Реакции цитохромного комплекса *bf*. (б) – Компоненты цепи переноса электронов взаимосвязаны ветвями линейного и циклического потоков электронов (ЛПЭ и ЦПЭ). Стрелки: «V66» – реакция потребления NADPH в строме, «V65» – динамическая константа скорости $k_{FNR}(t)$ активации Fd-NADP-редуктазы (FNR), уравнение (9). (в) – Сопряжение электронного и протонного транспорта (ЭТ/ПТ) в люменальных и стромальных сайтах, включая реакции комплекса фотосистемы II. (г) – Реакции фотосистемы I.

восстановление $P680^{+\bullet}$ при одновременной генерации молекулярного кислорода. Для упрощения предполагали, что притоку одного электрона на окисленный $P680^{+\bullet}$ через тирозин Y_Z [34] сопутствует освобождение одного протона в люмен тилакоида. Отток электронов от донорной стороны РЦ ФСII на акцепторную:



обусловлен разностью редокс-потенциалов компонент ФСII и сопровождается накоплением состояний закрытых РЦ с Q_A^- . Дважды восстановленный и протонированный из стромы пластохинол пополняет мембранный пул PQ/PQH_2 . Окисление молекул PQH_2 в электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) за ФСII ведет к посадке пластохинона PQ в стромальный Q_B -сайт, завершая каталитический цикл H_2O -пластохинон оксидоредуктазы ФСII (рис. 3, 4). В случае отдельного

блока модели ФСII превращение $PQH_2 \rightarrow PQ$ задано [1, 2, 30–34] оттоковой реакцией (41). В составе полной модели тилакоида процессы подсистемы ФСII вовлечены в общую структуру потоков зарядов, где реакции (41) и (57) относятся к диффузионным потокам PQH_2 и PQ .

Модель цитохромного комплекса bf. В системе ТМ комплекс *Cyt bf* влияет на редокс-состояние пула PQH_2/PQ , обеспечивая приток электронов от ФСII в линейном и от ферредоксина в циклическом потоках в двух центрах – люменальный Q_O -сайт (хинолоксидаза) и ориентированный в строму Q_I -сайт (хинонредуктаза). Согласно схеме Q -цикла [6] двухэлектронное окисление $PQH_2|_O$ в люменальном Q_O -центре протекает по двум путям – высоко- и низкопотенциального переноса электронов. Отчуждение одного электрона на железо-серный центр Риске (FeS_R) ведет к восстановлению цитохрома *f* и пластоцианина (PC). Второй электрон от пластохемихинона $PQH_2|_O$ поступает во внутреннюю цепь восстановления

b_L и b_H , низко- и высокопотенциальных b_6 -гемов и притока затем электронов на $PQ|_i$ молекулу в Q_i -центре: $PQH|_O \rightarrow b_6^L \rightarrow b_6^H \rightarrow PQ|_i$.

Редукция модели *Syt bf* [49] с учетом иерархии времен реакций Q -цикла включила четыре редокс-компоненты $b_L b_H$, $b_L \bullet b_H$, $b_L b_H \bullet$, $b_L \bullet b_H \bullet$, обозначенные $f1$, $f2$, $f3$, $f4$ на рис. 2а в виде паттерна реакций *Syt bf* в общей модели ТМ [3, 20, 24, 25, 30]. На свету поток электронов в Q -цикл (шаг 41, рис. 2в) обеспечивает через протолитические реакции $f1 \rightarrow f2$ и $f3 \rightarrow f4$ (шаги 50, 51, рис. 2а) восстановление РС и, одновременно, b_L а, затем трансмембранно b_H гема ($f2 \rightarrow f3$, шаг 52). Переходы $f4 \rightarrow f2$, $f3 \rightarrow f1$ ведут к продукции семихинона/пластохинона (53, 54, 55, 56, рис. 2а) в Q_i -центре с потреблением двух протонов из стромы. Стрелки 58 и 59 на рис. 2б указывают путь донирования электронов [6, 49] в стромальный хинон-связывающий Q_i -центр за счет вклада ЦПЭ согласно механизму $\Phi CI \rightarrow Fd \rightarrow b_H \rightarrow PQ|_i$ (рис. 1).

Модель фотосистемы I и взаимосвязь потоков в тилакоидной мембране. Перенос электрона от PQH_2 через *Syt bf* восстанавливает пластоцианин

и обеспечивает приток электронов на фракцию P^{+}_{700} катион-радикала РЦ ФСИ. Свет индуцирует быстрое (10^{-12} – 10^{-9} с) разделение зарядов на кофакторах $A_0 - A_1 - F_X$ РЦ ФСИ. Поэтому модель ФСИ (рис. 2г) объединяет кластеры F_X , F_A , F_B как акцептор «FeS». Согласно стадии 60, свет генерирует редокс-состояния $P700^{+}FeS^{\Gamma}$. Вслед за этим происходят обратимые реакции донирования электрона на P^{+}_{700} от РС $^{\Gamma}$ или ухода электрона от кластера FeS^{Γ} ФСИ на ферредоксин (стадии 61, 64, 62, 63, рис. 2г).

Пул молекул $Fd^{r(ox)}$ участвует в потоках линейного (ЛПЭ) и циклического (ЦПЭ) переноса электронов (рис. 2б и схема (1)). Стрелка $Fd^{\Gamma} \rightarrow Fd^{ox}$ указывает на окисление Fd^{Γ} в нескольких сопряженных процессах. Ветви 58 и 59 ЦПЭ связывают паттерны реакций ФСИ и *Syt bf*. Стрелка 65 относится к FNR реакции терминального восстановления $NADP^{+}$ до редокс-эквивалента NADPH потоком ЛПЭ, в то время, как шаг 66 (рис. 2б) связан с потреблением $NADPH \rightarrow NADP^{+}$ (см. рис. 1 и формулу (2)).

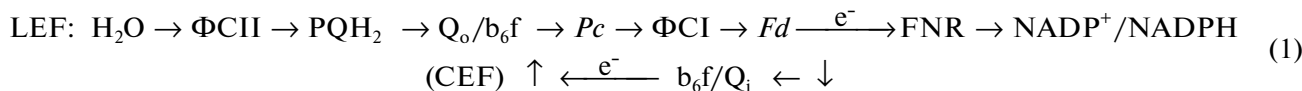


Схема (1) выявляет последовательные события, вызываемые освещением тилакоидных мембран в подсистемах ФСИ, ФСИ, *Syt bf*, связанных процессами переноса электронов и протонов через пулы подвижных переносчиков от входа до выхода системы ТМ.

Рис. 1 показывает потоки зарядов (электроны, протоны (H^{+}), противоионы) в компартментах ТМ. Стадии ЛПЭ и ЦПЭ сопряжены с освобождением H^{+} в люмен (КВК ФСИ, Q_o -центр *Syt bf*) и захватом H^{+} из стромы (Q_B -сайт ФСИ, Q_i -центр *Syt bf*). В результате образование градиента электрохимического потенциала H^{+} ($\Delta \tilde{\mu}_{H^{+}}$): на мембране тилакоида обеспечивает синтез АТФ. Процессы потребления метаболитов АТФ \rightarrow АДФ и $NADPH \rightarrow NADP^{+}$ (рис. 1) для упрощения определены через скорости оттоковых реакций:

$$V_{NADP} = k_{NADP} \times NADPH / (K_{NADP} + NADPH), \quad (2)$$

$$V_{ATP} = k_{ATP} \times ATP / (K_{ATP} + ATP), \quad (2a)$$

где k_{NADP} , K_{NADP} и k_{ATP} , K_{ATP} задают эффективные параметры переходов $NADPH \rightarrow NADP$ и $ATP \rightarrow$ АДФ для моделирования сопряжения си-

стемы ТМ и стромальных циклов потребления энергии, запасенной в световых реакциях.

Динамические параметры описания скоростей в модели тилакоида. Принципы построения модели ТМ и системы обыкновенных дифференциальных уравнений подробно представлены в работах [3, 20, 24, 25]. Запись дифференциальных уравнений в балансовой форме:

$$\frac{dX_i}{dt} = v_{\text{production}}(X_i(t)) - v_{\text{consumption}}(X_i(t))$$

суммирует скорости производства $v_{\text{production}}(X_i(t))$ и потребления $v_{\text{consumption}}(X_i(t))$ каждой i -й компоненты ($X_i(t)$) системы ТМ. Концентрации $X_i(t)$ в мМ определяют размерности скоростей в $\text{мМ} \cdot \text{с}^{-1}$, причем скорости задаются как нелинейные функции от концентраций компонент в согласии с механизмами процессов, обсужденных выше.

При описании процессов использованы кинетические параметры прямой k_n и обратной k_{-n} констант скоростей и константа равновесия K_{eq} редокс-реакций:

$$k_n = k_{-n} \cdot K_{eq}; \quad K_{eq} = \exp\left(-\frac{n_e \cdot F \cdot \Delta E_m}{RT}\right). \quad (3)$$

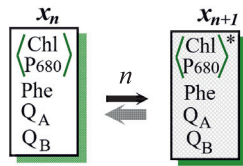


Рис. 3. Схема распада синглетного возбуждения $^1\text{Chl}^*$ антенны фотосистемы II. Редокс-формы реакционного центра фотосистемы II включают: $\left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle$ – пигменты хлорофилла антенны и P680 в РЦ; Phe – феофитин, первичный акцептор электронов ФС2; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы. Даны две редокс-формы для реакций с номерами $n = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ (см. рис. 4). Генерация возбужденного синглетного состояния $^1\text{Chl}^*$ задается световой константой $k_L = k_n$, предполагая $k_L = 200 \text{ с}^{-1}$ для PFD 300 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ [25, 30]. Распад $^1\text{Chl}^*$ определен суммой $k_{-n} = k_F + k_D$, где k_F – константа скорости испускания флуоресценции, $k_D(t)$ – динамическая константа скорости безизлучательной диссипации энергии в антенне ФСII, уравнение (8).

Здесь ΔE_m – разность эффективных среднеточечных редокс-потенциалов носителей электронов, а n – число электронов, перенесенных в редокс-реакции. Оценки K_{eq} , взятые из литературы [11–13], уточнялись при анализе экспериментов *in vivo* [1–3, 24, 25].

1. *Электрический трансмембранный потенциал, рН люмена и стромы.* Регуляторное влияние электрической компоненты $\Delta\Psi$ электрохимического потенциала $\tilde{\mu}_{H^+}$ на перенос электронов обсуждалось в работах [2, 23–26, 29, 30] и учтено выражением:

$$\tilde{K}_{\text{eq}}(\Delta\Psi) = \exp(-\alpha \cdot \Delta\Psi \cdot (F/RT)) \cdot K_{\text{eq}}. \quad (4)$$

Здесь K_{eq} – константа равновесия в отсутствии мембранного потенциала (т. е. $\Delta\Psi = 0$). Фактор α задает часть $\Delta\Psi$, продуцируемую отдельным шагом переноса электрического заряда по нормали к мембране [50, 51] и влияющую на перенос заряда в течение данного шага.

2. *Антенные комплексы и световая активация FNR-редуктазы.* Поток фотонов определяет «давление» экситонного возбуждения $\left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle \rightarrow \left\langle \begin{matrix} \text{Chl} \\ \text{P680} \end{matrix} \right\rangle^*$ в антенне, когда избыточное накопление закрытых РЦ затрудняет фотохимическое разделение зарядов. Защита системы от «давления возбуждения» с дезактивацией возбужденных состояний и тушением флуоресценции обеспечена непосредственно в антенне ФСII.

Согласно рис. 3 распад синглетного возбужденного состояния $^1\text{Chl}^*$ РЦ ФСII происходит путем испускания флуоресценции (k_F), которому сопутствует тепловая диссипация (k_D) в антенне. Суммарная скорость распада $^1\text{Chl}^*$ задается константой k_A :

$$k_A = k_F + k_D. \quad (5)$$

Потери возбуждения в антенне в процессах флуоресценции в модели ФСII определяются состояниями с синглетным возбуждением $^1\text{Chl}^*$, т. е. модельными формами в колонках 2 и 6 (рис. 4):

$$F(t) = S \cdot (x_2(t) + g_2(t) + y_2(t) + z_2(t) + x_6(t) + g_6(t) + y_6(t) + z_6(t)) \cdot k_F. \quad (6)$$

Диссипация энергии в антенне задана константой скорости $k_D(t)$ [35, 36] в виде зависящего от времени динамического параметра по аналогии с [24, 25]:

$$k_D(t) = k_{D\text{const}} + k_{D\text{var}} \cdot q(t), \quad (7)$$

где компоненты диссипации энергии указывают на величины: базовую $k_{D\text{const}}$, минимальную после темновой адаптации, и $k_{D\text{var}}$, достигаемую в присутствии тушителей в антенне ФСII. Фактор $0 < q(t) < 1$ определяет возрастание тепловых потерь путем распада $^1\text{Chl}^*$ вследствие запуска qE-тушения при низком люменальном рН согласно уравнению Хилла:

$$k_D(t) = k_{D\text{const}} + k_{D\text{var}} \cdot \frac{[H_L^+(t)]^n}{[H_L^+(t)]^n + K_Q^n}, \quad (8)$$

где концентрация $[H_L^+(t)]$ вычисляется при моделировании, параметры n (коэффициент Хилла) и K_Q (константа Михаэлиса) вместе с $k_{D\text{const}}$ и $k_{D\text{var}}$ находили фитированием модели ТМ по измерениям длительной ИФ без явного рассмотрения механизма qE-тушения.

В модели ТМ реакция ЛПЭ $\text{Fd}^+ \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{NADP}^+$ определена константой скорости:

$$k_{65}(t) = k_{\text{FNR}}(t) = k_{\text{FNRmax}} \cdot (1 - 0.99 \cdot \exp(-t/\tau_{\text{FNR}})). \quad (9)$$

Здесь после темновой адаптации, в момент $t = 0$ базовый уровень $k_{\text{FNR}}(t)$ равен 0.01 от максимальной величины k_{FNRmax} , достигаемой с характеристическим временем τ_{FNR} при усилении активности FNR.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ И МОДЕЛИРОВАНИЯ

Монокультуры микроводорослей в лабораторных условиях. Лабораторные культуры микрово-

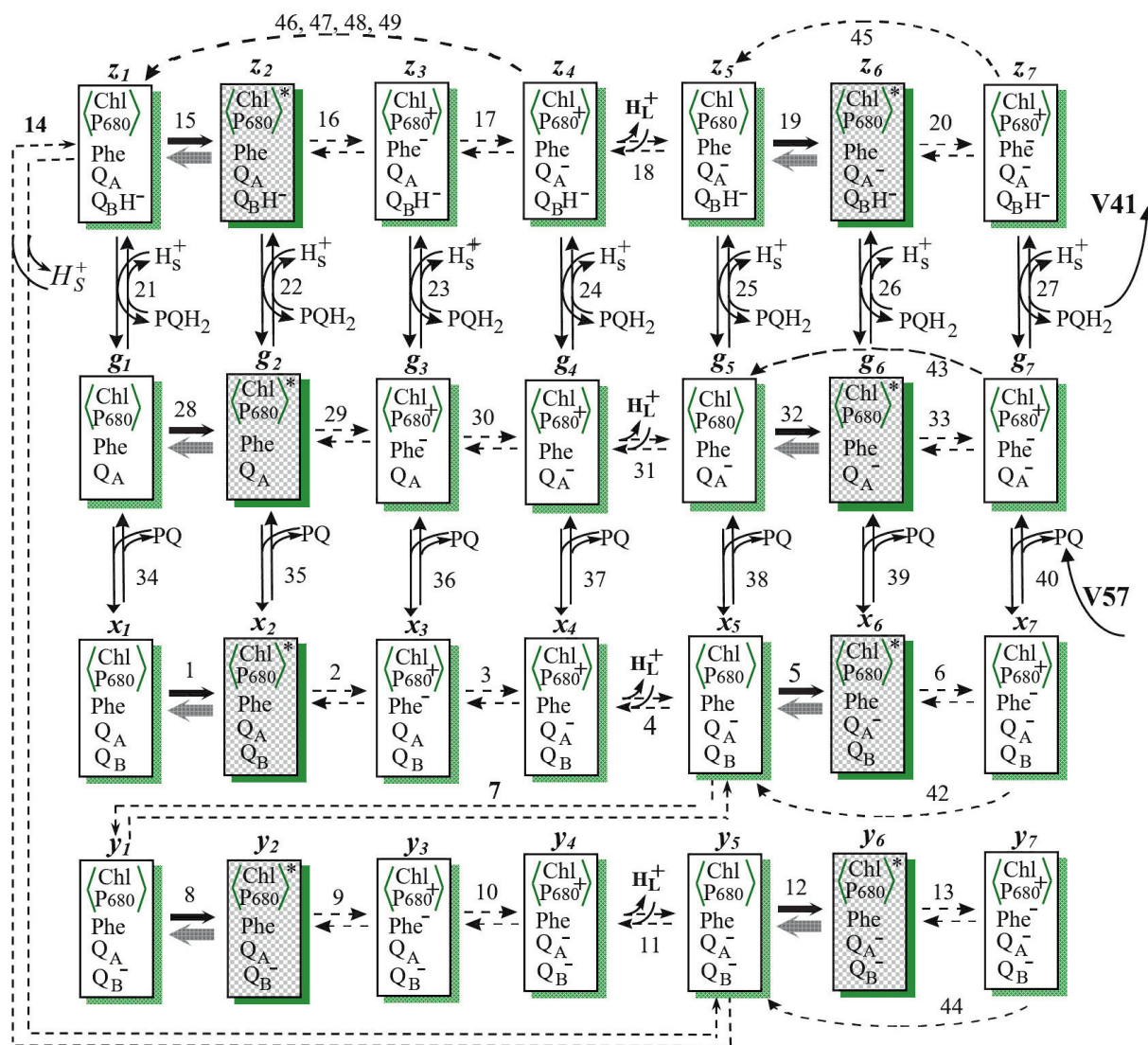


Рис. 4. Схема каталитического цикла фотосистемы II. Каждый прямоугольник – кинетическое состояние ФСII, определяемое редокс-состоянием входящих в него переносчиков электрона. Штриховкой показаны состояния, способные к испусканию квантов флуоресценции. Chl и P680 – хлорофилл антенны ФСII и реакционного центра; Phe – первичный акцептор электронов феофитин; QA и QB – первичный и вторичный хинонные акцепторы электронов. PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол; H_L⁺ – протоны, выделяемые в люмен тилакоида, H_S⁺ – протоны, поглощаемые из стромы тилакоида. Жирные стрелки – световые стадии. Цифры рядом со стрелками и буквы над прямоугольниками (x_i, y_i, z_i, g_i, i = 1, ... 7) соответствуют номерам реакций и обозначениям переменных модели.

дорослей исследовали, предполагая, что в условиях постоянной среды обитания характеристики клеток на равных стадиях роста сохраняются постоянными.

Фитирование модели тилакоидной мембраны по измерениям индукции флуоресценции.

1. Культура *Scenedesmus obliquus*. На рис. 5а приведены результаты измерений ИФ *Scenedesmus obliquus* (далее *Scenedesmus*) при культивировании микроводоросли в среде на стадии стационарного роста. Изменения интенсивности

ИФ в ответе клеток *Scenedesmus* на освещение детектировали на интервале времени до 10 мин при двух интенсивностях актиничного света – 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, соответствующих 60% (точки ФЛ1) и 40% (точки ФЛ2) от максимальной плотности потока квантов света (PFD), равной 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Шкала, на которой показана интенсивность флуоресценции, выбрана таким образом, что начальный уровень ФЛ при значении плотности фотонного по-

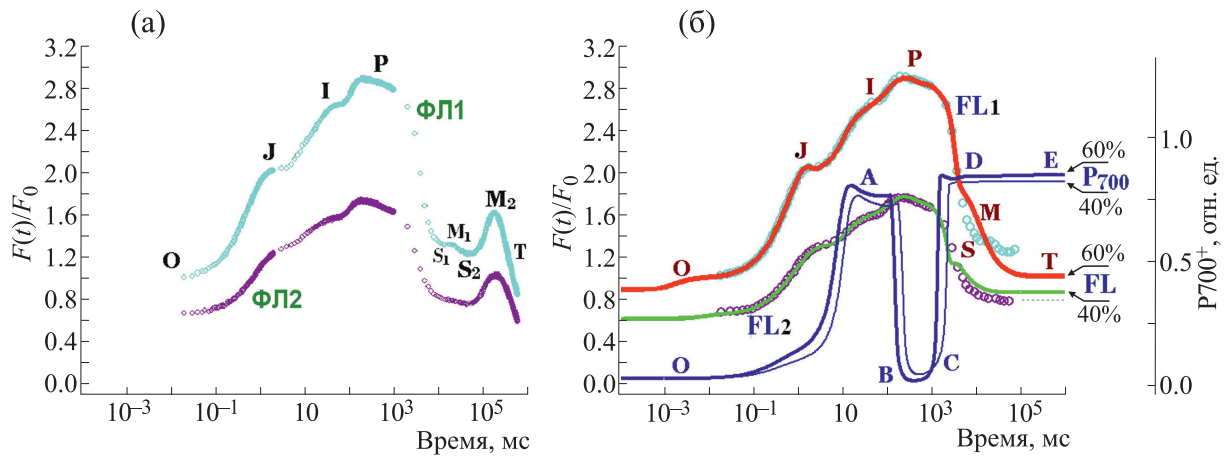


Рис. 5. Фитирование модели тилакоидной мембраны по измерениям на микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*). (а) – Детекция сигналов индукции флуоресценции клеток *Scenedesmus* от 20 мкс до 10 мин (ФЛ1 и ФЛ2) при интенсивности актиничного света 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹, соответствующей 60% и 40% от максимальной плотности потока квантов PFD 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Начальный уровень интенсивности флуоресценции при PFD 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ сопоставлен значению «1». (б) – Траектории индукции флуоресценции FL1 и FL2 фитируют решения модели ТМ (рис. 1–4, табл. 1) по измерениям ИФ клеток *Scenedesmus* при освещении 60% и 40% (ФЛ1 и ФЛ2) в интервале времени от микросекунд до 100 с. Траектории P700-60% и P700-40% (соответственно толстая и тонкая линии) – динамика окисления–восстановления P700 редокс-кофактора ФС1.

тока 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ полагается равным «1».

Данные измерений ОJIPСМТ кинетики ИФ (рис. 5а) показывают стадии нарастания ФЛ до пика Р и последующего спада к стационарному Т-уровню. Вместе с тем промежуточные стадии спада ФЛ содержат локальные минимумы S₁₍₂₎ и максимумы M₁₍₂₎. Кинетические ОJIPС₁M₁S₂M₂T-фазы наблюдаются для длительных измерений ИФ *Scenedesmus* при потоках света 60 и 40% (ФЛ1, ФЛ2, высокий и умеренный свет). Очевидно, что стадии M₁S₂M₂T на временах 2–5 мин проявляются независимо от освещенности.

Расчеты в модели тилакоида проведены (рис. 5б) на шкале времени от пикосекунд до минут. Модельные траектории FL1 и FL2 соответствуют результатам фитирования по кривым ИФ, измеренным (ФЛ1, ФЛ2, рис. 5а) при 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Согласно расчетам, измерения ИФ клеток *Scenedesmus* на стадиях ОJIPС₁(S₂)Т воспроизведены количественно для фаз ОJIP-нарастания от 10 мкс до 2 с и частично – для PS₁M₁S₂T-стадий спада в диапазоне времени до 100 с (рис. 5б).

Влияние фактора State transition на кинетику ИФ не учтено в данной работе с целью упрощения расчетов, а, также для выяснения параметров, наиболее существенных для воспроизведения формы кривых ИФ на временах до 100 с без учета стадий S₂M₂T на временах до 10 мин.

Количественные результаты фитирования модели тилакоида определены в табл. 1. В ней приведены значения параметров, которые соответствуют механизмам и факторам регуляции процессов, представленным на рис. 1.

2. *Культура Chlorella vulgaris.* Изменения флуоресценции клеток *Chlorella* измеряли (рис. 6а) в интервале 2 с. На рис. 6а результаты измерений ИФ *Chlorella* при действии света одинаковой интенсивности (2000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹) приведены точками ФЛ3час, ФЛ26час, ФЛ48час на стадиях роста 3, 26 и 48 ч соответственно. Результаты фитирования «малой» модели ФСII (траектории FL3, FL26 и FL48 на рис. 6б) по измерениям ИФ на образцах проб культуры из биофотореактора отражают кинетику ОJIPС-фаз и нарастания и, частично, спада после максимума Р кривой ИФ. Модель [24, 25] процессов в тилакоиде полностью воспроизводит ОJIPС-кинетику изменений ИФ *Chlorella* на временах до 2 с (F1 и FL2 на рис. 6в). при достижении максимума Р (F_m) и минимального начального уровня F₀ ИФ. Вместе с тем показано моделирование (P700, рис. 6в) динамики редокс-превращений катионрадикала P700⁺ [25, 38, 39]. Расчетный ход кривых флуоресценции на временах t > 10 сек теоретически соответствует известным данным по кинетике PSMT-фаз ИФ [4, 37].

Анализ параметров модели тилакоида для процессов фотосинтеза микроводорослей. Значения параметров в табл. 1 получены при достижении в вычислениях адекватной динамики редокс-пре-

Таблица 1. Параметры процессов тилакоидной мембраны (модель ТМ)

Переходы и номера реакций модели ТМ	$k_n, \text{мс}^{-1}, K_{EQn}$			
	40%	60%	26 ч	48 ч
Фотосистема II				
A_{eff} – Эффективное количество пигментов антенного комплекса	$A_{\text{eff}} = 140$		112	108
${}^1(\text{Chl-P680})^*\text{Ph} \leftrightarrow \text{Chl-P680}^+\text{Ph}^-(\text{QA})$	$k_2^{\text{op}} = 320000000 / A_{\text{eff}}$			
$k_2^{\text{op}} = k_2^{\text{op}} / K_{EQ2}$	$2.29 \times 10^6 / 32 = 7.14 \times 10^4$		$2.96 \times 10^6 / 16 = 1.85 \times 10^5$	
${}^1(\text{Chl-P680})^*\text{Ph} \leftrightarrow \text{Chl-P680}^+\text{Ph}^-(\text{QA}^-)$ $k_5^{\text{cl}} = k_2^{\text{op}} / a; K_{EQ5} = K_{EQ2} / b$	$a = 8; k_5^{\text{cl}} = 2.86 \times 10^5$ $b = 4; K_{EQ5} = 32 / 4$		$a = 6.4; k_5^{\text{cl}} = 4.63 \times 10^5$ $b = 5; K_{EQ5} = 20 / 5$	
Первый электрон в Q_B -сайт, k_7	3.2			
K_{EQ7}	20–16		12.5–10	
Второй электрон в Q_B -сайт, k_{14}	1.75			
K_{EQ14}	8–10			
Выход PQH_2 в фазу мембраны, k_{21}	0.8			
Диссипация ${}^1\text{Chl}^*$ в антенне k_{HD}	$(3+12) \cdot 10^4$	$(3+38) \cdot 10^4$	$(2+10) \cdot 10^4$	
Закрытые РЦ, безизлучательная рекомбинация зарядов $\text{P680}^+\text{Phe}^-$, k_{42-45}	$1.3 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^5$	
	$5.0 \cdot 10^5$	$5.8 \cdot 10^5$	$2.2 \cdot 10^5$	
	$6.4 \cdot 10^5$	$6.8 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^5$	
Безизлучательная рекомбинация зарядов $\text{P680}^+\text{QA}^-$, k_{46-49}	1.5	1.8	2.2	
	1.8	2.0	2.8	
	3.0	3.2	3.8	
Электронтранспортная цепь				
Световая константа	0.56, 0.48	0.84, 0.48	0.64	0.62
Комплекс $\text{Cyt } b_6/f, b_L \rightarrow b_H$, V52	0.30	0.42–0.40	0.48	0.72
Циклический транспорт вокруг ФСИ, V58, V59	0.008, 0.01		0.015, 0.001	
Электрохимический потенциал				
Стационарное состояние рН люмена	6.53	6.44	6.84	6.83
Стационарное состояние рН стромы	8.44	8.46	8.32	8.27

Примечание. Значения параметров получены при достижении в вычислениях адекватной динамики редокс-превращений катион-радикала P700^+ [39, 40] вместе с фитированием модели ТМ по измерениям ИФ на клетках *Scenedesmus* и *Chlorella* (рис. 5б и 6в); $(\text{QA})^-$ – открытые, (QA^-) – закрытые реакционные центры.

вращений катион-радикала P700^+ [25, 38, 39] вместе с фитированием модели тилакоидной мембраны по измерениям ИФ на клетках *Scenedesmus* и *Chlorella* (рис. 5б и 6в). Параметры переноса зарядов, индуцированного светом высокой и умеренной интенсивности в клетках *Scenedesmus*, даны в столбцах «60%» и «40%». Столбцы «26 ч» и «48 ч» показывают результаты для культуры *Chlorella* на стадиях роста 26 и 48 ч. Величина

параметра, одинаковая для вариантов расчетов, помещается в одной ячейке.

1. Реакции переноса электронов в фотосистеме II. Из табл. 1 видно, что параметры переноса электронов по редокс кофакторам реакционных центров ФСИ близки по величинам или совпадают для микроводорослей *Scenedesmus* и *Chlorella*.

В вычислениях кинетическая константа скорости восстановления Phe была принята равной $3.2 \cdot 10^8 \text{мс}^{-1}$ (табл. 1), но зависела [4, 5, 11] также от

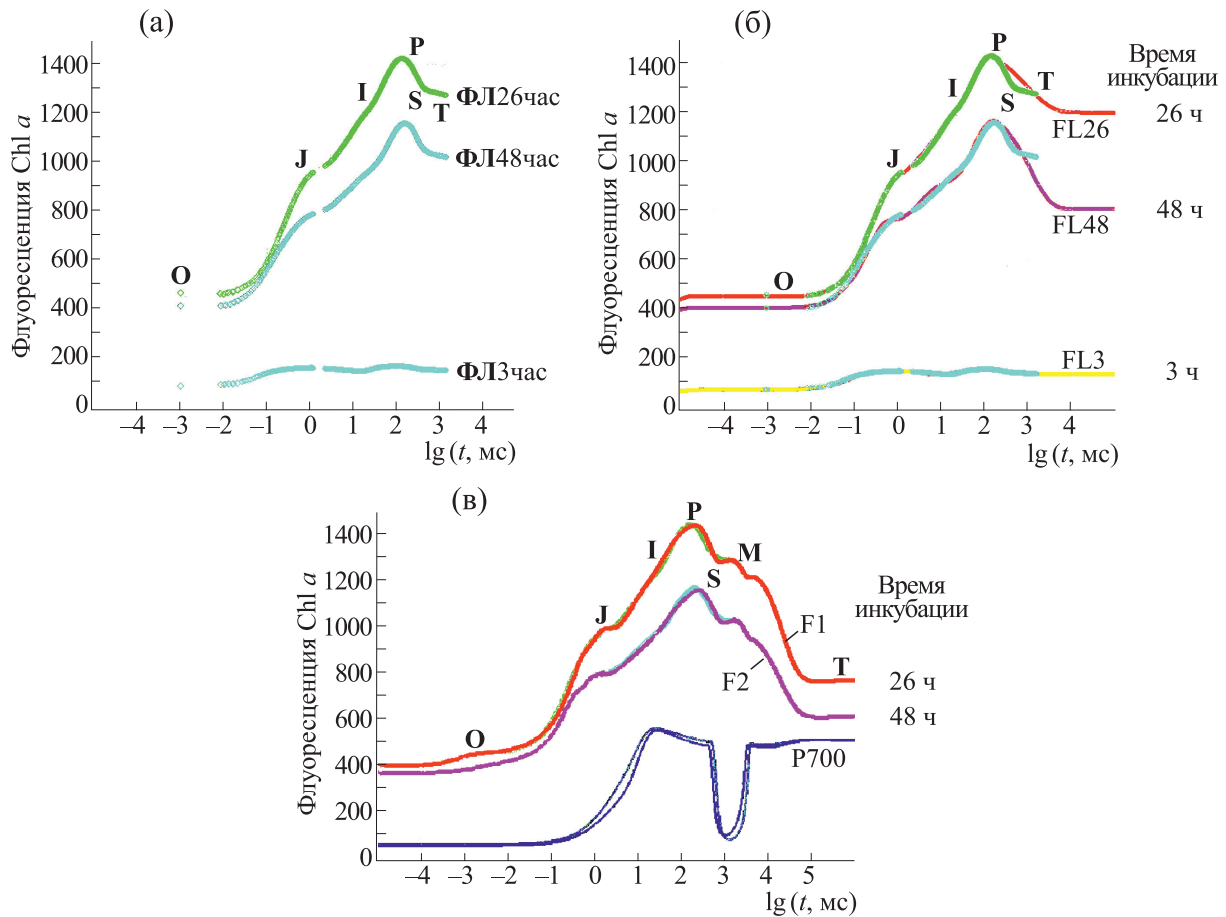


Рис. 6. Фитирование модели изолированной ФСII и модели тилакоидной мембраны по измерениям на клетках *Chlorella vulgaris* при действии света $2000 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. (а) – Измерения индукции флуоресценции в интервале времени от 5 мкс до 2 с на образцах *Chlorella* стадий роста 3, 26 и 48 ч (ФЛ-3, ФЛ-26 и ФЛ-48 соответственно). (б) – Результаты фитирования «малой» модели ФСII расчетными кривыми ИФ FL3, FL26, FL48 по измерениям ИФ на стадиях OJIPS-фаз. (в) – Модель ТМ [25] количественно воспроизводит в расчетах ИФ F1 и F2 (см. табл. 1, «26 ч» и «48 ч») OJIPS-кинетику ИФ культуры *Chlorella* стадий роста 26 и 48 ч. Расчетный ход кривых флуоресценции на временах $t > 10$ с и моделирование динамики редокс-превращений катион-радикала P700^+ соответствуют известным данным [39, 40].

параметра эффективного количества пигментов антенны $A_{\text{Eff}} = N_{\text{Ant}}$, который оказался различным для двух таксонов. Кинетика обратной реакции возбуждения антенн $^1(\text{Chl-P680})^*$ зависит от констант равновесия K_{EQ2} и K_{EQ5} , показанных в табл. 1 с учетом факторов a и b снижения эффективности разделения зарядов в закрытых (с Q_A^-) по сравнению с открытыми (Q_A) РЦ.

Согласно схеме модели ФСII (рис. 4), перенос электронов от донорной на акцепторную сторону ФСII и восстановление пула хинонов определены через константы скоростей реакций $k_{7,14}$ и k_{21} . Количественное описание выявляет одинаковые для двух таксонов *Scenedesmus* и *Chlorella* величины $k_{7,14} = 3.2, 1.75 \text{ мс}^{-1}$ и $k_{21} = 0.8 \text{ мс}^{-1}$ при неко-

торых отличиях констант равновесия $K_{\text{EQ7,14,21}}$. Однако величины параметров, выявляемых для *Chlorella*, необходимо в будущем проверить на основе измерений более длительных, чем 10 с.

2. *Диссипативные реакции рекомбинации зарядов в фотосистеме II.* Описание реакций ФСII (рис. 3 и 4) учитывает тепловые потери при диссипации возбужденных состояний антенн (k_{D}) либо при рекомбинации зарядов (k_{42+49}).

Четыре строки модели ФСII отличаются типом редокс-компонент Q_B -сайта, когда возможны следующие состояния вторичного хинона: нейтральный (Q_B), отсутствует (P_{empty}), восстановленный (Q_B^-), дважды восстановленный и протонированный (Q_BH^-). При анализе ИФ

Таблица 2. Константы скорости безызлучательной рекомбинации зарядов $P680^+Phe^-$ (k_{42}) и $P680^+Q_A^-$ (k_{46})

Реакции рекомбинации	$Phe^- \rightarrow P680^+$ (k_{42} , $мс^{-1}$)	Q_A^- и $P680^+$ (k_{46} , $мс^{-1}$)
Модель фотосистемы II Лист гороха	1200 и 300 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	$2.75 = 5.5 \cdot 10^8 / 2 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	30%, 5800 и 4500 с ⁻¹
Модель тилакоида <i>Synechocystis</i>	3000 и 1000 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	$3.2 = 4.0 \cdot 10^8 / 1.25 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	55%, 2800 и 1800 с ⁻¹
Модель тилакоида <i>Scenedesmus</i>	1800 и 1200 мкмоль фотонов·м ⁻² ·с ⁻¹	
	15.4%, $1.5 \cdot 10^8$ и $1.3 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$	20%, 1800 и 1500 с ⁻¹

Примечание. Константы фитированы для двух интенсивностей актиничного света для строки модели ФСII (рис. 4) с нейтральным Q_B .

микроводоросли *Scenedesmus* для каждой из строк нами выявлены константы скоростей рекомбинации зарядов: для $Phe^-P680^+ - k_{42-45}$ и для $Q_A^-P680^+ - k_{46-49}$ (табл. 1). Рассмотрим результат на примере освещенности PFD 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Реакции безызлучательной рекомбинации зарядов протекают одинаково, если в Q_B -сайте вторичный хинон нейтрален или отсутствует, а именно, $k_{42} = k_{43} = 1.3 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$; $k_{46} = k_{47} = 1500 \text{ с}^{-1}$. Увеличение значений k_{44} до $5.0 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, а k_{48} — до 1800 с^{-1} (строка Q_B^-), и далее, k_{45} — до $6.4 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$, k_{49} — до 3000 с^{-1} (Q_BH^-) проявляется для тех состояний РЦ, в которых вследствие переноса электронов при освещении накоплен электростатический заряд на вторичном хиноне Q_B -сайта. Эффект, возможно, связан с влиянием локальных электрических полей, возникающих в РЦ при освещении на перенос электрона [52, 53].

Диссипативные потери образцов можно сравнить, изменяя в модели уровень поглощения фотонов. Полученные при двух интенсивностях потока света константы безызлучательной рекомбинации (k_{42-45} ; k_{46-49}) удобно сравнить для минимальных величин в нейтральном Q_B -сайте (k_{42} , k_{46}), приведенных в табл. 2. Измерения длительной ИФ микроводоросли *Scenedesmus* проведены здесь при освещении 1200 и 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Расчеты в модели тилакоида при полуторакратном различии в поглощении фотонов показывают увеличение безызлучательной рекомбинации $P680^+Phe^-$ на ~15% и $P680^+Q_A^-$ — на ~20%.

Параметры k_{42} , k_{46} увеличены в случае освещения 60% по сравнению с 40% (табл. 1) для РЦ с редокс состояниями Q_B , Q_B^- и Q_BH^- . Однако за-

висимость величин k_{42-45} ; k_{46-49} (табл. 1) от стадии роста *Chlorella* (26 и 48 ч) не выявлена.

В итоге результаты показывают возможности многопараметрического анализа системы ТМ и доказывают необходимость длительных измерений ИФ с целью наблюдения регуляторных процессов [5–7, 9, 40, 44, 45] и изучения их механизмов. Вместе с тем компактная модель ФСII применима в оперативном анализе с целью изучения и сравнения особенностей фотосинтетического аппарата выбранных объектов.

Фитопланктон каскада водоемов при «летовании». Фитопланктон (фитоценоз) — это сообщество планктонных организмов [8], которые могут осуществлять процесс фотосинтеза и являются первичным звеном трофической цепи водной экосистемы. Если состояние водоема стабильно, то можно полагать, что состояние фитоценоза характеризует водоем как объект исследования [8].

При летовании каскада трех проточных прудов бассейна реки Темерник наблюдались устойчивые режимы функционирования для каждого из водоемов. А именно, после «летования» в 2017 г. для среднего в каскаде пруда № 2 характерна чистая вода (контроль) и высокая продуктивность популяции малька. В то же время верхний по течению пруд № 1 существует в состоянии биологической деградации, а в нижнем пруду № 3 происходит цветение воды. Мы взяли пробы фитопланктона из трех прудов, измерили кривые ИФ (рис. 7а) и применили модельный анализ (рис. 7б,в) процессов ФСII для изучения состояния фитоценозов верхнего, среднего и нижнего прудов (№№ 1, 2 и 3 соответственно).

Анализ состояния фитопланктона водоемов в модели фотосистемы II. На рис. 7а показан ход кривых ИФ на интервале до 1 с при освещении постоянным светом неизменной интенсивности 4500 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ для проб фитопланктона, взятых с глубины 0.3 м от поверхности прудов №№ 1–3. На рис. 7а кривые ИФ трех

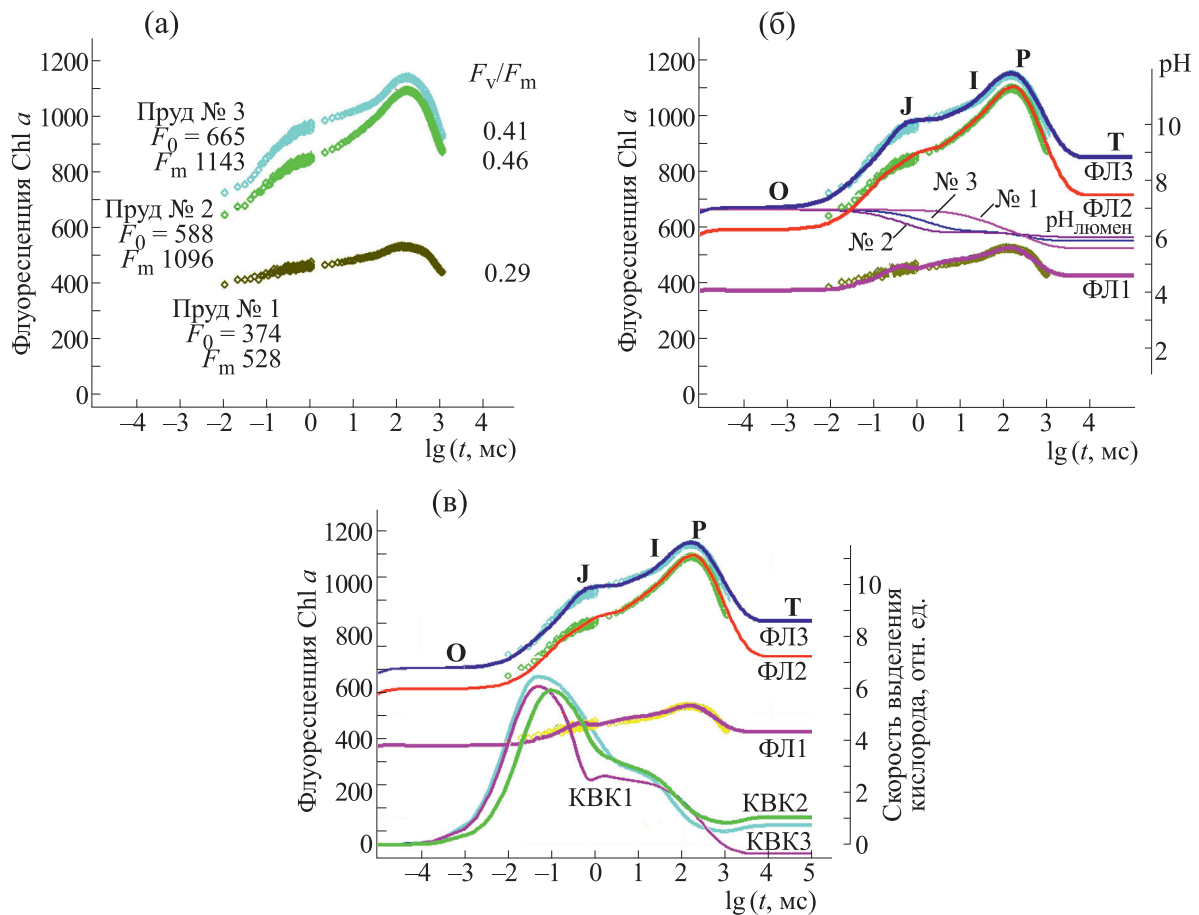


Рис. 7. Фитирование модели изолированной фотосистемы II по измерениям индукции флуоресценции на пробах фитопланктона каскада водоемов. (а) – Сигналы ИФ детектировали до 1 с при интенсивности актиничного света $4500 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на пробах фитопланктона трех водоемов в различном состоянии: средний в каскаде пруд № 2 (контроль), верхний по течению пруд № 1 (деградация), нижний пруд № 3 с цветением воды. Указаны также уровни максимума (F_m) и минимума (F_0) индукции флуоресценции. Значение $F_v/F_m = 0.46$ максимально для фитоценоза № 2. (б), (в) – Траектории индукции флуоресценции. ФЛ2, ФЛ1 и ФЛ3 фитируют модель ФСII (схема на рис. 4, табл. 3) по измерениям ИФ. (б) – Динамика закисления люмена $\text{pH}_{\text{люмен}}$ получена в расчетах для фитоценозов № 1, № 2, № 3 при стационарных значениях pH в люмене: $\text{pH}_{\text{№1}} = 5.2$, $\text{pH}_{\text{№2}} = 5.8$, $\text{pH}_{\text{№3}} = 5.5$. (в) – Траектории КВК-1-2-3 рассчитаны через сумму скоростей донирования электрона на P680^+ в четырех реакциях модели ФСII с $n = 4, 11, 18, 31$ (см. схему на рис. 4; константа скорости k_4 в табл. 3). Графики КВК-1-2-3 позволяют сравнить (в отн. ед.) уровни генерации кислорода фитоценозов № 1, № 2 и № 3.

водоемов не нормированы. Поэтому очевидны отличия начального и максимального уровней испускания флуоресценции F_0 , F_m и характера кинетических стадий нарастания ИФ. Очевидно, что переменная флуоресценция фитопланктона (выход F_v/F_0) для пробы «верхний пруд № 1» значительно снижена по сравнению с данными для водорослей *in vivo* (рис. 5а и 6а).

Оперативные вычисления в модели процессов ФСII фитированы по измерениям на пробах №№ 1–3. Модельные траектории ФЛ1, ФЛ2, ФЛ3 (рис. 7б,в) количественно воспроизводят кинетические стадии нарастания и начальной стадии спада ИФ, наблюдаемые для трех водое-

мов. Найденные в модели ФСII величины параметров собраны в табл. 3. Выше в табл. 1 набор параметров для *Chlorella* и *Scenedesmus* дан для более сложного расчета, когда блок модели ФСII включен в модель тилакоида.

Сравнение данных в табл. 1 и 3 выявляет близость или совпадение величин параметров процессов РЦ ФСII, найденных для двух монокультур микроводорослей и для проб фитопланктона. Так, совпадение констант равновесия или кинетических очевидно для переноса первого/второго электрона на пласто/семихинон (Q_B/Q_B^-) стромального сайта ФСII.

Таблица 3. Определение параметров в результате фитирования модели изолированной фотосистемы II по сигналам индукции флуоресценции для проб из каскада прудов

Номера реакций n и параметры k_n (мс^{-1}) / K_{Eqn}				Состояния и процессы
	Пруд № 1	Пруд № 2	Пруд № 3	Фитоценозы водоемов
k_1	0.24	0.48	0.48	Световая константа
A_{ntn}	80	200	200	A_{eff} – Эффективный размер антенн ФСII
$n = 2$	320000000 / A_{eff} ; 16			Первичное разделение зарядов открытых РЦ
k_{da}	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	Тепловая диссипация возбуждения антенны
$n = 7$	3.2/20			Перенос 1-го электрона на пластохинон Q_B -сайта
$n = 14$	1.6/10	1.6/8	1.6/10	Перенос 2-го электрона на семихинон Q_B -сайта
$n = 21$	0.4/1.6	0.4/1.6	0.8/2	Выход PQH_2 в фазу мембраны
$n = 34$	0.2/0.1	0.2/0.1	0.1/0.8	Заполнение Q_B -сайта молекулой хинона
$n = 41$	0.05/5000			Отток электронов от ФСII при окислении PQH_2
$n = 46$	2.4	2.4	1.4	Безизлучательная рекомбинация $P680^+QA^-$
$n = 42$	$4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	10^5	Рекомбинация зарядов $P680^+Phe^-$ закрытых РЦ
k_4	1.4	4.0		Константы скорости донирования электрона на катион радикал $P680^+$
k_2/a ; K_{Eq2}/b	$a = 5$ $b = 8$	$a = 5$ $b = 8$	$a = 5$ $b = 10$	Факторы a и b разделения зарядов в закрытых РЦ

Примечание. Состояние прудов: непродуктивный (№ 1), «контроль» (№ 2), цветущий (№ 3).

Паттерны флуоресценции фитоценоза как маркеры состояния водоемов. Параметр тепловой диссипации (k_D) в антенне (формула (5)) согласно табл. 3 отличается для трех фитоценозов: $5 \cdot 10^4 \text{ мс}^{-1}$ – № 2 (контроль), $8 \cdot 10^4 \text{ мс}^{-1}$ – № 3 (цветение), $2 \cdot 10^5 \text{ мс}^{-1}$ – № 1 (деградация). Таким образом, потери энергии света за счет тепловой диссипации в антенне РЦ ФСII увеличены по сравнению с величиной в контроле на 60 и 300% для водоемов ниже и выше по течению соответственно. Интенсивность света, вызывающая сигналы ИФ, одинакова для проб фитоценозов и не может быть причиной различий величин параметра $k_{da} = k_D$.

Модель ФСII объясняет усиление тепловой диссипации в антеннах степенью закисления люмена при освещении. Действительно, фитированию кривых ИФ проб №№ 1–3 на рис. 7б соответствуют три варианта расчетов кинетики рН люмена тилакоидных мембран с минимальным рН для верхнего водоема № 1. Стационарный уровень рН люмена для проб №№ 1–3 составил $\text{pH}_{\text{№1}} = 5.2$, $\text{pH}_{\text{№2}} = 5.8$ и $\text{pH}_{\text{№3}} = 5.5$ соответственно.

Состав фотосинтезирующих компонент фитопланктона каждого из трех прудов не изучался. Однако нами измерено содержание форм хлорофилла в пробах №№ 1–3. Суммарное возрастание концентрации Хл в прудах № 2 и № 3 по сравнению с верхним прудом № 1 согласуется с результатом фитирования эффективного размера антенн комплекса ФСII – A_{eff} . Размер антенн, равный 200, получен для прудов № 2 и № 3 и снижен до 80 для пруда № 1, находящегося в состоянии биологической деградации.

В модели ФСII, фитированной по ИФ фитопланктона, траектории «КВК1–3» на рис. 7в выявляют генерацию O_2 при условии, что эти траектории рассчитаны как сумма скоростей донирования электрона на $P680^+$ в четырех реакциях модели ФСII с $n = 4, 11, 18, 31$.

Очевидно, что генерация O_2 падает (до нуля) при моделировании фитоценоза неполноценного пруда № 1 (КВК1) по сравнению с фитоценозом «контроль» (КВК2), в то время как в цветущем пруду № 2 (КВК3) уровень генерации O_2 сохраняется. Результаты объяснимы снижением от 4000 до 1400 с^{-1} скорости восстановления $P680^+$,

усредненной по S_j -состояниям КВК (табл. 3, « k_4 », «Пруд 2», «Пруд 1»).

Результаты моделирования процессов ФСII на основе анализа быстрых кривых ИФ фитопланктона предоставили параметры, соотносимые с типом каждого из трех водоемов. Однако, для анализа механизмов процессов, стоящих за отличиями фитоценозов, необходимо получить расчеты в полной модели тилакоида по длительным измерениям ИФ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерения длительной ИФ на клетках *Scenedesmus* получили в интервале от 20 мкс до 10 мин в ответ на свет сильной и умеренной интенсивности (точки ФЛ1-60% и ФЛ2-40%, рис. 5а) и фитировали в модели тилакоидной мембраны (траектории FL1 и FL2, рис. 5б, табл. 3). В результате фитирования определены значения параметров процессов в системе ТМ (рис. 1), последовательность и динамика процессов переноса электронов и энергизации мембраны на интервале времени от пикосекунд до 100 с.

Энергозависимое qE-тушение в антенне фотосистемы II. В результате фитирования модели ТМ по ИФ клеток *Scenedesmus*, вызываемой светом 60%, на рис. 8а можно выявить динамику компонент энергизации мембраны тилакоида – рН люмена и стромы ($pH_L(t)$, $pH_S(t)$), а также электрического потенциала ($\Delta\Psi(t)$). Вместе с траекториями pH_L , pH_S , $\Delta\Psi$ дан график $k_D(t)$ ($k_{D_{Ant}}$, рис. 8а), определяющий ход во времени динамического параметра $k_D(t) = k_{D_{const}} + k_{D_{var}} \cdot q(t)$ согласно уравнениям (7) и (8). Динамика $k_D(t)$ указывает на диссипативные потери в антенне ФСII путем распада $^1Chl^*$ (рис. 3 и формула (5)) и может быть объяснена быстрой фазой NPQ тушения (в интервале ~ 1–2 мин) в ответ на освещение образца после темновой адаптации [6, 35–37, 42]. Эту компоненту NPQ обычно обозначают как энергозависимое qE-тушение, вызванное снижением люменальной рН.

Действительно, график $k_{D_{Ant}}$ (рис. 8а) указывает на низкий уровень диссипации энергии в антенне в соответствии с базовой величиной $k_{D_{const}} = 3 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$, неизменной в интервале $t < 10$ с после темновой адаптации образца. Для микроводоросли *Scenedesmus*, величина $k_{D_{const}}$ не зависит от интенсивности света (табл. 3). Параметр $k_{D_{var}}$ в формулах (7) и (8) определяет максимальный уровень потерь энергии в антенне согласно $k_{D_{var}} = 3.8 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ или $1.2 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ в зависимости от сильной или средней интенсивности света (табл. 1, столбцы 60% или 40%). В интервале $t > 10$ с динамика закисления люмена до значения

$pH_L|_{Trigg} = 6.7$ коррелирует с возрастанием qE-тушения в расчетах не только для 60%-го (рис. 8а, траектории pH_L , k_{D-qE}), но и для 40%-го освещения (не показано).

Динамика линейного и циклического переноса электронов при действии света. Как известно, поглощение фотона и экситонное возбуждение $^1Chl^*$ -антенн в светозахватывающих белковых комплексах приводит к переносу энергии в РЦ и разделению зарядов в ФСII на временах 10^{-11} – 10^{-8} с. Стабилизация электрона на $Q_A^{-1}(Chl-P680)^*Phe \leftrightarrow Phe^-P680^+Q_A \rightarrow PheP680^{(+)}Q_A^-$ (за ~300 пс) и последующий перенос $Q_A^{-1} \rightarrow Q_B^{(0)}$ (за сотни микросекунд) приводят к накоплению закрытых РЦ (рис. 8б, траектория ΣQ_A^-). Последующее замедление оттока электронов от ФСII происходит при обмене молекул PQH_2 на PQ при диффузии PQH_2 от стромальной стороны мембраны к люменальной (рис. 8б, PQH_{2S} и PQH_{2L}) и при транспорте электронов $PQH_2 \rightarrow Cyt\ b_6f \rightarrow PC \rightarrow FCI$. Фотохимическое разделение зарядов и закрытие РЦ ФСII происходит всегда быстрее последующего «открытия РЦ» и оттока электронов от PQH_2 в интервале времени 10^{-3} с.

Генерация возбуждения $^1(Chl-P680)^*$ определяется световой константой k_L , значение которой зависит от сечения поглощения фотонов фотосистемой II и интенсивности света [30]. Фитирование модельных кривых ИФ при увеличении k_L от 560 до 840 с^{-1} показало возрастание амплитуды сигнала ИФ (FL2 и FL1, рис. 5а) и ускорение стадий OABCD окисления–восстановления P700 (P_{7002} и P_{7001} , рис. 5а). «Давление возбуждения» на систему преобразования энергии света может привести к разрушению целостности компонент ЭТЦ за счет избытка электронов и появления активных форм кислорода. На схеме модели ТМ (рис. 1) процесс, обозначенный знаком \oplus , соответствует предотвращению действия избыточного возбуждения за счет процесса qE-тушения при энергизации мембраны тилакоида.

Фитирование параметров в формуле (8) (см. раздел «qE-тушение») показало, что при увеличении световой константы k_L в полтора раза (от 560 до 840 с^{-1}) константа $k_{D_{var}}$ усиленной диссипации энергии в этих условиях возрастает в три раза, $k_{D_{var}} = 1.2 \cdot 10^8$ и $3.8 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ (табл. 1). Иными словами, усиление распада $^1Chl^*$ под влиянием qE-тушения ($k_{D_{Ant}}$, рис. 8а) обеспечивает защиту системы ТМ в антенных комплексах ФСII в ответ на увеличение k_L . Моделирование показывает, что при действии постоянного света энергозави-

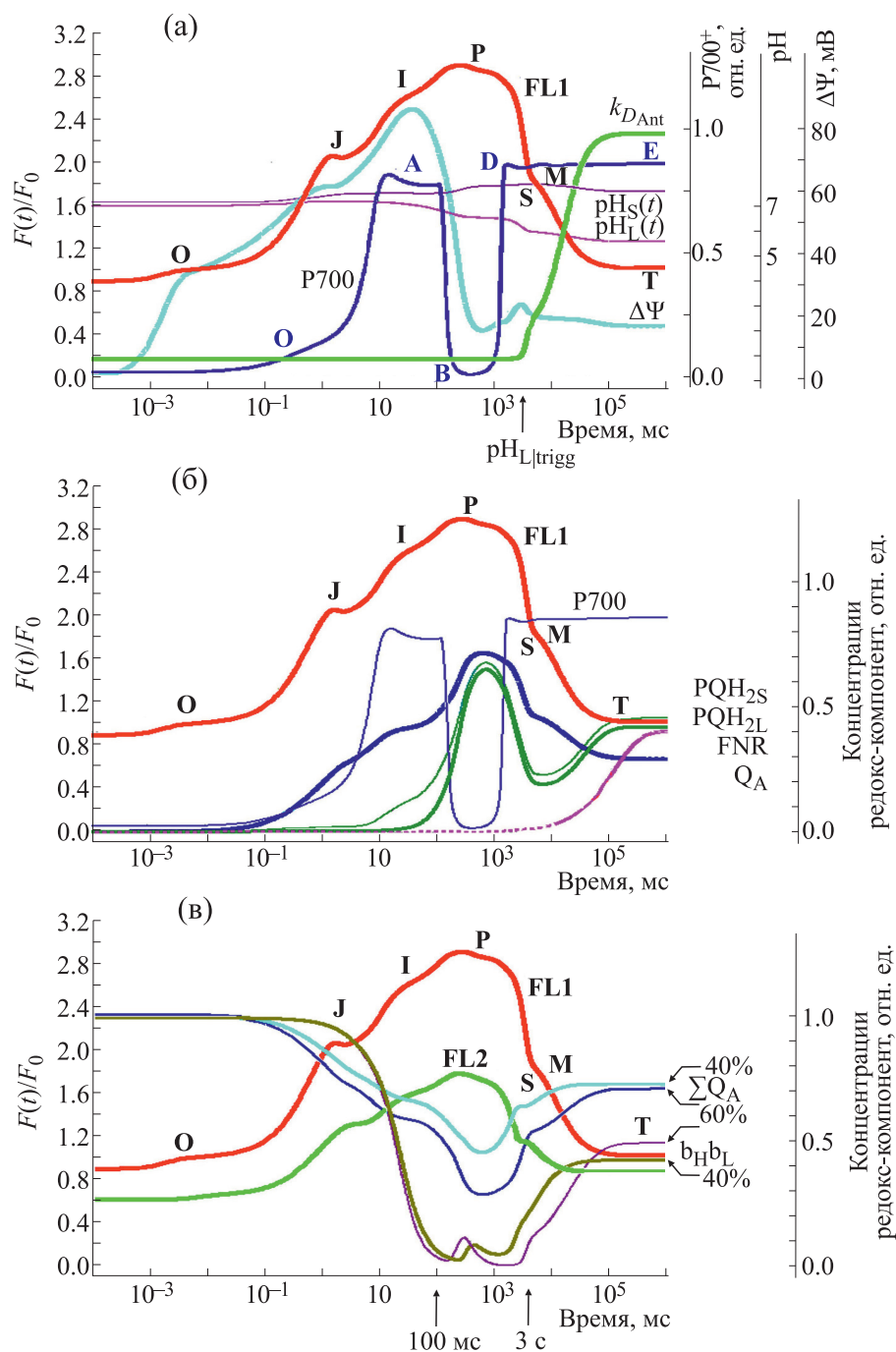


Рис. 8. Динамика компонент системы тилакоидных мембран, моделируемая для микроводоросли *Scenedesmus obliquus*. Траектории FL1 и P700 – расчет индукции флуоресценции, фитированной по ИФ клеток *Scenedesmus* (рис. 5а, ФЛ1) и редокс-превращений P700 ФСII (рис. 5б, FL1, P700-60%). (а) – Стадии энергизации мембраны связаны с изменениями pH люмена $pH_L(t)$, pH стромы $pH_S(t)$ и электрического потенциала $\Delta\Psi(t)$. Изменения динамической константы скорости диссипации энергии в антенне ФСII представлены графиком $k_{D_{Ant}}$ (формула (8) для $k_D(t)$), выявляють запуск qE-тушения при закислении люмена до $pH_{L|trigg} = 6.7$. (б) – Рассчитаны: ΣQ_A^- – закрытые формы РЦ ФСII с Q_A^- , PQH_{2S} и PQH_{2L} – степень восстановленности пула хинолов на стромальной и люменальной сторонах мембраны, FNR – динамическая константа скорости активации FNR-редуктазы $k_{FNR}(t)$ (формула (9)). (в) – Концентрации редокс-компонент рассчитаны на основе фитирования модели ТМ для освещенности 60% и 40% (см. рис. 5б). Динамика открытых РЦ ФСII (ΣQ_A -60% и ΣQ_A -40%) определяет фотохимическое qP-тушение. Графики $b_{L/H-60\%}$ и $b_{L/H-40\%}$ – расчет состояний S_{yt} bf без электронов на b_L - и b_H -гемах. Стрелками выделен интервал времени 100 мс $< t < 3$ с, в котором отличия $b_{L/H-60\%}$ и $b_{L/H-40\%}$ указывают на роль комплекса S_{yt} bf в световой адаптации системы ТМ.

симое qE-тушение включается в интервале $1 \text{ с} < t < 10 \text{ с}$ и возрастает до максимума в интервале $10 \text{ с} > t < 100 \text{ с}$ (k_{DAnt} , рис. 8а), усиливая спад интенсивности флуоресценции на медленной PSMT-стадии ИФ на фоне энергизации мембраны (график FL1, рис. 8а).

Индукцированные светом ЛПЭ и ЦПЭ (схема 1, рис. 1) дают вклад в формирование трансмембранного градиента протонов. Перенос электронов от Fd^{I} в стромальный сайт $\text{Cyt } b_f$ с последующим окислением PQH_2 и восстановлением PC в люменальном сайте формирует ЦПЭ вокруг ФCI, обеспечивая генерацию АТФ без продуцирования NADPH.

Известно [6, 40], что при активации стромальных метаболических циклов на кривой ИФ появляется фаза SM. Действительно, в нашей модели ТМ при фитировании ИФ *in vivo*, до 100 с после темновой адаптации, выявляется процесс световой активации FNR-редуктазы на стадии SM-фазы (график FNR, рис. 8б) при соотношении АТФ:NADPH = 1.52:1 в стационарном состоянии. Этот результат совпадает с литературными данными [6, 10] о таком же соотношении метаболитов (АТФ/NADPH = 1.5) при оптимальном режиме работы стромальных циклов.

Роль цитохромного комплекса b_6f в переносе электронов. Роль цитохромного комплекса $\text{Cyt } b_6f$ на стадиях переноса электронов между ФCII и ФCI анализировалась на основе фитирования траекторий (FL1 и FL2, рис. 5б) на временах от микросекунд до 100 с по измерениям кривых ИФ на клетках *Scenedesmus* (точки ФЛ1-60% и ФЛ2-40%, рис. 5а).

В условиях темновой адаптации гемы $b_L b_H$ комплексов $\text{Cyt } b_f$ нейтральны и не заполнены электронами (модель ТМ, рис. 1 и 2а, компонента fl). В переходах «темнота–свет» динамика процессов с участием подсистем ФCII, пул PQ/PQH_2 , $\text{Cyt } b_f$, ФCI (рис. 8б) связана с динамикой редокс-состояния гемов $b_L b_H$ ($b_{L/H}$), рассчитанной при $k_L = 560$ и 840 с^{-1} на рис. 8в.

На временах до $t < \sim 10 \text{ мс}$ степень восстановления гемов за счет ЦПЭ не зависит от k_L (рис. 8в, траектории $b_{L/H1}$ и $b_{L/H2}$). В интервале до 100 мс, согласно результатам вычислений, быстрые кинетические стадии ИФ (ОЛ) и изменений P700 катион-радикала (ОАВ) связаны с увеличением доли РЦ ФCII с Q_A^- и окислением P700 (рис. 8б, ΣQ_A^- и P700^+) в условиях независимой работы каждой из фотосистем – ФCII и ФCI.

В интервале $100 \text{ мс} < t < 3 \text{ с}$ степень восстановления $\text{Cyt } b_f$ максимальна, что отражает очередное заполнение компонент ЭТЦ электронами.

(1) Восстановление P700 на стадии «В» паттерна OABCDE P700 (рис. 8б) происходит в процессе ЦПЭ из пула Fd^{I} (схема 1, раздел «Структура модели ТМ»). (2) Формирование пула PQH_2 происходит параллельно с накоплением закрытых РЦ ФCII (рис. 8б). При этом восстановленные на стромальной стороне мембраны молекулы PQH_2 диффундируют (траектории PQH_{2S} и PQH_{2L} , рис. 8б) к люменальному сайту $\text{Cyt } b_f$.

Согласно вычислениям с $k_L = 560$ и 840 с^{-1} (траектории ΣQ_A -40% и ΣQ_A -60%, рис. 8в), фотохимическое тушение в ФCII определяется количеством открытых РЦ (ΣQ_A). Очевидно, что при световой индукции накопление закрытых РЦ (с Q_A^-) достигает 65% при освещении 1800 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ и 54% степени восстановленности РЦ при 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Максимальная восстановленность гемов $b_{L/H}$ поддерживается на более длительном интервале времени до 3 с при $k_L = 840 \text{ с}^{-1}$ по сравнению с интервалом до 1 с при 560 с^{-1} ($b_{L/H1}$ -60% и $b_{L/H2}$ -40%, рис. 8в). Этому сопутствует снижение фотохимического тушения при усилении освещения (ΣQ_A 60% в сравнении с ΣQ_A 40%).

Согласно расчетам при $k_L = 840 \text{ с}^{-1}$ превышение скорости ЛПЭ над ЦПЭ достигается за время около 1 с (здесь не показано) на начальной стадии активации FNR-редуктазы (траектория FNR, рис. 8б). Последующее усиление ЛПЭ ведет к снятию блокировки оттока электронов на стромальной стороне ФCI. Вслед за тем вторичное окисление P700 на стадиях CDE паттерна OABCDE редокс-превращений P700 (P700, 8б) и терминальное восстановление пула PQH_2 (PQH_2 , рис. 8б) достигают стационарного уровня в интервале 1–2 мин, когда переходы ФCII → PQ/PQH₂ → $\text{Cyt } b_6f$ → PC → ФCI взаимно согласованы при световой активации FNR-редуктазы (FNR, рис. 8б).

В целом на стадии заполнения гемов $b_{L/H}$ электронами обеспечивается согласование процессов в ФCII и ФCI в течение интервала времени $100 \text{ мс} < t < 2 \text{ с}$ и одновременное формирование на этом этапе максимумов восстановленности РЦ ФCII, хинолов PQH_2 , РЦ ФCI.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация системы тилакоидных мембран к режиму освещения сопровождается индукционными сигналами ФЛ Chl a и изменениями поглощения P700. В данной работе измерения ИФ микроводоросли *Scenedesmus* проводили на временах до 10 мин при плотности потока квантов

света 1800 и 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (высокая и умеренная интенсивности). Фитирование модели ТМ по данным ИФ клеток *Scenedesmus* позволило получить количественное совпадение модельных траекторий ИФ (FL1-60% и FL2-40%, рис. 5б) и детектируемых в опытах сигналов ОЛПСМТ (ФЛ1 и ФЛ2, рис. 5а) на временах до 100 с на быстрых (ОЛР) и медленных (ПСМТ) стадиях. Динамика изменения переменных в модели ТМ, рассчитанная до $t < 2$ мин, соответствует (рис. 8а–в) изменениям компонент системы ТМ в ответ на поглощение света в антенне ФСII и ФСI.

На свету происходит генерация состояний $\text{Phe}^- \text{P680}^+$ и $\text{Q}_A^- \text{P680}^+$ с разделенными зарядами, что сопровождается их рекомбинацией с константами скоростей k_{42-45} и k_{46-49} (табл. 1) и потерями энергии, запасенной в фотохимическом процессе. В расчетах обнаружено увеличение констант скоростей рекомбинации зарядов в РЦ с восстановленным вторичным хиноном Q_B -сайта (Q_B^- , Q_BH^-), что может быть связано с влиянием локальных электрических полей [52, 53]. Адаптация системы тилакоидных мембран к освещению отражается в динамике процессов в закрытых и открытых РЦ ФСII, восстановления/окисления пула PQ/PQH_2 и кофактора P700 РЦ ФСI. Это влияет на характер модельных траекторий ΣQ_A^- и ΣQ_A , PQH_2 , P700^+ на рис 8б, построенных по данным ИФ клеток *Scenedesmus*.

Стадии эволюции состояния системы ТМ в интервале времени $t < 2-3$ с связаны с генерацией трансмембранной разности $\Delta\text{pH}_{\text{O}_2}(t) = \text{pH}_S(t) - \text{pH}_L(t)$ (рис. 8а) и реализуются в регуляторной перестройке процессов ТМ, как показано *in silico* на рис. 8а–в.

При освещении поступление протонов в люмен при $\text{pH}_L|_{\text{Trigg}} = 6.7$ инициирует энергозависимое qE-тушение (k_{DAnt} , рис. 8а), максимально возрастающее в интервале $10 \text{ с} > t < 100 \text{ с}$. В результате pH-зависимой регуляции возбуждения в антенне (раздел «Структура модели», формула (8)) происходит снижение интенсивности ФЛ на медленной ПСМТ-стадии ИФ при согласовании фотохимического qP-тушения с оттоком электронов из системы ТМ.

Такое согласование отражается в характере терминального окисления P700 на стадии «Е» паттерна OABSCDE P700^+ , когда происходит снятие блокировки оттока электронов на стромальной стороне ФСI при активации на свету неактивной в темноте FNR-редуктазы, (траектории P700^+ и FNR, рис. 8б). Таким образом, усиление оттока электронов от Fd^I в реакции ЛПЭ $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$ становится зави-

симым от константы скорости $k_{\text{FNR}}(t)$ (раздел «Структура модели», формула (9)).

В целом теоретический анализ индуцированных процессов в тилакоидных мембранах клеток *Scenedesmus* показывает, что стационарные редокс-состояния компонент ЭТЦ определены взаимным согласованием потоков ЛПЭ и ЦПЭ на временах от пикосекунд до 1–2 мин в условиях активации FNR-редуктазы и qE-тушения.

В данной работе результаты моделирования сигнала ИФ, детектируемой до 2 с на культуре *Chlorella*, позволили оценить предел времени, в котором достигается фитирование данных по ИФ с применением модели изолированной ФСII либо модели ТМ. Применение модели ФСII при обработке сигналов ИФ, измеренных до 1 с на пробах фитопланктона, позволило получить параметры реакций РЦ ФСII фитоценозов для каждого из трех водоемов – экологически полноценного, цветущего, деградирующего. Отличия кривых ИФ, наблюдаемых для фитоценозов, связаны с разницей в величинах малого набора параметров, которые нами предложено использовать в качестве характеристик (маркеров) состояния фитоценозов природных водоемов.

С целью анализа механизмов процессов, стоящих за отличиями сигналов ИФ необходимо исследовать монокультуры микроводорослей в контролируемых лабораторных условиях, используя данные, полученные при длительной, до минут, световой индукции образцов оксигенного фотосинтеза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим сотрудницу кафедры биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. Е.В. Воронову за предоставление образцов микроводоросли *Scenedesmus obliquus*. Мы благодарны также проф. С.И. Погосяну за полезные обсуждения и к.б.н. С. С. Хрущеву за техническую поддержку работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121032500060-0 и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00465), а также Российского научного фонда (проект № 22-11-00009).

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

- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, R. Steffen, et al., *Photosynth. Res.*, **98**, 105 (2008).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Photosynth. Res.*, **125**, 123 (2015).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, K. E. Klementiev, et al., *Photosynth. Res.*, **146** (1), 259 (2020).
- A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.*, **113**, 15 (2012).
- A. Stirbet D. Lazár, G. C. Papageorgiou, and Govindjee, In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, Ed. by A. K. Mishra, D. N. Tiwari, and A. N. Rai (Acad. Press, Elsevier, 2019), pp. 79–130.
- A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.*, **125**, 65 (2015). DOI: 10.1007/s11120-015-0094-0
- Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19), Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004).
- A. Н. Шаров, Дисс. ... д-ра биол. наук (Санкт-Петербургский науч.-исслед. центр экологической безопасности РАН, 2020).
- Н. Ф. Реймерс, *Экология. Теории, законы, правила, принципы и гипотезы* («Россия молодая», М., 1994).
- C. R. Ireland, S. P. Long, and N. R. Baker, *Planta*, **160**, 550 (1984)
- G. H. Schatz, H. Brock, and A. R. Holzwarth, *Biophys. J.*, **54**, 397 (1988)
- T. A. Roelofs, C. H. Lee, and A. R. Holzwarth, *Biophys. J.*, **61**, 1147 (1992)
- J. M. Bowes and A. R. Crofts, *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 373 (1980)
- R. J. Strasser, A. Srivastava, and Govindjee, *Photochem. Photobiol.*, **61**, 32 (1995)
- G. Renger and A. Schulze, *Photobiochem. Photobiophys.*, **9**, 79 (1985)
- E. Baake and J. P. Schlöder, *Bull. Math. Biol.*, **54**, 999 (1992)
- A. Stirbet, Govindjee, B. J. Strasser, and R. J. Strasser, *J. Theor. Biol.*, **193**, 131 (1998)
- D. Lazár, *J. Theor. Biol.*, **220**, 469 (2003)
- D. Lazár, *Photosynthetica*, **47** (4), 483 (2009)
- Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, О. В. Демин и др., *Биофизика*, **47**, 1044 (2002).
- R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, In *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19), Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 321–362.
- A. А. Волгушева, О. В. Яковлева, Г. П. Кукарских и др., *Биофизика*, **56** (1) 105 (2011).
- A. Stirbet, D. Lazár, J. Kromdijk, and Govindjee, *Photosynthetica*, **56**, 86 (2018).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, *Photosynth. Res.*, **130**, 491 (2016).
- N. Belyaeva, A. Bulychev, G. Riznichenko, and A. Rubin, *Photosynth. Res.*, **140**, 1 (2019).
- G. Riznichenko, G. Lebedeva, O. Demin, and A. Rubin, *J. Biol. Phys.*, **25**, 177 (1999).
- G. V. Lebedeva, N. E. Beljaeva, G. Yu. Riznichenko, and O. V. Demin, in *BioThermoKinetics in the Post Genomic Era*, Ed. by C. Larsson, I. Pahlman and L. Gustafsson (Chalmers Reproservice, Goteborg, 1998), pp. 196–199.
- Н. Е. Беляева, Г. В. Лебедева, Г. Ю. Ризниченко и др., В сб. «Математика. Компьютер. Образование» (М., 2000), вып. 7, сс. 606–614.
- Н. Е. Беляева, Г. В. Лебедева и Г. Ю. Ризниченко, В сб. «Математика. Компьютер. Образование» (М., 2003), вып. 10, сс. 263–276.
- Н. Е. Беляева, Дисс. ... к-та физ.-мат. наук (МГУ им. М. В. Ломоносова, М., 2004).
- Н. Е. Беляева, В. З. Пашенко, Г. Ренгер и др., *Биофизика*, **51** (6) 976 (2006).
- N. E. Belyaeva, A. A. Bulychev, G. Yu. Riznichenko, and A. B. Rubin, *Biophysics*, **56** (3) 464 (2011a).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *BioSystems*, **103** (2), 188 (2011b).
- N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **77**, 49 (2014).
- O. Ebenhöf, G. Fucile, G. Finazzi, et al., *Philos. Trans. R. Soc. B*, **369**, 20130223 (2014).
- A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.*, **130**, 193 (2016).
- A. Laisk, H. Eichelmann, and V. Oja, *Photosynth. Res.*, **90**, 45 (2006).
- A. A. Bulychev, A. A. Cherkashin, E. M. Muronets, and I. V. Elanskaya, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, **1859**, 1086 (2018)/
- V. V. Ptushenko, T. V. Zhigalova, O. V. Avercheva, and A. N. Tikhonov, *Photosynth. Res.*, **139**, 509 (2019).
- I. V. Elanskaya, A. A. Bulychev, E. P. Lukashev, and E. M. Muronets, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1862**, 148318 (2021).
- G. C. Papageorgiou, M. Tsimilli-Michael, and K. Stamatidis, *Photosynth. Res.*, **94**, 275 (2007).
- G. Schansker, S. Z. Tóth, and R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 787 (2006).
- S. Kodru, T. Malavath, E. Devadasu, et al., *Photosynth. Res.*, **125**, 219 (2015).
- A. Morales, X. Yin, J. Harbinson, et al., *Plant Physiol.*, **176**, 1247 (2018)
- A. Stirbet, D. Lazár, Y. Guo, and Govindjee, *Ann. Botany*, **126**, 511 (2020).
- P. V. Fursova, E. N. Voronova, A. P. Levich, et al., *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* **72** (4), 184 (2017).
- С. И. Погосян, С. В. Гальчук, Ю. В. Казимирко и др., *Вода: химия и экология*, **6**, 34 (2009).

48. G. E. Milanovsky, A. A. Petrova, D. A. Cherepanov, and A. Y. Semenov, *Photosynth. Res.*, **133**, 185 (2017).
49. M. J. Kamali, G. V. Lebedeva, O. V. Demin, et al., *Biophysics*, **49**, 1061 (2004).
50. I. A. Reynolds, E. A. Johnson, and C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6869 (1985).
51. A. A. Bulychev, M. M. Niyazova, and A. B. Rubin, *Biologicheskie Membrany*, **4**, 262 (1987).
52. G. Schansker, S. Z. Toth, A. R. Holzwarth, and G. Garab, *Photosyn. Res.*, **120**, 43 (2014).
53. A. Laisk and V. Oja, *Photosynth. Res.*, **143**, 335 (2020).

Dynamics of *in vivo* Membrane Processes in Algal Thylakoids as Analyzed from Chlorophyll Fluorescence Induction Using the Photosystem II and Thylakoid Models

N.E. Belyaeva*, A.A. Bulychev*, V.Z. Paschenko*, K.E. Klementiev**, P.A. Ermachenko***, I.V. Konyukhov*, G.Yu. Riznichenko*, and A.B. Rubin*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172, China

***New Pipeline Technology Company, ul. Schepkina, 51/4, bld. 1, Moscow, 129110 Russia

The OJPSMT pattern of Chl *a* fluorescence induction (FI) was obtained with microalgae cells *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) exposed after dark adaptation to moderate and high light intensities (1200 and 1800 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the time range from the microseconds to 10 minutes. The fast and, particularly, slow OJIPS(M)T stages of FI extending up to 100 seconds were quantitatively described by fitting the thylakoid membrane (TM) model. The calculations adequately reproduced the dynamics of P700 oxidoreduction transients. The parameters of the TM processes were determined, and the transients of the TM model variables are shown in calculations. The dynamic stages of redox reactions in the reaction centers (RCs) of the photosystem II (PSII), the PQ/PQH₂ quinone pool, the cytochrome *b₆f* complex (Cyt *b_f*), and P700 of PSI RCs are influenced by the adaptation of the TM system to light. *In silico* analysis revealed the role of the Cyt *b_f* in the regulation of electron fluxes, when b_{L/H} hemes remain in a more reduced state at high light intensity than at moderate illumination in the interval from 100 ms to 3 s. For non-radiative recombination of the separated charges in the RC Phe⁻P680⁺ and Q_A⁻P680⁺, the dependence of the rate constants k_{42-49} on the level of Q_B⁽²⁾⁻ reduction was revealed, together with the dependence of k_{42-49} on the illumination of chloroplasts. Setting the dynamic rate constants $k_{\text{FNR}}(t)$ and $k_{\text{D-qE}}(t)$ allows comparing the generation $\Delta\text{pH}_{\text{O-i}}(t) = \text{pH}_{\text{S}}(t) - \text{pH}_{\text{L}}(t)$, initiation of qE-quenching at $\text{pH}_{\text{L}}|_{\text{Trigg}} = 6.7$, activation in the light FNR — reductase, and reaching the stationary charge flows up to 1–2 minutes of light induction. The fitting model of isolated PSII according to phytoplankton FI signals revealed the similarity of electron transfer parameters in PS2 RCs in monocultures such as *Scenedesmus*, *Chlorella*, and phytoplankton samples. The markers of the phytocenosis condition deviated only in the case of the degradation of a water reservoir compared to an ecologically clean one. These differences in markers consist in the reduced size of the antennas, an enhanced energy dissipation, and the pH decrease in the lumen.

Keywords: photosystems I and II; chlorophyll a fluorescence induction; model simulation; electron and proton transfer; nonphotochemical quenching

ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ Na^+/K^+ -АТФазы

© 2022 г. О.В. Слатинская*, П.И. Зарипов**, Н.А. Браже*, И.Ю. Петрушанко**, Г.В. Максимов*, ***, #

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/24, Москва, 119991, Россия

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

***Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Ленинский просп., 4/1, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, инфракрасной спектроскопии и лазерной интерференционной микроскопии выявлены как изменения морфологии, так и изменения конформации гемоглобина в эритроците в результате увеличения соотношения $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы клетки. Установлено, что блокирование Na^+/K^+ -АТФазы приводит не только к увеличению $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ в клетке, но и к увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и белковой глобулы гемоглобина, а именно, снижение плотности упаковки молекулы гемоглобина, которые могут быть связаны как с сорбцией Na^+ (или Ca^{2+}) с гемоглобином, так и с увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением гемоглобина. Вероятно, перераспределение гемоглобина и изменение плотности упаковки участка глобина оказывают влияние на конформацию гема, увеличивая вероятность нахождения гема гемоглобина в «куполообразной форме» и, таким образом, повышает его способность связывать O_2 .

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, гемоглобин, эритроциты, объем эритроцита.

DOI: 10.31857/S0006302922050064, EDN: JIEVCW

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения гемоглобина при изменениях ионного гомеостаза эритроцита. Вероятно, изменения морфологии или объема эритроцита приводят к изменению способности гемоглобина (Гб) связывать или сбрасывать лиганды (в том числе O_2 и NO_x). Очевидно, эти процессы могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть последствием ряда патологий [1–3]. Так, увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ выявлено у

больных с хронической почечной недостаточностью [4] и при уремии [4, 5]. Важно, что перераспределение ионов в эритроците сопровождается изменениями мембранного потенциала, которые модифицируют состояние мембранных белков и липидов [2]. Существенную роль в поддержании ионного гомеостаза, а также в регуляции объема и формы эритроцита выполняет фермент Na^+/K^+ -АТФаза (Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатаза, ЕС 3.6.3.9) [6, 7]. Перенос ферментом ионов против градиента их концентрации осуществляется за счет гидролиза АТФ и поддерживает низкий уровень $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ в клетке [8]. Важную роль в изменении функций эритроцитов выполняет процесс регуляции соотношения ионов Na^+ и K^+ в цитоплазме клетки [9].

Сокращения: Гб – гемоглобин, СЭ – суспензия эритроцитов, ЛИМ – лазерная интерференционная микроскопия, КР – комбинационное рассеяние, ИК – инфракрасный, PLB – среда, имитирующая плазму крови (Plasma-Like Buffer).

Однако в настоящее время мало известно, каким образом изменения ионного гомеостаза и/или мембранного потенциала при работе Na^+/K^+ -АТФазы в эритроците регулируют распределение гемоглобина в клетке и его конформацию. Целью работы было исследование конформации и перераспределения гемоглобина в эритроците при блокировании активности Na^+/K^+ -АТФазы убаином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение эритроцитов. Объектом исследования служила суспензия эритроцитов (СЭ) из кубитальной крови доноров (объект предоставлен НМИЦ кардиологии им. академика А.Е. Чазова).

В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 Ед/мл крови). После забора кровь хранили при 4°C. Для выделения СЭ использовали физиологический фосфатный буфер Аллена (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, рН 7.4). Очистку СЭ от компонентов плазмы и белых форменных элементов крови проводили следующим образом: к цельной крови добавляли буфер Аллена в соотношении 1 : 3, тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R, ThermoScientific, США) при 1500 г в течение 5 мин при 4°C. Полученный супернатант отделяли от осадка. Процедуру осаждения эритроцитов повторяли дважды при тех же условиях центрифугирования. Полученную суспензию эритроцитов хранили на льду не более 3 ч.

Инкубация СЭ с убаином. Для инкубации СЭ с убаином (G-Strophanthin, Sigma, США), готовили раствор с 10 мМ убаином (#75640, Fluka, Швейцария) в буфере Аллена и добавляли его к образцам СЭ (конечная концентрация убаина 1 мМ). Время инкубации СЭ в приготовленной среде составляло 60 мин.

Регистрация ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита. Для контроля за изменениями ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита 1 мл СЭ ($Ht = 40\%$) пробу СЭ разводили в 1000 раз буфером Аллена. Далее 1 мл полученного раствора помещали в одноразовую капиллярную поликарбонатную U-образную кювету DTS1070 (Malvern, Великобритания) с золотыми электродами и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей воздуха или скопления СЭ в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатирующей ячейке прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при 25°C. Время адаптации образца к температуре – 60 с, количество проведенных измерений – 100. Каждое измерение включало не менее пяти повторов. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в

комплекте с прибором Zetasizer Nano ZS, и пакет программ MS Excel.

Измерение объема эритроцита. Контроль за изменениями объема и формы эритроцита проводили при помощи лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ), разработанного во ВНИИОФИ на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия) с объективом 30× ($NA = 0.65$) и полупроводниковым лазером ($\lambda = 650$ нм) с мощностью лазера на объекте менее 2 мВт. Размер регистрируемого кадра составлял 195×145 мкм. Для анализа полученных изображений использовали ПЗС-видеокамеру VS-415U (NPK «Videoscanner», Россия), с размером матрицы 6.5×4.83 мм и разрешением 782×582 точек. Общее время регистрации изображения составляло 10 сек [10, 11]. Образец наносили на предметное стекло с зеркальной поверхностью и накрывали сверху предметным стеклом. Препарат с СЭ находился в буфере Аллена и в буфере Аллена с 1 мМ убаином [12]. Все измерения проводили после часовой инкубации СЭ в растворах. Для восстановления фазового изображения по девяти регистрируемым интерферограммам методом фазовых шагов, использовали программу WinPhast, для последующей работы с изображениями – программы FIJI (США) и Origin 2017 (Microcal Inc., США).

Метод ЛИМ позволяет рассчитать фазовый объем эритроцитов [13–15] по формуле:

$$V = \frac{OPX_{\text{mean}}}{n_1 - n_0} \times S, \quad (1)$$

где S – площадь клетки, рассчитанная методом наименьших квадратов по фоновому значению, OPX – оптическая разность хода светового луча. Измерения объема эритроцита с помощью ЛИМ проведено на 60 клетках.

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР, Рамановская спектроскопия) гемоглобина проводили с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 1000–3200 см^{-1} с шагом измерения 1 см^{-1} , охлаждение ССД камеры –50°C, объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600, мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15–30 с, количество накоплений сигнала – 3. Для регистрации сигнала образец помещали в гематокритный капилляр с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия), который запаивали для герметичности. Каждое измерение проводили не менее пяти раз. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Origin 2017. Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии.

Таблица 1. Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [16–21]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1375}/I_{1172}	Выраженность симметричных и асимметричных колебания пиррольных колец. Снижение величины соотношения характеризует возрастание подвижности гема
I_{1580}/I_{1375}	Вклад валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец. Относительная способность Гб выделять лиганды
I_{2880}/I_{2930}	Вклад несимметричных колебаний метиленовых групп аминокислот глобина по отношению к колебанию концевых метильных радикалов (возрастает при увеличении упорядоченности CH_n -групп)

Для анализа полученных результатов использовали соотношение интенсивностей абсолютных величин полос спектра КР гемоглобина (табл. 1).

Инфракрасная спектроскопия. Регистрацию инфракрасных (ИК) спектров молекул в эритроците проводили в буфере Аллена с использованием приставки НПВО (неполного внутреннего отражения) на инфракрасном Фурье-спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США). Для регистрации ИК-спектра 2 мкл образца наносили на окно регистратора и подсушивали, контролируя вклад ИК-полос от ОН-групп воды в течение 5 мин при температуре 25°C. Регистрацию ИК-спектра от молекул эритроцита проводили в диапазоне 550–4000 см^{-1} с шагом измерения 4 см^{-1} . Время регистрации составляло 20 с. Измерения проводили в количестве повторов не менее 12. Для анализа положения максимумов пиков полос и построения соотношений интенсивностей полос, осуществляли коррекцию базовой линии спектра в программе Origin 2017. Для анализа изменений структуры белковой части гемоглобина в эритроците использовали соотношения интенсивностей полос ИК-спектра (табл. 2) [22, 23].

Флуоресценция триптофана белков эритроцита.

Для контроля за изменениями конформации белков эритроцита (в первую очередь, гемоглобина) регистрировали изменения времени жизни флуоресценции триптофана с помощью метода счета одиночных фотонов с корреляцией по времени. Для этого, флуоресценцию белков эритроцита возбуждали импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLED 265, Edinburgh Instruments, Шотландия), с максимальным излучением при 260 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (260 нм, ширина 15 нм, Chgma, США), выдающий импульсы длительностью 700 пс со средней мощностью 0.6 мкВт при частоте повторения 20 МГц. Регистрацию сигнала флуоресценции (в диапазоне 300–400 нм, с максимумом при 340 нм) осуществляли через коллимационную линзу спектрографа (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия), оснащенного детектором PML-16-C и решеткой 1200 штрих/мм с разрешением 6.25 нм. Аппаратуру TCSPC использовали в режиме FIFO, регистрируя поток фотонов в программном обеспечении для измерений SPCM 9.82 (Becker & Hickl GmbH, Германия).

Измерения проводили в кварцевой кювете (толщина поглощающего слоя 10 мм). Регистра-

Таблица 2. Соотношение интенсивностей полос спектра ИК гемоглобина [22, 23]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1650}/I_{1540}	Характеризует изменение вклада Amide I/Amide II. Смещение положения пика Amide I (1650 см^{-1}) указывает на изменение общего конформационного состояния белка в клетке
I_{1650}/I_{1243}	Различия по белкам*
I_{1450}/I_{1243}	Различия по аминокислотам*
I_{2930}/I_{1243}	Различия по жирным кислотам*

Примечание. * – Если после вычета базовой линии полоса с максимумом при 1243 см^{-1} одинакова, то ее можно использовать в качестве внутреннего стандарта оценки количественных изменений [10].

цию потока около 10^6 фотонов проводили в течение 10 с. Для получения максимальной величины отношения сигнал/шум измерения проводили втроекратно. В эксперименте СЭ разводили в 1000 раз в буфере Аллена в термостатирующей ячейке при 25°C . Время адаптации образца к температуре – 60 с. Все эксперименты проводили не менее трех раз. Изменения интенсивности, времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью пакета программ SPCImage 8.0 (Becker & Nickl, Германия).

Определение содержания ионов Na^+ и K^+ в эритроците. Для выделения СЭ использовали среду, имитирующую плазму крови (PLB – Plasma-Like Buffer) следующего состава: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 25 мМ NaHCO_3 , 0.75 мМ MgSO_4 , 10 мМ глюкозы, 0.015 мМ ZnCl_2 , 0.2 мМ глицина, 0.2 мМ глутамата натрия, 0.1 мМ аргинина, 0.6 мМ глутамина, 0.2 мМ аланина, 20 мМ HEPES (pH 7.4 при 5% CO_2) [24]. PLB добавляли к крови в соотношении 8 : 1. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g, после чего супернатант отбирали и проводили отмывку СЭ от компонентов плазмы дважды. К отмывке СЭ добавляли 1.8 мл PLB, ресуспендировали и аликвотировали по 90 мкл. В экспериментальные образцы вносили 10 мкл 10 мМ убаина, а в контрольные образцы – 10 мкл PLB. После трехчасовой инкубации эритроцитов с убаином в CO_2 -инкубаторе пробы помещали на лед и вносили 1.5 мл ледяного 0.1 М MgCl_2 . Далее центрифугировали 10 мин при 2000 g и отбирали супернатант. Отмывку повторяли дважды. Затем к осадку добавляли по 1.5 мл 5% трихлоруксусной кислоты (#152592, MP Biomedicals, США) и оставляли образцы на ночь при 4°C . После осаждения клеточных белков трихлоруксусной кислотой [25] образцы центрифугировали 10 мин при 13700 g. Супернатант переносили в пробирки и определяли $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант-2М» («КОРТЭК», Россия) [26]. Осадок растворяли в 1.5 мл 0.1 М NaOH и определяли содержание белка методом Бредфорда [27] с использованием Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent (#5000205, BioRad, США) на спектрофотометре V560 (JASCO, Япония).

Полученные данные обрабатывали стандартными статистическими методами в программе Statistica 8.0: вычисляли среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего (SE) для экспериментальных и контрольных результатов. Используя t-критерий Стьюдента ($p < 0.05$), оценивали достоверность полученных результатов, а непараметрический критерий Вилкоксона применяли для оценки значимости различий двух связанных выборок ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений морфологии эритроцита при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы. Известно, что при селективном связывании убаина с Na^+/K^+ -АТФазой блокируется активный транспорт – выход из клетки Na^+ и вход K^+ [28]. При этом происходит накопление Na^+ внутри клетки, на 88% снижается вход K^+ [29] и, как следствие, наблюдается увеличение объема эритроцита.

С помощью ЛИМ нами установлено, что после инкубации эритроцитов с убаином снижается величина фазового объема и амплитуда оптической разности хода луча света за счет перераспределения Гб вследствие входа воды при накоплении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$. Вероятно, увеличение объема эритроцита при блокировании насоса [29–31] может сопровождаться как изменением трансмембранного потенциала, так и поверхностного заряда плазматической мембраны эритроцита. Действительно, при повышении $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ происходит деполаризация мембранного потенциала, которая запускает обратную моду $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, увеличивая $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Также основную роль в стабилизации объема эритроцитов выполняют кальций-активируемые калиевые каналы [32]. Вероятно, этими процессами обусловлено увеличение заряда мембраны с -15.2 ± 0.2 до -13.2 ± 0.2 мВ, а также перераспределение Гб в клетке (рис. 1а,в).

В следующей серии экспериментов исследовали изменения $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ эритроцита при действии убаина (рис. 2). Доказано, что при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы содержание $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ в эритроците возрастает, при этом наблюдается тенденция к снижению содержания $[\text{K}^+]_{\text{in}}$ (рис. 2). Полученные данные подтверждают увеличение соотношения содержания ионов натрия и калия в эритроците при блокировании насоса [33].

Исследование изменений конформации гемоглобина эритроцитов при блокировании Na^+/K^+ -АТФазы. Установлено, что блокирование активности Na^+/K^+ -АТФазы приводит к увеличению $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ и поверхностного заряда мембраны, а также перераспределению Гб в цитоплазме клетки (рис. 1). Мы предположили, что эти процессы могут быть фактором активации ряда внутриклеточных процессов (активация фосфолипаз), которые меняют упорядоченность жирнокислотных хвостов мембранных липидов, снижая долю примембранного Гб, связанного с белком полосы 3, а также формирования комплекса Гб и белка полосы 3 за счет отрицательно заряженного компонента белка полосы 3 [34–36]. Как отмечалось

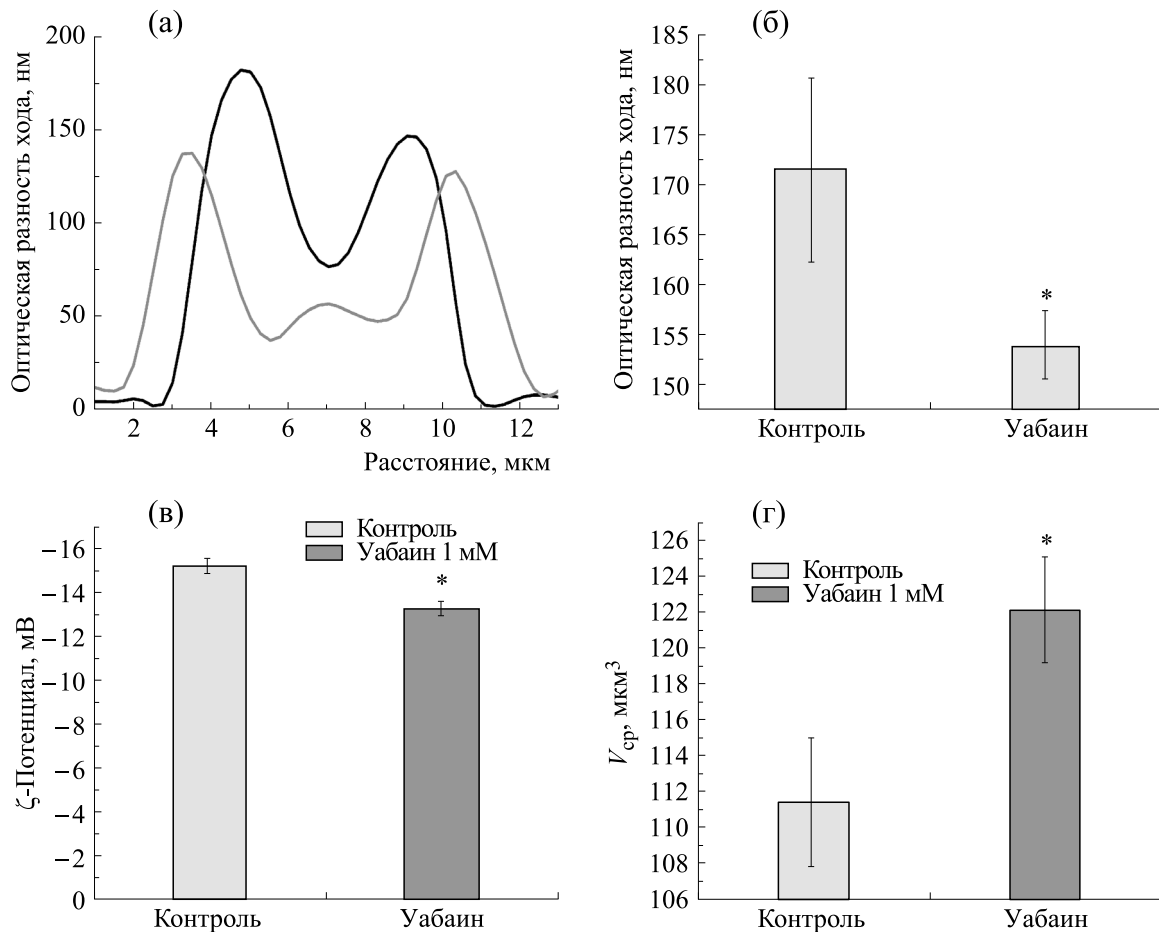


Рис. 1. Изменение величины оптической разности хода светового луча и поверхностного заряда эритроцитов после 60-минутной инкубации в растворе с 1 мМ уробилина: (а) – фазовый профиль эритроцита, полученный методом ЛИМ (черная кривая – контроль, серая кривая – после инкубации с уробилином); (б) – среднее значение оптической разности хода, полученное методом ЛИМ; (в) – ζ-потенциал мембран эритроцитов, (г) – фазовый объем (формула (1)). Данные представлены как среднее ± SE (* – $p \leq 0.05$).

выше, при увеличении $[Na^+]_{in}$ концентрация Ca^{2+} внутри эритроцита может увеличиться за счет активации Ca-каналов или обратной моды Na-Ca-обменника. Все это может влиять на конформацию Гб, а также на количество свободных ОН-групп тирозина белка полосы 3 [37, 38]. В связи с этим мы исследовали связь данных процессов с изменением конформации Гб в клетке.

С помощью метода КР установлено, что в условиях блокирования Na^+/K^+ -АТФазы (деполяризация мембраны и вход ионов Na^+ в клетку) наблюдаются изменения в спектре гема гемоглобина (область валентных колебаний пирролов, соотношение I_{1375}/I_{1172}), свидетельствующие об изменении конформации гема (доля гема в «куполообразной форме»), доли комплексов окси- и дезоксигемоглобина, сродства Гб к лигандам (увеличение величины соотношения I_{1375}/I_{1172} и

снижение величины соотношения I_{1580}/I_{1375}) (рис. 3). В частности, выявлены изменения в конформации гема, характеризующие снижение подвижности гема (увеличение интенсивности соотношения I_{1375}/I_{1172}) и снижение способности Гб выделять лиганды (снижение величины соотношения I_{1580}/I_{1375}), что может быть вызвано как деполяризацией мембраны, так и снижением плотности Гб за счет входа воды, экранирования Гб молекулами воды, а также селективного связывания катионов Na^+ белками [30]. Отметим, что накопление внутриклеточного натрия приводит и к изменению конформации глобиновой части молекулы Гб (выявлена тенденция к снижению упорядоченности CH_n -групп (снижение величины соотношения I_{2880}/I_{2930}), что указывает на снижение плотности упаковки глобулы глобина и коррелирует с данными, свидетельствующими о снижении плотности распределения гемо-

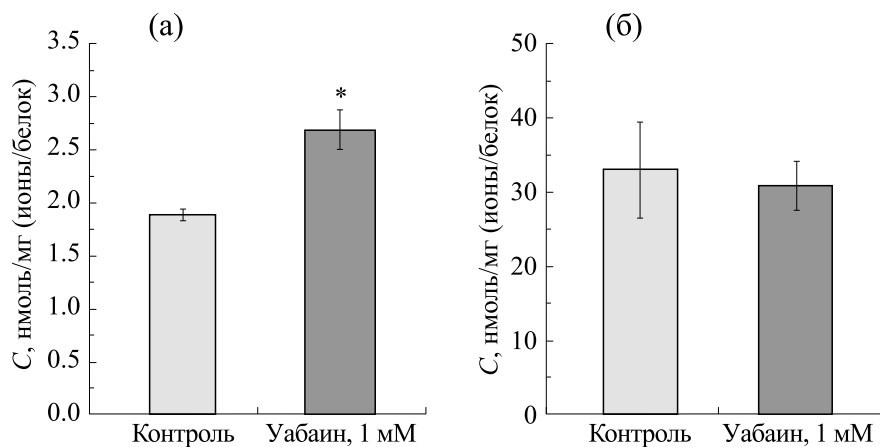


Рис. 2. Изменение содержания $[Na^+]_{in}$ (а) и $[K^+]_{in}$ (б) при инкубации эритроцитов в течении 1 ч с 1 мМ уробилина. Данные представлены как среднее $\pm SE$ (* – $p \leq 0.05$).

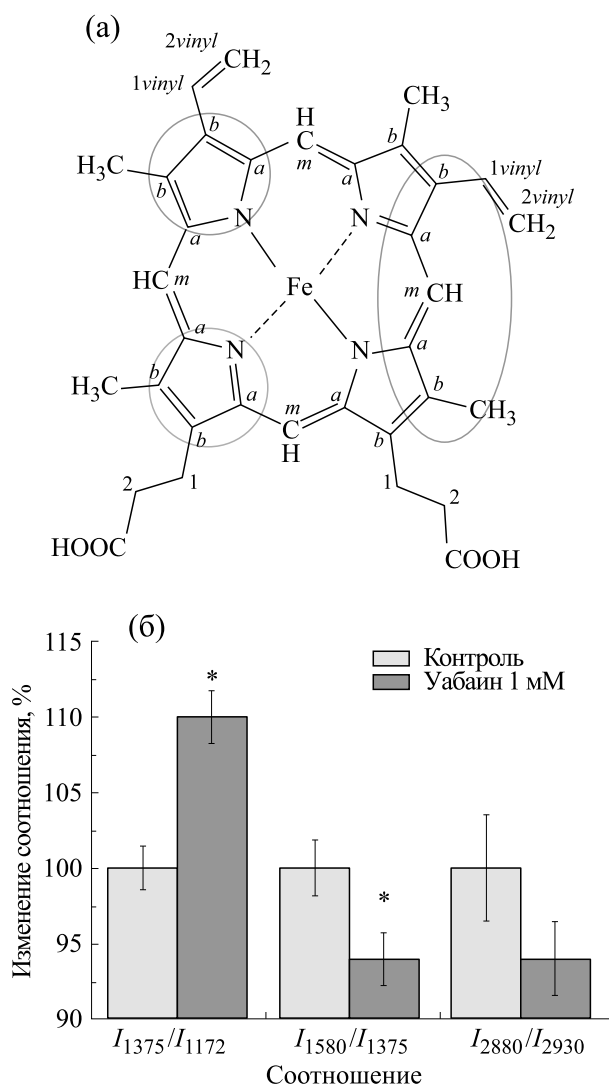


Рис. 3. (а) – Молекулярная структура гема гемоглобина; (б) – величины соотношений интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния представлены как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления уробилина в буфере Аллена). Данные представлены как среднее $\pm SE$ (* – $p \leq 0.05$).

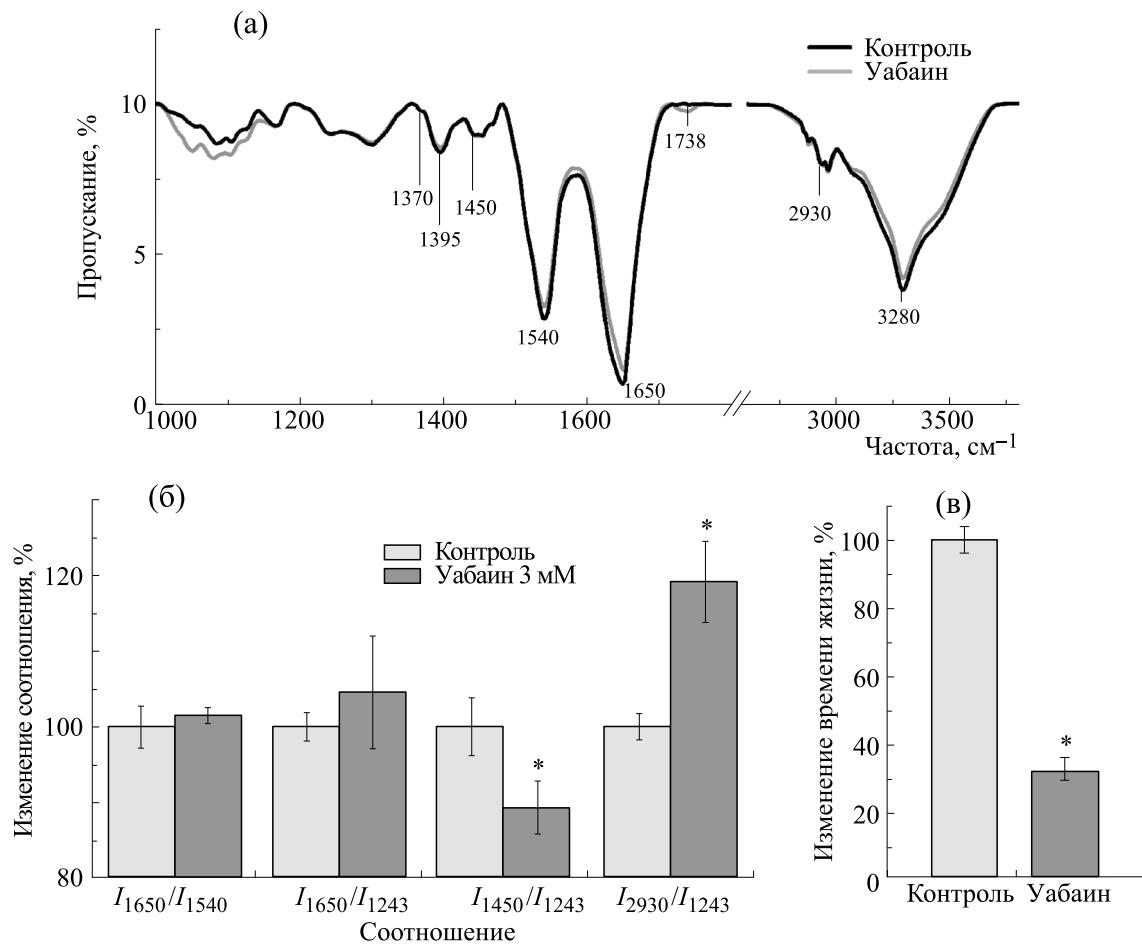


Рис. 4. (а) – ИК-спектр суспензии эритроцитов; (б) – величины соотношений интенсивностей полос ИК-спектра, представленные как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления убаина в буфере Аллена); (в) – время жизни триптофановой флуоресценции, представленное как изменение относительно контроля (суспензия эритроцитов без добавления убаина в буфере Аллена). Данные представлены как среднее \pm SE (* – $p \leq 0.05$).

глубина (по величине оптической разности хода светового луча) в клетке.

Для более детального исследования изменений конформации глобина гемоглобина и состояния липидов плазматической мембраны эритроцита при блокировании насоса использовали ИК-спектроскопию (рис. 4). Установлено, что в данных условиях наблюдаются изменения в валентных колебаниях связей CH_3 -групп аминокислотных остатков (I_{1450}/I_{1243}) и увеличение величины соотношения I_{2930}/I_{1243} , характеризующего упорядоченность жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов плазматической мембраны эритроцита. Например, при инкубации клеток с убаином возрастает интенсивность полосы 1738 см^{-1} (рис. 4а), которая характеризует растяжение $\text{C}=\text{O}$ -связей фосфолипидов мембраны [39, 40]. При инкубации эритроцитов с убаином не выявлены изменения соотношения I_{1650}/I_{1540} (отношение Amide I к Amide II) и

I_{1650}/I_{1243}), но смещение полосы 1650 до 1647 см^{-1} может свидетельствовать об изменении длины сопряжения между амидными связями $\text{C}=\text{O}$ во вторичной структуре белка.

В дополнительной серии экспериментов нами были выявлены изменения конформации белков СЭ (Гб, белки плазматической мембраны, цитоскелета и т. д.) (снижение времени жизни флуоресценции триптофанов, рис. 4в). Поскольку гемоглобин является основным белком эритроцитов, составляя около 98% всех белков цитоплазмы клетки, то изменения его конформации будут вносить основной вклад в изменение флуоресценции триптофанов. Таким образом, наблюдаемые изменения в первую очередь свидетельствуют об изменении конформации глобина за счет изменения положения триптофанов глобина близ гема, либо в окружения молекул Гб (например, в белке полосы 3). Все это, вероятно, отражает перераспределение молекул Гб в цитоплазме и

снижение плотности упаковки глобулы Гб (рис. 1 и 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов оптической спектроскопии (КР, ИК и ЛИМ) исследованы как изменения морфологии эритроцитов, так и изменения конформации Гб в эритроците в результате увеличения соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в клетке. Установлено, что блокирование Na^+/K^+ -АТФазы приводит не только к увеличению $[Na^+]_{in}$ в клетке, но и увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны (рис. 1 и 2). В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и белковой глобулы Гб, а именно, снижение плотности упаковки молекулы Гб, которые могут быть связаны как с сорбцией Na^+ с Гб, так и увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением Гб в клетке. Вероятно, перераспределение Гб и изменение плотности упаковки участка глобина оказывают влияние на конформацию гема, увеличивая вероятность нахождения гема гемоглобина в «куполообразной форме» и, таким образом, повышает способность выделять O_2 . Можно предположить, что выявленные изменения обусловлены главным образом изменениями во вторичной структуре белка-глобина близ центров локализации гема в Гб.

Итак, увеличение соотношения $[Na^+]_{in}$ и $[K^+]_{in}$ в клетке может привести как к деполяризации плазматической мембраны и изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб. Все вышеперечисленное нарушает способность эритроцитов переносить кислород и является причиной гипоксии в норме и при патологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-34-90073, для О.В.С.) (рис. 1, 3, 4); данные, представленные на рис. 2, получены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374-П, для И.Ю.П).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с кровью человека проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. J. Brearley, J. K. Aronson, N. A. Boon, et al., *Clin. Sci.*, **85** (6), 725 (1993).
2. С. С. Коваленко, Е. Ю. Паршина, А. И. Юсипович и др., *Биофизика*, **59** (6), 1093 (2014).
3. С. М. Иванова, О. И. Лабецкая, Н. А. Анисимов и др., *Авиакосмич. и экологич. медицина*, **53** (2), 62 (2019).
4. E. W. Weiler L. F. Saldanha, F. Khalil-Manesh, et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **7** (3), 454 (1996).
5. L. de Franceschi, O. Oliveri, D. Girelli, et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, **25** (10), 762 (1995).
6. L. N. Katyukhin, A. M. Kazennov, M. N. Maslova, et al., *Comp. Biochem. Phys. B*, **120** (3), 493 (1998).
7. J.-M. Krzesinski, et al., *J. Artif. Organs*, **16** (1), 23 (1993).
8. P. L. Jorgensen, K. O. Håkansson, S. J. D. Karlish, and P. L. Jorgensen, *Annu. Rev. Physiol.*, **65** (1), 817 (2003).
9. А. Г. Погорелов, А. В. Русаков и В. Н. Погорелова, *Биофизика*, **51** (5), 852 (2006).
10. А. И. Yusipovich, M. V. Zagubizhenko, G. G. Levin, et al., *J. Microsc.*, **244** (3), 223 (2011).
11. N. Y. Bryzgalova, N. A. Brazhe, A. I. Yusipovich, et al., *Biophysics*, **54** (3), 308 (2009).
12. Г. И. Козинец и Ю. А. Симоварт, *Поверхностная цитоархитектоника клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы клеток* (Валгус, Таллин, 1984).
13. P. Mazon, S. Muller, H. Azouzi, et al., *Eur. Biophys. J.*, (1997).
14. А. И. Yusipovich, N. Y. Bryzgalova, E. Y. Parshina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **145** (3), 382 (2008).
15. А. И. Yusipovich, S. M. Novikov, T. A. Kazakova, et al., *Quant. Electron.*, **36** (9), 874 (2006).
16. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy*, **24** (9), 275 (1993).
17. N. K. Howell, G. Arteaga, S. Nakai et al. *J. Agricult. Food Chem.* **47** (3), 924 (1999).
18. C. H. Camp and M. T. Cicerone, *Nat Photonics*, **9**, 295 (2015).
19. T. Filho, I. P. Ternner, J. Pittman, et al. *J. App. Phys.*, **104** (6), 1809 (2008).
20. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.*, **97** (12), 3206 (2009).

21. D. M. Scholler, M. Y. Wang, and B. M. Hoffman, *J. Biol. Chem.* **254** (10), 4072 (1979).
22. S. Din, E. L. Aisha, A. Bahay, et al., *Radiat. Phys. Chem.*, **44** (1–2), 195 (1994).
23. M. Polakovs, N. Mironova-Ulmane, and N. Kurjane, In *Proc. 6th Int. Conf. on Advanced Optical Materials and Devices* (Springer, 2008), p. 714214.
24. A. Makhro, L. Kaestner, and A. Bogdanova, In *NMDA Receptors* (Springer, 2017), pp. 265–282.
25. A. J. Link and J. LaBaer, *Cold Spring Harbor Protocols*, **8**, pdb-prot5651 (2011).
26. D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, et al., *Heliyon*, **7** (9), e08088 (2021).
27. T. Zor and Z. Selinger, *Anal. Biochem.*, **236** (2), 302 (1996).
28. С. Н. Орлов, *Бюл. сибирской медицины*, **18** (2), 234 (2019).
29. Е. Д. Суглобова, В. Н. Спиридонов, Ю. А. Борисов и др., *Нефрология*, **2** (4), 68 (1998).
30. S. Sidorenko, V. Rebrov, V. G. Verkhov, et al., *Chem. Biol. Ecol.*, **16** (3), 279 (2016).
31. Н. В. Калягина, М. В. Мартынов и Ф. И. Атауллаханов, *Биол. мембраны*, **30** (2), 115 (2013).
32. Ф. И. Атауллаханов, А. Б. Кляткина, В. М. Витвицкий и др., *Биол. мембраны*, **10** (5), 519 (1993).
33. И. А. Медведева, М. Н. Маслова и А. А. Панов, *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **78** (11), 119 (1992).
34. J. S. Wiley and K. E. McCulloch, *Pharmacol. Therapeut.*, **18** (2) 271 (1982).
35. E. Friederichs, R. A. Farley, and H. J. Meiselman, *Am. J. Hematol.*, **41**, 170 (1992).
36. Z. Peng, X. Li, I. V. Pivkin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (33), 13356 (2013).
37. G. Minetti, G. Piccinini, C. Balduini, et al., *Biochem. J.*, **320** (2), 445 (1996).
38. О. В. Слатинская, N. A. Brazhe, S. N. Orlov, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **15** (3), 230 (2021).
39. R. Gasper, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788** (6), 1263 (2009).
40. P. Lasch, et al., *Vibr. Spec.*, **28** (1), 147 (2002).

Changes in Conformation and Distribution of Hemoglobin in the Erythrocyte during Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase Activity

O.V. Slatinskaya*, P.I. Zaripov, N.A. Brazhe*, I. Yu. Petrushanko**, and G.V. Maksimov*, *****

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/24, Moscow, 119991 Russia

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

***National Research Technological University MISiS, Leninskiy prosp. 4/1, Moscow, 119049 Russia

Raman spectroscopy, infrared spectroscopy and laser interference microscopy revealed the changes in erythrocyte morphology and the hemoglobin conformational changes induced by an increase in the $[\text{Na}^+]_{\text{in}}/[\text{K}^+]_{\text{in}}$ ratio when Na^+/K^+ -ATPase was blocked in a cell. It has been established that the loss of Na^+/K^+ -ATPase leads to $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$ accumulation in the cell, and the cytoplasmic surface of the plasma membrane becomes less negative. Under these conditions, the following changes in the conformation of both the heme and the molten globule of hemoglobin were observed: the packing density of the hemoglobin molecule decreases; it can be due to the sorption of Na^+ (or Ca^{2+}) from hemoglobin and to an increase in number of water molecules in the cell and the redistribution of hemoglobin in a cell. It is likely that the redistribution of hemoglobin and the change in the packing density of the globin site affect the conformation of the heme, increasing the probability of finding the heme of hemoglobin in a "dome-shaped form" and, thus, increasing the ability to bind O_2 .

Keywords: Raman spectroscopy, hemoglobin, erythrocyte, red blood cells, erythrocyte volume

УДК 577.3

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ПРИ ГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

© 2022 г. В.В. Войнаровский*, Г.Г. Мартинович*, #

*Белорусский государственный университет, просп. Независимости, 4, Минск, 220030, Республика Беларусь

E-mail: martinovichgg@bsu.by

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 03.06.2022 г.

Принята к публикации 22.06.2022 г.

С использованием численного моделирования и спектрофотометрического анализа исследованы механизмы регуляции адаптации эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра. Показано, что наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от суммарной концентрации серебра и содержания ионов в растворе. Гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами. Обнаружено, что пероксид водорода повышает структурную устойчивость эритроцитов при гемолизе наночастицами серебра и нитратом серебра. Диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение доли негемолизированных клеток (область гормезиса), зависит от времени разрушения клеток при действии повреждающего фактора. Максимум гормезиса при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, а при разрушении нитратом серебра – при 700 мкМ. С помощью численного моделирования установлено, что зависимость максимума гормезиса от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования обусловлена динамическим характером цитоплазматических механизмов, регулирующих соотношение мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина.

Ключевые слова: гормезис, адаптация, пероксид водорода, эритроциты, метгемоглобин, наночастицы серебра.

DOI: 10.31857/S0006302922050076, EDN: JHJGL

Способность адаптироваться к стрессу является важнейшей характеристикой здорового организма [1]. Однако защитно-адаптационные механизмы на уровне клеток изучены недостаточно. Ключевыми участниками регуляции ответа клеток на действие стрессовых факторов являются активные формы кислорода (АФК) – высокореакционные продукты метаболизма кислорода, обладающие широким спектром физиологического и патофизиологического действия [2]. К АФК относятся различные химические соединения, включая синглетный кислород (1O_2), супероксидный ($O_2^{\cdot-}$) и гидроксильный (HO^{\cdot}) радикалы, пероксид водорода (H_2O_2) и другие.

Основной молекулой группы АФК, осуществляющей передачу регуляторных сигналов, является пероксид водорода [3]. Сигналы, передаваемые пероксидом водорода, характеризуются своим концентрационным порогом активации и длительностью. Действие таких сигналов обратимо и регулируется многокомпонентной антиоксидантной системой в результате сопряженного функционирования специализированных белков, таких как каталаза (Cat), глутатионпероксидаза (Gpx), пероксиредоксин (Prx) и др. [2].

В последние годы выяснено, что регуляция экспрессии генов белков антиоксидантной системы клеток млекопитающих осуществляется фактором транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), активность которого контролируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) [4]. Система Keap1-Nrf2 играет ключевую роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза при стрессовых воздействиях и рассматривается как потенциальная мишень для терапии широкого спектра заболеваний [5, 6]. Однако в эритроцитах, самых многочисленных клетках крови человека, данная систе-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, Cat – каталаза, Gpx – глутатионпероксидаза, Prx – пероксиредоксин, NADH – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма), NAD^+ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма), NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма), $NADP^+$ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма), B3 – белок полосы 3, MetHb – метгемоглобин, FerHb – феррилгемоглобин.

ма поддержания редокс-гомеостаза отсутствует, и защита клеток при стрессовых воздействиях осуществляется цитоплазматическими механизмами, включающими регуляцию функционального состояния белков и их взаимодействий с мембраной и цитоскелетом клетки.

Важнейшим механизмом защиты эритроцитов является повышение структурной стабильности мембраны при связывании ее компонентов с гемоглобином — основным белком эритроцитов [7]. Константы скорости образования и распада мембранных комплексов гемоглобина зависят от окисленного состояния белка [8, 9]. Взаимодействие метгемоглобина с компонентами мембраны характеризуется более высокой константой связывания, чем связывание оксигемоглобина. Показано, что обратимое связывание метгемоглобина с белками цитоскелета оказывает стабилизирующее действие на эритроцитарные мембраны [10, 11]. Восстановление метгемоглобина никотинамидадениндинуклеотидом (NADH), катализируемое цитохромом b5, приводит к снижению количества мембранных комплексов белка [12]. Накопление более окисленной формы гемоглобина — феррилгемоглобина усиливает процессы перекисного окисления липидов и снижает структурную стабильность мембран [13]. Механизмы изменения баланса окисленных форм гемоглобина и их связывания с мембраной при действии внешних стрессовых факторов до сих пор не изучены.

Ранее нами было показано, что соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина определяет гормезисную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода: регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких [14]. Диапазон концентраций пероксида водорода, при котором наблюдается увеличение структурной стабильности мембраны (область гормезиса), зависит от ряда внутренних и внешних факторов.

Значительный рост объемов производства новых материалов, содержащих наноразмерные частицы, и расширение областей их применения актуализировало исследования механизмов взаимодействия искусственных наноматериалов и биологических систем. Широкое применение находят наночастицы серебра, которые используются в качестве бактерицидных, противовирусных, противогрибковых и антисептических агентов, однако способны проявлять токсические свойства по отношению к клеткам млекопитающих и человека [15]. Поскольку при действии на-

ночастиц серебра может изменяться концентрация пероксида водорода, в настоящей работе изучены условия и механизмы защитного действия окислителя при повреждении эритроцитов наночастицами серебра.

Разрушение клеток под действием наночастиц серебра обусловлено, в основном, ионами серебра, высвобождаемыми наночастицами [16, 17], и зависит от ряда факторов, включая внеклеточные и внутриклеточные редокс-условия [18]. Для количественного анализа влияния различных факторов на действие пероксида водорода в эритроцитах построена математическая модель, в которой передача сигнала с участием пероксида водорода и образование мембранных комплексов окисленных белков рассматривается как цепь взаимосвязанных событий.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Повышение структурной стабильности мембран эритроцитов, индуцируемое пероксидом водорода, усиливает защитные свойства клеток и, следовательно, уменьшает количество разрушенных при гемолизе клеток. При моделировании индуцированного наночастицами гемолиза эритроцитов считается, что скорость разрушения клеток пропорциональна количеству клеток в суспензии и количеству высвобождаемых наночастицами ионов серебра, вызывающих разрушение. Скорость высвобождения ионов серебра, в свою очередь, прямо пропорциональна количеству ионов, заключенных в наночастицы, и зависит от защитных свойств клеток. В этом случае скорость изменения количества клеток в суспензии регулируется двумя конкурирующими процессами (защиты и разрушения) и может быть описана следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -k_p \cdot n \cdot [Ag^+] \\ \frac{d[Ag^+]}{dt} = \frac{1}{k_3} \cdot [Ag^0] \\ \frac{d[Ag^0]}{dt} = -\frac{1}{k_3} \cdot [Ag^0] \end{cases}, \quad (1)$$

где n — число клеток в суспензии, k_p — коэффициент разрушения, k_3 — коэффициент защиты, $[Ag^+]$ — концентрация высвобожденных ионов серебра в растворе, $[Ag^0]$ — концентрация ионов серебра в форме наночастиц. Суммарная концентрация серебра считается постоянной.

Решением системы (1) является уравнение:

$$n(t) = n(0) \cdot \exp([Ag^0](0) \cdot k_p \cdot (k_3 - k_3 \cdot \exp(-\frac{t}{k_3}) - t)), \quad (2)$$

где $n(0)$ – начальное количество клеток в суспензии, $[Ag^0](0)$ – начальная концентрация ионов серебра, которая была использована при синтезе наночастиц, t – время. Значения коэффициентов k_p и k_3 определяли на основе экспериментально полученных зависимостей гемолиза эритроцитов с использованием метода наименьших квадратов.

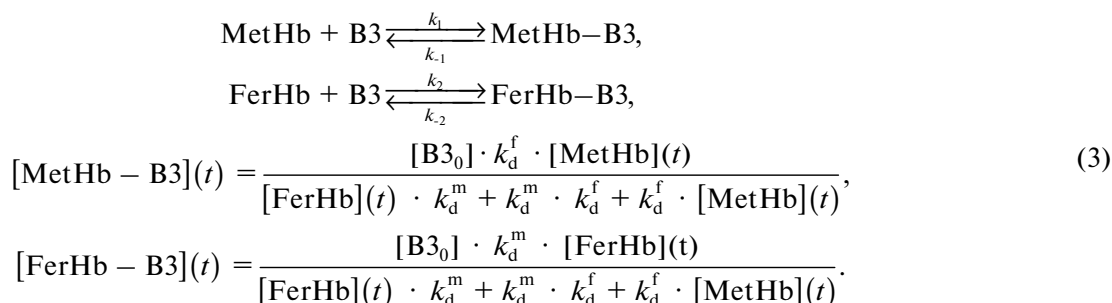
Защитные свойства клеток при гемолизе определяются структурной стабильностью мембраны и характеризуются коэффициентом защиты k_3 . На основании ранее проведенных исследований [14] в модели полагается, что структурная стабильность мембраны зависит от количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина и изменяется со временем.

Для количественного анализа динамики изменения защитных свойств клетки рассматривали ключевые этапы образования метгемоглобина и феррилгемоглобина и их связывания с мембраной при действии внеклеточного пероксида водорода на основе математической модели, описанной нами ранее [14]. Для учета влияния наночастиц серебра в модели сделаны ряд изменений.

В новой модели введено упрощение полной системы гликолиза и пентозофосфатного пути, основанное на условии стационарного состояния потоков [19]. При определении скорости восстановления NADPH и NADH учитывается скорость транспорта глюкозы через мембранный транспортер GLUT1 (мембранный транспортер глюко-

зы типа 1 – Glucose transporter 1). Считается, что при окислении одной молекулы глюкозы восстанавливаются две молекулы NAD^+ или две молекулы $NADP^+$. Снижение поступления источника энергии (глюкозы) приводит к истощению пула NADPH и NADH и изменяет скорость гликолиза или пентозофосфатного пути пропорционально концентрации пиридиннуклеотидов. Таким образом, в новой модели учитываются не общие скорости гликолиза или пентозофосфатного пути, а только их отклонения от начального значения.

Индукцированное пероксидом водорода образование метгемоглобина и феррилгемоглобина приводит к их связыванию с компонентами мембраны эритроцита. Динамика образования мембранных комплексов окисленных форм гемоглобина описывается кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия, где в качестве лиганда выступает окисленный гемоглобин, а рецептором служит мембранный белок полосы 3 (B3). Достижение равновесия процессов связывания и распада комплексов на мембране происходит значительно быстрее процессов восстановления окисленных белков, поэтому в модели рассматривается стационарное состояние формирующихся комплексов. Количество мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина зависит соответственно от количества метгемоглобина и феррилгемоглобина в цитоплазме:



где $[\text{B3}]$ – концентрация доступных для связывания белков полосы 3, $[\text{B3}_0]$ – суммарная концентрация белков полосы 3, $[\text{MetHb}]$ – концентрация метгемоглобина в клетке, $[\text{MetHb-B3}]$ – концентрация мембранных комплексов метгемоглобина, $[\text{FerHb}]$ – концентрация феррилгемоглобина в клетке, $[\text{FerHb-B3}]$ – концентрация мембранных комплексов феррилгемоглобина, k_d^f – константа диссоциации комплексов феррилгемоглобина, k_d^m – константа диссоциации комплексов метгемоглобина.

Построенная математическая модель является нелинейной и содержит 17 дифференциальных уравнений. В табл. 1 и 2 приведены эти уравнения и их константы. Все константы и начальные условия взяты из литературных источников. Выполнен анализ на устойчивость системы. Численное решение системы выполнено в программе Wolfram Mathematica.

На основе численного моделирования изучено влияние пероксида водорода на динамику изменения мембраносвязанного состояния окисленных форм гемоглобина при действии разных повреждающих факторов.

Таблица 1. Реакции и уравнения скорости в модели

№	Реакция и уравнение скорости	Значение констант	Ссылка
1	H_2O_2 (внешн) $\rightarrow H_2O_2$ $v_1 = -P \cdot ([H_2O_2] - [H_2O_2(\text{внешн})]) \cdot \frac{S_{\text{клет}}}{V} \cdot N_{\text{клет}}$	$P = 6 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $S_{\text{клет}} = 1.09 \cdot 10^{-10} \text{ М}^2$ $V = 10^{-6} \text{ М}^3$ $N_{\text{клет}} = 3 \cdot 10^7$	[20]
2	H_2O_2 (внешн) $\rightarrow H_2O_2$ $v_2 = -P \cdot ([H_2O_2] - [H_2O_2(\text{внешн})]) \cdot \frac{S_{\text{клет}}}{V_{\text{клет}}}$	$P = 6 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $S_{\text{клет}} = 1.09 \cdot 10^{-10} \text{ М}^2$ $V_{\text{клет}} = 6.3 \cdot 10^{-17} \text{ М}^3$	[20]
3	$H_2O_2 + \text{Cat} \rightarrow H_2O + \text{CompI}$ $v_3 = k_3 \cdot [\text{Cat}] \cdot [H_2O_2]$	$k_3 = 6 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
4	$H_2O_2 + \text{CompI} \rightarrow H_2O + O_2 + \text{Cat}$ $v_4 = k_4 \cdot [\text{CompI}] \cdot [H_2O_2]$	$k_4 = 1.6 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
5	$H_2O_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{Gpx}} 2H_2O + \text{GSSG}$ $v_5 = \frac{[\text{Gpx}] \cdot [\text{GSH}] \cdot [H_2O_2]}{K_1 \cdot [H_2O_2] + K_2 \cdot [\text{GSH}]}$	$[\text{Gpx}] = 1.4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ $K_1 = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}$ $K_2 = 2.4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}$	[22]
6	$2\text{Hb} + H_2O_2 \rightarrow 2\text{MetHb} + H_2O$ $v_6 = k_6 \cdot [\text{Hb}] \cdot [H_2O_2]$	$k_6 = 100 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[21]
7	$\text{MetHb} + H_2O_2 \rightarrow \text{FerHb} + H_2O$ $v_7 = k_7 \cdot [\text{MetHb}] \cdot [H_2O_2]$	$k_7 = 98 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[23]
8	$\text{MetHb} + \text{cytb5(восст)} \rightarrow \text{Hb} + \text{cytb5(окисл)}$ $v_8 = k_8 \cdot [\text{MetHb}] \cdot [\text{cytb5(восст)}]$	$k_8 = 6200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[24]
9	$\text{NADH} + \text{cytb5(окисл)} \xrightarrow{\text{cytb5R}} \text{NAD}^+ + \text{cytb5(восст)}$ $v_9 = \frac{k_9 \cdot [\text{cytb5R}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{cytb5(окисл)}]}{(K_M^{\text{NADH}} + [\text{NADH}]) \cdot (K_M^{\text{cytb5(окисл)}} + [\text{cytb5(окисл)}])}$	$k_9 = 418 \text{ с}^{-1}$ $[\text{cytb5R}] = 7 \cdot 10^{-8} \text{ М}$ $K_M^{\text{NADH}} = 3.1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ $K_M^{\text{cytb5(окисл)}} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	[24]
10	$\text{FerHb} + 2\text{Asc} \rightarrow \text{MetHb} + \text{DHA} + \text{Asc}$ $v_{10} = k_{10} \cdot [\text{FerHb}] \cdot [\text{Asc}]$	$k_{10} = 400 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	[23]
11	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{DHAR}} \text{Asc} + \text{GSSG}$ $v_{11} = \frac{k_{11} \cdot [\text{DHAR}] \cdot [\text{DHA}] \cdot [\text{GSH}]}{[\text{DHA}] \cdot [\text{GSH}] + K_{\text{DHA}} \cdot [\text{GSH}] + K_{\text{GSH}} \cdot [\text{DHA}]}$	$k_{11} = 5.27 \text{ с}^{-1}$ $[\text{DHAR}] = 10^{-7} \text{ М}$ $K_{\text{DHA}} = 2.1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ $K_{\text{GSH}} = 3.5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	[25]
12	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GR}} \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$ $v_{12} = \frac{[\text{GR}] \cdot [\text{GSSG}] \cdot [\text{NADPH}]}{K_1 \cdot [\text{NADPH}] + K_2 \cdot [\text{GSH}]}$	$[\text{GR}] = 1.4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ $K_1 = 2.4 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}$ $K_2 = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}$	[22]
13	$\text{NAD(P)}^+ \xrightarrow{\text{GLUT1}} \text{NAD(P)H}$ $v_{\text{GLUT}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+])}{2 \cdot \left(1 + \frac{[\text{glc(внешн)}]}{K_{\text{ex}}^m} + \frac{[\text{glc(внешн)}]}{K_{\text{in}}^m} - 2 \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+]) \right) + \alpha \cdot \frac{[\text{glc(внешн)}] \cdot ([\text{glc(внешн)}] - 2 \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADP}^+]))}{K_{\text{ex}}^m \cdot K_{\text{in}}^m}}$	$V_{\text{max}} = 0.0207 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ $K_{\text{ex}}^m = 1.7 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ $K_{\text{in}}^m = 6.9 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ $\alpha = 0.54$	[19]

Таблица 2. Полная система уравнений в модели

Система уравнений	Начальные значения, М
$[\text{Cat}]'(t) = -v_3 + v_4$	$[\text{Cat}](0) = 5.5 \cdot 10^{-6}$
$[\text{CompI}]'(t) = v_3 - v_4$	$[\text{CompI}](0) = 5.5 \cdot 10^{-6}$
$[\text{H}_2\text{O}_2(\text{внешн})]'(t) = -v_1$	$[\text{H}_2\text{O}_2(\text{внешн})](0) = (1 \dots 1.25) \cdot 10^{-3}$
$[\text{H}_2\text{O}_2]'(t) = v_2 - v_3 - v_4 - v_5 - v_6 - v_7$	$[\text{H}_2\text{O}_2](0) = 0$
$[\text{cytb5}(\text{восст})]'(t) = -v_8 + v_9$	$[\text{cytb5}(\text{восст})](0) = 8.1 \cdot 10^{-6}$
$[\text{cytb5}(\text{окисл})]'(t) = v_8 - v_9$	$[\text{cytb5}(\text{окисл})](0) = 0$
$[\text{MetHb}]'(t) = v_6 - v_7 - v_8 + v_{10}$	$[\text{MetHb}](0) = 0$
$[\text{FerHb}]'(t) = v_7 - v_{10}$	$[\text{FerHb}](0) = 0$
$[\text{Hb}]'(t) = -v_6 + v_8$	$[\text{Hb}](0) = 0.01$
$[\text{Asc}]'(t) = -v_{10} + v_{11}$	$[\text{Asc}](0) = 7.5 \cdot 10^{-5}$
$[\text{DHA}]'(t) = v_{10} - v_{11}$	$[\text{DHA}](0) = 0$
$[\text{GSH}]'(t) = 2(-v_5 - v_{11} + v_{12})$	$[\text{GSH}](0) = 1.5 \cdot 10^{-3}$
$[\text{GSSG}]'(t) = v_5 + v_{11} - v_{12}$	$[\text{GSSG}](0) = 0$
$[\text{NADP}]'(t) = -v_{\text{GLUT}} + v_{12}$	$[\text{NADP}](0) = 0.2 \cdot 10^{-6}$
$[\text{NADPH}]'(t) = v_{\text{GLUT}} - v_{12}$	$[\text{NADPH}](0) = 5 \cdot 10^{-5}$
$[\text{NAD}]'(t) = -v_{\text{GLUT}} + v_9$	$[\text{NAD}](0) = 8.9 \cdot 10^{-5}$
$[\text{NADH}]'(t) = v_{\text{GLUT}} - v_9$	$[\text{NADH}](0) = 1.5 \cdot 10^{-7}$

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали нитрат серебра («ЛенРеактив», Россия) и пероксид водорода (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Минск, Беларусь). Лейкоцитарный слой и плазму крови отделяли после двукратного центрифугирования при 1500 об/мин. Спектрофотометрические исследования эритроцитов проводили в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2.7 мМ KCl , 5 мМ D-глюкозы (рН 7.4).

Получение наночастиц проводили с применением методов «зеленой химии» [18]. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным экстрактом растений в соотношении 9 : 1 при рН 8.0 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика на длине волны 400 нм, обусловленного поверхностным плазмонным резонансом. Определение размеров наночастиц проводили спектрофотометрическим методом [26]. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию ионов серебра ($[\text{Ag}^0]$), необходимую для их синтеза.

Гемолиз инициировали путем добавления наночастиц серебра или нитрата серебра к суспензии эритроцитов. Кинетику гемолиза эритроцитов измеряли путем регистрации оптической плотности клеточной суспензии (30 млн/мл) на

длине волны 680 нм при температуре 37°C. По окончании гемолиза (через 50 мин для наночастиц и 20 мин – для нитрата серебра) измеряли спектры поглощения гемолизата. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Осмотический гемолиз проводили путем инкубирования эритроцитов в растворах с различной концентрацией NaCl (48–85 мМ).

Для определения защитного эффекта клетки инкубировали с пероксидом водорода в течение 10 мин до введения гемолизирующего фактора. Защитный эффект определяли по увеличению доли негемолизированных эритроцитов (N/N_0 , где N_0 – начальное количество эритроцитов в суспензии, N – количество клеток после гемолиза) в присутствии окислителя.

Окисленную форму гемоглобина на мембране эритроцитов определяли спектрофотометрически через 10 мин инкубирования с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ после осмотического разрушения клеток. Продукты гемолиза выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 7000 об/мин. Далее записывали спектр поглощения гемолизата на длинах волн 400–450 нм. Измерения проводили с использованием спектрофлуориметра CM-2203 и спектрофотометра UV-VIS PB 2201 (Solar, Республика Беларусь).

Результаты представлены как средние значения \pm стандартное отклонение среднего для трех–пяти независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность значе-

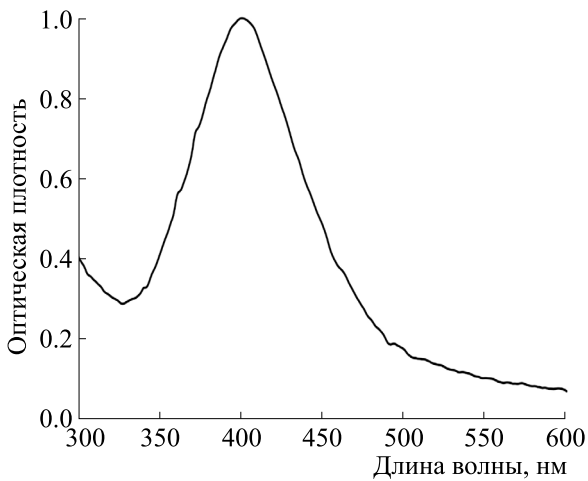


Рис. 1. Спектр поглощения наночастиц серебра. Концентрация серебра 40 мкМ.

ний определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптические свойства наночастиц серебра характеризуются наличием в области видимого света ярко выраженной резонансной полосы, называемой полосой поверхностного плазмонного резонанса, положение которой зависит от размера и формы наночастиц [26]. На рис. 1 показан спектр поглощения синтезированных наночастиц серебра. Положение основного максимума на длине

400 нм и шириной менее 100 нм позволяет сделать вывод о том, что частицы мало различаются по размеру и имеют диаметр в среднем 20 нм. Отсутствие дополнительных пиков поглощения говорит о доминировании сферических наночастиц.

В результате исследований показано, что полученные наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от суммарной концентрации серебра и содержания ионов в растворе. На рис. 2а представлена кинетика гемолиза эритроцитов наночастицами при концентрации серебра от 5 до 60 мкМ. Как видно из представленных данных, скорость гемолиза увеличивается с ростом концентрации серебра, используемого для синтеза наночастиц. При одинаковой концентрации серебра гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами (рис. 2б).

Предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода приводит к снижению доли гемолизированных клеток при разрушении наночастицами серебра. Защитный эффект проявляется при концентрации пероксида водорода в диапазоне от 250 до 1500 мкМ. Доля негемолизированных клеток при этом повышается до 0.8 (рис. 3а). При разрушении эритроцитов нитратом серебра защитный эффект пероксида водорода наблюдается при более низких концентрациях, а доля негемолизированных клеток достигает единицы (рис. 3б).

На основе данных по гемолизу эритроцитов определены значения коэффициентов разрушения k_p и защиты k_3 при разных концентрациях пероксида водорода. Коэффициент k_p характеризу-

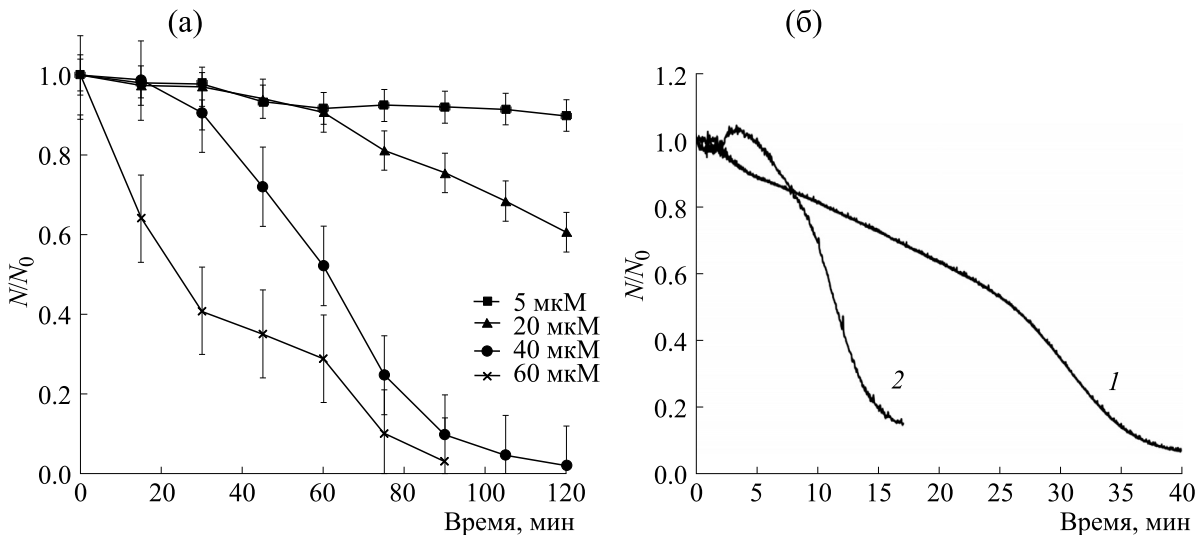


Рис. 2. (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов наночастицами при разных концентрациях серебра; (б) — кинетические кривые гемолиза эритроцитов наночастицами (кривая 1) и нитратом серебра (кривая 2) при концентрации 100 мкМ. N/N_0 — доля негемолизированных эритроцитов, где N_0 — начальное количество эритроцитов в суспензии, N — количество клеток после гемолиза.

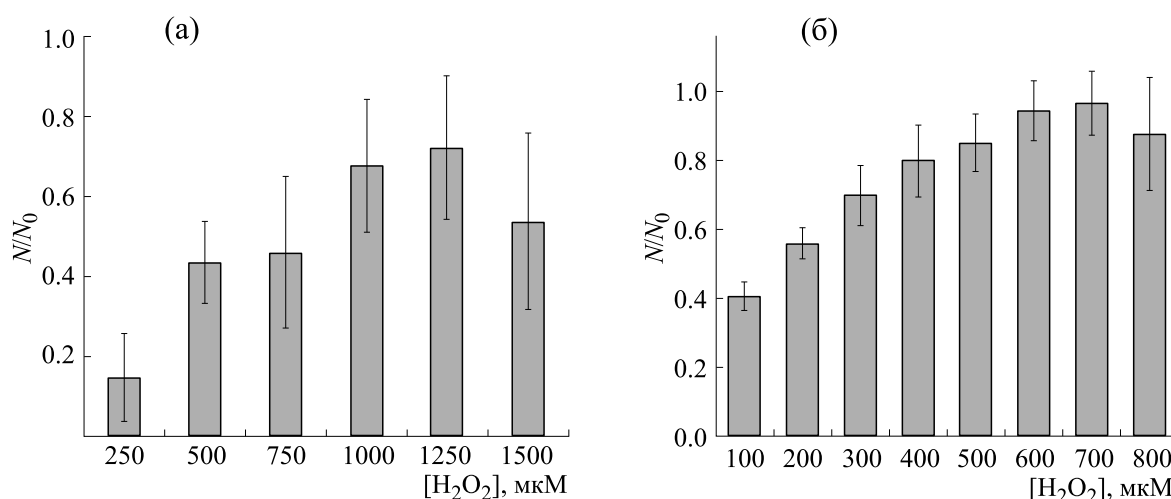


Рис. 3. Зависимость доли негемолизированных эритроцитов от концентрации внеклеточного пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра (а) и нитратом серебра (б). N/N_0 — доля негемолизированных эритроцитов, где N_0 — начальное количество эритроцитов в суспензии, N — количество клеток после гемолиза.

ет токсическое действие ионов серебра и его значение не зависит от концентрации окислителя, т.е. остается постоянным. Значение коэффициента k_3 зависит от количества мембранных комплексов метгемоглобина, и, следовательно, зависит от концентрации внеклеточного пероксида водорода, при действии которого изменяется количество метгемоглобина и его мембраносвязанной формы. Зависимости значений коэффициента защиты от концентрации пероксида водорода при разрушении наночастицами серебра и нитратом серебра показаны на рис. 4. Как видно из

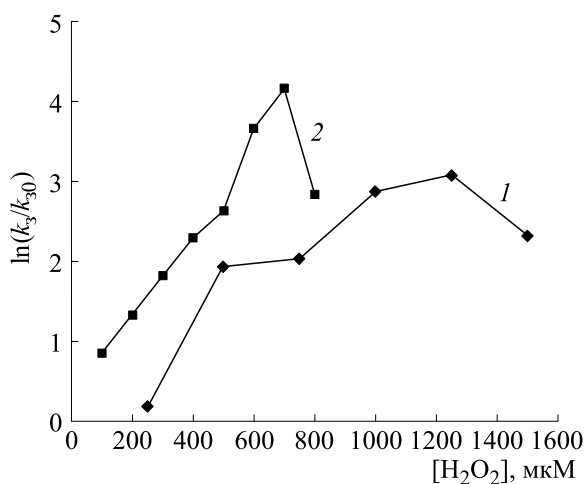


Рис. 4. Зависимость коэффициента защиты от концентрации пероксида водорода при гемолизе наночастицами серебра (кривая 1) и нитратом серебра (кривая 2); k_3 — коэффициент защиты при действии пероксида водорода, k_{30} — коэффициент защиты без пероксида водорода.

представленных на рис. 4 данных, зависимость значений k_3 от концентрации пероксида водорода является гормезисной: величина коэффициента защиты повышается при низких концентрациях окислителя и снижается при высоких. Различия в значениях коэффициента защиты клеток при действии разных гемолизирующих факторов обусловлены, вероятно, изменением соотношения окисленных форм гемоглобина и их мембраносвязанных форм с течением времени.

Зависимость кинетики связывания окисленных форм гемоглобина с мембраной эритроцитов человека от внутриклеточных и внеклеточных условий изучали на основе предложенной математической модели. В рамках модели считается, что внеклеточный пероксид водорода посредством диффузии через мембрану поступает внутрь клетки, где утилизируется в реакциях с гемоглобином и в реакциях с участием каталазы и глутатионпероксидазы. С ростом начальной концентрации пероксида водорода скорость его диффузии и разложения также увеличивается. При концентрациях ниже 1.5 мМ и количестве клеток 30 млн время утилизации внеклеточного пероксида водорода не превышает 10 мин. Таким образом, после периода предварительного инкубирования (10 мин) внеклеточное взаимодействие между окислителем и наночастицами исключается, а в клетке остаются только продукты реакций окисления.

Окисление гемоглобина приводит к образованию метгемоглобина и феррилгемоглобина, которые обратимо связываются с компонентами эритроцитарной мембраны. Количество мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина при этом зависит от количества

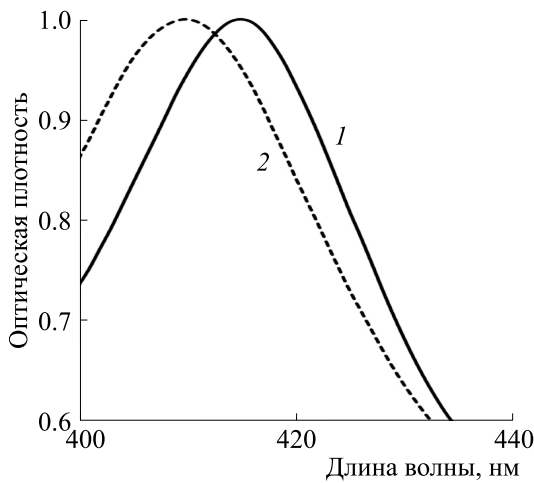


Рис. 5. Спектр поглощения гемолизата эритроцитов в контроле (кривая 1) и гемолизата эритроцитов, проинкубированных с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ (кривая 2).

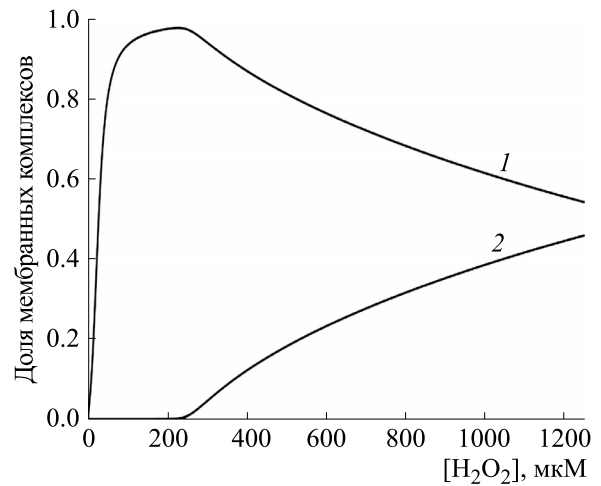


Рис. 6. Зависимость доли мембранных комплексов метгемоглобина (кривая 1) и феррилгемоглобина (кривая 2) от концентрации внеклеточного пероксида водорода.

соответствующих белков в цитоплазме. Восстановление окисленных форм гемоглобина осуществляется компонентами антиоксидательной системы эритроцитов. При уменьшении содержания антиоксидантов восстановление замедляется и происходит накопление окисленных форм белка. Согласно расчетам данный эффект реализуется при концентрации внеклеточного пероксида водорода выше 300 мкМ. На рис. 5 представлен спектр поглощения гемоглобиновых комплексов после осмотического разрушения эритроцитов, проинкубированных с пероксидом водорода в концентрации 250 мкМ. В спектре белковых комплексов гемолизата обработанных пероксидом водорода клеток наблюдается смещение максимума с 415 нм к 405 нм, что является признаком накопления метгемоглобина, а не оксигемоглобина на мембране.

В рамках предложенной модели адапционного механизма степень увеличения структурной стабильности мембраны определяется количеством образованных комплексов «мембрана–метгемоглобин» и «мембрана–феррилгемоглобин». Связывание метгемоглобина с мембраной приводит к увеличению структурной стабильности мембраны, при образовании комплексов «мембрана–феррилгемоглобин», напротив, происходит ускорение процессов перекисного окисления липидов и нарушение взаимодействия цитоскелета с мембраной. Количество образованных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина зависит от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования, числа клеток в растворе, состояния антиоксидательной системы эритроцитов, метаболической активности клеток и внешних мета-

болических условий. На рис. 6 представлены зависимости количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина от концентрации внеклеточного пероксида водорода. При низкой концентрации пероксида водорода в клетке, как видно из представленных на рис. 6 данных, преимущественно образуются мембранные комплексы метгемоглобина. Снижение пула антиоксидантов в клетке и увеличение концентрации пероксида водорода приводит к росту доли мембранных комплексов феррилгемоглобина.

Пероксид водорода в высоких концентрациях приводит к большему накоплению окисленных форм гемоглобина в клетке. С течением времени общее количество окисленного гемоглобина уменьшается благодаря ферментативному и неферментативному восстановлению. На рис. 7 представлены результаты численных экспериментов по изменению количества образованного метгемоглобина и феррилгемоглобина в клетке при концентрации пероксида водорода 400 и 600 мкМ. Из представленных данных видно, что со временем концентрация окисленных форм гемоглобина снижается в связи с восстановлением. Таким образом, повышение защитных свойств клеток, индуцированное пероксидом водорода, будет уменьшаться со временем.

Для более продолжительного сохранения высокой концентрации мембранных комплексов метгемоглобина, необходим пероксид водорода в более высоких концентрациях. В результате при увеличении времени разрушения эритроцитов после воздействия пероксида водорода, положение максимума гормезиса смещается в сторону больших концентраций окислителя. При разрушении эритроцитов наночастицами серебра, бо-

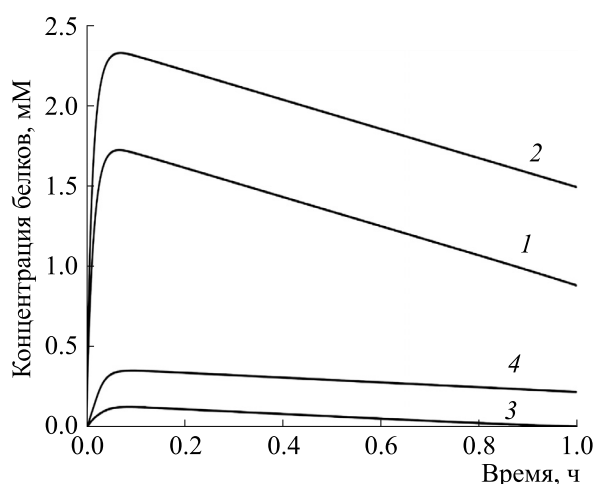


Рис. 7. Зависимость индуцированного пероксидом водорода изменения концентрации метгемоглобина (кривые 1 и 2) и ферритингемоглобина (кривые 3 и 4) от времени. Концентрация пероксида водорода 400 мкМ (кривые 2 и 4) и 600 мкМ (кривые 1 и 3).

лее длительном в сравнении с гемолизом нитратом серебра, максимум кривой гормезиса наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ (рис. 3а), тогда как максимум кривой гормезиса при разрушении нитратом серебра — при 700 мкМ (рис. 3б). Сокращение времени гемолиза, наоборот, приводит к смещению максимума гормезиса к более низким концентрациям окислителя. Нами показано, что при осмотическом гемолизе, когда время разрушения составляет меньше минуты, защитный эффект достигает максимума при концентрации пероксида водорода 100 мкМ (рис. 8).

Следует отметить, что скорость повреждения белков при действии наночастиц серебра и нитрата серебра также различается. В растворе оксигемоглобина при соотношении концентраций $[Hb] : [AgNO_3] = 1 : 10$ нитрат серебра вызывает разрушение белка и накопление агрегатов в течение 1 ч, что приводит к увеличению оптической плотности на длине волны 600 нм в спектре поглощения белка (рис. 9а). На рис. 9б представлен спектр поглощения раствора оксигемоглобина и его изменение при введении наночастиц. Как видно из представленных данных, менее интенсивное взаимодействие наночастиц серебра с оксигемоглобином приводит к образованию агрегатов за 3 ч. Таким образом, более медленное повреждение клеток и белков при действии наночастиц серебра приводит к тому, что для сохранения защитных свойств клеток необходимы более высокие концентрации окислителя, чем при действии нитрата серебра.

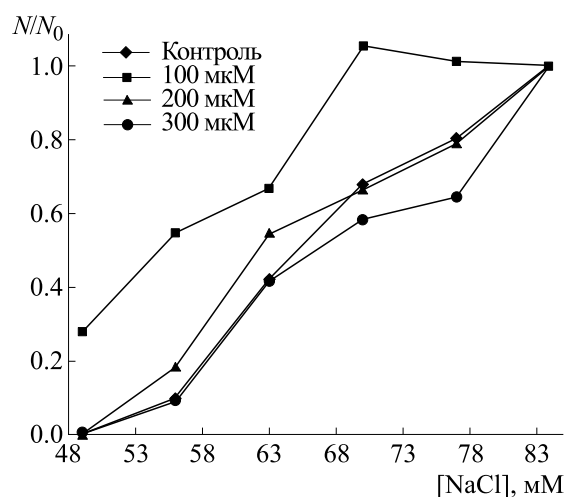


Рис. 8. Влияние пероксида водорода на зависимость доли негемолизированных эритроцитов от концентрации хлорида натрия в растворе. N/N_0 — доля негемолизированных эритроцитов, где N_0 — начальное количество эритроцитов в суспензии, N — количество клеток после гемолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевым этапом создания эффективных здоровьесберегающих технологий служит понимание механизмов адаптации на молекулярно-клеточном уровне. В настоящей работе на основе численного моделирования и спектрофотометрического анализа изучены механизмы регуляции адаптации эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра.

Показано, что наночастицы серебра индуцируют гемолиз эритроцитов, скорость которого зависит от общей концентрации серебра и содержания ионов в растворе. Гемолиз эритроцитов нитратом серебра протекает в два раза быстрее, чем наночастицами.

Установлено, что пероксид водорода позволяет снизить долю гемолизированных клеток при разрушении эритроцитов наночастицами серебра и нитратом серебра. В рамках предложенной модели защита клеток при действии пероксида водорода обусловлена окислением гемоглобина, что приводит к образованию мембраносвязанного состояния окисленных форм белка. Окисление гемоглобина оказывает разнонаправленное действие на устойчивость клеток: обратимое связывание метгемоглобина с мембраной приводит к увеличению структурной стабильности мембраны, увеличение концентрации ферритингемоглобина и его связывание с компонентами мембраны приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов и нарушению взаимодействия цитоскелета с мембраной.

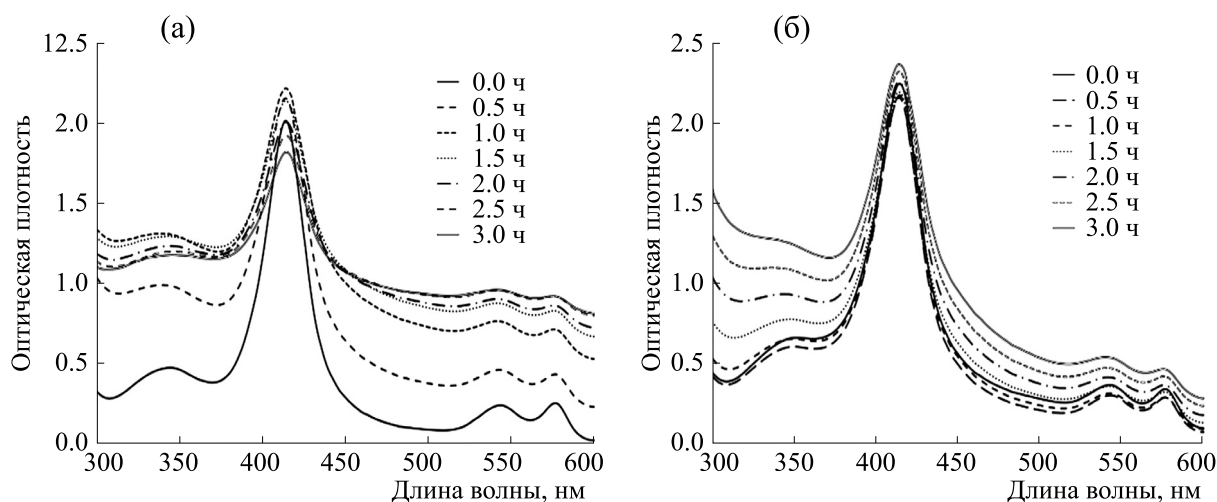


Рис. 9. Изменение спектра поглощения раствора оксигемоглобина во времени при введении нитрата серебра (а) и наночастиц серебра (б).

Показано, что область гормезиса зависит от времени разрушения клеток при действии повреждающего фактора. Максимум кривой гормезиса при разрушении наночастицами серебра наблюдается при концентрации пероксида водорода 1250 мкМ, а при разрушении нитратом серебра — при 700 мкМ. На основе численного моделирования установлено, что зависимость максимума кривой гормезиса от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования обусловлена динамическим характером цитоплазматических механизмов, регулирующих соотношение мембранных комплексов метгемоглобинов и феррилгемоглобинов. Таким образом, динамика процессов связывания метгемоглобина и феррилгемоглобина с мембраной играет ключевую роль в способности эритроцитов к защите от разрушения наночастицами серебра и другими повреждающими факторами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б22-045).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. López-Otín and G. Kroemer, *Cell*, **184** (1), 33–63 (2021).
2. Г. Г. Мартинович, *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы* (БГУ, Минск, 2021).
3. H. Sies and D. P. Jones, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21** (3), 1 (2020).
4. Н. К. Зенков, А. В. Чечушков, П. М. Кожин и др., *Биохимия*, **82** (5), 749 (2017).
5. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Биофизика*, **65** (6), 1081 (2020).
6. A. V. Ulasov, A. A. Rosenkranz, G. P. Georgiev, et al., *Life Sci.*, **291**, 120111 (2021).
7. О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, В. Н. Блиндарь и др., *Прикладная биохимия и микробиология*, **55** (2), 107 (2019).
8. N. Arashiki, N. Kimata, S. Manno, et al., *Biochemistry*, **52**, 5760 (2013).
9. E. M. Welbourn, M. T. Wilson, A. Yusof, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **103**, 95 (2017).
10. L. M. Snyder, N. L. Fortier, J. Trainor, et al., *J. Clin. Invest.*, **76**, 1971 (1985).
11. S. A. Mendanha, J. L. V. Anjos, A. H. M. Silva, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **45**, 473 (2012).
12. A. Kinoshita, Y. Nakayama, T. Kitayama, et al., *FEBS Journal*, **274**, 1449 (2007).
13. P. Jarolim, M. Lahav, S. C. Liu, et al., *Blood*, **76**, 2125 (1990).
14. В. В. Войнаровский и Г. Г. Мартинович, *Биол. мембраны*, **39** (1), 28 (2022).
15. O. Gherasim, R. A. Puiu, A. C. Birca, et al., *Nanomaterials*, **10** (11), 2318 (2020).
16. C. Liao, Y. Li, and S. C. Tjong, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 449 (2019).
17. I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **15**, 2555 (2020).

18. D. He, A. M. Jones, S. Garg, et al., *J. Phys. Chem. C*, **115**, 5461 (2011).
19. H. Holzhütter, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2905 (2004).
20. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биомед. химия*, **51** (6), 626 (2005).
21. R. M. Johnson, G. Jr. Goyette, Y. Ravindranath, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1407 (2005).
22. F. Orrico, M. N. Möller, A. Cassina, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **121**, 231 (2018).
23. L. Gebicka and E. Banasiak, *Acta Biochim. Pol.*, **56** (3), 509 (2009).
24. A. Kinoshita, Y. Nakayama, T. Kitayama, et al., *FEBS Journal*, **274**, 1449 (2007).
25. X. D. Peng, M. P. Washburn, G. P. Sun et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **221** (1), 117 (1996).
26. Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин и др., *Успехи химии*, **77** (3), 242 (2008).

Protective Effect of Hydrogen Peroxide during Erythrocyte Hemolysis by Silver Nanoparticles

V.V. Voinarovski and G.G. Martinovich

Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus

Using numerical modeling and spectrophotometric analysis, mechanisms of regulation of erythrocyte adaptation by hydrogen peroxide during hemolysis by silver nanoparticles were studied. It was shown that silver nanoparticles induce hemolysis of erythrocytes, the rate of which depends on the total concentration of silver and the content of ions in the solution. Hemolysis of erythrocytes by silver nitrate proceeds twice as fast as by nanoparticles. It was found that hydrogen peroxide increases the structural stability of erythrocytes during hemolysis by silver nanoparticles and silver nitrate. The concentration range for hydrogen peroxide, within which the proportion of non-hemolyzed cells (hormesis region) increases, depends on the time of cell destruction due to a damaging factor. The maximum hormetic effect after treatment of cells with silver nanoparticles is observed at the hydrogen peroxide concentration of 1250 μM , and after treatment of cells with silver nitrate, at 700 μM . Based on numerical modeling, it was established that the maximum hormetic effect depends on the concentration of extracellular hydrogen peroxide and the incubation time due to the dynamics of the cytoplasmic mechanisms that regulate the ratio of membrane complexes of methemoglobin and ferryl-hemoglobin.

Keywords: hormesis, adaptation, hydrogen peroxide, erythrocytes, methemoglobin, silver nanoparticles

УДК 577.23

ДЕЙСТВИЕ АСТАКСАНТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2022 г. Р.Р. Крестинин*, Ю.Л. Бабурина*, И.В. Одиноква*,
Л.Д. Сотникова*, О.В. Крестинина*.*#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 07.07.2022 г.

Принята к публикации 18.07.2022 г.

Изучено влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была достигнута путем введения изопротеренола крысам подкожно. Хроническое введение астаксантина осуществляли перорально. Обнаружено, что инъекция изопротеренола ухудшала функциональное состояние митохондрий мозга крыс, в то время как введение астаксантина снимало эффект изопротеренола и функциональное состояние митохондрий у крыс с сердечной недостаточностью улучшалось. При этом дыхательный контроль митохондрий мозга крыс повышался. Содержание основных субъединиц, таких как альфа-субъединица комплекса V, митохондриально кодируемая цитохром с-оксидаза I комплекса IV, фактор сборки комплекса убихинооксидоредуктазы 8 комплекса I, сукцинатдегидрогеназный комплекс II, цитохром b-c1 комплекс субъединицы 2 комплекса III увеличивалось. Изопротеренол ускорял Ca²⁺-индуцированное набухание митохондрий, тогда как астаксантин этот параметр снижал. Астаксантин оказывал защитное действие на митохондрии.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, митохондрии мозга крыс, астаксантин, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0006302922050088, EDN: JIJTXD

Митохондрии считаются важными клеточными органеллами потому что более 90% энергии, которая идет на многочисленные процессы, происходящие в клетке, производится именно митохондриями. Кроме того, митохондрии принимают участие в заболеваниях различной этиологии. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий – важнейшая предпосылка для нормальной функции клетки. Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода, дисбаланс которых в организме приводит к нарушению функционирования митохондрий т.е. к митохондриальной дисфункции. В свою очередь, митохондриальная дисфункция может вызывать окислительный стресс, что приводит к возникновению различных заболеваний. Окислительный стресс является

одной из причин возникновения различных заболеваний у человека, таких как метаболический синдром и нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и воспалительные заболевания [1]. Снизить окислительный стресс способны антиоксиданты [2]. Существуют антиоксиданты, которые вырабатываются организмом человека, и те, которые поступление которых возможно только извне, например, с продуктами питания. Под воздействием различных факторов, таких как загрязнение атмосферы, травмы, стресс и других, количество антиоксидантов, вырабатываемых в организме уменьшается, это может привести к возникновению различных заболеваний. Одним из интересных для исследования антиоксидантов является астаксантин, представляющий собой вещество красного цвета. Он принадлежит к семейству каротиноидов, подклассу ксантофилов; обладает сильной антиоксидантной способностью и может поглощать синглетный кислород и свободные радикалы [3]. Большое количество астаксантина содержится в водоросли *Hematococcus pluvialis*, кроме того он встречается в дрожжах

Сокращения: ИЗО – изопротеренол, ММК – митохондрии мозга крысы, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, МТСО1 – митохондриально кодируемая цитохром с-оксидаза I комплекса IV, С1П-UQCRC2 – цитохром b-c1-комплекс субъединицы 2 комплекса III, ДК – дыхательный контроль.

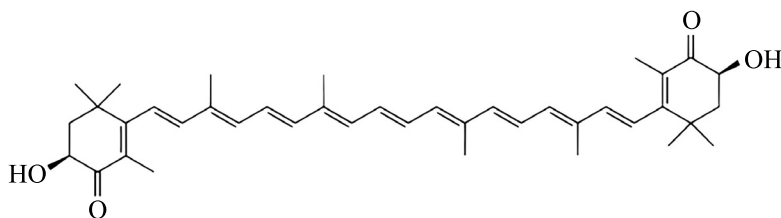


Рис. 1. Химическая структура астаксантина.

и морских животных, таких как лосось, форель, креветки и омары. Структурно молекула астаксантина представляет собой длинный полиеновый скелет с полярными иононовыми кольцами на концах (рис. 1). Наличие полярных гидроксильных и карбонилсодержащих иононовых колец наделяет его более высокой антиоксидантной способностью по сравнению с другими каротиноидами [4]. Астаксантин имеет уникальную молекулярную структуру, которая позволяет ему оставаться как внутри, так и вне клеточной мембраны [5]. Известно, что астаксантин значительно ослабляет митохондриальную дисфункцию, связанную с ишемическим повреждением миокарда, может снижать окислительный стресс [6] и предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний [7–9].

Сердечная недостаточность приводит к уменьшению кровотока из-за снижения эффективности сердечной мышцы [10]. У пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга [11]. Причиной может быть недостаточное снабжение кислородом организма, в том числе головного мозга. Исследования, проведенные авторами работы [12], показали, что астаксантин улучшает обучение и уменьшает ослабление памяти и повреждение нейронов. Его применение увеличивало количество пирамидных нейронов гиппокампа и восстанавливало нормальную морфологию нейронов.

Изопротеренол (ИЗО) — неселективный агонист бета-адренорецепторов. Введение ИЗО представляет собой модель, имитирующую стресс-индуцированные повреждения в различных сердечных патологиях [13]. Целью настоящей работы было исследовать влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс (ММК) с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была вызвана инъекцией ИЗО модели, признанной в международном сообществе и успешно применяемой в нашей лаборатории [14, 15]. Были исследованы дыхательные активности в ММК, изменение основных субъединиц комплексов дыхательной цепи и набухание ММК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка животных к эксперименту. В эксперименте были использованы 16 крыс-самцов линии Wistar, массой 240–250 г (возраст два месяца). Животных содержали индивидуально в помещении с регулируемой температурой (22°C) и кормили стандартной диетой с полным доступом к воде и пище. Для экспериментов крыс разделили на четыре группы (по четыре крысы в каждой группе). Первая группа была контрольной, крысам второй группы вводили перорально растворенный в оливковом масле астаксантин (Natural, Китай) в дозе 150 мг/кг в течение двух недель. Крысам третьей группы для индукции сердечной недостаточности делали инъекцию растворенным в воде ИЗО (100 мг/кг) дважды с интервалом 24 ч. Крысам четвертой группы вводили астаксантин (150 мг/кг) в течение двух недель. Животные первой и третьей групп получали равное количество оливкового масла. Через две недели крысам четвертой группы делали инъекцию ИЗО дважды с интервалом в 24 ч [14, 15], а крысам первой и второй групп вводили физиологический раствор. Митохондрии выделяли из мозга крыс каждой экспериментальной группы.

Приготовление тканевых лизатов. От левого желудочка сердца отрезали 6–7 мг ткани. К кусочку ткани сердца добавляли RIPA-буфер с коктейлем протеаз (4°C), гомогенизировали и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 2 ч при температуре 4°C. Полученные образцы центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белка в тканевых лизатах определяли по методу Брэдфорда, она составляла 2 мг/мл.

Выделение митохондрий мозга крыс. Мозг крыс быстро (в течение 30 с) извлекали и помещали в раствор, содержащий 320 мМ сахарозы, 0.5 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 0.02% бычьего сывороточного альбумина (фракция V, не содержащая жирных кислот) и 10 мМ трис-НСl, pH 7.4. Ткань мозга гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе; отношение мозговой ткани к среде выделения составляло 1 : 10 (масса/объем). Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин. Нечистый митохондриальный осадок получали путем центрифугирования полученного суперна-

танта при 12500 *g* в течение 10 мин. Затем митохондрии очищали в градиенте Перколла (3–10–15–24%). Несинаптические митохондрии мозга суспендировали в растворе, содержащем 320 мМ сахарозы и 10 мМ трис-НСl, рН 7.4, центрифугировали при 11500 *g* в течение 10 мин и ресуспендировали в том же буфере. Все процедуры проводили при 4°C [16]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad, Германия), она составляла 25–30 мг/мл.

Измерение дыхательной активности митохондрий. Митохондрии (1 мг белка/мл) инкубировали при 25°C в среде, содержащей 125 мМ КСl, 10 мМ трис (рН 7.4) и 2 мМ К₂НРО₄. В экспериментах в качестве дыхательных субстратов использовали глутамат (5 мМ) и малат (5 мМ). Эксперимент проводили в закрытой камере после добавления 150 мкМ АДФ к ММК. Оценивали скорость потребления кислорода ($V_{st.2}$, $V_{st.3}$ и $V_{st.4}$; нг-атом О/мин/мг белка).

Измерение митохондриального набухания. Набухание митохондрий определяли путем изменения светорассеяния в митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм (A_{540}) на спектрофотометре Tecan I-Control Infinite 200 (Tecan Group Ltd, Швейцария) при 25°C. Стандартная среда инкубации для анализа набухания содержала 125 мМ КСl, 10 мМ трис, 0.4 мМ КН₂РО₄, 5 мМ глутамата и 5 мМ малата. Концентрация митохондриального белка в лунке составляла 0.5 мг белка/мл. Набухание инициировали добавлением 120 нмоль Са²⁺ на мг белка. Процесс набухания характеризовался временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Аликвоты тканевых лизатов (1 мг/мл), солюбилизованные в буфере Лэммли (Bio-Rad, США), наносили по 20 мкг на каждую ячейку и разделяли при помощи электрофореза (12.5% SDS-PAGE) на белки по массе. Переносили белки с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) и блокировали в растворе Roti-block (Karl Roth, Германия) в течение 1 ч. Полученные мембраны окрашивали антителами к миоглобину, тропонину I и лактатдегидрогеназе (ЛДГ) (Abcam, Великобритания). Моноклональные антитела к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (SantaCruz, США) использовали как контроль белковой нагрузки.

Аликвоты лизатов выделенных интактных митохондрий (2 мг/мл) из каждой группы переносили в пробирки и солюбилизовали в буфере Лэммли (Bio-Rad, США). Образцы митохондриального белка (20 мкг) наносили на каждую линию и разделяли при помощи электрофореза (12.5% SDS-PAGE) по массе, затем осуществляли перенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану

(0.2 мкм) методом вестерн-блоттинга. Изменения в уровнях субъединиц электронно-транспортной цепи определяли с помощью коктейля антител Total OxpHos Rodent WB Antibody Cocktail (ab 110413, Abcam, Великобритания). Коктейль антител OxpHos состоит из альфа-субъединицы комплекса V (CV-ATP5A, 55 кДа), цитохром *b*-с1-комплекса субъединицы 2 комплекса III (СIII-UQCRC2, 48 кДа), митохондриально кодируемой цитохром *c*-оксидазы I комплекса IV (СIV-МТ-СО1, 40 кДа), сукцинатдегидрогеназного комплекса II (СII-SDHB, 30 кДа), фактора сборки комплекса убихиноноксидоредуктазы 8 комплекса I (СI-NDUFB8, 20 кДа). СОXIV (Abcam, Великобритания) использовали для нормирования белковой нагрузки.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали среднее значение параметров из трех-четырех экспериментов $\pm SD$. Статистическую достоверность считали с использованием тестов *t*-критерия Стьюдента и *t*-критерия Стьюдента–Ньюмана–Кайло.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сначала мы проверили изменение содержания белков, таких как миоглобин, тропонин I и лактатдегидрогеназа, с целью выявления нарушения функционирования сердца в присутствии изопротеренола. Для этого тканевые лизаты сердца разделяли на белки по массе методом электрофореза в системе Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали антителами к миоглобину, тропонину I и ЛДГ. Как видно из рис. 2, уровень всех белков в тканевых лизатах сердца третьей группы (с инъекциями ИЗО) снижался. На рис. 2а–в в верхней части показан вестерн-блоттинг исследуемых белков. В нижней части рисунка представлено количественное соотношение белковых полос после нормирования их по GAPDH. Снижение содержания белков в тканевых лизатах у крыс после инъекции ИЗО (сравнение колонок 3 и 1) свидетельствует о нарушении функционирования сердца. Астаксантин снимал эффект ИЗО, и уровень белков повышался (сравнение колонок 4 и 3).

Следующим этапом исследования было выяснить влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс с сердечной недостаточностью. В табл. 1 представлены результаты влияния астаксантина на дыхательные активности в митохондриях мозга крыс, которым вводили ИЗО для достижения сердечной недостаточности. Скорость потребления кислорода в состояниях 2 ($V_{st.2}$) отражает субстрат-зависимое дыхание изолированных митохондрий, а в состоянии 3 ($V_{st.3}$) – скорость потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии.

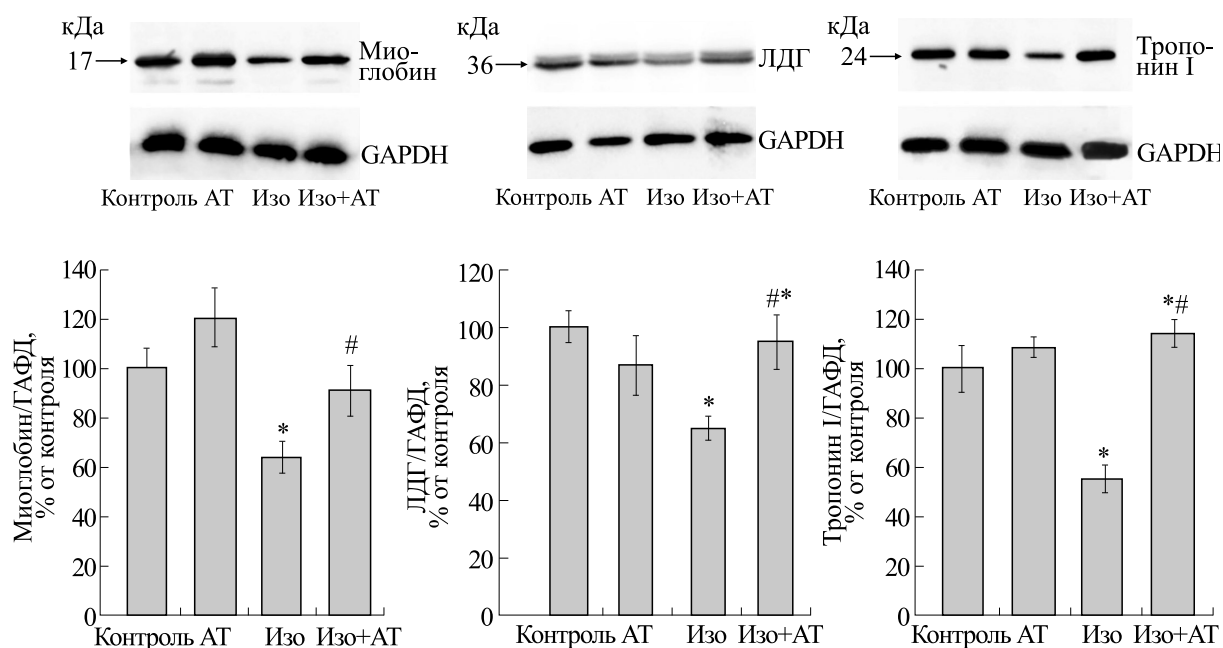


Рис. 2. Влияние астаксантина (АТ) и изопротеренола (ИЗО) на изменение содержания миоглобина, тропонина I и ЛДГ в тканевых лизатах сердца крыс. Образцы белка экстрагировали и подвергали вестерн-блоттингу. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. В верхнем ряду – иммуноокрашивание антителами к миоглобину, ЛДГ, тропонину I и GAPDH; в нижнем ряду – количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленная как отношение количества отдельных белков к GAPDH; данные представлены как среднее \pm SD трех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$ – достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем (первая группа); # – $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость оценивали с помощью теста Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

Мы наблюдали, что $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ снижалась на 50 и 30% соответственно в ММК после инъекций ИЗО по сравнению с контролем. Хроническое введение астаксантина не повлияло на скорости потребления кислорода в $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ по сравнению с контролем. Однако $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ в ММК из четвертой группы повышались на 70 и 60% соответственно по сравнению с ММК, изолированными из группы крыс после инъекции ИЗО. Скорость

потребления кислорода в состоянии 4 ($V_{st.4}$, скорость дыхания в отрегулированном состоянии после истощения избытка АДФ) в ММК с инъекцией ИЗО замедлялась на 35% по сравнению с контролем. После введения астаксантина в сочетании с ИЗО $V_{st.4}$ в ММК не изменилась по сравнению с контролем и увеличивалась на 30% относительно $V_{st.4}$ в ММК, изолированных из крыс, которым вводили ИЗО. Показателем работоспо-

Таблица 1. Влияние астаксантина и изопротеренола на дыхательную активность митохондрий, изолированных из каждой группы крыс

	$V_{st.2}$	$V_{st.3}$	$V_{st.4}$	RCI
Первая группа	14.37 \pm 1.8	102.06 \pm 6.26	12.35 \pm 3.69	8.26 \pm 1.1
Вторая группа	13.07 \pm 1.6	99.5 \pm 13.78	12.81 \pm 2.67	7.76 \pm 1.32
Третья группа	7.65 \pm 1.12*	77.74 \pm 3.74*	14.23 \pm 0.51*	5.46 \pm 0.98
Четвертая группа	12.99 \pm 0.54#	116.84 \pm 2.19#	12.65 \pm 0.61#	9.17 \pm 2.73*#

Примечание. Показатели дыхательной активности в состояниях 2, 3 и 4 определяли, как число нг-атомов кислорода, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. ДК рассчитывается как отношение $V_{st.3}$ к $V_{st.4}$; данные представлены как среднее \pm SD четырех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$, указывает на достоверную разницу относительно контроля (ММК из первой группы); # – $p < 0.05$, указывает на достоверную разницу по сравнению с ММК, изолированными из группы крыс, которым вводили ИЗО (третья группа).

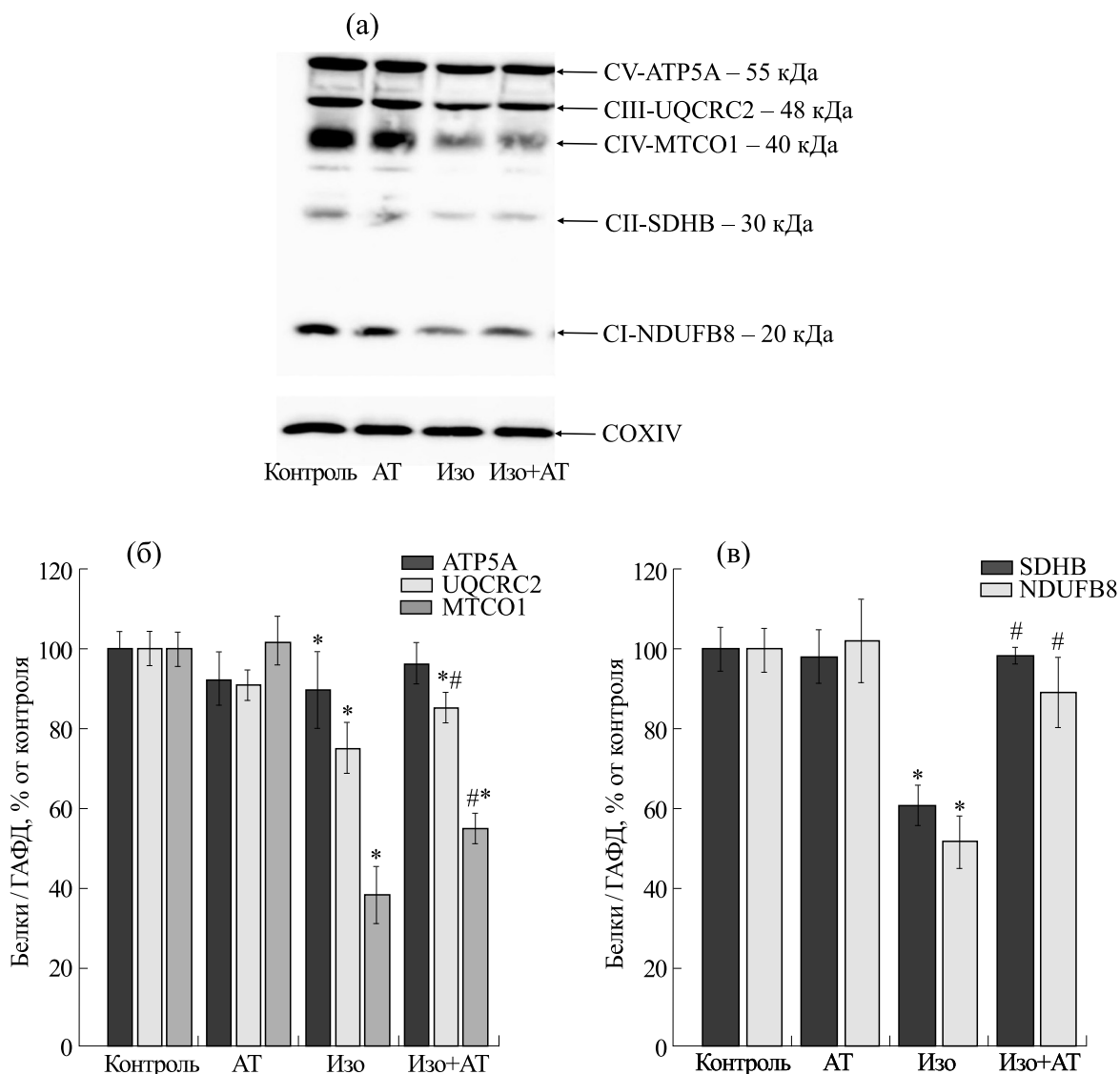


Рис. 3. Влияние астаксантина и ИЗО на изменение уровней основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в ММК. COXIV был использован в качестве контроля белковой нагрузки. (а) – Иммуноокрашивание коктейлем антител OXPHOS и COXIV; (б) и (в) – количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, данные представлены как среднее \pm SD из трех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$ свидетельствует о достоверном различии уровня белка по сравнению с контролем (первая группа); # – $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

способности митохондрий является коэффициент дыхательного контроля (ДК), который рассчитывается как отношение $V_{st.3}/V_{st.4}$. Следует отметить, что ДК у крыс, которым вводили астаксантин, не изменялся по отношению к ДК контрольных крыс. ДК в митохондриях крыс после инъекции ИЗО снижался приблизительно на 40%, в то время как ДК в митохондриях крыс, получавших астаксантин, с последующей инъекцией ИЗО увеличился на 40% по сравнению с ДК в митохондриях крыс, которым вводили ИЗО.

Далее мы проанализировали изменение содержания основных субъединиц комплексов электрон-транспортной цепи в интактных ММК, выделенных из каждой группы крыс. На рис. 3а показан вестерн-блоттинг основных субъединиц комплексов дыхательной цепи, таких как CV-ATP5A (55 кДа), CIII-UQCRC2 (48 кДа), CIV-MTCO1 (40 кДа), CII-SDHB (30 кДа), CI-NDUFB8 (20 кДа). COX IV использовали как контроль белковой нагрузки. На рис. 3б,в изображены диаграммы, отражающие количественное соотношение белковых полос после нормирования их

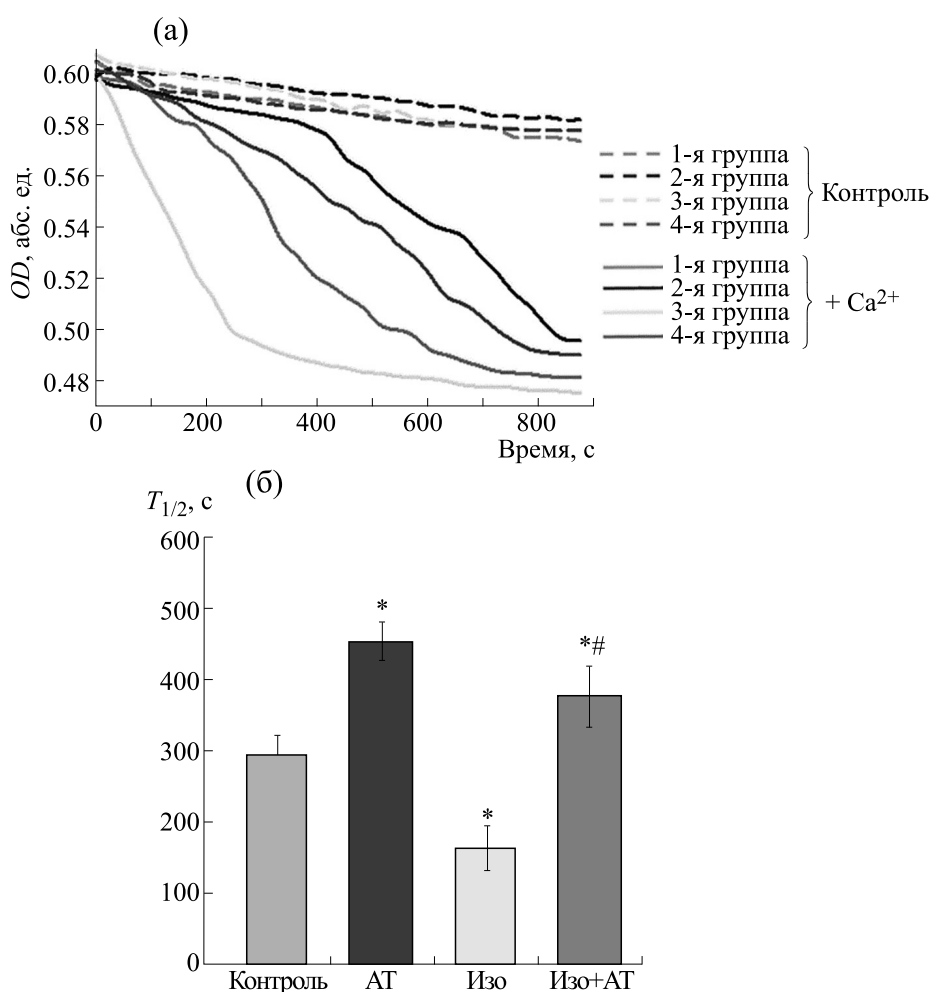


Рис. 4. Влияние астаксантина и ИЗО на набухание митохондрий мозга крыс: (а) — кривые набухания ММК, изолированных из крыс каждой группы; (б) — диаграмма, отражающая время достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$). Набухание инициировалось ионами Ca^{2+} и составляло 120 нмоль на мг белка. Данные представлены как среднее \pm SD из четырех независимых экспериментов. * — $p < 0.05$ указывает на достоверную разницу в $T_{1/2}$ относительно контроля (первая группа); # — $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

по COX IV. Введение астаксантина не изменяло уровень всех субъединиц комплексов дыхательной цепи по сравнению с контролем (вторая группа против первой), тогда как инъекция ИЗО снижала содержание CV-ATP5A на 15%, CIII-UQCRC2 — на 25%, CIV-MTCO1 — на 60%, CII-SDHB — на 40%, а CI-NDUF8 — на 50% относительно контроля (третья группа против первой). При комбинированном действии астаксантина и ИЗО мы наблюдали, что по сравнению с контролем не было изменений в содержании CV-ATP5A-, CII-SDHB- и CI-NDUF8-субъединиц, однако содержание CIII-UQCRC2 и CIV-MTCO1 снижалось на 15 и 45% соответственно (четвертая группа против первой). Следует отметить, что содержание CV-ATP5A увеличивалось на 10%, CIII-UQCRC2 — на 10%, CIV-MTCO1 — на 17%, CII-SDHB — на

38% и CI-NDUF8 — на 35% по сравнению с содержанием субъединиц в ММК, изолированных из группы крыс с инъекцией ИЗО (четвертая группа против третьей).

Общепринято, что при разобщении окислительного фосфорилирования наблюдается изменение проницаемости митохондриальной мембраны. Поэтому на следующем этапе нашего исследования мы измерили набухание митохондрий в наших экспериментальных условиях. На рис. 4а показаны кривые набухания митохондрий, изолированных из всех групп крыс. Набухание инициировалось ионами Ca^{2+} (120 нмоль на мг белка). Рис. 4б количественно отражает процесс набухания, охарактеризованный временем достижения полумаксимального сигнала све-

торассеяния ($T_{1/2}$). $T_{1/2}$ митохондрий в присутствии астаксантина увеличивался в полтора раза по сравнению с контролем (вторая группа против первой), т.е. скорость набухания снижалась. Инъекция ИЗО привела к тому, что $T_{1/2}$ набухания в ММК снижалась в два раза по сравнению с контролем (третья группа против первой), т.е. скорость набухания повышалась. Введение астаксантина крысам с последующей инъекцией ИЗО увеличивало $T_{1/2}$ на 20% по сравнению с контролем (четвертая группа против первой) и более чем в два раза снижало по сравнению с $T_{1/2}$ в ММК с инъекцией ИЗО (четвертая группа против третьей).

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальная дисфункция может быть причиной различных заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, различные поражения печени и скелетно-мышечной системы, сепсис и психические расстройства [17]. Митохондриальная дисфункция, вызванная окислительным повреждением, вызывает морфологические и функциональные изменения в митохондриях. При патологических состояниях структурные изменения, возникающие при окислительных повреждениях, такие как набухание, фрагментация митохондрий и деление митохондрий, становятся более выраженными [18]. При возникновении различных заболеваний может происходить уменьшение потребления кислорода митохондриями и, как следствие, возникает митохондриальная дисфункция [19]. Митохондриальная дисфункция характеризуется потерей эффективности цепи переноса электронов и снижением синтеза высокоэнергетических молекул, таких как аденозин-5'-трифосфат (АТФ), что характерно для хронических заболеваний [20]. Ранее мы показали, что астаксантин улучшал функциональное состояние митохондрий сердца крыс при сердечной недостаточности [7–9].

Авторы работы [21] показали, что в результате поражения сердца сердечная недостаточность может индуцировать повреждения головного мозга, поскольку у пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга. Было показано, что повреждения головного мозга наблюдаются в широком диапазоне клинических состояний и сердечных функций, кроме того, они могут влиять на результаты лечения пациентов. Существуют данные, показывающие участие нейрогормональных, пищевых и воспалительных механизмов в этом сложном процессе [21]. В настоящей работе был исследован эффект астаксантина на функцио-

нальное состояние митохондрий мозга, изолированных из крыс с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была достигнута путем инъекции изопроterenолола, модели широко используемой в международном научном сообществе [14, 15]. Снижение уровней белков, таких как миоглобин, тропонин I и ЛДГ в тканевых лизатах левого желудочка сердечной мышцы показало, что сердечная недостаточность была достигнута.

В различных патологиях наблюдается снижение скорости потребления кислорода митохондриями, это может быть связано с нарушением работы переносчиков электронов [22]. Известно, что при окислительном стрессе или гипоксии скорость потребления кислорода митохондриями в $V_{st.3}$ снижается. Кроме того, низкая скорость дыхания неповрежденных митохондрий в состоянии $V_{st.4}$ может быть связана с тем, что высокий мембранный потенциал препятствует переносу протонов через внутреннюю мембрану, и тем самым останавливает поток электронов. Утечка ионов через мембрану снимает мембранный потенциал и приводит к увеличению скорости дыхания $V_{st.4}$. Повышение $V_{st.4}$ может происходить также благодаря увеличению проницаемости внутренней мембраны митохондрий. В настоящей работе мы заметили, что в ММК, изолированных из крыс третьей группы (инъекция ИЗО), $V_{st.3}$ снижался, а $V_{st.4}$ увеличивался по сравнению с контролем, что приводило к снижению ДК митохондрий. Напротив, мы заметили, что $V_{st.3}$ увеличивался, а $V_{st.4}$ снижался в митохондриях в группе крыс, которым вводили астаксантин, с последующей инъекцией ИЗО. Астаксантин отменял эффект ИЗО и ДК митохондрий увеличивался.

Известно, что электрон-транспортная цепь во внутренней митохондриальной мембране состоит из трансмембранных белковых комплексов (I–IV) и свободно движущихся переносчиков электронов — убихинона и цитохрома *c*. Для правильной работы комплексы должны быть собраны в специально образованный суперкомплекс. Эти собранные компоненты вместе с комплексом V становятся основой для производства АТФ при окислительном фосфорилировании. Следует отметить, что дефекты дыхательных комплексов и АТФ-синтазы влияют на митохондриальные функции [23, 24]. В наших экспериментальных условиях уровень основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в ММК, изолированных из крыс третьей группы (инъекция ИЗО) снижался, что свидетельствовало о снижении митохондриальной эффективности. Астаксантин отменял эффект ИЗО и содержание субъединиц в интактных ММК повышалось.

Снижение скорости потребления кислорода митохондриями может происходить также и в результате разрыва мембран и набухания митохондрий, вследствие чего проницаемость внутренней мембраны митохондрий может изменяться [25]. Ранее мы наблюдали, что скорость набухания митохондрий сердца, изолированных из крыс с сердечной недостаточностью, увеличивалась, тогда как астаксантин предотвращал эффект ИЗО и скорость набухания снижалась [7, 8]. В настоящем исследовании мы заметили тот же эффект в митохондриях мозга крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной инъекцией ИЗО. Мы показали, что в условиях сердечной недостаточности скорость потребления кислорода в состоянии 3 снижалась, а в состоянии 4 увеличивалась, вследствие чего снижался и дыхательный контроль, в то время как астаксантин снимал воздействие ИЗО, дыхательный контроль повышался, и функциональное состояние митохондрий улучшалось. Кроме того, астаксантин повышал уровень основных субъединиц комплексов дыхательной цепи и АТФ синтазы в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью, тем самым снижая проницаемость внутренней мембраны, что также улучшало функциональное состояние мозга крыс. Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что астаксантин выполняет защитную функцию в митохондриях, повышая их эффективность. Поэтому астаксантин можно рассматривать как важный ингредиент в питании для профилактики возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и повреждений головного мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе были использовано научное оборудование Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-00131 и № 20-015-00072), а также Государственного задания 075-01027-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили в соответствии с Положением о проведении исследований на экспериментальных животных (приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Протокол одобрен комиссией по биологической безопасности и этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол №05/2022 от 05 марта 2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. S. Bhatti, G. K. Bhatti, and P. H. Reddy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863** (5), 1066 (2017).
2. B. Halliwell, *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 73 (1995).
3. J. P. Yuan, J. Peng, K. Yin, and J. H. Wang, *Mol. Nutr. Food Res.*, **55** (1), 150 (2011).
4. R. R. Ambati, S. M. Phang, S. Ravi, and R. G. Aswathanarayana, *Mar. Drugs*, **12** (1), 128 (2014).
5. I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46** (2), 185 (2006).
6. S. H. Kim and H. Kim, *Nutrients*, **10** (9), 1137 (2018).
7. Y. Baburina, R. Krestinin, I. Odinkova, et al., *Antioxidants (Basel)*, **8** (12), 576 (2019).
8. R. Krestinin, Y. Baburina, I. Odinkova, et al., *Biomedicines*, **8** (10), 437 (2020).
9. O. Krestinina, Y. Baburina, R. Krestinin, et al., *Antioxidants (Basel)*, **9** (3), 262 (2020).
10. K. Mueller, F. Thiel, F. Beutner, et al., *Circ Res.*, **126** (6), 750 (2020).
11. O. Havakuk, K. S. King, L. Grazette, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **69** (12), 1609 (2017).
12. C. Galasso, I. Orefice, P. Pellone, et al., *Mar. Drugs*, **16** (8), 247 (2018).
13. P. Balakumar, A. P. Singh, and M. Singh, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **56** (1), 1 (2007).
14. P. Akila, L. Asaikumar, and L. Vennila, *Biomed. Pharmacother.*, **85**, 582 (2017).
15. I. Odinkova, Y. Baburina, A. Kruglov, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (6), 1555 (2018).
16. Y. Baburina, I. Odinkova, T. Azarashvili, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (11), 3499 (2018).
17. G. T. Rezin, G. Amboni, A. I. Zugno, et al., *Neurochem. Res.*, **34** (6), 1021 (2009).
18. S. H. Kim, J. W. Lim, and H. Kim, *Nutrients*, **10** (9), 1320 (2018).
19. P. M. Herst, M. R. Rowe, G. M. Carson, and M. V. Berridge, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **8**, 296 (2017).
20. P. H. Reddy and T. P. Reddy, *Curr. Alzheimer Res.*, **8** (4), 393 (2011).
21. J. S. Bock and S. S. Gottlieb, *Circulation*, **121** (23), 2592 (2010).
22. C. Guo, L. Sun, X. Chen, and D. Zhang, *Neural Regen. Res.*, **8** (21), 2003 (2013).
23. R. Guo, S. Zong, M. Wu, et al., *Cell*, **170** (6), 1247 (2017).
24. S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, et al., *Science*, **281** (5373), 64 (1998).
25. K. A. Webster, *Future Cardiol.*, **8** (6), 863 (2012).

The Effect of Astaxanthin on the Functional State of Rat Brain Mitochondria in Heart Failure

R.R. Krestinin*, Yu.L. Baburina*, I.V. Odinkova*, L.D. Sotnikova*, and O.V. Krestinina*

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

The effect of astaxanthin on the functional state of brain mitochondria in rats with heart failure was studied. The induction of heart failure in rats was performed through subcutaneous injection of isoproterenol. Astaxanthin was chronically administered through the oral route. It was found that application of isoproterenol impaired the functional state of rat brain mitochondria, while administration of astaxanthin abolished the effect of isoproterenol and improved the functional state of mitochondria in rats with heart failure. At the same time, the respiratory control index of rat brain mitochondria increased. The content of the main subunits, such as alpha subunits of complex V, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I of complex IV, ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8 of complex I, succinate dehydrogenase (complex II), cytochrome *b-c1* complex subunit 2 of complex III increased. Isoproterenol accelerated Ca^{2+} -induced swelling of mitochondria, while astaxanthin reduced this parameter. Astaxanthin exhibited a protective effect on mitochondria.

Keywords: heart failure, rat brain mitochondria, astaxanthin, mitochondrial dysfunction, oxidative stress

ОЦЕНКА ОКРАШИВАНИЯ ТКАНИ МОЗГА ЭКСТРАКТОМ ЧАЯ УЛУН С ОСОБЫМ ВНИМАНИЕМ К ГЛАДКОМУ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМУ РЕТИКУЛУМУ

© 2022 г. Е.А. Шишкова*, И.В. Краев**, В.В. Рогачевский*.*

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

**Faculty of Health and Social Care, the Open University, Walton Hall, Milton Keynes, UK, MK7 6AA

#E-mail: cckpem.icb.ras@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2022 г.

После доработки 08.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Электронная микроскопия остается золотым стандартом в исследованиях нервной системы, поскольку позволяет получать изображения ультраструктуры нервной ткани с адекватным пространственным разрешением. Несмотря на высокое разрешение электронно-микроскопических изображений, их корректная интерпретация возможна только при наличии достаточного контраста элементарных мембран, компонентов цитоплазмы и цитоскелета, которого достигают с использованием опасных реагентов и тяжелых металлов. Ранее для замены токсичного и радиоактивного ацетата диоксида урана был предложен раствор сухого экстракта чая улун, но окрашивание с ним давало более слабый контраст внутриклеточных органелл. Известно, что в зависимости от природы образца и условий эксперимента различные ткани обладают разной способностью связывать краситель. В данной работе с помощью просвечивающей электронной микроскопии мы впервые оценили красящие свойства экстракта чая улун на ткани мозга новорожденной и взрослой крысы. Мы обнаружили, что приготовленный насыщенный водный экстракт чая улун не уступает стандартным красителям и имеет ряд преимуществ. Показано, что его использование позволяет в незрелом мозге выявлять тончайшие детали гладкого эндоплазматического ретикулама нейронов, а в сочетании с осмированием с феррицианидом калия и какодилатным буфером обеспечивает лучшую визуализацию цитоскелета нейронов и гладкого ретикулама терминальных ламелл астроцитов. Окрашивание насыщенным водным экстрактом чая улун после общепринятого протокола химической фиксации хорошо подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных, в том числе для пакетного контрастирования большого числа препаратов.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, экстракт чая улун, контраст мембран; эндоплазматический ретикулум; гиппокамп.

DOI: 10.31857/S000630292205009X, EDN: JILFBC

Современный уровень исследований центральной нервной системы методами электронной микроскопии включает 3D-реконструкции больших объемов ткани мозга на основе автоматической сегментации стека изображений серийных ультратонких срезов на отдельные клеточные компартменты при помощи машинного обучения. В таких исследованиях коннектомики по-

средством сканирующей электронной микроскопии (SEM) основное внимание уделяют анализу общей структуры отростков нейронов: дендритов, дендритных шипиков и аксональных пресинаптических бутонов, что требует высокого контраста их плазматических мембран.

Для усиления контраста мембран в ходе подготовки ткани для электронной микроскопии фиксацию ткани альдегидами проводят в присутствии специальных добавок, таких как ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} . После первичной фиксации ткань дополнительно фиксируют восстановленным ферроцианидом тетраоксидом осмия (rO), или повторно в OsO_4 (rOO или двойное осмиро-

Сокращения: SEM – сканирующая электронная микроскопия, ОТО – осмий–тиокарбогидразид–осмий, PSD – постсинаптическое уплотнение, ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия, УАс – уранилацетат, ОТЕ – экстракт чая улун (oolong tea extract), гЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум, UL – краситель на основе солей лантаноидов (UranylLess).

вание), или в вариантах фиксаторов/красителей, содержащих чрезвычайно токсичный тиокарбондигидрид (гОТО), или другими контрастерами. В качестве последнего этапа кусочки ткани часто насыщают различными солями тяжелых металлов (см., например, работы [1–5]).

Такие препараты в целом имеют достаточный контраст мембран для последующего анализа методами SEM, такими как сканирование поверхности блока ткани, последовательно срезаемого алмазным ножом (SBF-SEM) или ионным пучком (FIB-SEM), или сканирование ультратонких срезов (ATUM- или Multi-SEM). Но эти методы имеют несколько присущих им недостатков, ограничивающих комплексный анализ ультраструктуры клетки. Известно, что наличие постсинаптического уплотнения (PSD) и/или пресинаптических везикул наряду с синаптической щелью является критерием идентификации ассиметричных и симметричных синапсов [6, 7], а площадь активной зоны или мембраны, занятой PSD, является важным маркером уровня активности синапса. Поэтому высокий контраст этих структур играет важную роль в анализе центральной нервной системы методами электронной микроскопии. В то же время, в отличие от стандартных протоколов подготовки ткани для просвечивающей электронной микроскопии (TEM), гОТО-препараты имеют значительно меньший контраст PSD и плазматических мембран синаптической щели [8]. Более того, на некоторых препаратах, подготовленных для SBF-SEM с применением гОТО-протокола, PSD вообще невозможно идентифицировать (см., например, работу [9]). Еще одним недостатком ОТО-метода является очень низкий контраст других внутриклеточных структур, таких как рибосомы, ядерный хроматин, тонкие филаменты, в некоторой степени снижены контраст микротрубочек и электронная плотность митохондриального матрикса (см. иллюстрации в работе [8] и рис. 5 в работе [10]).

С учетом этих недостатков некоторым исследователям при подготовке образцов для SEM пришлось вернуться к методу двойного контрастирования срезов уранилацетатом (UAc) и солями свинца (см., например, работу [10]). Так, срезы ткани, подготовленной по протоколу с двойным осмированием, последовательно контрастированные уранилацетатом и свинцом (рис. 5 в работе [5], рис. 5 в работе [10]) или только свинцом (рис. 5 в работе [5]), на SEM-изображениях имели достаточный контраст PSD, синаптической щели и некоторых других внутриклеточных структур. Кроме этого, классический протокол подготовки для TEM, за которым следовало

двойное контрастирование, облегчал подготовку препаратов для SEM [10].

Почти все компоненты для подготовки биологических образцов для электронной микроскопии, применяемые для усиления контраста, являются опасными, и чем меньше они будут использоваться, тем лучше. Поэтому если контрастирование свинцом является, по-видимому, незаменимым для визуализации тонких деталей не только в TEM, но и в SEM, то токсичный и радиоактивный UAc можно легко заменить на альтернативные менее опасные реагенты.

Более десяти лет назад в качестве заменителя UAc для контрастирования ультратонких срезов соединительной ткани легких и гепатоцитов был предложен забуференный фосфатами экстракт чая улун (OTE-stain) [11, 12]. Позднее OTE-контрастирование было протестировано на простейших [13], бактериальных клетках [14] и на периферическом миелинизированном нервном волокне [15]. Авторы отмечали, что, несмотря на меньший общий контраст образцов, окрашенных с OTE, некоторые тонкие детали выявлялись лучше [13]. В то время как стандартное двойное контрастирование (UAc и цитрат свинца) давало более четкие очертания шероховатого эндоплазматического ретикулума и митохондрий, после окраски с OTE слабоконтрастные цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (гЭР) проявляли лучшую сохранность и были менее фрагментированы [12].

С одной стороны, гЭР возбудимых клеток представляет собой сложно разветвленную сеть цистерн и играет ключевую роль в динамике ионов кальция во время сокращения мышц и в вызванной или гомеостатической синаптической пластичности центральной нервной системы. Поэтому организацию гЭР кардиомиоцитов и нейронов экстенсивно исследовали с помощью FIB-SEM или SBF-SEM на основе ручной 3D-реконструкции в больших объемах клеточных компартментов, хотя и с относительно низким оптическим разрешением (15 нм/пиксель) [16] или с вышеупомянутыми ограничениями контрастирования SEM-препаратов [17]. В этом отношении анализ гЭР можно было бы облегчить его автоматизированной 3D-реконструкцией на TEM-изображениях более высокого разрешения, но этому может препятствовать слабый контраст гЭР на TEM-препаратах. С другой стороны, наряду с ограниченным числом публикаций по красящим свойствам OTE также известно, что в зависимости от природы образца и других экспериментальных условий, биологические ткани и их внутриклеточные структуры различаются по своей способности связывать краситель. Поэтому выбор адекватной техники контрастирования явля-

ется ключевым моментом как для комплексной интерпретации ультраструктуры, так и для получения корректной эталонной модели для обучения нейронной сети.

В попытке оценить красящие свойства ОТЕ по сравнению с такими широко используемыми контрастерами для ТЕМ, как UAc и UranylLess, мы обнаружили, что ультратонкие срезы, окрашенные экстрактом чая улун, полученным из заваренного чая (рОТЕ), имеют такой же контраст плазматических мембран, как и окрашенные уранилацетатом. рОТЕ также имеет ряд преимуществ в контрастировании гЭР и других внутриклеточных структур нейронов и глиальных клеток, по крайней мере в ювенильном мозге, и хорошо подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мозг раннего постнатального периода. Гиппокамп криоанестезированных новорожденных крыс Wistar выделяли между первыми и вторыми сутками постнатального развития, разрезали лезвием перпендикулярно длинной оси на кусочки менее 1 мм в капле фиксатора и погружали в тот же фиксатор, содержащий 3% параформальдегида и 2.5% глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере, на 1 ч при комнатной температуре, а затем на ночь при 4°C. На следующий день образцы были дважды отмыты в том же буфере и для четкости экспериментальных данных разделены на две группы. Одну группу образцов постфиксировали в 1%-м растворе OsO₄ в 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.01% K₂Cr₂O₇ (группа Os). Другую группу постфиксировали в 1%-м растворе восстановленного OsO₄ добавлением 1.5%-го феррицианида калия (K₃[Fe(CN)₆] (непосредственно перед использованием) в тот же буфер, содержащий бихромат калия (группа rOs). Осмирование обеих групп образцов проводили в течение ночи при 4°C, отмывали дважды деионизированной водой (milliQ, каждая смена по 10 мин), обезвоживали в серии возрастающих концентраций этанола и затем в 100%-м ацетоне, далее заливали в смесь смол EMBed812 (на ночь в смесь EMBed812 с 100%-м ацетоном в объемном отношении 1 : 1 и затем в чистую смолу), которую полимеризовали 48 ч при 60°C. Отвержденные блоки были заточены специально приготовленными стеклянными ножами [18] для получения пирамидок в СА3-области гиппокампа (содержащей большое число конусов роста мшистых волокон). С каждой пирамидки на ультратоме Leica EM UC6 с помощью алмазного ножа были получены срезы номинальной толщиной 60 нм, которые монтировали на медные бленды (сеточки с

одним слотом), покрытые пленкой-подложкой из пиолоформа, укрепленной аморфным углеродом.

Получение экстракта чая улун. Ввиду отсутствия местных поставщиков ОТЕ и в отличие от предыдущих публикаций, описывающих использование ОТЕ вместо UAc, мы использовали водный экстракт, полученный из свежеприготовленного молочного чая улун (рОТЕ), доступного в любом магазине. В данной работе мы использовали чай, приобретенный 10 лет назад (Ahmad Tea Ltd., дата упаковки 01.2011). Для получения рОТЕ 5 г сухих листьев чая в 50 мл деионизированной воды (milliQ) в стеклянном флаконе нагревали в микроволновой печи до начала кипения, флакон оборачивали алюминиевой фольгой и оставляли настаиваться минимум 40 мин. Полученный раствор вместе с листьями можно хранить плотно закрытым и завернутым в фольгу при комнатной температуре в течение нескольких недель и использовать по необходимости. Для удаления крупных частиц непосредственно перед использованием экстракт центрифугировали и пропускали через шприцевой фильтр с порами диаметром 0.2 мкм. Сухой вес фильтрованного рОТЕ составлял около 2.8% и не менялся со временем хранения раствора.

Процедуры окрашивания. Все сеточки со срезами ювенильной ткани мозга были разделены попарно (Os и rOs) на несколько групп и окрашены на каплях при комнатной температуре следующими реагентами:

- Группа 1 (рис. 1а,б) – насыщенным раствором UAc в течение 10 мин.
- Группа 2 (рис. 1в,г) – насыщенным раствором UAc в течение 30 мин.
- Группа 3 (рис. 1д,е) – красителем UranylLess в течение 1 мин.
- Группа 4 (рис. 1ж,з) – старым рОТЕ (хранился около двух месяцев при комнатной температуре) в течение 40 мин.
- Группа 5 (рис. 2а,б) – свежим рОТЕ в течение 40 мин.
- Группа 6 (рис. 2в,г) – свежим рОТЕ, разведенным 1:1 по объему 0.2 М какодилатным буфером (рН 7.6) в течение 40 мин.
- Группа 7 (рис. 2д,е) – свежим рОТЕ, разведенным 1:1 по объему 0.2 М фосфатным буфером (рН 7.3–7.4) в течение 40 мин.

Затем все сеточки последовательно отмывали по 1 мин на каждой из трех капель деионизированной воды и дополнительно контрастировали модифицированным красителем Сато, содержащим три соли свинца [19], разведенным дважды с H₂O (рН воды был доведен до рН красителя Са-

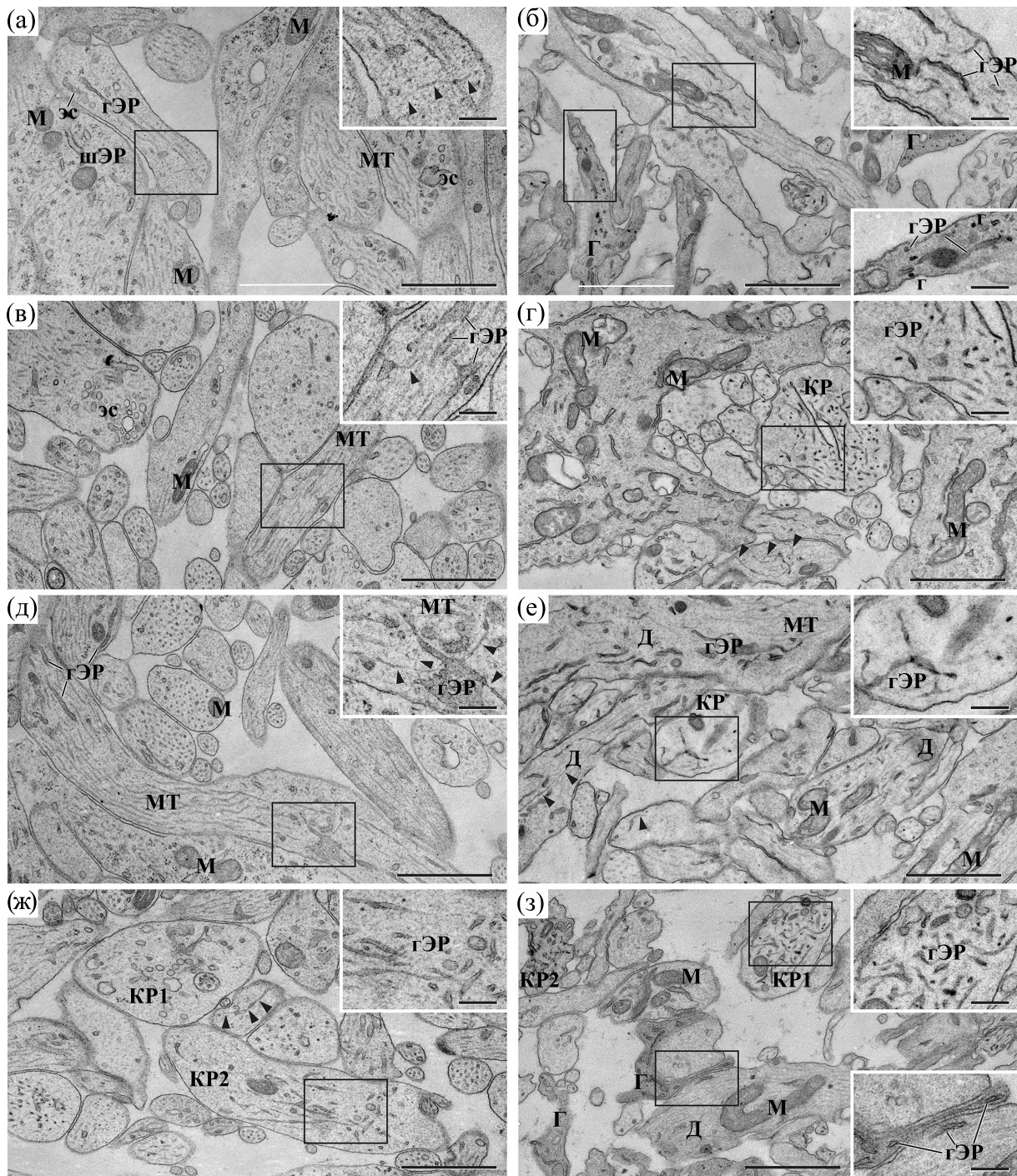


Рис. 1. Ультраструктура нейроплазмы области СА3 гиппокампа новорожденной крысы после окраски УАс, лантаноидами и старым рОТЕ. Изображения в левой колонке получены с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в OsO_4 ; изображения в правой колонке – с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в OsO_4 , восстановленном феррицианидом калия. (а) и (б) – Срезы обработаны насыщенным раствором УАс в течение 10 мин; (в) и (г) – срезы обработаны насыщенным раствором УАс в течение 30 мин; (д) и (е) – срезы окрашены UrapuLess в течение 1 мин; (ж) и (з) – срезы окрашены старым рОТЕ в течение 40 мин. Все срезы дополнительно контрастированы тремя солями свинца по Сато (см. описание в основном тексте). Сокращения: гЭР – трубочки и расширенные цистерны гладкого ЭР, шЭР – цистерны шероховатого ЭР, эс – эндосомальные компартменты ретикулума, М – митохондрии, МТ – микротрубочки, г – гликогеновые гранулы, Г – глиальные клетки, КР – конусы роста, Д – дендриты. Головками стрелок на основных панелях и врезках отмечены тончайшие цистерны гладкого ЭР. Шкала для всех панелей 1 мкм, для врезок – 200 нм.

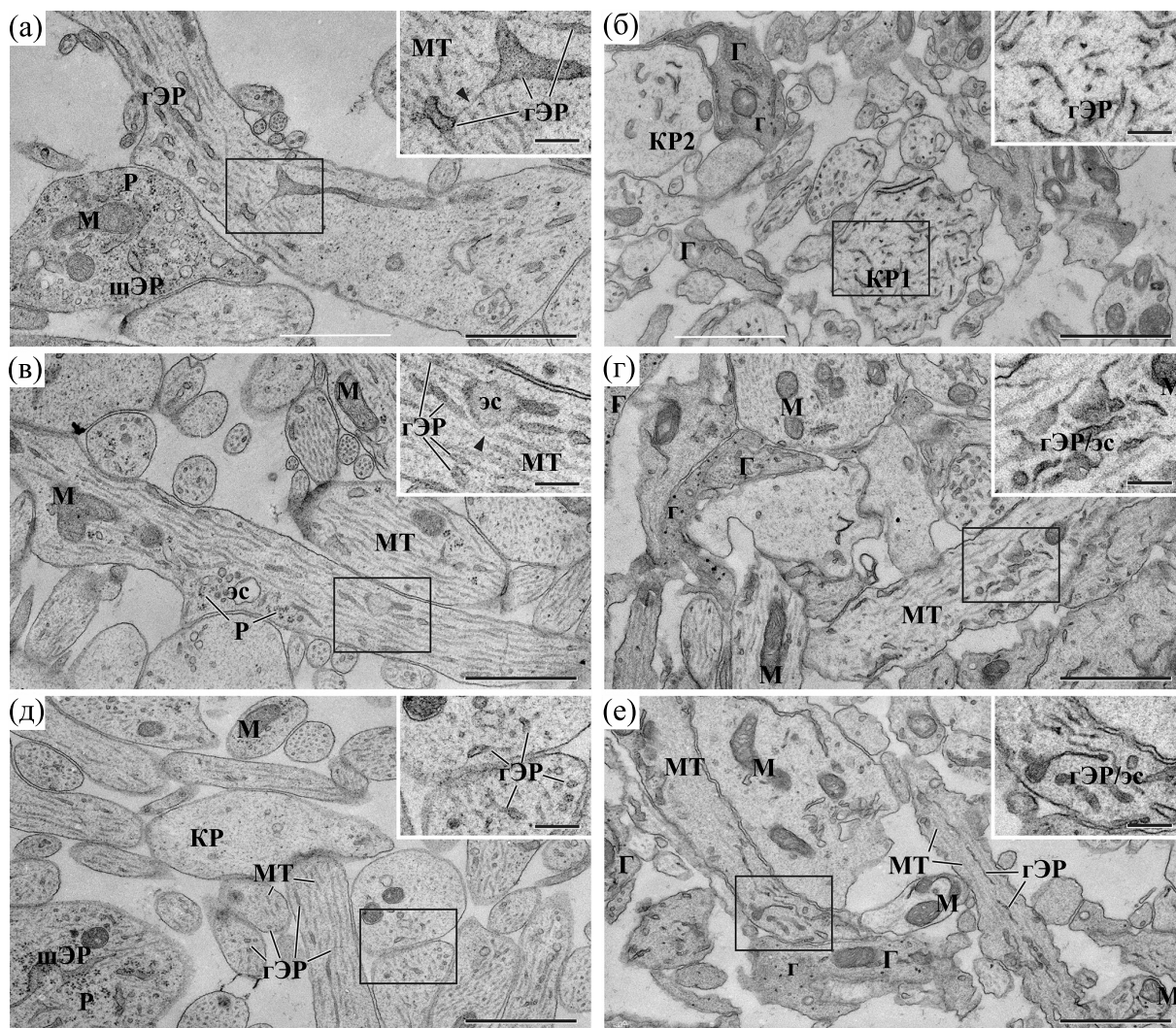


Рис. 2. Ультраструктура нейропиля СА3-области гиппокампа новорожденной крысы после окраски свежеприготовленным рОТЕ. Изображения в левой колонке получены с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в OsO_4 ; изображения в правой колонке – с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в OsO_4 , восстановленном феррицианидом калия. (а) и (б) – срезы окрашены незабуференным рОТЕ в течение 40 мин; (в) и (г) – срезы окрашены рОТЕ с какодильным буфером в течение 40 мин; (д) и (е) – срезы окрашены рОТЕ с фосфатным буфером в течение 40 мин. Все срезы дополнительно контрастированы тремя солями свинца по Сато. (см. описание в основном тексте). Сокращение: Р – свободные рибосомы и полисомы. Остальные сокращения те же, что и на рис. 1. Головками стрелок отмечены тончайшие цистерны гладкого ЭР. Шкала для всех панелей 1 мкм; для врезок – 200 нм.

то). Каждую сеточку отмывали 0.02 М раствором NaOH и дважды деионизированной водой в течение 1 мин.

Мозг взрослого животного. Крысу Wistar (возраст 7 месяцев, масса 310 г) анестезировали внутривенным введением пентобарбитала натрия (200 мг/кг веса). Фиксацию мозга крысы проводили путем транкардиальной перфузии сначала изотоническим солевым раствором (0.9% NaCl), содержащим гепарин (60 ед./мл), а затем 0.1 М фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), содержащим 2% параформальдегида и 2% глутаро-

вого альдегида. Мозг был помещен в этот же фиксатор на ночь. Коронарные срезы дорзального гиппокампа толщиной 50 мкм получали на вибраторе VT1000S (Leica, Германия) и далее обрабатывали как было описано ранее [20, 21]. Срезы были постфиксированы в 1%-м растворе OsO_4 в течение одного-полутора часов при комнатной температуре, обезвожены в серии спиртов с возрастающей концентрацией, затем в 100%-м ацетоне и выдержаны в смеси ацетон:смола (Agar100/Araldite CY212) в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее для заключения в

смолю в расплавленном состоянии (flat-embedding) срезы помещали в смолу между сжатыми листами акларовой пленки и полимеризовали при 60°C в течение 48 ч. В области среднего молекулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа была заточена пирамидка, с которой были получены и собраны, как описано выше, ультратонкие срезы номинальной толщиной ~70–80 нм. Срезы сначала выдерживали на каплях свежеприготовленного рОТЕ в течение 40 мин при комнатной температуре, трижды отмывали на каплях деионизированной воды и затем контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу в течение 10 мин.

Получение изображений. Микрофотографии срезов всех образцов ювенильной ткани и калибровочной реплики (дифракционной решетки с шагом 463 нм) получали с использованием фотопленки на электронном микроскопе JEM-1200EX (JEOL, Япония) при увеличении 12000× с одинаковыми настройками колонны микроскопа: ускоряющее напряжение – 80 кВ, размер пятна – 3, диафрагма объективной линзы – 20 мкм, плотность потока электронов – 44–47 пА/см². Негативы оцифровывали с разрешением 2400 dpi с помощью сканера Epson Perfection V700 в HDR-режиме, а небольшие различия в общей плотности отсканированных пленок были нормализованы путем получения одинаковой оптической плотности заливочной среды (внеклеточного пространства) с помощью уровней серых тонов в программе Photoshop. Изображения срезов мозга взрослого животного были получены на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) с помощью камеры АМТ XR60 (АМТ Imaging, США) при увеличении 6000× (ускоряющее напряжение – 80 кВ, размер пятна – 2, диафрагма объективной линзы – 40 мкм, плотность потока электронов – 35 пА/см²) в режиме захвата монтажа из взаимоперекрывающихся кадров. Кадры объединяли в бесшовные изображения с помощью эластичных трансформаций плагином TrakEM2 в программе ImageJ [22]. За исключением исходных настроек АМТ XR60, ни яркость, ни контраст финального изображения не меняли. Отдельные изменения контраста исходных изображений отмечены ниже по тексту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки способности рОТЕ окрашивать ткань мозга в качестве кандидата на роль идеальной модели мы выбрали мозг крысы на втором дне постнатального развития по следующим причинам. Во-первых, данный период развития характеризуется массивным ростом и ветвлением нейритов, а также формированием межклеточных контактов и, следовательно, требует повы-

шенного синтеза мембран, необходимых для роста конусов роста [23, 24]. Во-вторых, известно, что эмбриональная или незрелая ткань окрашивается менее интенсивно и имеет меньший контраст из-за большого содержания воды [25]. Таким образом, было предположено, что если окрашивание с рОТЕ покажет усиление контраста на незрелой ткани, то такой же эффект должен проявиться и на зрелой ткани.

Окрашивание ткани незрелого мозга. Стандартные красители. Все изображения на рис. 1 и 2 иллюстрируют структуру *Str. lucidum* или *radiatum* развивающегося нейропиля поля СА3 гиппокампа. Нейропил сформирован массой растущих нейритов и их конусов роста, большинство из которых еще невозможно идентифицировать как аксоны или дендриты, за исключением больших профилей проксимальных дендритов пирамидных нейронов. В качестве стандарта электронной плотности и контраста мы взяли изображения после двойного контрастирования с насыщенным водным раствором UAc (в течение 10 или 30 мин, рис. 1а и 1в соответственно), за которым следовало контрастирование модифицированным красителем Сато [19] (в течение 1 мин) с обычно используемой нами двукратно сниженной концентрацией трех солей свинца.

Профили нейритов на рис. 1в, некоторые из которых заполнены пучками микротрубочек, четко очерчены плазматическими мембранами. Среди слабоконтрастных микротрубочек можно наблюдать чуть более темные цистерны гЭР, от расширенных участков которых отходят тонкие следы не совсем различных анастомозирующих веточек, направленных поперек оси нейрита (головки стрелок и указатели на врезках на рис. 1а,в). Четко различимы и некоторые другие внутриклеточные органеллы, такие как митохондрии с плотным матриксом, эндосомальные компартменты, кластеры свободных рибосом и шероховатый ретикулум.

Поскольку осмий, восстановленный с ферроили феррицианидом, широко и регулярно используют в ультраструктурных исследованиях для усиления контраста мембран [26, 27], мы опробовали все используемые варианты контрастирования (левые колонки на рис. 1 и 2) на тех же образцах мозга, но осмированных с феррицианидом калия (правые колонки на рис. 1 и 2). Ювенильная ткань, фиксированная гОs, обладала несколькими отличительными особенностями. Некоторые из них, такие как значительно усиленный контраст элементарных мембран и гранул гликогена, были описаны давно, но другие также заслуживают внимания. Плазматические мембраны и тонкие цистерны гЭР в таких образцах имеют неравномерные волнистые очертания по типу ряби

на поверхности воды. Поскольку оба протокола фиксации идентичны за исключением добавленного феррицианида калия, то причиной такого волнообразного искривления мембран может являться только постфиксация ткани восстановленным OsO_4 . И если во взрослом мозге этот недостаток на плазматических мембранах менее выражен за счет плотной упаковки нейрональных отростков в нейропиле (см., например, работы [28–30]), то большие межклеточные пространства в незрелом мозге этому способствуют. Свободное расположение тонких цистерн гЭР в нейроплазме также способствует их волнообразной форме после обработки с гОс. Нативную форму тонких цистерн гЭР можно было бы сохранить или отказавшись от использования гОс (левые колонки на рис. 1 и 2) или, по-видимому, только с использованием криофиксации ткани (как, например, в работе [31]). Как было ранее отмечено в работе [26], клетки, фиксированные с гОс, проявляли более слабое прокрашивание нуклеопротеинов и слабо различимые рибосомы, но последующее контрастирование с UAc позволяло их выявлять. Отчасти в противоположность этим наблюдениям, после применения протоколов контрастирования, использованных в данной работе, электронная плотность рибосом повышалась, но не в достаточной степени.

Красители на основе лантаноидов. Недавно в качестве замены UAc были предложены некоторые лантаноиды, такие как Sm, Gd, Nd, Yb [32–36], полиоксометаллаты [37] или гафний [38], а также ставший уже популярным *UranylLess* (UL), содержащий соли La, Dy, Gd [39]. Поэтому для определения красящих свойств рОТЕ UL также был взят в качестве второго стандарта электронной плотности и контраста. В то время как общая электронная плотность сечений нейритов и конусов роста, окрашенных с помощью UL (рис. 1д,е), занимает промежуточное положение между таковой на срезах, контрастированных с UAc в течение 10 и 30 мин, некоторые детали гЭР выявлялись лучше. Лучшее выявление деталей по сравнению с UAc может быть связано со сравнительно меньшей молекулярной массой солей лантаноидов и, как следствие, с увеличением плотности промежуточных тонов. Это свойство UL позволяет наблюдать, как тонкие трубочки гЭР отходят в разных направлениях от уплощенной цистерны гладкого ретикула в нейрите (рис. 1д, врезка), или лежат параллельно микротрубочкам в дендритах, или произвольно расположены в конусах роста (рис. 1е).

Все соли выше упомянутых лантаноидов обладают хотя и несколько отличающейся, но достаточной способностью усиливать контраст. Однако будучи достаточно хорошо растворимыми со-

лями, обладающими высокой проникающей способностью в ткани и высокой химической активностью, все они также содержат атомы тяжелых металлов и, следовательно, могут оказывать негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека. А поскольку они являются редкоземельными металлами (следовательно, не самыми дешевыми), то вряд ли будут удобны для пакетного контрастирования большого числа сеточек или «конвейерного» контрастирования лент со срезами (grid-tape) (см., например, работу [5]).

Контрастирование с рОТЕ. Полифенолы, например дубильную кислоту, благодаря ее красящим свойствам уже давно стали использовать в электронно-микроскопических исследованиях в качестве промежуточного агента до и после осмия для усиления контраста мембран (см., например, работы [40, 41]). С тех пор как авторы работы [11] предположили, что ОТЕ с более низкой молекулярной массой танинов чая улун предпочтительнее дубильной кислоты, использование рОТЕ стало частью нашей повседневной практики, однако мы готовим рОТЕ заново перед каждым контрастированием срезов. На рис. 1ж,з представлена ткань, окрашенная водным экстрактом чая, хранившегося около двух месяцев при комнатной температуре. Можно видеть, что длительно хранимый рОТЕ обеспечивает хорошее качество окраски всех клеточных структур, включая внешние и внутренние мембраны, микротрубочки и промежуточные филаменты, митохондрии, нуклеопротеины и рибосомы, не уступая результату контрастирования с UAc или UL (рис. 1а–е). Кроме того, стоит обратить внимание на другую, не отмеченную ранее особенность ювенильной ткани мозга, фиксированной с гОс: глиальные клетки имеют более плотно окрашенную цитоплазму, что позволяет в незрелой ткани отличать их профили от профилей нейронов. Цитоплазма некоторых глиальных клеток и конусов роста, наряду с гранулами гликогена, окрашивается даже более интенсивно с рОТЕ (рис. 1з), чем с UAc (рис. 1б). Также интересно отметить наличие цистерн гЭР в тонких терминальных глиальных отростках, тогда как традиционно считается, что терминальные отростки астроцитов не имеют таких органелл [42–44]. Характерна ли для рОТЕ способность контрастировать цистерны гЭР в терминальных отростках астроцитов или наличие таких цистерн является чертой незрелого мозга — вопрос для дальнейших исследований.

Авторы работы [11] указывали на необходимость использования забуференного фосфатами ОТЕ для лучшего качества окраски. Для сравнения красящих свойств рОТЕ с результатами вышеупомянутых публикаций, полученных с ис-

пользованием коммерчески доступного порошка ОТЕ, мы протестировали красящие свойства свежеприготовленного чая как с буферами, так и без них. Как показано на рис. 2а, окраска свежеприготовленным рОТЕ обеспечивает хорошее окрашивание рибосом, микротрубочек, проявляет резко очерченные контуры плазматических мембран, митохондриальных внешней и внутренней мембран, а также хороший общий вид гЭР с гладкими мембранами и гомогенно зернистым содержимым цистерн (рис. 2а, врезка). Как можно видеть на врезке, окрашивание с рОТЕ позволяет четко идентифицировать даже самые тонкие цистерны гЭР с наименьшими их диаметрами вплоть до считанных нанометров.

На рис. 2в представлена ткань, окрашенная забуференным какодилатом рОТЕ. В то время как общая электронная плотность не сильно отличается от незабуференного рОТЕ (рис. 2а), изображение выглядит более четким благодаря чуть более светлому цитозолю, что способствует более легкой идентификации внутриклеточных структур. Ткань, окрашенная рОТЕ с фосфатным буфером (рис. 2д; рН 7.3–7.4 согласно работе [11]), имеет в целом чуть меньшую электронную плотность и в общем сравнима с тканью, окрашенной с UL или длительно хранившимся рОТЕ.

Авторами работы [12] после окрашивания гепатоцитов с ОТЕ была показана лучшая визуализация альфа-частиц (розеток) гликогена по сравнению с окрашиванием UAc. Но в отличие от гепатоцитов, такой эффект мы не наблюдали на незрелой ткани мозга. Однозначная идентификация гликогеновых гранул и глиальных клеток благодаря их более темной цитоплазме была возможна только при комбинации фиксации ткани с гOs и последующей окраски срезов безотносительно природы контрастирующих растворов (UAc, UL, рОТЕ и/ или модифицированного свинцового красителя Сато).

Однако фиксация с гOs имеет другое серьезное ограничение, как впрочем и ТО- и ОТО-подобные протоколы постфиксации: микротрубочки становятся практически не различимы на фоне цитозоля (см. правую колонку на рис. 1 и рис. 2б,е). В этом отношении использование рОТЕ, забуференного какодилатом с рН 7.6 (в отличие от фосфатного буфера), имеет очевидные преимущества для идентификации микротрубочек и обеспечивает в общем лучшую ультраструктурную целостность ткани, которая была фиксирована с гOs (рис. 2г).

Согласно опыту других исследователей и нашему собственному известно, что фиксация тканей млекопитающих в растворах, забуференных какодилатом (в отличие от фосфатного буфера),

обеспечивает лучшее качество изображения. Однако, поскольку мы не проверяли красящие свойства рОТЕ при разных рН, мы не можем с уверенностью утверждать, что высокое качество изображений обеспечено использованием именно какодилатного буфера, а не рН свежеприготовленного экстракта чая. Поэтому было бы неправильно исключать влияние рН. Тем не менее, в более ранних работах Симионеску [45], используя галлоилглюкозу *en bloc* в качестве усилителя контраста, также наблюдали наилучшие результаты при использовании мышьяк-содержащих буферов.

Окрашивание экстрактом чая ткани зрелого мозга. Для более широкой оценки красящих свойств рОТЕ мы анализировали ткань мозга взрослого животного. На рис. 3 представлен срез среднего молекулярного слоя зубчатой фасции, которая была фиксирована альдегидами и осмирована невосстановленным OsO₄. Ультратонкие срезы были окрашены незабуференным водным рОТЕ, а затем цитратом свинца по Рейнольдсу. Несмотря на хорошо прокрашенные нуклеопротейны и постсинаптические уплотнения дендритных шипиков, можно заметить, что зрелая ткань имеет более низкую общую электронную плотность нейропила по сравнению с профилями нейритов незрелой ткани.

Такому эффекту могло бы быть несколько причин. Во-первых, существуют некоторые отличия в протоколах подготовки тканей: для ткани взрослого животного использовали фиксатор на фосфатном буфере и смолу Agar100 в качестве заливочной среды. Во-вторых, возможно, что у зрелой и незрелой тканей способность связывать рОТЕ отличается. Мы также не можем исключить то, что комбинация окраски с рОТЕ с последующим контрастированием цитратом свинца по Рейнольдсу неэффективна для усиления контраста мембран, в отличие от последующего контрастирования тремя солями свинца по Сато. Действительно, по сравнению с окраской UAc авторы работы [14] обнаружили лишь умеренное усиление контраста на криофиксированных образцах, залитых в смолу Спура, которые затем были окрашены с ОТЕ на фосфатном буфере и контрастированы цитратом свинца по Рейнольдсу. Также Феллнер с соавторами [46] показали явно меньший контраст образцов, залитых в смолу Agar100, окрашенных с ОТЕ и контрастированных цитратом свинца по Рейнольдсу. Несмотря на то что некоторые из этих причин достойны более глубокого рассмотрения, изображение ткани мозга зрелого животного, представленного на рис. 3, имеет хорошее качество, которое является достаточным для рутинного подсчета синапсов и/или для полуавтоматической 3D реконструкции.

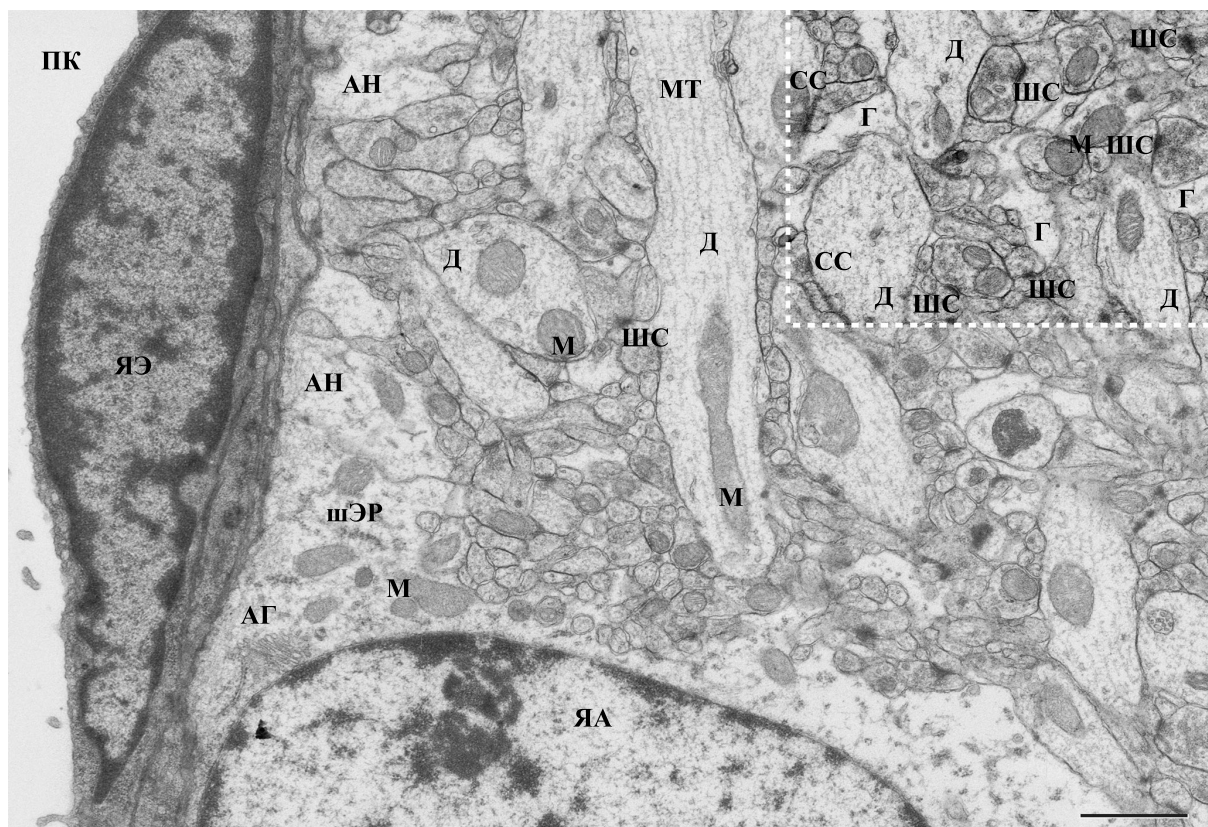


Рис. 3. Ультраструктура зубчатой фасции гиппокампа взрослой крысы. Срез зубчатой фасции окрашен свежеприготовленным незабуференным рОТЕ в течение 40 мин и постконтрастирован цитратом свинца. Контраст выделенной области в верхнем правом углу увеличен для лучшего проявления постсинаптических уплотнений. Сокращения: ПК – просвет капилляра; ЯЭ – ядро эндотелиальной клетки; ЯА – ядро астроцита; АГ – аппарат Гольджи; АН – астроцитарная ножка; ШС – шипиковые синапсы; СС – стволовые синапсы. Остальные сокращения те же, что и на рис. 1. Шкала 1 мкм.

Предполагаемые механизмы взаимодействия рОТЕ с тканью. Уже давно было показано, что остаток галловой кислоты в молекуле низкомолекулярной галлоилглюкозы является эффективным усилителем окраски [47]. При том, что относительное содержание галловой кислоты постепенно повышается со временем хранения чая [48], для окраски ультратонких срезов мы использовали чай, собранный 10 лет назад. Поэтому можно предположить, что наблюдаемое нами усиление контраста происходит за счет увеличения в чае содержания галловой кислоты. Однако авторы работы [45] отмечали, что обработка срезов галлоилглюкозой без предварительной пропитки галлоилглюкозой всего образца до заключения в смолу не обеспечивала хорошего контраста, а обработка галлоилглюкозой как самой ткани, так и полученных с нее срезов, не увеличивала контраст по сравнению с обработкой лишь только самой ткани. Но с другой стороны, кроме галловой кислоты рОТЕ содержит значительное количество других низкомолекулярных фенолсодержа-

щих предшественников танинов, таких как катехины, кофеин и т.д. Некоторые из них, как и галлоилглюкоза, также содержат остаток галловой кислоты, а общая масса катехинов в сухих листьях улуна составляет около 8% [49]. В данной работе мы не пропитывали всю ткань экстрактом чая. Тем не менее, в отличие от обработки срезов галлоилглюкозой, окрашивание срезов с рОТЕ обеспечивает хороший контраст. Учитывая, что некоторые полифенолы или катехины связываются с их белковыми мишенями в мембране с образованием устойчивых к растворению детергентами агрегатов (см., например, работы [50–52]), нельзя исключить того, что широкий спектр органических и неорганических веществ, составляющих рОТЕ [53], может вносить вклад в усиление контраста ткани, в которой каждое вещество находит свою нишу для связывания. Несмотря на то что точная природа взаимодействия рОТЕ с тканью остается неизвестной, он обеспечивает отличное качество изображений, безопасен в использова-

нии/утилизации и обладает некоторыми другими преимуществами.

Иные преимущества окраски с использованием рОТЕ. В отличие от УАс, в результате окраски срезов с рОТЕ в темноте и при свете мы не обнаружили каких-либо различий в качестве контрастирования, как это было замечено ранее [13]. В данной работе для окраски срезов мы использовали центрифугированный и фильтрованный экстракт, приготовленный из листьев чая. Дополнительным преимуществом использования рОТЕ является отсутствие загрязнений, которых обычно трудно избежать при окрашивании с УАс. В то же время, некоторые авторы отмечали более частое загрязнение срезов с ОТЕ, чем с УАс (см., например, работу [46]). Однако, как можно видеть на рис. 1–3, во внеклеточном пространстве или просвете капилляра отсутствуют какие-либо крупные или мелкие, сходные с молотым перцем, загрязнения. Также и в других родственных публикациях не было информации о большем загрязнении после окраски коммерчески доступным ОТЕ. Следовательно, загрязнения, упомянутые в вышеуказанном исследовании, вероятнее всего могут быть следствием неаккуратного обращения с сеточками в процессе монтирования и контрастирования срезов, или пропуска стадии их промывки после контрастирования, которую рекомендуют некоторые поставщики ОТЕ (напр., Science Services GmbH, Германия). Кроме того, коммерчески доступный порошок ОТЕ в отличие от заваренного чая может содержать менее растворимые компоненты, которые могут являться источником нежелательной контаминации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное в нашем исследовании усиление контраста с помощью рОТЕ ясно показывает, что полученный из заваренного листового чая улун насыщенный водный экстракт в комбинации с какодилатным буфером и/или с повышенным рН вполне применим в качестве заменителя уранилацетата в исследованиях центральной нервной системы. Окрашивание с рОТЕ даже имеет некоторые преимущества перед окрашиванием с УАс. рОТЕ нетоксичен и нерадиоактивен, он лучше выявляет тончайшие детали гладкого эндоплазматического ретикулума и вполне подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных. С учетом низкой стоимости чая улун по сравнению со стоимостью большинства реактивов для электронной микроскопии, таких как уранилацетат, UranylLess и др., использование экстракта чая в качестве первичного агента в контрастировании ультратонких срезов позволяет

использовать его для пакетной обработки большого числа препаратов.

Другое преимущество использования улун может состоять в том, что после трудоемкого приготовления и монтирования ультратонких срезов есть благоприятная возможность выпить чашку-другую ароматного чая, отделив несколько капель для ультратонких срезов. К тому времени, когда чаепитие подойдет к концу, срезы будут уже окрашены и готовы к последующей обработке солями свинца. Таким образом, использование экстракта чая улун позволяет сочетать исследование с пользой для здоровья.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность В.Г. Цыгановой (ИТЭБ РАН) за помощь в выделении гиппокампа новорожденных животных.

Исследование было проведено на базе сектора электронной микроскопии Центра коллективного пользования ПНЦБИ РАН (<https://www.pbcras.ru/services/tskp/>; <http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>), Пушкино, Россия, а также на базе лаборатории Электронной микроскопии Открытого Университета, Милтон-Кинс, Великобритания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ПНЦБИ РАН (№ АААА-А20-120101390069-4) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90068).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с: положениями Совета по исследованиям в области защиты животных и этики Открытого университета и Министерства внутренних дел Великобритании (PPL 80/2612); Европейским руководством по содержанию и использованию лабораторных животных 1986 г. в соответствии с Этическими принципами Директивы Совета ЕС (86/609/ЕЕС); протоколом Комитета по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ РАН, Протокол № 13/2019 от 12.03.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. J. Deerinck, E. A. Bushong, V. Lev-Ram, et al., *Microscopy and Microanalysis*, **16**, 1138 (2010).
2. J. C. Tapia, N. Kasthuri, K. J. Hayworth, et al., *Nature Protocols*, **7**, 193 (2012).
3. S. Mikula and W. Denk, *Nature Methods*, **12**, 541 (2015).
4. Y. Hua, P. Laserstein, and M. Helmstaedter, *Nature Communications*, **6**, 7923 (2015).
5. Y. Kubota, J. Sohn, S. Hatada, et al., *Nature Commun.*, **9**, 437 (2018).
6. M. Colonnier, *Brain Res.*, **9**, 268 (1968).
7. E. G. Gray, *J. Anatomy*, **93**, 420 (1959).
8. A. M. Seligman, H. L. Wasserkrug, and J. S. Hanker, *J. Cell Biol.*, **30**, 424 (1966).
9. L. de Vivo, M. Bellesi, W. Marshall, et al., *Science*, **355**, 507 (2017).
10. E. Kim, J. Lee, S. Noh, et al., *Appl. Microsc.*, **50**, 14 (2020).
11. S. Sato, Y. Sasaki, A. Adachi, et al., *Med. Electron Microsc.*, **36**, 179 (2003).
12. S. Sato, A. Adachi, Y. Sasaki, and M. Ghazizadeh, *J. Microsc.*, **229**, 17 (2008).
13. A. A. Miller and A. V. Simakova, *Cell Tissue Biol.*, **4**, 109 (2010).
14. K. Yamaguchi, K.-I. Suzuki, and K. Tanaka, *J. Electron Microsc.*, **59**, 113 (2010).
15. X. He and B. I. N. Liu, *J. Microsc.*, **267**, 27 (2017).
16. C. Pinali, H. Bennett, J. B. Davenport, et al., *Circ. Res.*, **113**, 1219 (2013).
17. Y. Wu, C. Whiteus, C. S. Xu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E4859 (2017).
18. V. V. Rogachevskii, *Cell Tissue Biol.*, **7**, 487 (2013).
19. T. Hanaichi, T. Sato, T. Iwamoto, et al., *J. Electron Microsc.*, **35**, 304 (1986).
20. V. I. Popov, H. A. Davies, V. V. Rogachevsky, et al., *Neuroscience*, **128**, 251 (2004).
21. M. G. Stewart, H. A. Davies, C. Sandi, et al., *Neuroscience*, **131**, 43 (2005).
22. A. Cardona, S. Saalfeld, J. Schindelin, et al., *PLoS One*, **7**, e38011 (2012).
23. E. Kawana, C. Sandri, and K. Akert, *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **115**, 284 (1971).
24. M. Z. Chauhan, J. Arcuri, K. K. Park, et al., *iScience*, **23**, 100836 (2020).
25. M. A. Hayat, *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications* (Cambridge University Press, 2000).
26. M. J. Karnovsky, In *Abstr. Book of the 11th Annual Meet. of the American Society for Cell Biology*, Abstracts 284, 146 (1971).
27. L. A. Langford and R. E. Coggeshall, *Anatom. Record*, **197**, 297 (1980).
28. J. Spacek and K. M. Harris, *J. Neurosci.*, **17**, 190 (1997).
29. J. R. Cooney, J. L. Hurlburt, D. K. Selig, et al., *J. Neurosci.*, **22**, 2215 (2002).
30. T. Cui-Wang, C. Hanus, T. Cui, et al., *Cell*, **148**, 309 (2012).
31. N. Jiménez, K. Vocking, E. G. van Donselaar, et al., *J. Struct. Biol.*, **166**, 103 (2009).
32. M. Nakakoshi, H. Nishioka, and E. Katayama, *J. Electron Microsc.*, **60**, 401 (2011).
33. N. Hosogi, H. Nishioka, and M. Nakakoshi, *Microscopy*, **64**, 429 (2015).
34. K. Inoue, Y. Muranaka, P. Park, and H. Yasuda, In *Proc. Eur. Microsc. Congr.* (2016), 461.
35. J. Kuipers and B. N. G. Giepmans, *Histochem. Cell Biol.*, **153**, 271 (2020).
36. A. L. Pinto, R. K. Rai, A. Shoemark, et al., *Diagnostics*, **11**, 1063 (2021).
37. A. Moscardini, S. Di Pietro, G. Signore, et al., *Sci. Reports*, **10**, 11540 (2020).
38. K.-I. Ikeda, K. Inoue, S. Kanematsu, et al., *Microscopy Research and Technique*, **74**, 825 (2011).
39. N. Benmeradi, B. Payre, and S. L. Goodman, *Microscopy and Microanalysis*, **21**, 721 (2015).
40. K. Asami, *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95**, 38 (1986).
41. R. C. Wagner, *J. Ultrastruct. Res.*, **57**, 132 (1976).
42. B. Fernandez, I. Suarez, and G. Gonzalez, *Anat. Anz.* **156**, 31 (1984).
43. A. Reichenbach, A. Derouiche, and F. Kirchhoff, *Brain Res. Rev.*, **63**, 11 (2010).
44. B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, *Nature Neurosci.*, **18**, 942 (2015).
45. N. Simionescu and M. Simionescu, *J. Cell Biol.*, **70**, 608 (1976a).
46. N. Fellner, M. Brandstetter, K. Trimmel, and G. Resch, *reSolution*, **1**, 8 (2012).
47. N. Simionescu and M. Simionescu, *J. Cell Biol.*, **70**, 622 (1976b).
48. M. M.-C. Wang, Y. Yeh, Y.-E. Shih, and J. T.-C. Tzen, *J. Food Drug Analysis*, **26**, 609 (2018).
49. M. G. Sajilata, P. R. Bajaj, and R. S. Singhal, *Comprehensive Rev. Food Science Food Safety*, **7**, 229 (2008).
50. M. Nakayama, K. Shimatani, T. Ozawa, et al., *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **79**, 845 (2015).
51. M. P. Borisova, A. A. Kataev, and V. S. Sivozhelezov, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1861**, 1103 (2019).
52. K. M. Pomier, R. Ahmed, and G. Melacini, *Molecules*, **25** (2020).
53. C. Cabrera, R. Giménez, and M. C. López, *J. Agricult. Food Chem.*, **51**, 4427 (2003).

Evaluation of Oolong Tea Extract Staining of Brain Tissue with Special Reference to Smooth Endoplasmic Reticulum

E.A. Shishkova*, I.V. Kraev**, and V.V. Rogachevsky*

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

***Faculty of Health and Social Care, the Open University, Walton Hall, Milton Keynes, UK, MK7 6AA*

Electron microscopy remains the gold standard for studying the nervous system, as it allows adequate spatial resolution imaging of the finer structures of nervous tissues. Despite the high resolution, correct interpretation of electron microscopy images is only possible with the sufficient contrast of unit membranes, cytosolic components and cytoskeleton, which is achieved using hazardous reagents and heavy metals. Earlier, solution of dry oolong tea extract was introduced as a replacement for toxic and radioactive uranyl acetate. However staining with oolong extract showed less contrast of intracellular organelles. It is known that depending on the specimen nature and experimental conditions, different tissues have unequal ability to capture the stain. Here, oolong tea extract staining of early postnatal and adult rat brain tissue was used for the first time to evaluate with transmission electron microscopy. We found that oolong extract obtained from freshly prepared tea is equal with conventional stains in section staining and has several advantages. We showed that its use on the immature brain allows to reveal the finest details of the smooth endoplasmic reticulum of neurons. Also, in combination with osmication with potassium ferricyanide and cacodylate buffer, it provides better visualization of the neuronal cytoskeleton and the smooth cisternae in the terminal astrocytic lamellae. A conventional chemical fixation protocol followed by staining with a saturated oolong tea water extract is also well suited for routine studies of the brain of adult animals, as well as for multiple grids batch staining.

Keywords: scanning electron microscopy; transmission electron microscopy; oolong tea extract; membrane contrast; endoplasmic reticulum; hippocampus

УДК 577.3

ЦИТОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ НА КЛЕТКИ *Escherichia coli* ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КАТИОНАМИ НИТРОЗОНИЯ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИМИСЯ ИЗ ЭТИХ КОМПЛЕКСОВ

© 2022 г. А.Ф. Ванин*,#, В.И. Телегина**, В.Д. Микоян*, Н.А. Ткачев*, С.В. Васильева**

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

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

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Продемонстрировано бактериостатическое действие биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* TN300, определявшееся по колоние-образующей активности этих клеток. Бактериостатическое действие, инициированное этими комплексами, резко усиливалось в присутствии диэтилдитиокарбамата. Предполагается, что этот эффект был обусловлен повышением количества катионов нитрозония (NO^+), высвобождавшихся из комплексов в результате их распада под действием диэтилдитиокарбамата. Аналогичный результат был получен на клетках *E. coli* при их обработке диэтилдитиокарбаматом через 40 мин после контакта клеток с нитритом натрия или S-нитрозоглутатионом. При этом уровень динитрозильных комплексов железа, появлявшихся в бактериальных клетках под действием нитрита или S-нитрозоглутатиона, был таким же, как и при обработке клеток комплексами с глутатионом. Что касается бактериостатического эффекта молекул NO , выделявшегося из нитрита или S-нитрозоглутатиона при их кратковременном контакте с бактериями, в дозовом отношении он был на порядок ниже бактериостатического действия NO^+ . Отсюда следует, что именно катионы нитрозония, высвобождающиеся из динитрозильных комплексов железа, были ответственны за обнаруженное бактериостатическое действие этих комплексов на клетки *E. coli*.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, катион нитрозония, S-нитрозоглутатион, бактериостатическое действие, клетки *Escherichia coli*.

DOI: 10.31857/S0006302922050106, EDN: JIRKIZ

В соответствии с современными представлениями в качестве основного эффектора иммунологической защиты в организме животных и человека при бактериальной инфекции выступает система эндогенного оксида азота (NO), продуцируемого ферментативным путем из L-аргинина [1–4]. Однако до сих пор остается нерешенным вопрос, какой из компонентов этой системы — NO или продукт его одноэлектронного окисления ка-

тион нитрозония (NO^+) — ответственен за подавление пролиферации бактерий в организме животных и человека, обусловленной соответственно превращением молекул NO в пероксинитрит, характеризующийся высокой цитотоксической активностью [3–6] или способностью NO^+ S-нитрозировать различные жизненно важные белки [3, 4, 7–9], и тем самым подавлять их активность.

Цель настоящей работы состояла в попытке ответить на этот вопрос в экспериментах на клетках *Escherichia coli* с использованием в качестве доноров NO and NO^+ динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Как было показано в работах [10–12], появление этих агентов в ДНКЖ определяется механизмом их образования, определяемым реакцией диспропорционирования молекул NO , попарно связывающихся с ионом двухва-

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ — моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ — биядерная форма динитрозильных комплексов железа, МНКЖ — моонитрозильные комплексы железа, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, МГД — N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамат, GSH — глутатион, Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, GS-NO — S-нитрозоглутатион, КОА — колониеобразующая активность, СТС — сверхтонкая структура.

лентного железа в присутствии тиолсодержащих (RS⁻) лигандов, как это показано на схеме 1. В соответствии с этой схемой появляющийся в ходе диспропорционирования молекул NO анион нитроксила (NO⁻) гидролизуется, т. е. протонируется и выходит в форме молекулы нитроксила (HNO) из лигандного окружения железа с последующей трансформацией двух молекул HNO в закись азота (N₂O) и воду. Освободившееся место у иона железа занимает третья молекула NO, что и приводит к образованию моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ), характеризующейся в соответствии со схемой 1 резонансной структурой

[(RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂] или [(RS⁻)₂Fe²⁺(NO⁺)(NO)]. Что касается возможного гидролиза катиона нитрозония, появляющегося в ДНКЖ в результате диспропорционирования молекул NO, его взаимодействие с анионом гидроксила, которое приводило бы к трансформации NO⁺ в азотистую кислоту или нитрит, блокируется в результате нейтрализации положительного заряда на этом нитрозильном лиганде электронной плотностью, поступающей на него от атомов тиоловой серы тиолсодержащих лигандов, характеризующихся высокой π-донорной активностью.

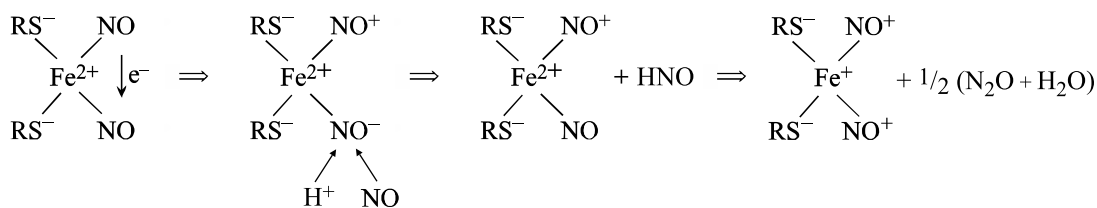


Схема 1. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe²⁺ + NO + RS⁻ [10–12].

Как показано в работах [10–13], приведенные выше резонансные структуры для М-ДНКЖ характерны и для биядерной формы ДНКЖ (Б-ДНКЖ) – [(RS⁻)₂Fe₂²⁺(NO⁺)₂(NO)₂] или [(RS⁻)₂Fe₂²⁺(NO⁺)₄].

Согласно данным, приводимым в работах [11, 12], катионы нитрозония, также, как и молекулы NO, могут высвобождаться из ДНКЖ, причем в равном количестве, в ходе установлении химического равновесия между этими комплексами и их компонентами, а также при необратимом распаде последних, обусловленным удалением из ДНКЖ

железа или тиолсодержащих лигандов. Среди агентов, вызывающих распад этих комплексов, особое место занимают производные дитиокарбамата (формула R₂=N-CS₂). Этим соединениями способны перехватывать на себя железомононитрозильную группу [Fe²⁺-NO] из железодинитрозильных фрагментов [Fe²⁺-(NO)(NO⁺)] ДНКЖ с последующим образованием стабильных, ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов (МНКЖ) с производными дитиокарбамата, как это показано на схеме 2 [14–16].

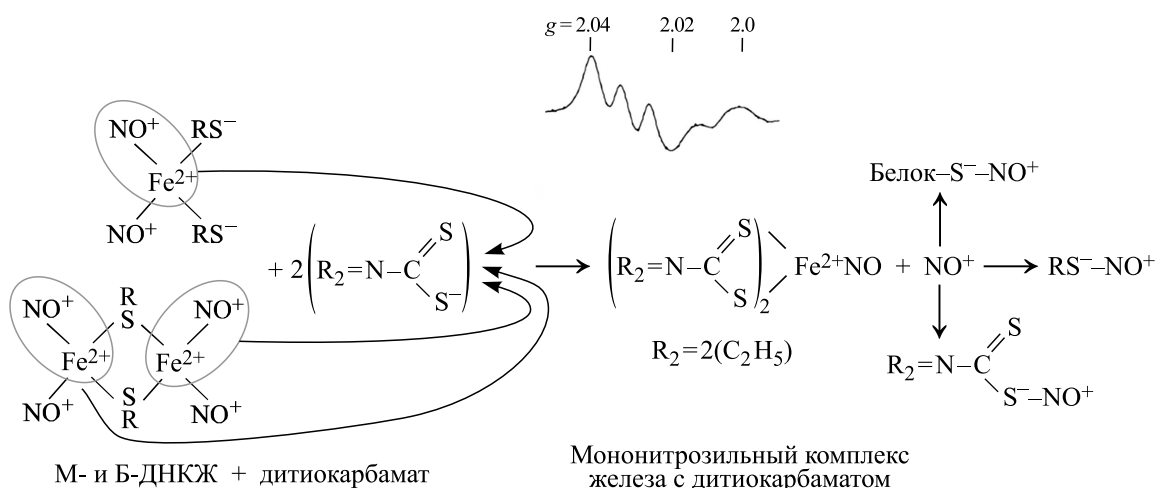


Схема 2. Механизм превращения Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД. На врезке сверху приводится зарегистрированный при 77 К ЭПР-сигнал со значениями g-фактора 2.04 и 2.02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с производными дитиокарбамата.

Ранее такого рода трансформация ДНКЖ под действием производных дитиокарбамата — диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) и N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамата (МГД) в живых организмах была продемонстрирована нашей группой [15, 16].

Было показано, что в клетках и тканях образующиеся в ходе этой трансформации МНКЖ-ДЭТК или МНКЖ-МГД жестко связывают нейтральные молекулы NO, предотвращая тем самым действие этих молекул, исходно входивших в ДНКЖ, на их биологические мишени. В результате молекулы NO «выходят из игры». Что касается катионов нитрозония, в соответствии со схемой 2 они высвобождаются из распадающихся ДНКЖ в свободной форме с последующим связыванием с различными тиолами. Как было показано в работах [17, 18], взаимодействие этих катионов именно с тиолами, приводящее к образованию S-нитрозотилов, а не с анионами гидроксидов, приводящее к гидролизу этих катионов, определяется существенно большим сродством катионов нитрозония к тиолам.

Предполагается, что происходящее при этом S-нитрозирование разнообразных тиолсодержащих белков могло обеспечивать цитотоксическое действие ДНКЖ [19–24]. Такого рода действие Б-ДНКЖ с меркаптосукциноматом наблюдалось нами также на культуре опухолевых клеток MCF7, оно резко усиливалось в присутствии МГД, повышавшего уровень катионов, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ [25].

Цель настоящей работы состояла в детальном изучении вклада ДЭТК в антибактериальное (бактериостатическое) действие Б-ДНКЖ с глутатионом (GSH) на бактерии *Escherichia coli* с тем, чтобы определить какой из компонентов этих комплексов — молекулы NO или катионы нитрозония — способны подавлять размножение этих клеток (их колониеобразующую активность).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Были использованы сульфат железа (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, нитрит натрия и диэтилдитиокарбамат натрия (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции сульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой методом низкотемпературной сублимации в вакууме [13].

Синтез биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и S-нитрозоглутатиона. Биядерные комплексы железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) синтезировали обработкой растворов сульфата железа и GSH газообразным NO при молярном соотношении $Fe^{2+} : GSH$, равном 1 : 2, и давлении NO 100–150 мм рт. ст. После размещения 0.5 мл раствора сульфата железа в дистиллированной воде (pH 5.5) и 4.5 мл раствора

GSH в 15 mM HEPES-буфере при pH 8.0 соответственно в верхней и нижней частях аппарата Тунберга с последующей откачкой воздуха из аппарата в него вводили NO. Затем после 5 мин встряхивания аппарата, растворы железа и GSH смешивали в атмосфере NO, снова встряхивали 5–10 мин, что было достаточно для образования Б-ДНКЖ-GSH, после чего из аппарата откачивали NO и определяли по интенсивности полос поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, соответственно равными $\epsilon = 4600$ и $3700 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ), концентрацию полученного комплекса [13].

Синтез S-нитрозоглутатиона (GS-NO), основанный на способности азотистой кислоты (HNO_2), возникающей при протонировании нитрита в кислой среде, инициировать S-нитрозирование тиолов, проводили следующим образом. 11 mM раствор GSH смешивали на воздухе с 10 mM раствором нитрита натрия с последующим подкислением исходно нейтрального раствора до pH 2–3, что сразу же приводило к розовому окрашиванию раствора. Через полтора часа pH раствора повышали до нейтральных значений. Концентрацию полученного таким образом GS-NO оценивали по интенсивности его полосы поглощения на 334 нм с $\epsilon = 980 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Эксперименты на бактериальных клетках. В экспериментах на бактериальных клетках *Escherichia coli* TN530 их выживаемость оценивали по величине колониеобразующей активности (КОА) (в % по отношению к той же величине для необработанных, контрольных клеток). Суспензию клеток выращивали на жидкой среде LB при 37°C в течение 18 ч. Затем аликвоту разбавляли той же средой в соотношении 1 : 50 и выращивали в ней клетки 3 ч до экспоненциальной стадии — до титра $(3-5) \cdot 10^8$ кл/мл, соответствовавшего стандартному (контрольному) образцу. Изучение влияния Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия и GS-NO на бактериальные клетки проводили следующим образом: 1) определялась дозовая зависимость бактериостатического действия этих агентов по отдельности; 2) и 3) определялось влияние ДЭТК на бактериостатическое действие указанных агентов при одновременном введении в клеточную культуру ДЭТК и каждого из этих агентов или при введении ДЭТК через 40 мин после контакта клеток с Б-ДНКЖ-GSH, нитритом натрия и GS-NO. В первом случае 1 мл Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO в возрастающей концентрации добавляли в кювету с 1 мл клеток. Смесь инкубировали в течение 30 мин, а затем инокулировали на агаре с разбавлением 1 : 10 с последующим инкубированием на нем в течение 24 ч при 37°C и последующим (для оценки бактериостатической активности Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO) подсчетом колоний — величины КОА

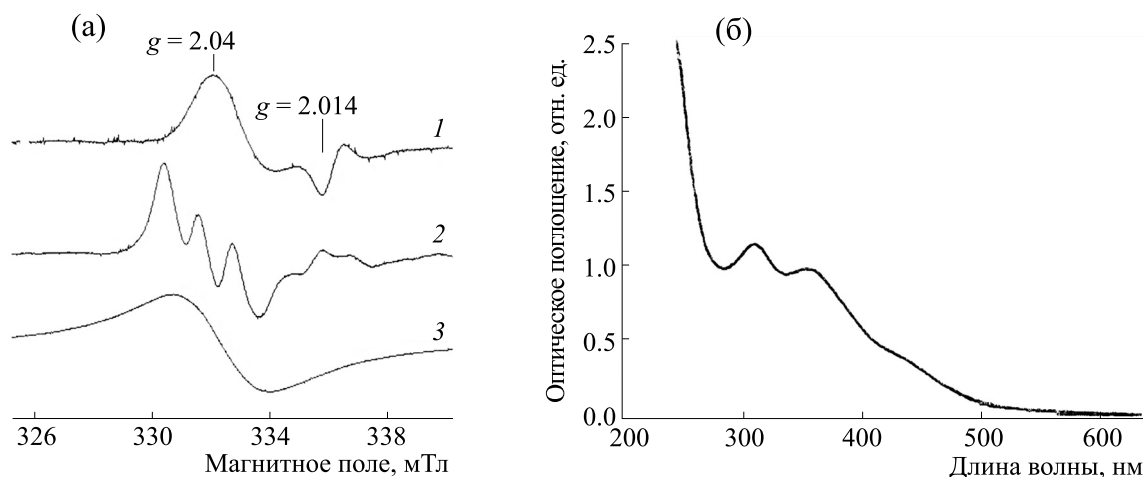


Рис. 1. (а) – Сигналы ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (спектр 1) и МНКЖ-ДЭТК, зарегистрированные для последних в гидрофобной (спектр 2) или водной (спектр 3) средах. Запись при 77 К. (б) – Спектр оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH.

в % (1 клетка = 1 колония). Таким же образом изучали влияние ДЭТК (2.5 мМ) на бактериостатическое действие на бактерии Б-ДНКЖ-GSH, нитрита натрия или GS-NO (в концентрации 0.5 мМ) при одновременном введении с ними ДЭТК или через 40 мин после них.

Оптические и ЭПР-измерения. Оптические измерения растворов Б-ДНКЖ-GSH проводили на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия) в плоских кварцевых кюветах с оптическим путем 10 мм при комнатной температуре на воздухе. ЭПР-спектры М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (GSH и клеточными тиолсодержащими белками), а также ЭПР-спектры МНКЖ-ДЭТК, возникавших в бактериальной культуре, регистрировали при 77 К в кварцевом сосуде Дьюара с жидким азотом на модифицированном радиоспектрометре RadioPan (Польша) при СВЧ мощности 5 мВт и амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля, равной 0.2 мТл. Концентрацию ЭПР-активных парамагнитных центров оценивали методом двойного интегрирования их сигналов ЭПР, используя в качестве стандарта М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией. Часть ЭПР-измерений проводилась при комнатной температуре с использованием кварцевых капилляров диаметром 1 мм, в которые помещали исследуемые растворы.

Статистическая обработка результатов Каждый результат оценивался как среднее трех независимых измерений \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические характеристики Б-ДНКЖ-GSH и МНКЖ-ДЭТК. В противоположность М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характе-

ризующимся сигналом ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{cp} = 2.03$), называемым сигналом 2.03 [26] и приведенным на рис. 1а, Б-ДНКЖ-GSH диамагнитны и, следовательно, ЭПР-недетектируемые. Как указывалось выше, их концентрация могла определяться по интенсивности их полос оптического поглощения на 310 и 360 нм в спектре, приводимом на рис. 1б.

Что касается сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК, то, будучи растворимыми в гидрофобных средах, например, в клеточных мембранах, эти комплексы, в соответствии с результатами предыдущих публикаций [15, 16], характеризовались сигналом ЭПР, приведенным на рис. 1а (со средним значением g -фактора 2.04 и разрешенной триплетной сверхтонкой структурой (СТС)). Если же эти комплексы локализовались в водной среде, где они были слабо растворимыми, триплетная СТС в их сигнале «смазывалась», в результате чего сигнал трансформировался в бесструктурный симметричный синглет с центром при $g = 2.04$, приведенный на рис. 1а.

Антибактериальное (бактериостатическое) действие Б-ДНКЖ-GSH на клетки *E. coli*. Как следует из рис. 2, клетки *E. coli* оказались достаточно устойчивыми к бактериостатическому действию на них Б-ДНКЖ-GSH. 50%-я величина КОА достигалась лишь при ~ 5 мМ концентрации этих комплексов. Более того, при их низких концентрациях (0.03–0.1 мМ) способность клеток к размножению даже повышалась: КОА возрастала по сравнению с контролем до 120%. Аналогичный эффект обнаруживался и в опытах с обработкой клеток ДЭТК.

Как указывалось выше, влияние ДЭТК на бактериостатическое действие Б-ДНКЖ-GSH было изучено при их концентрациях соответственно

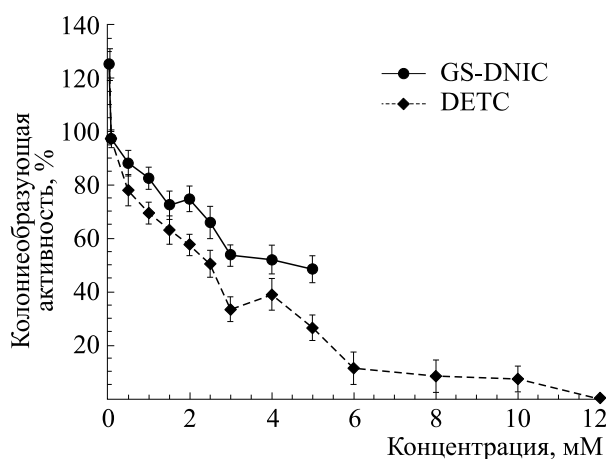


Рис. 2. Дозовая зависимость влияния Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК на колониобразующую активность клеток *E. coli* TN530.

2.5 и 0.5 мМ, для которых, согласно дозовым кривым, приведенным на рис. 2, величины КОА оказались равными $50 \pm 5\%$ и $88 \pm 5\%$. В соответствии с этими величинами, если бы Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК действовали на клетки одновременно, не влияя на состояние друг от друга, то, согласно теории независимых вероятностных процессов, их суммарное действие определялось бы 44%-й величиной КОА (рис. 3, колонка 3). В реальности же при одновременном контакте клеток с ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH эта величина снижалась до $7 \pm 5\%$ (рис. 3, колонка 4). Если же ДЭТК добавляли к клеткам через 40 мин после введения Б-ДНКЖ-GSH, клетки полностью прекращали размножаться — величина КОА снижалась до нулевого уровня (рис. 3, колонка 5).

В соответствии с данными, приводимыми во «Введении», столь резкое усиление бактериостатического действия Б-ДНКЖ-GSH под влиянием ДЭТК могло быть обусловлено распадом Б-ДНКЖ-GSH, сопровождающимся, согласно схеме 2, образованием ЭПР-активных МНКЖ-ДЭТК и высвобождением из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, которые и могли оказывать на бактериальные клетки негативное действие. ЭПР-измерения клеточной массы полностью подтвердили это предположение. Вместо сигнала ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{cp} = 2.03$), характерного для МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (сигнала 2.03), регистрируемого при 77 К в клетках, обработанных только Б-ДНКЖ-GSH и приведенного на рис. 1а, при одновременном введении ДЭТК в клетках регистрировался бесструктурный синглетный сигнал ЭПР, приведенный на рис. 1а и характерный для МНКЖ-ДЭТК, локализованного в водной среде, очевидно, в межклеточной жидкости.

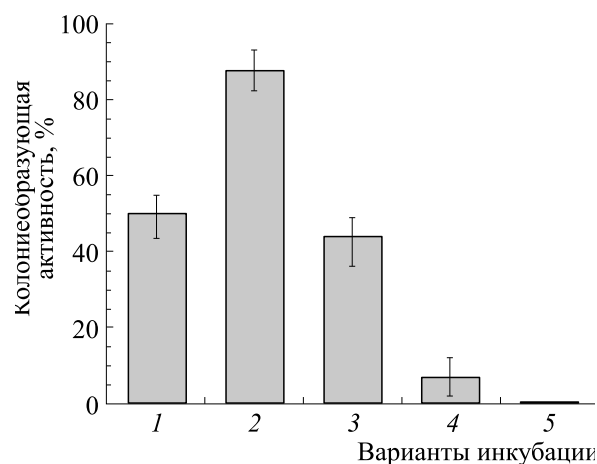


Рис. 3. Влияние на колониобразующую активность бактерий *E. coli* TN530 добавления к ним ДЭТК (2.5 мМ, колонка 1), Б-ДНКЖ-GSH (0.5 мМ, колонка 2), предполагаемого суммарного действия ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH при отсутствии взаимодействия между ними (колонка 3), при одновременном введении в клеточную культуру Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК (колонка 4), при введении ДЭТК через 40 мин после введения Б-ДНКЖ-GSH (колонка 5).

Если же ДЭТК вводили через 40 мин после Б-ДНКЖ-GSH, то в клеточной культуре при 77 К регистрировался сигнал ЭПР с триплетной СТС, приведенный на рис. 1а, характерный для МНКЖ-ДЭТК, локализованного в гидрофобной среде, очевидно, в клеточных мембранах. Этот сигнал регистрировался вместо ЭПР-сигнала 2.03, приведенного на рис. 1а и наблюдавшегося в клетках к этому времени перед добавлением ДЭТК.

Таким образом есть все основания утверждать, что резкое усиление бактериостатического действия Б-ДНКЖ-GSH при одновременном введении с ним ДЭТК было обусловлено катионами нитрозония, высвобождавшимися из Б-ДНКЖ-GSH. Что касается молекул NO, исходно входивших в состав этих комплексов, они включались в устойчивые МНКЖ-ДЭТК, и как сказано выше, «выходили из игры», т.е. не могли оказывать на клетки никакого действия.

Сигнал 2.03, характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, не обнаруживался в клетках, не обработанных Б-ДНКЖ-GSH. Не обнаруживался в этих клетках после их обработки ДЭТК и сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ-ДЭТК.

Бактериостатическое действие на клетки *E. coli* нитрита натрия (NaNO_2) и S-нитрозоглутатиона. Устойчивость клеток *E. coli* к бактериостатическому действию NaNO_2 и GS-NO в дозовом отношении (рис. 4) оказалась примерно такой же, как и для Б-ДНКЖ-GSH — для всех них 50%-я вели-

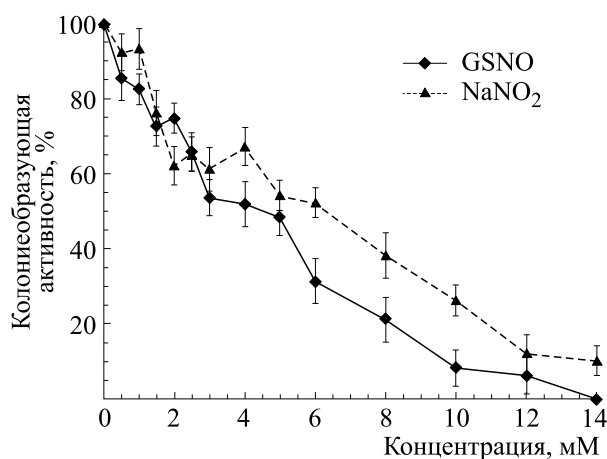


Рис. 4. Дозовая зависимость бактериостатического действия нитрита натрия и GS-NO на клетки *E. coli* TN530.

чина КОА достигалась при ~ 5 мМ концентрации этих соединений.

Это совпадение могло определяться тем, что уже через 40 мин инкубации клеток в 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO в них, судя по появлению сигнала 2.03, возникали М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, причем в концентрации, примерно равной концентрации этих комплексов в бактериальных клетках, обработанных 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH. Этот результат полностью согласуется с предыдущими результатами нашей группы [12, 16], а также данными других авторов [27–29] о появлении в микроорганизмах, клетках и тканях животных как М-, так и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при контакте указанных биообъектов с нитритом или S-нитрозотиолами, очевидно, в результате поступления в них газообразного NO, высвобождавшегося из этих соединений. При снижении времени контакта бактериальных клеток с 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO до 3–5 мин образование заметного количества ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами не обнаруживалось.

Что касается стимулирующего влияния ДЭТК на бактериостатическое действие 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO, в отличие от аналогичных опытов с Б-ДНКЖ-GSH, оно обнаруживалось при добавлении ДЭТК только через 40 мин после введения NaNO₂ и GS-NO и не имело места при одновременном введении ДЭТК и этих агентов (рис. 5, соответственно колонки 8, 9 и 6, 7).

При этом, судя по приводимым ниже результатам ЭПР-анализа, в первом случае МНКЖ-ДЭТК возникали в результате взаимодействия ДЭТК с М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ, возникавшими до этого в присутствии NaNO₂ или GS-NO. МНКЖ-ДЭТК возникали в клеточной культуре и во вто-

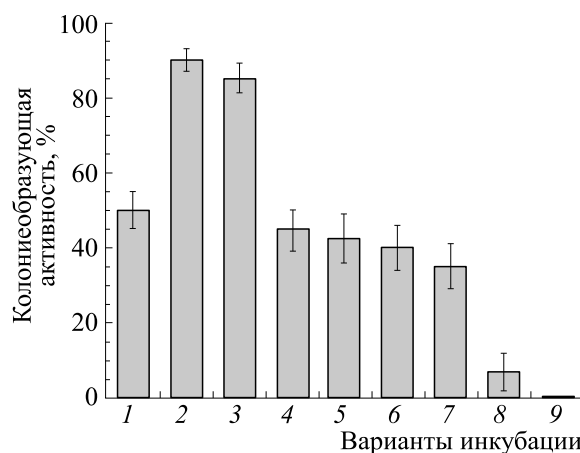


Рис. 5. Влияние на колониобразующую активность клеток *E. coli* TN530 2.5 мМ ДЭТК (колонка 1), 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO (колонки 2 и 3), предполагаемого суммарного действия 2.5 мМ ДЭТК и 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO при отсутствии взаимодействия между ними (колонки 4 и 5), при одновременном введении в клеточную культуру 2.5 мМ ДЭТК и 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO (колонки 6 и 7), при введении 2.5 мМ ДЭТК через 40 мин после введения 0.5 мМ NaNO₂ или 0.5 мМ GS-NO (колонки 8 и 9).

ром случае, но не при участии ДНКЖ, а при участии главным образом NO, происшедшего из NaNO₂ или GS-NO и железа, включавшегося в образование МНКЖ-ДЭТК из инкубационной среды и из бактерий.

Образование МНКЖ-ДЭТК не из М-ДНКЖ и Д-ДНКЖ, а в реакции ДЭТК с NO и примесным железом не могло приводить к появлению в клеточной культуре катионов нитрозония, что, очевидно, и вело к тому, что при одновременном добавлении к клеткам ДЭТК, NaNO₂ или GS-NO не наблюдалось заметное влияние ДЭТК на бактериостатическое действие нитрита и GS-NO.

Результаты ЭПР-измерений, которые позволили нам сделать этот вывод, состояли в следующем. При обработке бактериальных клеток ДЭТК через 40 мин после их контакта с NaNO₂ или GS-NO в клетках при 77 К регистрировался сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК с триплетной СТС, приведенный на рис. 1а. Это означает, что комплексы возникали при взаимодействии с ДНКЖ, возникшими в клетках, в гидрофобных компартментах которых локализовались растворяющиеся в них МНКЖ-ДЭТК. Этот процесс и приводил к появлению в клетках катионов нитрозония, подавлявших размножение этих клеток. При одновременной обработке клеток ДЭТК, NaNO₂ или GS-NO в клеточной культуре при 77 К регистрировался бесструктурный симметричный сигнал МНКЖ-ДЭТК, приведенный на рис. 1в, что сви-

детельствовало о локализации этих комплексов не в клетках, а в водной межклеточной среде, характеризующейся слабой растворимостью в ней МНКЖ-ДЭТК. Отсюда следует, что эти комплексы возникали не в реакции ДЭТК с ДНКЖ, которые могли бы возникать в клетках, а в межклеточной среде в реакции ДЭТК с NO, образующимся из NaNO₂ или GS-NO, и ионами Fe²⁺, которые могли поступать из среды инкубации или из самих клеток. Очевидно, что этот процесс не мог приводить к появлению в межклеточной среде катионов нитрозония.

Последнее полностью согласуется с результатами измерений КОА клеток при одновременном их контакте с ДЭТК, NaNO₂ или GS-NO (рис. 5, колонки 6 и 7). Величины КОА составляли соответственно 40 ± 5 и $35 \pm 5\%$, что было сопоставимо с рассчитанными величинами КОА, при одновременном (суммарном), независимом друг от друга действии ДЭТК, нитрита натрия или GS-NO на бактериальную клетку (рис. 5, колонки 4 и 5).

Концентрации ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и МНКЖ-ДЭТК в клеточной суспензии. Сигнал ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (сигнал 2.03), превращающийся в более интенсивный сигнал ЭПР с триплетной СТС МНКЖ-ДЭТК, мы зарегистрировали в клетках *E. coli* после их обработки сначала газообразным NO при давлении 100 торр в течение 15 мин в соответствии с работой [13], а затем ДЭТК. Судя по интенсивности сигнала ЭПР М-ДНКЖ, появлявшихся в клетках при их обработке NO, их концентрация в клеточной суспензии составляла 2.0 ± 0.5 мкМ и была практически такой же, как и концентрация тех же комплексов, возникавших в той же суспензии при введении в нее на 40 мин 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH, NaNO₂ или GS-NO – соответственно 1.5 ± 0.5 , 1.5 ± 0.5 и 2.5 ± 0.5 мкМ. При последующем введении в эти суспензии ДЭТК (2.5 мМ), концентрация образующихся МНКЖ-ДЭТК достигала соответственно 4.0 ± 0.5 , 5.0 ± 0.5 и 5.0 ± 0.5 мкМ, тогда как в клетках, предварительно обработанных газообразным NO, концентрация этих комплексов составляла 6.5 ± 0.5 мкМ. Согласно результатам наших работ [15, 16], более высокий уровень МНКЖ-ДЭТК по сравнению М-ДНКЖ объясняется включением в реакцию с ДЭТК биядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образующихся в клетках в более высоком количестве по сравнению с их мономерными аналогами.

Образование в бактериальных клетках М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ при их обработке как газообразным NO, так и его донорами примерно в одинаковой концентрации могло быть обусловлено лимитирующим влиянием на синтез этих комплексов одного из компонентов ДНКЖ. Поскольку при таком синтезе ни уровень газообраз-

ного NO, ни избыток железа (соответственно в экспериментах с обработкой клеток газообразным NO или Б-ДНКЖ-GSH) не влияли на концентрацию образующихся ДНКЖ, есть основание утверждать, что лимитирующим фактором в образовании этих комплексов могли выступать клеточные тиолсодержащие соединения (преимущественно тиолсодержащие белки).

Что касается уровня МНКЖ-ДЭТК, возникших в клетках после их одновременной обработки ДЭТК (2.5 мМ) и 0.5 мМ NaNO₂ или GS-NO, он оказался равным 50 мкМ. Это означает, что количество NO, быстро возникавшего из нитрита или GS-NO и включавшегося в МНКЖ-ДЭТК было не ниже этой концентрации. Она оказалась существенно большей уровня М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с эндогенными тиолсодержащими лигандами, возникавших в клетках (~1.5 и 5 мкМ) через 40 мин их инкубации с нитритом или GS-NO. Соответственно и уровень высвобождавшихся из них катионов нитрозония был на том же низком уровне. Тем не менее, бактериостатический эффект, вызываемый NO (50 мкМ), возникавшего из нитрита и GS-NO (колонки 2 и 3 на рис. 5), был существенно ниже по сравнению с действием на клетки катионов NO⁺ (1,5 - 5 мкМ), высвобождавшихся под действием ДЭТК из М- и Б-ДНКЖ, возникших в клетках через 40 мин их инкубации с нитритом или GS-NO (колонки 8 и 9 на рис. 5). Этот факт однозначно свидетельствует о более высокой бактериостатической активности этих катионов по сравнению с аналогичной активностью молекулярного NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Главный результат проведенных нами исследований состоит в обнаружении резкого усиления бактериостатического (негативного) действия на бактерии *Escherichia coli* TN530 биядерных ДНКЖ-GSH под влиянием ДЭТК. Аналогичный результат был получен ранее в работе [30] и в нашей работе [25] в экспериментах на культурах опухолевых клеток соответственно Jurkat и MCF-7. В этих работах вместо ДЭТК использовали МГД, хорошо растворимое в воде производное дитиокарбамата, а вместо Б-ДНКЖ-GSH М-ДНКЖ – тиосульфат [30] или Б-ДНКЖ-меркаптосукцинат [25], введенные в клеточные культуры одновременно с МГД. Результатом было резкое усиление гибели клеток по сравнению с аналогичным действием на клетки МГД, тиосульфата или меркаптосукцината при их добавлении в клеточные культуры по отдельности.

В вышеупомянутых работах [25, 30], как и в нашей настоящей работе, были использованы экзогенные, синтезированные химическим путем ДНКЖ. Между тем уже в первых наших публика-

циях в 1960-е годы, рассмотренных позже в монографиях А.Ф. Ванина [31, 32], и до настоящего времени было продемонстрировано образование в живых организмах и клеточных культурах эндогенных М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникавших в этих биообъектах при появлении NO из его эндогенных и экзогенных источников. Есть основание полагать, что эти эндогенные комплексы могут функционировать в качестве основных эффекторов Т-клеточного иммунитета. В пользу этого может говорить факт обнаружения в 1990-е годы М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в активированных макрофагах, эффективно продуцирующих NO при участии индуцибельной формы NO синтазы (iNOS) [33–36]. Эти комплексы могли переходить из макрофагов в сокультивируемые с ними опухолевые клетки с последующей гибелью этих клеток [34].

Поскольку ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, действительно, могут выступать в качестве доноров катионов нитрозония [10–12], и эти катионы могут, как мы показали в настоящей работе, подавлять размножение клеток *E. coli*, а также вызывать гибель опухолевых клеток [25, 30], не исключено, что способность иммунокомпетентных клеток подавлять размножение различных патогенных бактерий определяется образованием в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как донорами катионов нитрозония. Цитотоксическое действие последних, как основных эффекторов системы Т клеточного иммунитета может определяться их способностью S-нитрозировать различные жизненно важные тиолсодержащие белки и ферменты [30].

Среди этих ферментов могут оказаться протеазы различных вирусов, включая коронавирусы SARS-CoV-2, так что не исключено, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут оказаться полезными при лечении ковида. Предположение об этом было сделано в работе [37] и подтверждено при испытании смеси Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в экспериментах на сирийских хомячках, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 [38].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная работа не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. de Groote and F. C. Fang, Clin. Infection Dis., **21** (Suppl. 2), S162 (1995).
2. F. C. Fang, J. Clin. Invest., **99**, 2818 (1997).
3. J. L. Jones, J. G. Ganopoulos, A. Labbe, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., **88**, 401 (2010).
4. L. A. Bowman, S. McLean, R. K. Pool, et al., Adv. Microbiol. Physiol., **59**, 135 (2011).
5. H. Ischiropoulos and F. B. Al-Mehdi, FEBS Lett., **364**, 279 (1995).
6. M. J. Juedes, and G. N. Wogan, Mutat. Res., **349**, 51 (1996).
7. D. D. Schraier, J. S. Chouake, J. D. Nosanchuk, et al., Virulence, **3**, 271 (2012).
8. S. Spiro, FEMS Lett., **31**, 193 (2007).
9. D. Seth, D. T. Hess, A. Hausladen, et al., Mol. Cell, **69**, 451 (2018).
10. A. F. Vanin, Austin J. Anal. Pharmaceut. Chem., **5**, 1109 (2018).
11. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
12. A. F. Vanin, Appl. Magn. Resonance, **50**, 851 (2020).
13. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **23**, 136 (2011).
14. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., (2013) Nitric Oxide Biol. Chem., **29**, 4 (2013).
15. V. D. Mikoyan, E. N. Burgova, R. R. Borodulin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **62**, 1 (2017).
16. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова и А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 1142 (2020).
17. D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshir, et al., Chem. Res. Toxicol., **7**, 519 (1994).
18. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, J. Biol. Chem., **270**, 28158 (1995).
19. X. Cui, C. L. Joannou, M. N. Hughes, et al., FEBS Lett., **98**, 67 (1992).
20. K. Yoshida, T. Akaaki, K. Doi, et al., Infection and Immunity, **61**, 3552 (1993).
21. J. Green, M. D. Rolfe, and L. J. Smith, Virulence, **5**, 1 (2013).
22. J. R. Laver, S. McLean, A. H. Bowman, et al., Antioxid. Redox Signal., **18**, 309 (2013).
23. R. Grosser, A. Weiss, L. N. Shaw, et al., J. Bacteriol., **198**, 2043 (2016).
24. S. B. Wiegand, L. Traeger, H. R. Nguyen, et al., Redox Biol., **39**, 101826 (2021).
25. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
26. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **2**, 224 (1998).
27. J. C. Woolum, E. Tiezzi, and B. Commoner, Biochim. Biophys. Acta, **160**, 311 (1968).
28. A. Samouilov, H. Li, and J. L. Zweier, in *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide*, Ed. by E. van Faassen and A. F. Vanin (Elsevier, Amsterdam, 2007), p. 313.
29. T. Yoshimura, in *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide*, Ed. by E. van Faassen and A. F. Vanin (Elsevier, Amsterdam, 2007), p. 337.

30. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1340 (2006).
31. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: Физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, М.-Ижевск, 2015).
32. A. F. Vanin, *Dinitrosyl iron complexes as a "working form" of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholars Publ., Cambridge, UK, 2019).
33. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223 (1990).
34. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 119 (1990).
35. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10162 (1991).
36. A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1177**, 37 (1993).
37. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 818 (2020).
38. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др. *Биофизика*, **67**, 981 (2022).

Cytostatic Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione on *Escherichia coli* Cells Is Related to Nitrosonium Cations Released from These Complexes

A.F. Vanin^{*,#}, V.I. Telegina^{}, V.D. Mikoyan^{*}, N.A. Tkachev^{*}, and S.V. Vasilieva^{**}**

^{*}*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

^{**}*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

Our study has shown that a bacteriostatic effect of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione is observed for *Escherichia coli* TN300 cells, it has been measured using the colony-forming efficiency assay. The bacteriostatic effect evoked by these complexes increased considerably in the presence of diethyldithiocarbamate. Our results suggested that this effect was caused by the increase in the number of nitrosonium cations (NO⁺) released from DNICs that decomposed under the action of diethyldithiocarbamate. Similar results were obtained when *E. coli* cells were treated with diethyldithiocarbamate 40 min after addition of sodium nitrite or S-nitrosoglutathione. Notably, the total DNICs level observed in the bacterial cells due to the effects of sodium nitrite or S-nitrosoglutathione was almost the same as obtained after treatment with complexes with glutathione. As to bacteriostatic effects of the molecules of NO released from nitrite or S-nitrosoglutathione during the short-time reaction with bacteria, it was significantly smaller than bacteriostatic effects of NO⁺. Therefore, it was assumed that nitrosonium cations released from DNICs were responsible for the observed bacteriostatic effect of these complexes on *E. coli* cells.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, nitrosonium cations, S-nitrosoglutathione, bacteriostatic effect, Escherichia coli cells

УДК 577.3

ПОЛИАКРИЛАТЫ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ – ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ЦИСПЛАТИНЕ И ДОКСОРУБИЦИНУ

© 2022 г. Л.А. Островская*,#, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Ю.А. Хоченкова**,
Н.В.Блюхтерова*, К.А. Абзаева***

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E mail: larros@list.ru

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ,
Каширское шоссе, 23, Москва, 115478, Россия

***Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, ул. Фаворского, 1, Иркутск, 664033, Россия

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 30.06.2022 г.

Проведено изучение цитотоксической активности металлополиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатине (MCF-7/CP) и доксорубину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатины и доксорубина. Установлено, что резистентные к цисплатине и доксорубину клетки сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию аурумакрила и аргакрила. Обнаружено отсутствие перекрестной резистентности у препаратов металлополиакрилатов с цисплатиной и с доксорубином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), полиакрилат серебра (аргакрил), цисплатина, доксорубин, цитотоксический эффект, резистентность, культуры клеток MCF-7, MCF-7/CP, MCF-7/ADR.

DOI: 10.31857/S0006302922050118, EDN: JIVQVD

Как показали проведенные в последние годы исследования, соединения, содержащие благородные металлы золото и серебро, обладают разносторонней биологической, в частности, противоопухолевой активностью [1, 2].

Среди веществ, оказывающих такой эффект, особое внимание привлекают полиакрилаты благородных металлов, к числу которых относятся и изучаемые нами препараты аурумакрил (полиакрилат золота) и аргакрил (полиакрилат серебра) [3–7].

Аурумакрил и аргакрил проявляют значительную противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755) *in vivo*, обладают цитотоксической эффективностью в отношении клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого А-549, рак толстой кишки НСТ116, меланома Mel Me) *in vitro* [8–11].

Принципиальные отличия в химической структуре этих соединений, представляющих со-

бой золото- и серебросодержащие полимеры на основе полиакриловой кислоты, от других широко исследуемых металлокомплексов дают основания полагать, что мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила и аргакрила, возможно, иные, чем у ряда известных, клинически апробированных лекарственных средств, таких, в частности, как цисплатина [12].

Доклинические исследования новых потенциальных противоопухолевых препаратов включают в качестве одного из этапов изучение их противоопухолевой и цитостатической активности в отношении опухолевых моделей с приобретенной резистентностью к известным химиотерапевтическим агентам.

Цель представленной работы состояла в оценке наличия перекрестной резистентности между металлополиакрилатами (аурумакрил и аргакрил) и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами цисплатиной и доксорубином.

Таблица 1. Показатели цитотоксического эффекта препаратов в отношении культуры клеток рака молочной железы человека, обладающих чувствительностью (MCF-7) и резистентностью к действию цисплатины (MCF-7/CP) и доксорубицина (MCF-7/ADR)

Препарат	Линия клеток	Диапазон концентраций, мкг/мл	IC_{96}	IC_{50}
Цисплатина	MCF-7	0.122–500	250	2
	MCF-7/CP	1.953–500	500*	20
	MCF-7/ADR	0.976–500	500	7
Доксорубицин	MCF-7	0.007–1000	P500	0,12
	MCF-7/CP	0.061–1000	1000	5
	MCF-7/ADR	0.122–500	500	5
Аурумакрил	MCF-7	7.812–1000	500 (40)**	125 (10.0)
	MCF-7/CP	0.976–1000	1000 (80)	120 (9.6)
	MCF-7/ADR	0.488–1000	500 (40)	75 (6.0)
Аргакрил	MCF-7	7.812–2000	500 (40)	50 (4.0)
	MCF-7/CP	1.953–2000	1000 (160)	40 (3.2)
	MCF-7/ADR	0.976–2000	500 (40)	40 (3.2)

Примечание. * – Указанная концентрация цисплатины вызывает гибель 91% клеток линии MCF-7/CP. ** – Курсивом в скобках указаны значения концентраций IK_{50} и IK_{96} для препаратов аурумакрил и аргакрил в пересчете на содержание золота и серебра соответственно.

С этой целью проведено сравнительное изучение цитотоксической активности указанных препаратов на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатине (MCF-7/CP) и доксорубицину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследовавшиеся полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов в количестве 8 масс. %. Аурумакрил – неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечающая общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOOAgCl_3H-)_m$, аргакрил – неполная серебряная соль полиакриловой кислоты, отвечающая формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOOAgCl_3H-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 cm^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебряного (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [4, 5]. Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* была проведена при их концентрациях в диапазоне от 0.488 до 1000 мкг/мл для аурумакрила и от 0.976 до 2000 мкг/мл для аргакрила (табл. 1).

Использованные в исследовании конвенционные препараты цисплатина (Teva, Израиль) и доксорубицин (Pfizer, США) применяли в концентрациях, изменяющихся в диапазоне 0.122–500 мкг/мл и 0.007–1000 мкг/мл соответственно (табл. 1).

Культуры клеток. Изучение цитотоксичности аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухоли человека с приобретенной резистентностью к цисплатине и доксорубицину проведено с использованием сублиний культуры клеток рецептор-положительной карциномы молочной железы MCF-7.

Протестированные в работе культуры клеток, обладающие исходной чувствительностью к препаратам (MCF-7) и резистентностью к цисплатине (MCF-7/CP) и к доксорубицину (MCF-7/ADR), получены из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка цитотоксического эффекта. Исследование цитотоксичности аурумакрила, аргакрила, цисплатины и доксорубицина проведено на указанных линиях клеточных культур путем определения доли выживших после воздействия препаратов клеток по отношению к контролю с использованием стандартного МТТ-теста [13, 14].

Клетки ($8 \cdot 10^4$ клеток/лунка) вносили в 96-луночный планшет в полной среде DMEM (арт. 41965039, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия) и 10 Ед/мл пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Рос-

сия), в конечном объеме 200 мкл на лунку и помещали в CO_2 -инкубатор.

Через 24 ч клеткам заменяли среду и добавляли исследуемые препараты в указанных выше концентрациях (табл. 1). В контрольную группу клеток препараты не вносили. Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) (AppliChem, Германия) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 3 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл ДМСО до растворения кристаллов формазана (37°, 10 мин, при встряхивании).

Долю выживших клеток определяли в соответствии с показателем оптической плотности раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США).

В качестве показателя цитотоксического действия препаратов служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергнутой воздействию веществ, и контрольной группах клеток, выраженное в процентах. Выживаемость клеток, подвергнутой воздействию препаратов, определяли в соответствии с формулой: $(\text{ОП экспериментальной группы} / \text{ОП контрольной группы}) \times 100\%$, где ОП – оптическая плотность раствора.

Результаты экспериментов представлены в виде кривых «концентрация–эффект», характеризующих изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препаратов и позволяющих определить общепринятый показатель цитотоксичности IC_{50} (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся клеточных культур.

Статистический анализ результатов. Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica 6.0, Statistica 8.0 и Excel for Windows. Результаты представлены как среднее из шести индивидуальных измерений для культивируемых клеток. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена с использованием t -критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения t превышают значения критерия Стьюдента $t_{0,1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0.01$) при заданном числе степеней свободы f [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение цитотоксической активности полиакрилатов проведено на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатине (MCF-7/CP) и доксорубину (MCF-7/ADR) вариантах

культуры клеток рака молочной железы человека с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатины и доксорубина.

Исходная культура клеток MCF-7 обладает высокой чувствительностью к цисплатине и, особенно, к доксорубину, о чем свидетельствуют данные, представленные на рис. 1а и 2а, а также значения коэффициента IC_{50} , равные 2.0 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 1, рис. 1а, 2а).

Развитие резистентности клеток к указанным препаратам подтверждается существенным снижением их цитотоксического эффекта в отношении исходно чувствительной культуры. Так, показатель IC_{50} цисплатины в отношении резистентной к ней культуры клеток MCF-7/CP составляет 20 мкг/мл, увеличиваясь в 10 раз по сравнению с исходным значением, равным 2 мкг/мл для культуры MCF-7 (рис. 1а,б, табл. 1). Для доксорубина коэффициент IC_{50} в отношении резистентной к нему культуры клеток MCF-7/ADR составляет 5 мкг/мл, увеличиваясь более, чем в 40 раз по сравнению с исходным значением, равным 0.12 мкг/мл для культуры MCF-7 (рис. 2а,б, табл. 1).

Необходимо отметить, что линии клеток с приобретенной резистентностью к цисплатине и доксорубину обладают перекрестной устойчивостью к действию этих препаратов. Цитотоксичность цисплатины по отношению к резистентным к доксорубину клеткам MCF-7/ADR снижается в 3.5 раза: значения коэффициента IC_{50} составляют 7.0 и 2.0 мкг/мл для культур MCF-7/ADR и MCF-7 соответственно (табл. 1, рис. 1а,в). Цитотоксичность доксорубина по отношению к резистентным к цисплатине клеткам MCF-7/CP снижается более чем в 40 раз по сравнению с его активностью в отношении исходных клеток MCF-7: значения коэффициента IC_{50} составляют 5.0 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 1, рис. 2а,в).

Результаты изучения цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила в отношении исходной культуры клеток MCF-7 и сублиний, резистентных в цисплатине MCF-7/CP и доксорубину MCF-7/ADR, представлены в виде зависимостей «концентрация–эффект» на рис. 3 и 4 соответственно, а также в табл. 1 и 2.

Как видно из представленных данных, аурумакрил и аргакрил, так же как цисплатина и доксорубин, обладают дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации вещества.

Аурумакрил и аргакрил, подобно цисплатине и доксорубину, вызывают гибель до 96% опухолевых клеток при применении в сопоставимых

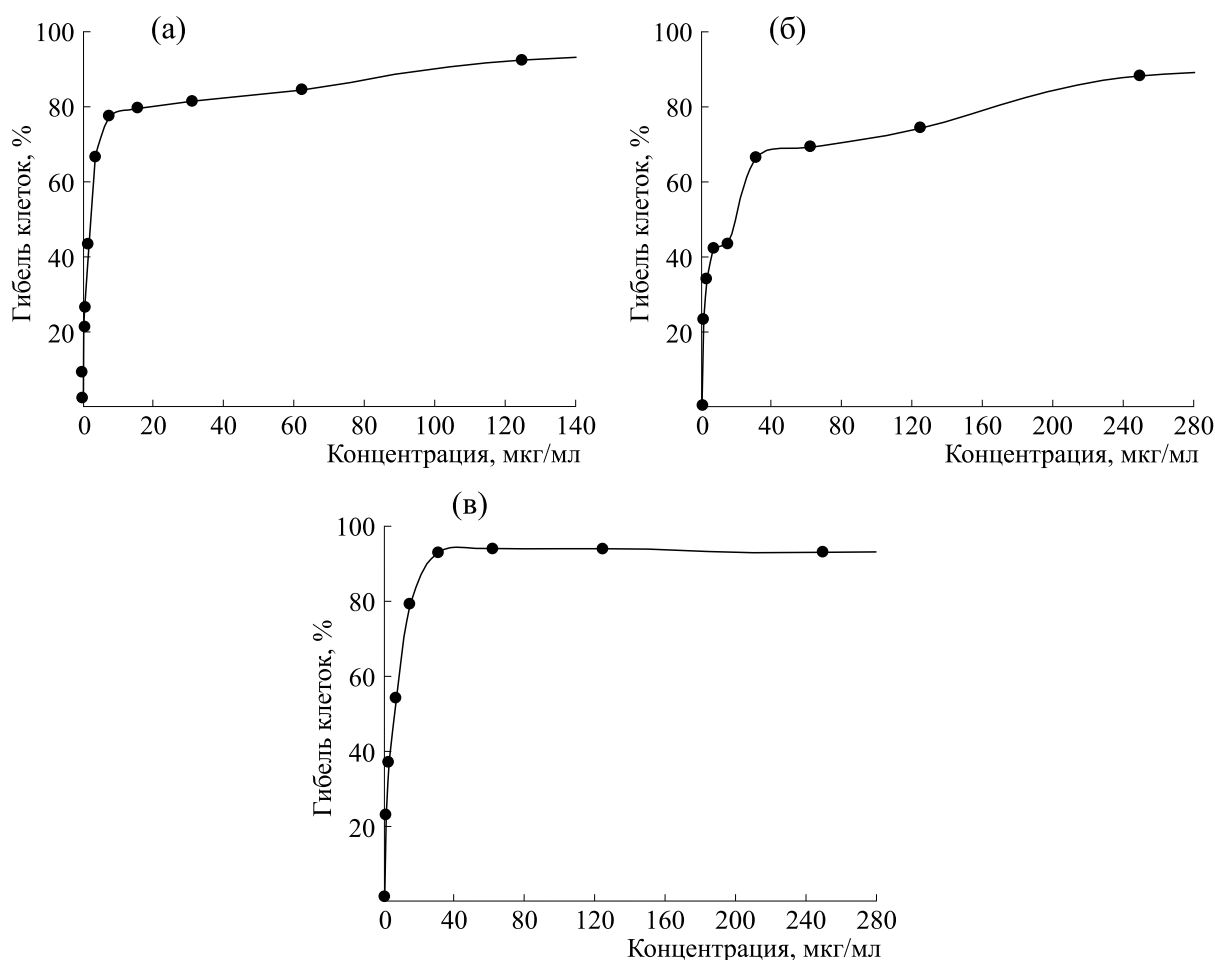


Рис. 1. Цитотоксический эффект цисплатины в отношении чувствительных и резистентных клеток культуры MCF-7: (а) – исходная линия клеток MCF-7, (б) – резистентная к цисплатине линия клеток MCF-7/CP, (в) – резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR. По оси абсцисс – концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

концентрациях. Так, показатель IC_{96} (минимальная концентрация вещества, вызывающая максимальную гибель клеток) в отношении клеток MCF-7 составляет 500 мкг/мл для аурумакрила, аргакрила и доксорубина и 250 мкг/мл для цисплатины. В отношении клеток, резистентных к действию цисплатины MCF-7/CP, показатель IC_{96} составляет 1000 мкг/мл для аурумакрила, аргакрила и доксорубина и 500 мкг/мл для цисплатины. Клетки, резистентные к доксорубину MCF-7/ADR, практически полностью (96%) погибают при воздействии изученных препаратов в концентрации 500 мкг/мл (табл. 1, рис. 1–4).

Рассматривая действие аурумакрила и аргакрила, необходимо отметить как принципиально важный результат, полученный в данном исследовании, сохранение практически одинаковой цитотоксической активности полиакрилатов в

отношении чувствительных и резистентных к действию цисплатины и доксорубина клеток.

Характеризуя цитотоксический эффект аурумакрила, отметим, что коэффициент IC_{50} для чувствительных MCF-7 и резистентных к цисплатине клеток MCF-7/CP имеет практически одинаковые значения, равные 125 и 120 мкг/мл, а для клеток с резистентностью к доксорубину MCF-7/ADR показатель IC_{50} равен 75 мкг/мл (табл. 1, рис. 3).

Для аргакрила значения коэффициента IC_{50} составляют 50 мкг/мл в отношении чувствительных клеток MCF-7 и 40 мкг/мл в отношении резистентных клеток MCF-7/CP и MCF-7/ADR (табл. 1, рис. 4).

Учитывая, что аурумакрил и аргакрил являются полимерами на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металлов в количе-

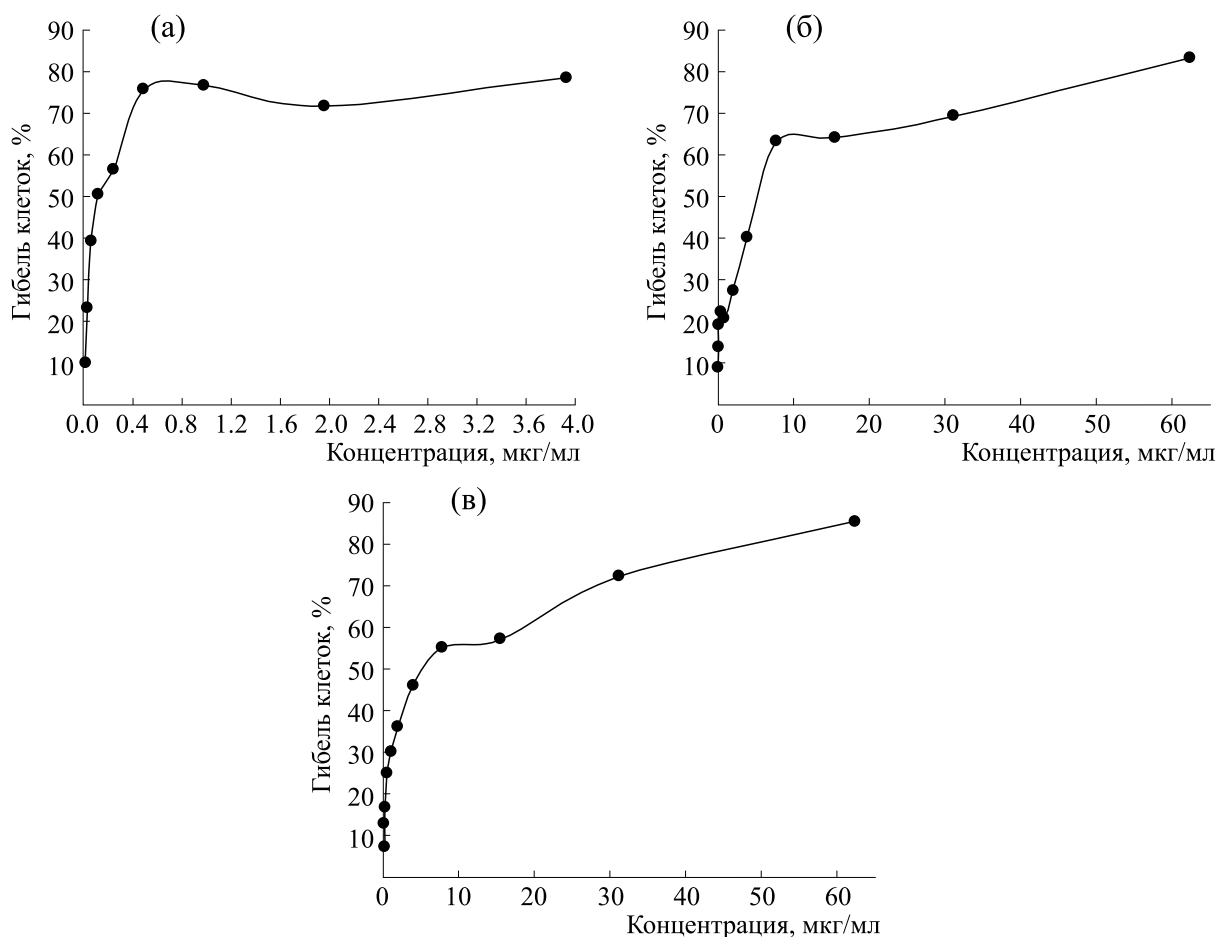


Рис. 2. Цитотоксический эффект доксорубина в отношении чувствительных и резистентных клеток культуры MCF-7: (а) – исходная линия клеток MCF-7, (б) – резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR, (в) – резистентная к цисплатине линия клеток MCF-7/CP. По оси абсцисс – концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

стве 8%, а противоопухолевый эффект этих соединений связывают в основном с действием образующихся наночастиц благородных металлов, представляется уместным характеризовать цитотоксическую активность этих препаратов соответствующими показателями в пересчете на содержание золота и серебра, соответственно [15].

Значения общепринятого критерия оценки цитотоксического эффекта IC_{50} для аурумакрила и аргакрила в пересчете на содержание металла, наряду с аналогичными показателями для цисплатины и доксорубина, для удобства сравнения активности препаратов выделены в отдельную таблицу (табл. 2).

Сопоставление активности препаратов в соответствии со значениями критерия оценки цитотоксического эффекта IC_{50} в отношении изученных моделей чувствительных и резистентных опухолевых клеток позволяет сделать следующие выводы (табл. 2).

В отношении чувствительных клеток линии MCF-7 эффективность препаратов снижается в ряду: доксорубин – цисплатина – аргакрил – аурумакрил.

В отношении клеток, резистентных к действию цисплатины MCF-7/CP и доксорубина MCF-7/ADR, активность препаратов убывает в последовательности: аргакрил – доксорубин – аурумакрил – цисплатина.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что резистентные к цисплатине и доксорубину клетки рака молочной железы человека сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию полиакрилатов – аурумакрила и, особенно, аргакрила (табл. 2).

Иными словами, в результате проведенных исследований обнаружено отсутствие перекрестной резистентности у препаратов полиакрилатов (аурумакрил и аргакрил) с цисплатиной и с доксорубином.

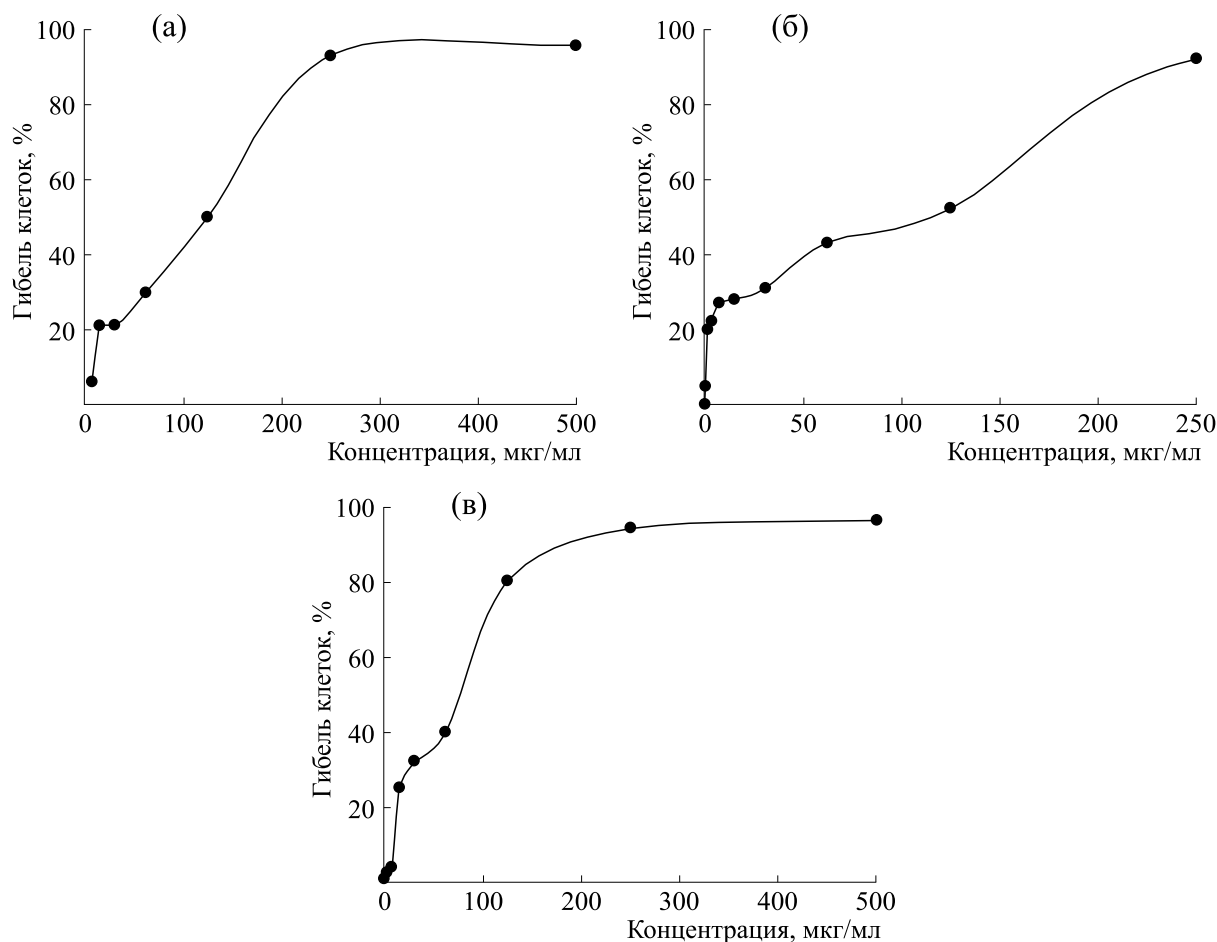


Рис. 3. Цитотоксический эффект аурумакрила в отношении чувствительных и резистентных клеток культуры MCF-7: (а) – исходная линия клеток MCF-7, (б) – резистентная к цисплатине линия клеток MCF-7/CP, (в) – резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR. По оси абсцисс – концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

бицином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженное в проведенном исследовании сохранение чувствительности к цитотоксическому действию полиакрилатов благородных металлов у клеток, обладающих резистентностью к цисплатине и доксорубину, может рассматриваться в качестве свидетельства, подтверждающего предположение о наличии определенных особенностей в механизме противоопухолевого эффекта этих соединений.

Необходимо отметить, что аурумакрил и аргакрил являются единственными полимерными соединениями среди изученных биологически активных веществ, содержащих золото и серебро, которые способны формировать наночастицы металлов в полимерной матрице, что возможно

вносит свой вклад в особенности метаболизма этих препаратов в физиологических условиях [16].

Рассматривая механизм действия металлополиакрилатов, отметим, что полимерные комплексы, которые содержат в своем составе ионогенные группы и наночастицы металла, способны к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к не валентным взаимодействиям с биологическими объектами. Эти свойства определяют возможный широкий спектр фармакологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, в том числе в качестве потенциальных лекарственных препаратов [15].

Цитотоксическое действие наночастиц золота и серебра на опухолевые клетки может реализовываться путем апоптоза или некроза, индуцируе-

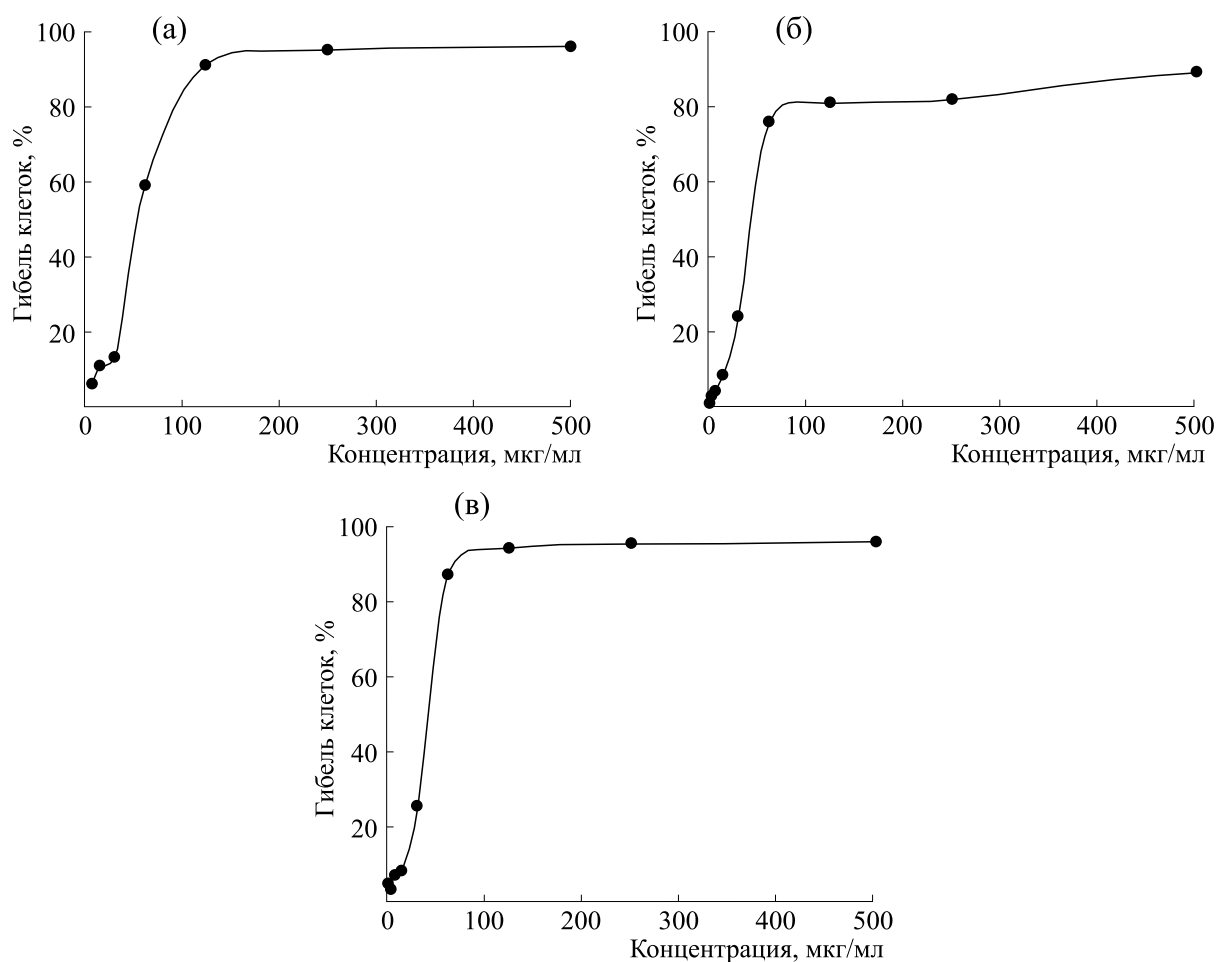


Рис. 4. Цитотоксический эффект аргакрила в отношении чувствительных и резистентных клеток культуры MCF-7: (а) – исходная линия клеток MCF-7, (б) – резистентная к цисплатине линия клеток MCF-7/CP, (в) – резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR. По оси абсцисс – концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

Таблица 2. Значения показателя IC_{50} аурумакрила, аргакрила (в пересчете на содержание металла), цисплатины и доксорубина в отношении чувствительных (MCF-7) и резистентных (MCF-7/CP, MCF-7/ADR) клеток культуры рака молочной железы человека

Препарат	Культура клеток		
	MCF-7	MCF-7/CP	MCF-7/ADR
	IC_{50} , мкг/мл		
Аурумакрил	10	9.6	6
Аргакрил	4	3.2	3.2
Доксорубин	0.12	5	5
Цисплатина	2	20	7

мых разрушением ультраструктуры клеток в результате усиления продукции активных форм кислорода, что приводит к развитию оксидативного стресса, сопровождающегося повреждением митохондрий, ДНК, инактивацией ферментов и нарушениями со стороны регуляторных сигнальных путей.

Следует заметить, что индукция в опухолевых клетках оксидативного стресса рассматривается в настоящее время как одно из новых перспективных направлений в лекарственной терапии рака [17].

Согласно существующим представлениям, биомиметиками для золото- и серебро содержащих препаратов могут служить белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации опухолевых клеток, в развитии процессов апоптоза и ангиогенеза [1, 2].

Показано, в частности, высокоспецифичное ингибирование под влиянием такого рода препаратов митохондриального фермента тиоредоксин редуктазы, имеющей в активном центре селен, который высокочувствителен к действию тяжелых металлов. Результатом такого взаимодействия является усиление продукции активных форм кислорода, повреждение митохондриальной мембраны, выход в цитозоль цитохрома *c* и индукция апоптоза [1, 2].

Обнаружено также модулирование препаратами золота и серебра активности протеасомы и уменьшение содержания антиапоптотических белков, что приводит к стимуляции процессов апоптоза клеток. Высока вероятность влияния такого рода соединений на белки, входящие в сигнальный каскад трансдукции митогенных сигналов, что может вести к подавлению клеточной пролиферации и гибели клеток [1, 2].

Полученные в проведенном нами исследовании данные об отсутствии перекрестной резистентности у металлополиакрилатов (аурумакирил и аргакрил) с цисплатиной и с доксорубицином в отношении клеток опухоли человека дополняют имеющиеся результаты, свидетельствующие о противоопухолевой активности этих соединений, и указывают на целесообразность их дальнейшего изучения.

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. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6) 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6) 697 (2018).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика*, **38** (12), 64 (2019).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
5. М. Г. Воронков, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая и др. *Патент РФ № 2372091*, *Бюл. изобретений*, **31** (2009).
6. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, N. V. Bluhterova, et al., *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **4** (4), 816 (2014).
7. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
8. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, **66** (12), 2333 (2017).
9. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика*, **59** (4), 785 (2014).
10. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5) 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
11. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1) 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
12. Д. Б. Корман, *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
13. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.
14. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика*, **64** (6), 1138 (2019).
15. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, **66** (12), 2314 (2017).
16. Б. И. Западинский, А. В. Котова, И. А. Матвеева и др., *Хим. физика*, **29** (10), 87 (2010).
17. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика*, **64** (3), 552 (2019). DOI:10.1134/S0006350919030102

Noble-Metal Polyacrylates: Cytotoxicity against Cisplatin and Doxorubicin-Resistant Tumor Cells

L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, Yu.A. Khochenkova**,
N.V. Bluhterova*, and K.A. Abzaeva***

**Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

***Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

****A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia*

The cytotoxic activity of metal polyacrylates containing gold (aurumacryl) and silver (argacryl) was studied on sensitive (MCF-7) and cisplatin (MCF-7/CP) and doxorubicin (MCF-7/ADR) resistant variants of human breast cancer cell culture with a parallel assessment of cytotoxicity for these cell lines of cisplatin and doxorubicin. It was found that cells resistant to cisplatin and doxorubicin retain full sensitivity to the cytotoxic effects of aurumacryl and argacryl. This study showed a lack of cross-resistance between metal polyacrylates and cisplatin, doxorubicin on the MCF-7 human breast cancer cell culture model.

Keywords: gold polyacrylate (aurumacryl), silver polyacrylate (argacryl), cisplatin, doxorubicin, cytotoxic effect, resistance, MCF-7, MCF-7/CP, MCF-7/ADR cell cultures

СЕЛЕНИТ НАТРИЯ КАК ВОЗМОЖНЫЙ АДЬЮВАНТ В ТЕРАПИИ COVID-19

© 2022 г. Т.М. Гусейнов*., Р.Т. Гулиева*, С. Н. Джафарова*, Н.Х. Джафар**

*Институт биофизики НАН Азербайджана, ул. Захида Халилова, 117, Баку, AZ1143, Азербайджан
#E-mail: tokus@mail.ru

**Клиника «MediClub», ул. Узеира Гаджибейли, 119, Баку, AZ1010, Азербайджан

Поступила в редакцию 23.05.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 20.07.2022 г.

Показана роль селена при развитии РНК вирусных инфекций, в частности Covid-19. Многие РНК-вирусы являются селензависимыми из-за «антисмысловых» взаимодействий между вирусный РНК и участком мРНК клеток хозяина, содержащим последовательность селенистеина, которые приводят к развитию селендефицитного состояния, окислительного стресса, нарушению иммунного ответа и т.д. К преимуществам лицензионного препарата селена — селенита натрия, широко применяемого в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, относятся: быстрая проникновения через мембраны клеток во все ткани организма; активное участие в метаболических процессах, сопровождающихся окислением клеточных серосодержащих белков; антиагрегационный эффект за счет снижения активности тромбосана; прерывание контакта вириона (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2) с мембраной здоровой клетки; подавление активности NF-κB-фактора, которая существенно возрастает при ковидных инфекциях. Приведены аргументы в пользу использования селенита натрия в качестве адьюванта в терапии Covid-19.

Ключевые слова: РНК-вирусы, COVID-19, окислительный стресс, селенит натрия, глутатионпероксидаза, тиоредоксинредуктаза.

DOI: 10.31857/S000630292205012X, EDN: JJTPM

Селен является эссенциальным, абсолютно незаменимым элементом для жизнедеятельности многих организмов (от вирусов до млекопитающих), и что важно, человека. Несмотря на то, что его валовое содержание в организме человека массой 70 кг составляет всего 14–15 мг, он принимает непосредственное участие во многих жизненно важных регуляторных процессах [1–3]. Его распространение в земной коре незначительно, так называемый кларк составляет всего $10^{-5}\%$, и, при этом он распределен очень неравномерно. Принято считать почвы с содержанием менее $10^{-5}\%$ селена — бедными, а более $10^{-5}\%$ — богатыми [4]. Исходя из этого, содержание селена в продуктах зависит от его региональной обеспеченности и, следовательно, обеспеченность селена (статус селена) в организме человека может сильно меняться даже в пределах одной страны. При этом установлено, что различные организмы неравномерно поглощают селен. Некоторые растения, относящиеся к злаковым и астрагалам, могут служить индикаторами обеспеченности почвы селеном. Несмотря на то, что содержание селена в

океане очень низкое, отдельные виды морских организмов, в частности, различные водоросли (например, спирулина) обладают способностью аккумулировать его в своих тканях [4]. Кроме видовых особенностей существует еще органная специфичность. В печени, почках, сетчатке, щитовидной железе, надпочечниках, семенниках, клетках крови (лимфоциты, тромбоциты, эритроциты), нервных клетках содержание селена высокое, что говорит о его важности в их функционировании [2, 5]. С 70-х годов XX века во многих странах мира началось интенсивное изучение обеспеченности населения селеном [4, 6]. Наблюдаемое заметное снижение селенового статуса связано с определенным ухудшением экологических условий в связи с ростом техногенной деятельности человека. В частности, интенсивное развитие энергетики (зольные остатки сжигаемых углеводородов), промышленности, средств связи, транспорта, приводящее к значительным выбросам газовых ангидридов, обуславливает закисление почв. Загрязнение тяжелыми элементами, которые образуют нерастворимые комплексы

с селеном, в конечном счете становится причиной того, что уменьшаются подвижные формы селена, то есть того селена, который поглощается растениями и через них попадает в организм человека [2, 4].

Во многих регионах мира, включая развитые страны и большую часть Азии, Австралии, Африки, а также многие страны СНГ (Россия, Украина, Беларусь и др.) и Балтии, которые страдают от дефицита селена, приняты или рассматриваются государственные программы по обеспечению нормализации селенового статуса на законодательном уровне [7, 8]. В Азербайджане статус селена близок к дефициту и это представляет определенную опасность для здоровья населения [6].

Селен входит в состав более 25 важных белков [9], выполняющих значительные регуляторные функции – это регуляция обмена йода в организме [2], защита гемоглобина от окисления [4], обеспечение нормальной репродуктивной функции [2], функций сердечно-сосудистой системы [2], углеводного обмена [2, 10], поражение нервной системы, в том числе когнитивных функций [2], регуляция иммунитета [2, 11], участие в торможении роста ряда злокачественных опухолей [2, 12], интоксикация от последствий отравления тяжелыми металлами [2], а также в регуляции свертываемости крови (ингибирование тромбоза) [9].

Особенно важно то, что большая часть селен-белков обладает уникальными антиокислительными функциями. Еще в 1970-е годы было установлено, что в селендефицитных районах высока смертность от рака [2, 12], а в 1980-е годы выявлена высокая смертность от кардиомиопатии (болезни Кешана), которая в разы превышает норму [3]. В последние 20 лет изучение таких вирусных заболеваний, как ВИЧ-инфекции [13, 14], лихорадки Эбола [13], вируса Коксаки [3, 9], Хантавируса [15], вируса Зика [15], различных видов гриппа (птичий грипп и др.) [16, 17] выявило, что в селендефицитных районах летальность от этих заболеваний существенно выше, чем в районах, достаточно обеспеченных селеном. Было предположено, что в геноме этих вирусов содержатся коды селенсодержащих белков – глутатионпероксидазы, главного антиоксидантного фермента [14, 18–20]; Se-транспортного SeP-белка [14] (включает в себя 10 и более атомов селена [15]); тиоредоксинредуктазы [14]. Что важно отметить, тиоредоксинредуктаза обладает окислительно-восстановленными функциями, предохраняющими клетки организма от ДНК-повреждений в ходе вирусной атаки, приводящей к окислительной модификации [13, 14]. Однако позднее авторы работ [21, 22] на примере ВИЧ-1 и вируса Эбола установили, что при развитии этих заболе-

ваний происходят «антисмысловые взаимодействия» между РНК вируса и мРНК клеток хозяина, в ходе которых происходит избирательный захват участка последовательности шипа – вставки аминокислоты селенистеин (элемент SECIS) с образованием комплементарной двухнитевидной спиральной структуры, обеспечивающей экспрессию уже «вирусных» селенопротеинов, в итоге за счет ресурсов селена клеток хозяина приводящих к его дефициту. А это при вирусных инфекциях отражается на качестве иммунитета, который в подобных условиях страдает от окислительного стресса [15, 23].

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА СЕЛЕНА И ПРЕДПОСЫЛКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ КАК АДЬЮВАНТА В ЛЕЧЕНИИ COVID-19

Механизм противовирусного действия селена носит многосторонний характер, охватывает ряд стадии развития вирусной инфекции, начиная от вторжения вириона в здоровые клетки и кончая борьбой с ее последствиями. Ниже приводится краткий перечень полезных свойств селена, на примере селенита натрия (основного неорганического соединения селена, применяемого в биологии и медицине) при лечении вирусных инфекций на примере ВИЧ и лихорадки Эбола [13, 18].

Прерывание контакта шипов вируса с мембранами здоровых клеток. Селенит натрия может выступать в роли прерывателя контакта вирионов (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2) с мембранным аппаратом здоровых клеток (хозяина). В частности, сам вирион SARS-CoV-2 состоит из гидрофобной оболочки, на внешней части которой расположены белковые выступы-шипы, а во внутренней части находится собственно носитель его генома – мРНК. Белки этих шипов взаимодействуют с мембранным аппаратом клеток «хозяина», т.е. организма, подвергаемого атаке вируса, в основном, посредством мембранного интегрального белка клеток – ангиотензинного фермента ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) и с последующим нарушением целостности мембран, способствуя проникновению генетического материала вируса в здоровые клетки. В дальнейшем эта мРНК встраивается в геном клетки хозяина, модифицирует его, после чего происходит размножение вируса за счет ресурсов клетки хозяина [24, 25]. Значит, прерывание контакта шипов вируса с мембранами здоровых клеток за счет изменения структуры каких-либо белков шипа является превентивной мерой для пресечения развития инфекции [26]. Эта гипотеза подробно представлена в работе [27].

Пассивный транспорт и участие в активном внутриклеточном метаболизме селена. Селенит натрия, являясь малоразмерной и неполярной молекулой, легко проходит через мембраны клеток путем пассивного транспорта, обладает активным внутриклеточным метаболизмом селена, который сопровождается окислением внутриклеточных серосодержащих белков с одновременным восстановлением селенита (+4) до селенида (-2). Учитывая то, что селен и сера по химическим свойствам достаточно схожи, можно предположить, что селен при поступлении в организм как химически более активный элемент будет замещать серу в серосодержащем цистеине (2-амино-3-меркаптопропановой кислоте) или, при взаимодействии с SH-группами белков, отнимать от тиолов атом водорода и тем самым окислять их, образуя связи типа R-S-S-R и R-S-Se-S-R [28, 29]. В случае вирусной инфекции селенит натрия также будет взаимодействовать и с вирусными серосодержащими белками, в том числе и с находящейся в шипах COVID-19 дисульфидизомеразой (PDI), дезактивируя ее как фермент по схеме:



Это означает, что селенит натрия может способствовать срыву контактного проникновения вируса в здоровые клетки [26, 27].

Как указывалось, выше, в результате геномных антисмысловых взаимодействий возникает дефицит селена, приводящий к уменьшению ресурсов селенэнзимов, в первую очередь тиродоксинредуктазы, поставщика протонов для нужд ДНК синтеза здоровых клеток [30]. В результате появляется повышенный расход организмом селена, необходимого для синтеза селенпротеинов, как для собственных, так и для «вирусных». Вследствие этого возникает селендефицитное состояние, приводящее к образованию активных форм кислорода [14, 31], ослаблению иммунитета на фоне окислительного стресса и снижению антиокислительной защиты организма [10]. Селенит натрия является удачной в этом отношении формой селена, способствующей быстрому проникновению его в клеточные структуры и преодолению гематоэнцефалического барьера [10, 28]. Это свойство позволяет организму использовать селен из селенита натрия для поддержания жизненно важного уровня селенпротеинов, защищая его от окислительного стресса [2].

Ингибирование опухолевого роста. На модельных опытах с применением опухолевых клеток было установлено, что селенит натрия специфически подавляет РНК- и ДНК-полимеразные реакции в результате образования стабильного сополимерного продукта селена с молекулами

полимеразных энзимов через селенотрисульфидную ковалентную связь. Таким образом, селен может ингибировать опухолевый рост, что указывает на определенную возможность торможения и вирусного размножения в клетках хозяина (учитывая, что существует и вирусная версия развития рака) [32]. Это было продемонстрировано и для вируса гриппа А [17].

Ингибирование активации ядерного фактора NF-κB. Исходя из известной схожести между SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, можно сделать определенные предположения о действии селена в отношении репликационных и транскрипционных процессов при инфекции COVID-19. Так, для SARS-CoV-1 была установлена существенная активация ядерного фактора NF-κB, играющего ключевую роль в регулировании иммунного ответа [33–35]. Фактор NF-κB принимает активное участие в транскрипции геномного материала вируса, которая сопровождается токсичными воспалительными процессами [36]. Имеется много сведений о том, что селен ингибирует эту активацию, тогда как дефицит селена вызывает активацию NF-κB [9]. О важности ингибирования этого фактора свидетельствует и тот факт, что он является ключевым звеном в транскрипционных процессах при ВИЧ-инфекции [9] (как уже отмечалось, геном вируса иммунодефицита имеет много схожих свойств с геномом COVID-19).

Регуляция иммунного ответа. Активация NF-κB фактора сопровождается развитием противовоспалительных процессов [37], а это означает усиленную секрецию множества цитокинов. Неконтролируемое производство цитокиновых факторов, содержащих интерлейкины IL-6, IL-8, IL-10, IL-1β и фактор некроза опухоли-альфа совместно с активными формами кислорода и азота стимулируют синдром острого респираторного дисбаланса (Acute Respiratory Distress Syndrome – ARDS) [38–41]. Все это приводит к развитию наиболее опасных последствий COVID-19, таких как массивная атака интерлейкинов, в том числе IL-2 и IL-6 (цитокиновый шторм), на инфицированный организм [39, 42] и нарушение иммунного ответа в целом. В этом контексте селен давно известен, как регулятор иммунного ответа на всех уровнях: неспецифическом, гуморальном и клеточном, в то же время ограничивающим деятельность Т-хелперов [1, 43, 44].

Антиагрегационный эффект. Как уже отмечалось, опасными последствиями развития COVID-19 являются не только респираторные патологии, но и в равной мере сосудистые, связанные с генерацией сверхсвертываемости крови [36, 37, 42] и образованием тромбоцитопении [45]. В основе этих процессов лежит образование тромбосана A2, ведущего агрегацию тромбоци-

тов, что является причиной свертывания крови в сосудах, начиная с самых мелких альвеолярных и до крупных легочных артерий (эффект «матового стекла») не только в легких, но и в других органах, богатых сосудами (сердце, почки, сетчатка, надпочечники и др.) [30, 46]. Селенит натрия, ингибируя формирование тромбосана, обладает антиагрегационным эффектом [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение 2020–2022 гг. в ходе распространения COVID-19 по всему миру появилось много обзорных и оригинальных работ, посвященных связи обеспеченности организма человека и животных эссенциальными минералами и различными витаминами с развитием патогенеза и успешным лечением COVID-19 [5, 21, 34, 38, 47–51]. Среди этих необходимых нутриентов важное место занимает селен, статус которого заметно влияет на течение этой вирусной инфекции [22, 49–52] и др. Кроме того, в этих работах приведены гипотетические механизмы регулирования иммунного ответа селеном и его соединениями [22, 38, 44, 53–55]. В них большое место отводится влиянию селена на активность фактора NF-κB и на сопряженную с ним экспрессию противовоспалительных цитокинов (цитокиновый шторм) [33, 35]. Во многих модельных опытах были использованы селенит натрия, который показал высокую метаболическую активность в различных регуляторных процессах, и именно это является причиной его широкого использования. Следует подчеркнуть, что в последнее время появились довольно обширные обзоры, посвященные роли селена и ряда других микроэлементов (цинк, железо, медь и другие), которые всесторонне освещают эту проблему (например, обзорные работы [8, 26, 56]).

Подводя итоги проведенного краткого обзора об участии селена в развитии вирусных инфекций, в особенности SARS-CoV-2, можно сделать определенные выводы:

1. Восприимчивость к инфекции SARS-CoV-2 и ее последствиям, а также тяжесть протекания заболевания зависят от обеспеченности организма селеном.

2. Селенит натрия, обладая активным окислительным метаболизмом, участвует в регуляции вирусного размножения и в репарации поврежденных клеток.

3. Селенит натрия как сертифицированный препарат применяется в лечебной практике в составе селеносодержащих препаратов или селеносо-

держащих БАДов. Он имеет ряд неоспоримых преимуществ по сравнению другими препаратами селена (

L-селенметионином и L-селенцистеином и др.). Так как синтез селеносодержащих белков происходит по специфическому SECIS-механизму, который не предполагает использование селеносодержащих аминокислот в готовом виде, эти аминокислоты проходят длинный путь разложения (изъятия селена из молекул аминокислот) до селенида, то есть происходит синтез *de novo*. Для селенита натрия характерна быстрота доставки селена в поврежденные клетки, и эта быстрота оказываемых репарационных эффектов придает ему определенные преимущества.

Учитывая высокую контагиозность SARS-CoV-2 и высокую степень риска заражения медицинского персонала, соприкасающегося с пациентами с COVID-19 и особенно врачей «неотложной помощи», представляется важным рекомендовать в качестве превентивных мер по усилению их иммунитета насыщение организма селеном, цинком и другими усиливающими иммунитет средствами.

Перечисленные выше соображения говорят о целесообразности использования селенита натрия в качестве адьювантного средства при лечении коронвирусного инфекционного заболевания, особенно на ранних этапах его развития.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная работа не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. R. Arthur, R. C. McKenzie, and G. J. Beckett, *J. Nutrition*, **133** (5), 1457S (2003).
2. M. P. Rayman, *Lancet*, **379** (9822), 1256 (2012).
3. J. K. Wrobel, R. Power, and M. Toborek, *IUBMB Life*, **68** (2), 97 (2015).
4. В. В. Ермаков и В. В. Ковальский, *Биологическое значение селена* (Наука, М., 1974).
5. F. Zhou, T. Yu, R. Du, et al., *Lancet*, **395**, 1054 (2020).
6. Э. М. Зейналлы, Р. Т. Гулиева и Ф. Р. Яхьяева, в сб. *Материалы науч.-практич. конф. посвящ. 80-летию проф. Э.И. Ибрагимова* (Центр онкологии МЗ Азербайджана, Баку, Азербайджан, 2010), сс. 65–66.

7. Н. А. Голубкина, А. В. Синдирева и В. Ф. Зайцев, Юг России: экология, развитие, **12** (1), 107 (2017).
8. Л. Н. Йованович и В. В. Ермаков, в сб. *Материалы международного биогеохимического симпозиума* (Тирасполь, 2020), сс. 71–83.
9. S. Tomo, G. Saikiran, M. Banerjee, and S. Paul, *EXCLI J.* **20**, 781 (2021).
10. K. T. Suzuki, *J. Health Sci.*, **51** (2), 107 (2005).
11. F. Qian, S. Misra, and K. S. Prabhu, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **54** (6), 484 (2019).
12. M. Kieliszek, B. Lipinski, and S. Blazejak, *Cells*, **6** (4), 39 (2017).
13. B. Lipinski, *Br. J. Med. & Med. Res.*, **6**, 319 (2015).
14. E. W. Taylor, J. A. Ruzicka, L. Premadasa, and L. Zhao, *Biochemistry. Curr. Top Med. Chem.*, **16** (3), 1530 (2016).
15. O. M. Guillin, C. Vindry, T. Ohlmann, and L. Chavatte, *Nutrients*, **11** (9), 2101 (2019).
16. G. Gong, Y. Li, K. He, et al., *RSC Adv.*, **10** (13), 8002 (2020).
17. Z. A. Lazimova, I. I. Abdullaev, F. I. Abdullaev, and T.B. Asadullaev, *Voprosi virusologii*, **31** (2), 236 (1986).
18. Т. М. Гусейнов и Н. С. Сафаров, *Биомедицина*, № 2, 3 (2007).
19. E.W. Taylor, J.A. Ruzicka, and L. Premadasa, *ResearchGate* (2015). Available online at: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.10237.51683>.
20. E. W. Taylor, *Natural Health, News*, June 18 (2020).
21. R. A. Heller, Q. Sun, J. Hackler, et al., *Redox Biol.*, **38**, 101764 (2021).
22. M. Majeed, K. Nagabhushanam, S. Gowda, and L. Mundkur, *Nutrition*, **82**, 111053 (2021).
23. L. Delgado-Roche and F. Mesta, *Arch. Med. Res.*, **51** (5), 384 (2020).
24. R. Lu, X. Zhao., J. Li, et al., *Lancet*, **395** (10224), 565 (2020).
25. A. Mittal, K. Manjunath, R. K. Ranjan, et al., *PLoS Pathog*, **16** (8), 1008762 (2020).
26. V. V. Ermakov and L. N. Jovanović, *Geochem. Int.* **60**, 137 (2022).
27. M. Kieliszek and B. Lipinski, *Med. Hypotheses*, **143**, 1 (2020).
28. С. Я. Гусейнова, *Биомедицина*, **17** (3), (2019).
29. M. Hongoh, M. Haratake, N. Fachigame, et al., *Roy. Soc. Chem.*, **41** (24), 7340 (2012).
30. S. Miller, S. W. Walker, J. R. Arthur, et al., *Clin. Sci. Lond. Engl.*, **100** (5), 543 (2001).
31. L. Hiffler and B. Rakotoambinina, *Front. Nutr.*, **7**, 164 (2020).
32. J. L. Larabee, J. R. Hocker, R. J. Hanas, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **64** (12), 1757 (2002).
33. C. A. Lutomski, T. J. El-Baba, J. R. Bolla, and C. V. Robinson, *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.10.06.328112 (2020).
34. A. Gorji and M. G. Khaleghi, *Nutrition*, **82**, 111047 (2021).
35. W. Zeng, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **527**, 618 (2020).
36. M. L. De Diego, J. L. Nieto-Torres, J. A. Regla-Nava, et al., *J. Virol.*, **88** (2), 913 (2014).
37. Z. Varga, A. J. Flammer, P. Steiger, et al., *Lancet*, **395** (10234), 1417 (2020).
38. X. Jing, G. Liangqin, L. Huiqing, and Ch. Shao-dong, *Nutrition*, **82**, 111049 (2021).
39. S. S. Martinez, Y. Huang, L. Acuna, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (1), 280 (2021).
40. S. H. Tian, W. Hu, L. Niu, et al., *Preprints* (2020).
41. D. Wang, B. Hu, C. Hu, et al., *China, JAMA* (2020).
42. R. Jayawardena, P. Sooriyaarachchi, M. Chourdakis, et al., *Clin. Res. Rev.*, **14** (4), 367 (2020).
43. M. Fakhrolmobasheri, Z. Nasr-Esfahany, H. Khanahmad, and M. Zeinalian, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **91** (3–4), 197 (2020).
44. S. Hariharan and S. Dharmaraj, *Inflammopharmacology*, **28**, 667 (2020).
45. M. Ackermann, et al., *New Engl. J. Med.*, **383** (2), 120 (2020).
46. G. Lippi, M. Plebani, and B. M. Henry, *Clin. Chim. Acta*, **506**, 145 (2020).
47. J. Katz and S. Yue, *Nutrition*, **84**, 111106 (2021).
48. R. Kumar, H. Rathi, A. Haq, et al., *Virus Res.*, **15**, 292 (2021).
49. A. Moghaddam, R. A. Heller, Q. Sun, et al., *Nutrients*, **12** (7), 2098 (2020).
50. J. Zhang, R. Saad, E. W. Taylor, and M. P. Rayman, *Redox Biol.*, **37**, 1017 (2020).
51. J. Zhang, E. W. Taylor, K. Bennett, et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, **111** (6), 1297 (2020).
52. G. Bermanno, C. Meplan, D. K. Mercer, and J. E. Hesketh, *Br. J. Nutr.*, **125** (6), 618 (2021).
53. Y. Fu, Y. Cheng, and Y. Wu, *Virol. Sin.*, **35**, 266 (2020).
54. K. R. Sachitra, R. Nirmal, R. Ismail, and B. Faizal, *Nutrition*, **83**, 111089 (2021).
55. H. Shakoore, J. Feehan, A. S. Al Dhaheri, et al., *Maturnitas*, **143**, 1 (2021).
56. S. Khatiwada and A. Subedi, *Curr. Nutr. Rep.*, **10** (2), 125 (2021).

Sodium Selenite as a Potential Adjuvant Therapy for COVID-19

T.M. Huseynov*, R.T. Guliyeva*, S.H. Jafarova*, and N.H. Jafar**

**Institute of Biophysics, National Academy of Sciences of Azerbaijan, ul. Zahida Khalilova 17, Baku, AZ1143 Azerbaijan*

***Clinic "MediClub", ul. Uzeyira Hajibeyli 119, Baku, AZ1010 Azerbaijan*

The review shows that selenium plays a role in the development of RNA viral infections, and in particular, COVID-19. Many RNA viruses are selenium-dependent due to "antisense" interactions between the viral RNA and the mRNA region of the host cells, containing the selenocysteine insertion sequence, leading to the development of a selenium deficiency state, oxidative stress, impaired immune response, and so forth. The advantages of sodium selenite, the licensed product of selenium, widely used in medicine, veterinary medicine, agriculture, include: a) the speed of penetration through cell membranes into all tissues of the organism; b) active participation in metabolic processes, accompanied by the oxidation of cellular sulfur-containing proteins; c) antiaggregation effect by reducing the activity of thromboxane; d) interruption of the contact of the virion (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2) with the membrane of a healthy cell; e) suppression of the activity of the NF- κ B factor, which increases significantly in Covid infections. The review considers evidence that is relevant in providing support for the use of sodium selenite as adjuvant therapy in Covid-19

Keywords: RNA viruses, COVID-19, oxidative stress, sodium selenite, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase

ЭФФЕКТЫ ХЛОРИДА НИКЕЛЯ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ МИОКАРДА АКТИВНЫХ СУСЛИКОВ С РАЗЛИЧНЫМ ОТВЕТОМ НА ГИПОТЕРМИЮ

© 2022 г. А.С. Аверин*, #, Н.М. Захарова*, Д.А. Игнатъев*

*Институт биофизики клетки — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 19.07.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 29.07.2022 г.

Исследовано влияние 1.5 мМ хлорида никеля на силу сокращений, зависимость «частота—сила» и эффект паузы в миокарде активных сусликов *Urociellus undulatus* с разной реакцией на гипотермию. Показано, что при температуре 20°C в группе сусликов, сохраняющих отрицательную направленность зависимости «частота—сила» при охлаждении, сила сокращения составляет $52 \pm 15\%$ и $4 \pm 3\%$ от силы сокращения в контроле при частоте стимуляции 0.1 и 1 Гц соответственно. В миокарде, в котором при охлаждении тип зависимости «частота—сила» менялся с двухфазного на положительный, уменьшение сократимости было значительно более выраженным; происходило практически полное подавление сокращений до $6 \pm 3\%$ и $1 \pm 0.5\%$ для частот стимуляции 0.1 и 1.0 Гц соответственно. В присутствии 1.5 мМ ионов Ni^{2+} при частоте стимуляции 0.3 Гц величина эффекта паузы снижалась в среднем на 45–55% в группе с отрицательной зависимостью «частота—сила», в группе с положительной зависимостью снижение достигало 90–98%. При частоте стимуляции 1.0 Гц уменьшение эффекта паузы в данных группах составляло 45–55% и 65–85% соответственно. Таким образом, миокард сусликов, сохраняющий отрицательную зависимость «частота—сила», существенно менее зависим от поступления внеклеточного Ca^{2+} по сравнению с миокардом активных сусликов, для которого при охлаждении характерен переход к положительной зависимости «частота—сила».

Ключевые слова: миокард, гипотермия, частота-сила, потенциация паузой, Ni^{2+} .

DOI: 10.31857/S0006302922050131, EDN: JJSEXK

Зависимость «частота—сила» впервые описана более ста лет назад, но до сих пор остается в фокусе современных исследований. При этом одна часть работ использует этот показатель как важный диагностический признак, позволяющий судить о физиологическом состоянии миокарда [1–3], а другая стремится раскрыть на зависимости «частота—сила» влияние отдельных механизмов электромеханического сопряжения [4–8]. Как правило, выделяют три основных типа зависимости «частота—сила»: положительная — характерная для здорового миокарда большинства млекопитающих [9], двухфазная — наблюдается у некоторых грызунов (крысы, мыши и др.) [8, 10, 11] и отрицательная — отмечается в патологическом миокарде [2, 7], в миокарде гибернантов и при некоторых физиологических состояниях [12–14].

Сокращения: CP — саркоплазматической ретикулум, LTCC — Ca^{2+} канал L-типа.

Дополнительным источником информации о состоянии миокарда также может служить эффект паузы, который заключается в том, что если на фоне стимуляции с постоянной частотой вносится временной перерыв, то это ведет к потенциации первого после паузы сокращения, при этом сила сокращения будет пропорциональна количеству ионов кальция, выброшенных из саркоплазматического ретикулума (CP) [15]. Анализ эффекта паузы может являться диагностическим признаком в силу того, что внесение паузы в здоровом миокарде вызывает потенциацию сокращения, а в патологическом миокарде приводит к снижению потенциации или ее спаду [7, 16, 17].

Миокард гибернантов представляет большой интерес для исследований в силу своей поразительной устойчивости к действию гипотермии и своей уникальной пластичности. Из литературных данных известно о существенных отличиях между миокардом гибернирующих животных

зимнего сезона и сезона летней активности. В частности, было установлено, что при переходе между сезонами меняется характер зависимости «частота—сила» [11], выраженность эффектов различных инотропных воздействий [18], а также активность Ca^{2+} -каналов L-типа (LTCC) [19]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что среди сусликов периода летней активности возможно существование различных видов зависимости «частота—сила» и эффекта паузы [13]. Такое многообразие находит свое дальнейшее отражение в формировании различных типов реакции данных показателей на охлаждение [20]. Механизмы, лежащие в основе наблюдаемых отличий между активными сусликами с различным типом реакции на температуру, остаются еще недостаточно изученными. Известно, что в условиях гипотермии, может значительно изменяться действие блокаторов отдельных механизмов электромеханического сопряжения [21]. Поэтому в качестве инструмента блокирования входа внеклеточного Ca^{2+} мы использовали ионы никеля.

Цель данного исследования — оценить соотношение вклада внеклеточных и внутриклеточных источников Ca^{2+} в активацию сокращения миокарда с помощью физиологических тестов — зависимости «частота—сила» и эффекта паузы, а также посредством блокирования входа внеклеточного Ca^{2+} хлоридом никеля в условиях гипотермии. Преимуществом использования Ni^{2+} является его способность ингибировать несколько путей поступления внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль, при этом эффективность его не зависит от температуры в отличие, например, от нефидипина, что делает использование хлорида никеля более предпочтительным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка сердца якутских сусликов *Urociellus undulatus* в периоды летней (июнь—июль, $n = 10$) активности.

Животные. Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): $\text{NaCl} - 135$, $\text{KCl} - 4$, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{CaCl}_2 - 1.8$, $\text{NaHCO}_3 - 13.2$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 1.8$, глюкоза — 11 (рН 7.4). Раствор аэрировали газовой смесью состава 95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$. Выделенные папиллярной мышцы, стимуляцию и измерение силы сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [22] при температуре перфузирующего раствора $20 \pm \pm 0.1^\circ\text{C}$. Для исследования механической активности папиллярной мышцы использовали автоматизированную установку на основе персональ-

ного компьютера и плат АЦП-ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6X-2M. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами (напряжением 5 В и длительностью 5 мс, с силой тока, в два раза превышающей пороговую) с частотой 0.3 Гц в течение 1 ч для стабилизации силы сокращения.

Зависимость «частота—сила». Зависимость «частота—сила» в изометрическом режиме регистрировали в интервале частот стимуляции от 0.1 до 1.0 Гц. При построении зависимости величину силы сокращения для каждой из частот стимуляции в исследуемом диапазоне выражали в процентах по отношению к ее величине на частоте стимуляции 0.1 Гц, принимаемой за 100% [14, 20].

Регистрация эффекта паузы. На фоне постоянной стимуляции с заданной частотой, при которой сила сокращения находится на стабильном уровне (базовое сокращение) вносили паузу в стимуляции, что приводило к потенциации первого после паузы сокращения (тестового). Величину эффекта выражали в процентах по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции (0.3 и 1.0 Гц). Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро—Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA) (по уровню значимости $p < 0.05$). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость «частота—сила». Как говорилось выше, группа активных сусликов неоднородна по типу реакции миокарда на охлаждение, на рис. 1а можно видеть пример сохранения отрицательной зависимости «частота—сила» в ответ на охлаждение до 10°C и трансформацию из двухфазной зависимости в положительную (рис. 1б); также заметно, что при 20°C для миокарда этих типов была характерна отрицательная (рис. 1в,д) и положительная зависимости (рис. 1г,е).

Под воздействием 1.5 мМ Ni^{2+} в группе сусликов с отрицательной зависимостью «частота—сила» при стимуляции частотами 0.1 Гц и 1 Гц сила сокращения снижалась до $52 \pm 15\%$ и $4 \pm 3\%$ соответственно (рис. 1в,д); в миокарде с положительной зависимостью «частота—сила» отрицательный инотропный эффект был значительно более выражен при практически полном подавлении

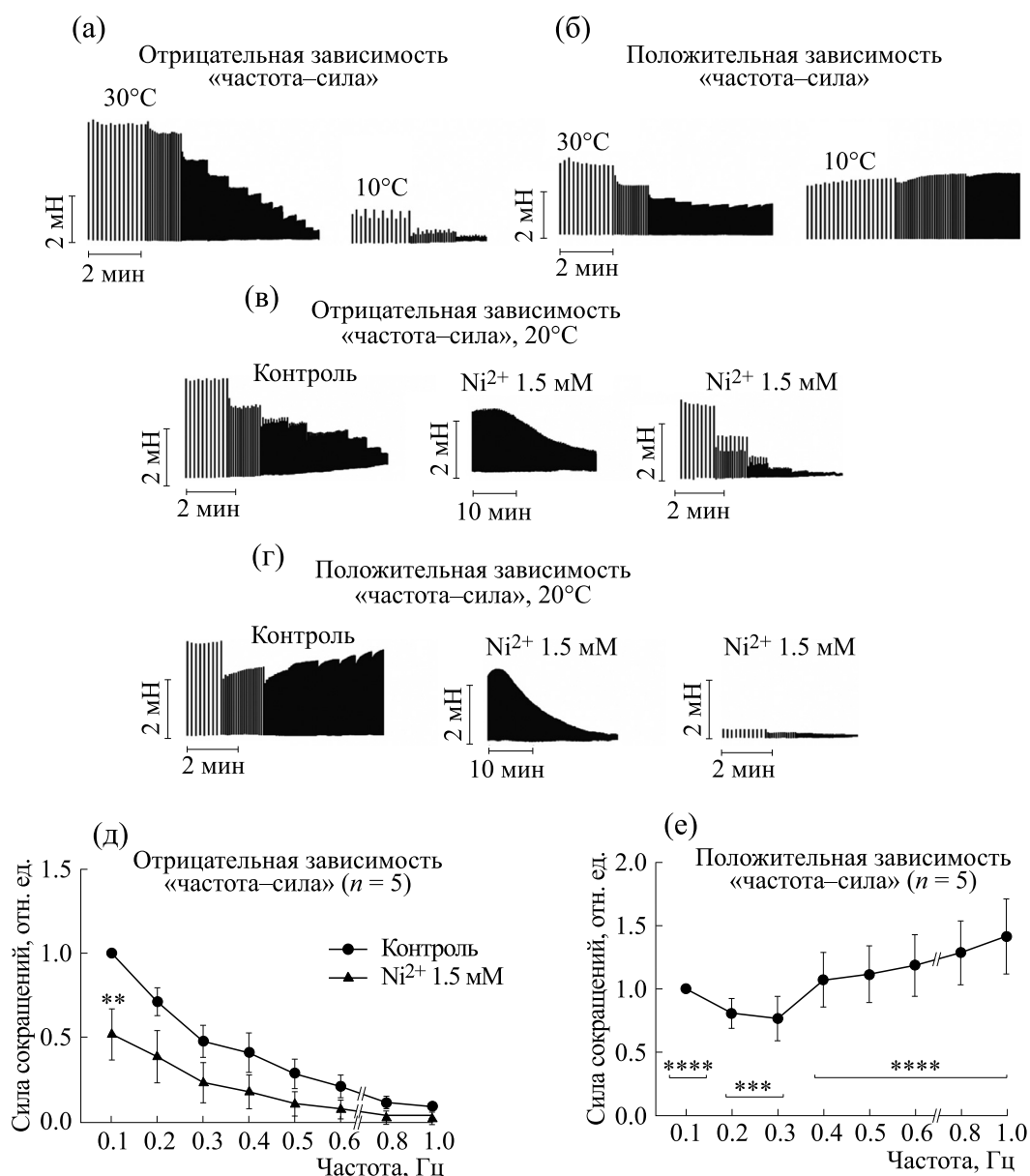


Рис. 1. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на силу сокращений и зависимость «частота–сила» в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной ($n = 5$) и положительной ($n = 5$) зависимостью. (а) – Пример сохранения отрицательного характера зависимости «частота–сила» при охлаждении; (б) – пример перехода из отрицательной к положительной зависимости «частота–сила»; (в, г) – типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на сократимость папиллярной мышцы с отрицательной и положительной зависимостью «частота–сила» соответственно; (д, е) – соответствующие кривые зависимости «частота–сила». По оси ординат – сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на частоте 0.1 Гц, принимаемая за единицу; по оси абсцисс – частота стимуляции, Гц. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле на той же частоте: ** – $p < 0.005$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$).

сокращений, сила которых составляла $6 \pm 3\%$ (0.1 Гц) и $1.0 \pm 0.5\%$ (1 Гц) (рис. 1г,е).

Из данных литературы известно, что концентрации Ni²⁺ менее 100 мкМ блокируют преимущественно T-Ca²⁺-ток с различной эффективностью действия на отдельные изоформы [23], при этом более высокие концентрации (0.5–5 мМ)

блокируют LTCC [24], а концентрациями около 5 мМ блокируется натрий-кальцевый обменник [25, 26].

Полученные нами эффекты с более выраженным подавлением в группе с положительной зависимостью «частота–сила» в целом соответствуют, по-видимому, большей роли LTCC в актива-

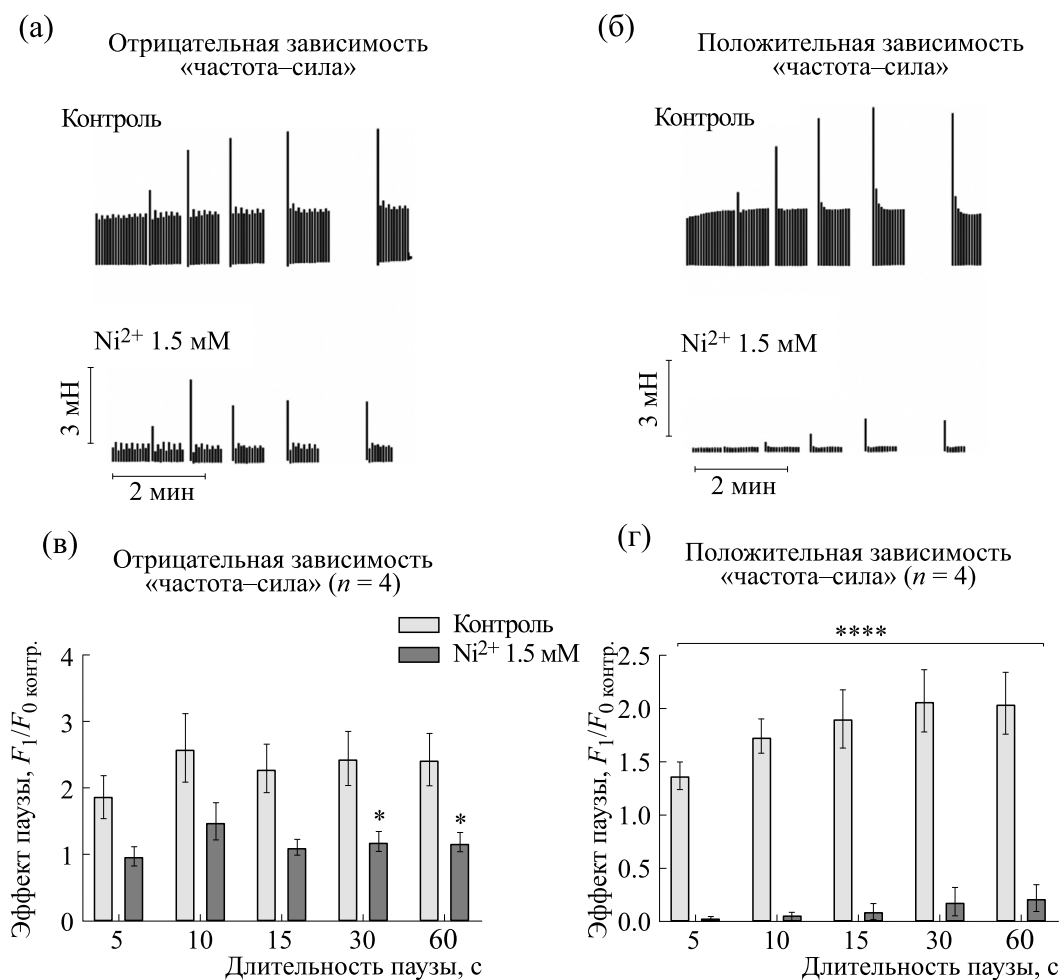


Рис. 2. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы при частоте стимуляции 0.3 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной ($n = 4$) и положительной ($n = 4$) зависимостью «частота–сила». (а, б) – Типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы с отрицательной и положительной зависимостью «частота–сила» соответственно; (в, г) – соответствующие статистические гистограммы. По оси ординат – эффект паузы (сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции в контроле); по оси абсцисс – длительность пауз, с. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле при той же длительности паузы: * – $p < 0.05$; **** – $p < 0.0001$).

ции сокращения. Вместе с тем они показывают, что в миокарде сусликов с данным типом реакции на температуру ведущую роль в формировании положительной зависимости «частота–сила» играет ЛТСС сходно с миокардом нормотермных животных как в условиях, близких к физиологическим, так и при умеренной гипотермии [27, 28]. В экспериментальной группе, сохраняющей негативную зависимость «частота–сила» в диапазоне 0.1–0.3 Гц оставались заметные сокращения, что может свидетельствовать с одной стороны о наполненности СР Ca²⁺, а с другой – что при блокировании ЛТСС дополнительные источники, такие как депозависимый вход Ca²⁺ [22] или обратная форма натрий-кальциевого обменника [26, 29, 30], могут активировать выброс Ca²⁺ из

СР. По некоторым данным, дополнительной возможностью для активации сокращения также может стать прямое конформационное взаимодействие между ЛТСС и каналами рианодинных рецепторов без проведения ионов Ca²⁺ [31].

В наших опытах, независимо от типа реакции на температуру, при данных экспериментальных условиях мы наблюдали исключительно отрицательный инотропный эффект, в то время как в миокарде лягушки, для которого характерна положительная зависимость «частота–сила» [32], как в некоторых состояниях у сусликов, может наблюдаться положительный инотропный эффект Ni²⁺ (10–200 мкМ) [33]. Причина и условия формирования положительного эффекта Ni²⁺ в миокарде зимоспящих остается неясной. Не-

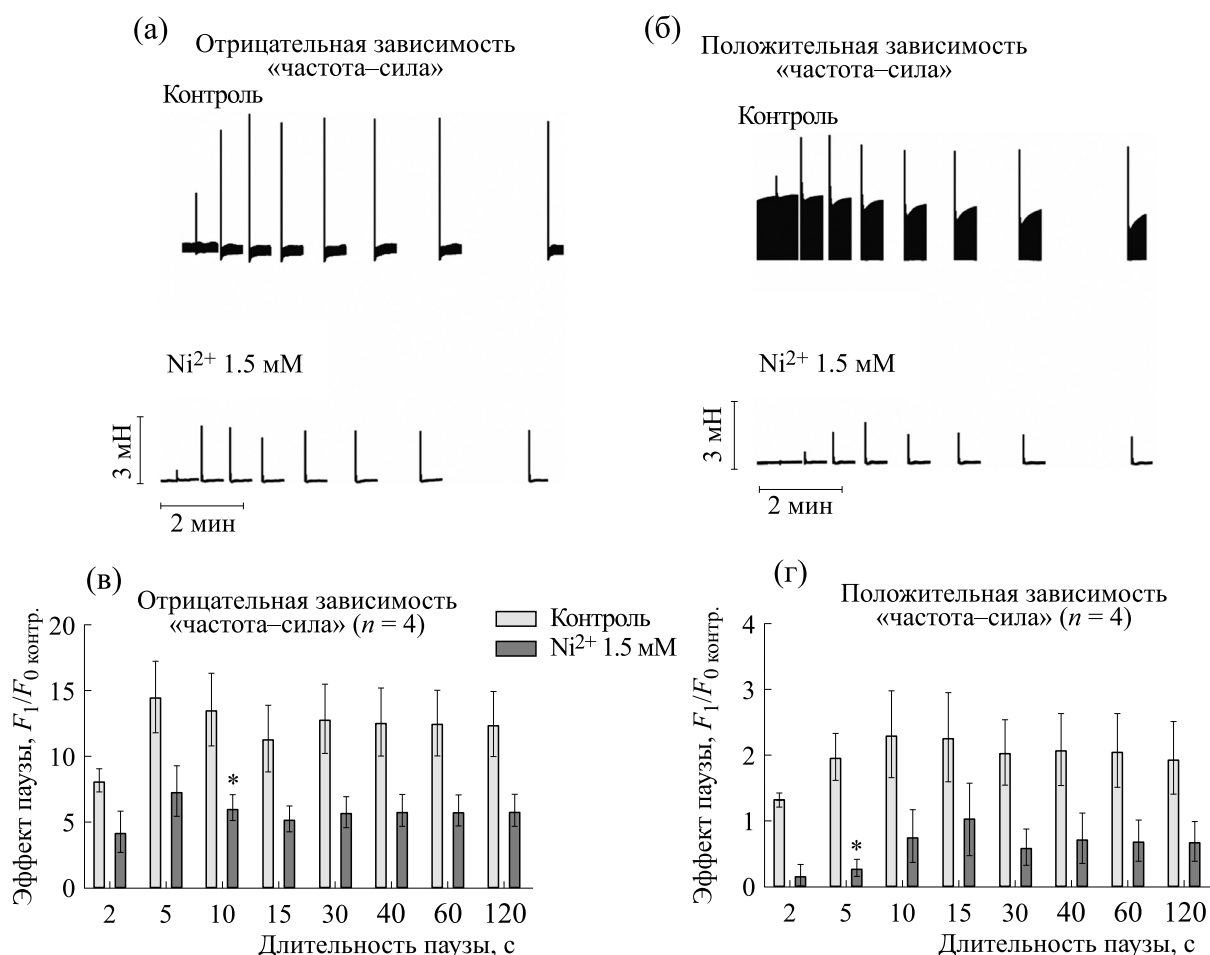


Рис. 3. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы при частоте стимуляции 1.0 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной ($n = 4$) и положительной ($n = 4$) зависимостью «частота-сила». (а, б) – Типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы с отрицательной и положительной зависимостью «частота-сила» соответственно; (в, г) – соответствующие статистические гистограммы. По оси ординат – эффект паузы (сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции в контроле); по оси абсцисс – длительность пауз, с. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле при той же длительности паузы: * – $p < 0.05$).

смотря на то что прямые исследования, объясняющие этот феномен, в миокарде отсутствуют, можно провести определенную аналогию между клетками разных типов. Так, в гепатоцитах Ni²⁺ вызывал рост внутриклеточного Ca²⁺ [34], в гладких мышцах – рост сократимости через участие активных форм кислорода [35]. Показано также, что создание условий, затрудняющих прямую работу натрий-кальциевого обменника (который блокируется Ni²⁺ в концентрациях в несколько миллимолей) ведет к росту сократимости [36–38], однако в целом этот вопрос еще требует дополнительных исследований.

Потенциация паузой. В контроле при частоте стимуляции 0.3 Гц эффект потенциации паузой в миокарде с отрицательной зависимостью «частота-сила» достигал максимума при длительности

паузы 10 с и составлял $260 \pm 11\%$, снижаясь до $230 \pm 36\%$ при 15 с и незначительно увеличиваясь при дальнейшем увеличении длительности паузы. В присутствии 1.5 мМ Ni²⁺ характер эффекта паузы не претерпевал значительных изменений, при этом величина его уменьшалась в среднем на 45–55% (достоверно для пауз 30 и 60 с) (рис. 2а,в). Для миокарда животных с положительной зависимостью «частота-сила» наблюдался иной характер эффекта паузы. Он постепенно нарастал с $137 \pm 13\%$ при 5 с, достигая максимума в $208 \pm 29\%$ при 30 с и значительно не изменяясь к 60 с (рис. 2б,г). Также как и в другой группе, характер эффекта паузы не претерпевал изменений, однако величина его снижалась более значительно: на 98% при паузе 5 с и на 90% при паузе 60 с достоверно при всех длительностях пауз.

При частоте стимуляции 1.0 Гц наблюдалась схожая картина. В группе животных с негативной зависимостью «частота–сила» после воздействия Ni^{2+} эффекта паузы составлял 45–55% от контрольного уровня, при этом статистически значимыми были отличия только для паузы в 10 с (рис. 3а,в). В группе животных с положительной зависимостью снижение эффекта паузы было более заметным – от 85 до 65%. Достоверными отличия были только для паузы в 5 с (рис. 3б,г).

Эффект паузы был при этом более выраженным, чем в контроле в обеих группах при частоте стимуляции как 0.3, так и 1.0 Гц. Сходная картина описана для миокарда телят, где блокирование входа внеклеточного Ca^{2+} с помощью ионов Ni^{2+} и Co^{2+} приводило к более яркому проявлению эффекта паузы [39], а также для миокарда сусликов с препятствованием входу внеклеточного Ca^{2+} блокатором ЛТСС нифедипином [13].

Таким образом, увеличение частоты стимуляции практически не влияет на выраженность подавляющего эффекта Ni^{2+} в группе с негативной зависимостью «частота–сила» что может свидетельствовать о том, что СР уже заполнен Ca^{2+} даже при частоте стимуляции 0.3 Гц и ее увеличение не приводит к каким-либо изменениям. В группе с трансформирующей зависимостью увеличение частоты стимуляции ведет к снижению подавления эффекта паузы под воздействием Ni^{2+} , то есть в СР данной группы животных с увеличением частоты стимуляции увеличивается содержание Ca^{2+} . Этот факт хорошо согласуется с данными литературы о том, что увеличение частоты стимуляции может способствовать увеличению содержания Ca^{2+} в СР и, следовательно, меньшей зависимости эффекта паузы от входа внеклеточного Ca^{2+} [40, 41].

ВЫВОДЫ

Впервые было показано, что в условиях выраженной гипотермии (20°C) миокард сусликов, сохраняющий отрицательную зависимость «частота–сила» существенно менее зависим от поступления внеклеточного Ca^{2+} , так как СР уже содержит значительное количество аккумулярованных ионов Ca^{2+} , которое индифферентно к повышению частоты стимуляции. Миокард активных сусликов, для которого характерен переход к положительной зависимости «частота–сила» при охлаждении, напротив, в значительной степени зависит от входа внеклеточного Ca^{2+} и загрузку Ca^{2+} в СР можно существенно увеличить.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Госзадания «Механизмы природного и искусственного гипобиоза» (НИОКТР: 122041100276-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. S. Maier, C. Schwan, W. Schillinger, et al., *Cardiovasc. Res.*, **45**, 913 (2000).
2. M. A. Mashali, N. S. Saad, B. D. Canan, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **156**, 7 (2021).
3. B. Pieske, L. S. Maier, V. Piacentino, et al., *Circulation*, **106**, 447 (2002).
4. W. F. Bluhm, E. G. Kranias, W. H. Dillmann, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, 249 (2000).
5. J.-H. Chung, B. D. Canan, B. A. Whitson, et al., *Physiol. Rep.*, **6**, e13898 (2018).
6. A. Krishna, M. Valderrábano, P. T. Palade, et al., *Theor. Biol. Med. Model.*, **10**, 54 (2013).
7. W. Schillinger, S. E. Lehnart, J. Prestle, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **93** (Suppl 1), 38 (1998).
8. B. D. Stuyvers, A. D. McCulloch, J. Guo, et al., *J. Physiol.*, **544**, 817 (2002).
9. M. Endoh, *Eur. J. Pharmacol.*, **500**, 73 (2004).
10. Z. Kassiri, R. Myers, R. Kaprielian, et al., *J. Physiol.*, **524** (Pt 1), 221 (2000).
11. N. Kondo and S. Shibata, *Science*, **225**, 641 (1984).
12. K. Li and J. L. Rouleau, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**, 1251 (1995).
13. O. V. Nakipova, N. M. Zakharova, L. A. Andreeva, et al., *Cryobiology*, **55**, 173 (2007).
14. O. V. Nakipova, A. S. Averin, L. S. Kosarsky, et al., *Biophysics*, **64** (5), 786 (2019).
15. A. Lukas, R. Bose, A. Lukas, et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **334**, 480 (1986).
16. S. E. Ahlberg, R. C. Hamlen, D. L. Ewert, et al., *Cardiovasc. Eng.*, **7**, 32 (2007).
17. D. S. Kondratieva, S. A. Afanasiev, V. Yu. Usov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 612 (2017).
18. N. Kondo, *Circ. Res.*, **59**, 221 (1986).
19. Y. Kokoz, A. S. Grichenko, A. F. Korystova, et al., *Membr. Cell. Biol.*, **14**, 277 (2000).

20. N. M. Zakharova, O. V. Nakipova, A. S. Averin, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **424**, 21 (2009).
21. H. M. Piper, J. F. Hütter, and P. G. Spieckermann, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 277 (1984).
22. O. V. Nakipova, A. S. Averin, E. V. Evdokimovskii, et al., *PLoS One*, **12**, e0177469 (2017).
23. E. Perez-Reyes, *Physiol. Rev.*, **83**, 117 (2003).
24. I. A. Hobai, J. C. Hancox, and A. J. Levi, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H692 (2000).
25. D. J. Beuckelmann and W. G. Wier, *J. Physiol.*, **414**, 499 (1989).
26. A. J. Levi, K. W. Spitzer, O. Kohmoto, et al., *Am. J. Physiol.*, **266**, H1422 (1994).
27. A. S. Averin, N. M. Zakharova, and S. V. Tarlachkov, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **57** (4), 761 (2021).
28. A. Redel, W. Baumgartner, K. Golenhofen, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **445**, 297 (2002).
29. J. Huang, L. Hove-Madsen, and G. F. Tibbits, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C516 (2008).
30. S. E. Litwin, J. Li, and J. H. Bridge, *Biophys. J.*, **75**, 359 (1998).
31. U. Mackiewicz, K. Emanuel, and B. Lewartowski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **51**, 777 (2000).
32. S. Subramani, S. Balakrishnan, T. Jyoti, et al., *Acta Physiol. Scand.*, **185**, 193 (2005).
33. I. V. Shemarova, S. V. Kuznetsov, I. N. Demina, et al., *J. Evol. Biochem. Phys.*, **45** (3), 319 (2009).
34. K. Sayuri Utsunomiya, L. Jonatas da Silva, J. Iwamoto, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **26**, 641 (2021).
35. S. Ahmad Wani, L. Ahmad Khan, and S. Farhat Basir, *J. Smooth Muscle Res.*, **54**, 71 (2018).
36. H. Lüllmann, U. Ravens, and P. Stöckel, *Pharmacol. Toxicol.*, **68**, 39 (1991).
37. K. Mubagwa, W. Lin, K. Sipido, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 977 (1997).
38. K. Tsuchida, H. Hirose, S. Ozawa, et al., *Pharmacology*, **106**, 91 (2021).
39. O. Bass, *Circ. Res.*, **39**, 396 (1976).
40. A. S. Averin, N. M. Zakharova, and D. A. Ignatiev, *Biophysics*, **66** (6), 1011 (2021).
41. B. M. Wolska and B. Lewartowski, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **25**, 75 (1993).

Effects of Nickel Chloride on Myocardial Contractile Parameters in Active Ground Squirrels with Different Responses to Hypothermia

A.S. Averin*, N.M. Zakharova*, and D.A. Ignatiev*

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

The effect of 1.5 mM nickel chloride on contraction force, the force-frequency relation, and the effect of rested state contraction in the myocardium of active ground squirrels *Urociellus undulates* with different responses to hypothermia were studied. It was shown that at 20°C, in the group of ground squirrels retaining the negative direction of the force-frequency relation in cooling, contraction force was 52 ± 15% and 4 ± 3% of contraction force in the control using a 0.1 Hz and 1 Hz stimulation frequencies, respectively. In the myocardium, when the muscle contraction pattern changed from biphasic contraction to positive in cooling, a reduction of contractility was much more pronounced rest effect leading to almost complete suppression of contractions, contraction force was 6 ± 3% and 1 ± 0.5% at 0.1 Hz and 1.0 Hz, respectively. During stimulation frequency of 0.3 Hz in the presence of 1.5 mM Ni²⁺, when the force-frequency relation in the myocardium was negative, the magnitude of the effect of rested state contraction decreased by 45–55% on the average, but when the force-frequency relation was positive, this effect was reduced by 90–98%. At a stimulation frequency of 1.0 Hz, there was a 45–55% and 65–85% reduction, respectively. Thus, it was shown that the myocardium of ground squirrels retaining negative force-frequency relation was significantly less dependent on extracellular Ca²⁺ input as compared with the myocardium of active ground squirrels, which was characterized by the transition to a positive force-frequency relationship in cooling.

Keywords: myocardium, hypothermia, force-frequency relation, rest potentiation, Ni²⁺

УДК 577.3

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2 НА МОДЕЛИ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА

© 2022 г. А.В. Шиповалов*, А.Ф. Ванин**, #, О.В. Пьянков*, Е.Г. Багрянская***, В.Д. Микоян**, Н.А. Ткачев**, Н.А. Асанбаева***, В.Я. Попкова**

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора РФ, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Россия

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

***Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, просп. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия

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

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 04.07.2022 г.

Принята к публикации 08.07.2022 г.

В экспериментах на модели сирийского хомячка продемонстрировано противовирусное действие в отношении вируса SARS-CoV-2 биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и диэтилдитиокарбамата натрия при последовательной аэрозольной обработке зараженных животных растворами этих соединений. Методом электронного парамагнитного резонанса в аналогичных экспериментах на здоровых хомячках установлена преимущественная локализация комплексов железа и диэтилдитиокарбамата натрия в ткани легких. У мышей при таких же измерениях эти агенты равно эффективно локализовались как в легких, так и в печени. Предполагается, что при контакте биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом и диэтилдитиокарбамата натрия в организме животных происходит высвобождение из комплексов железа катионов нитрозония, вызывающих S-нитрозирование протеаз клетки-хозяина и вируса, что приводит к подавлению инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, диэтилдитиокарбамат натрия, катионы нитрозония.

DOI: 10.31857/S0006302922050167, EDN: JJZIZA

Для вирусных инфекций характерно резкое повышение в клетках организма-хозяина уровня одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO) [1–15]. Поскольку внутриклеточное увеличение концентрации NO сопровождается S-нитрозированием разнообразных вирусных белков – протеаз, белков оболочки, обратных транскриптаз, факторов

транскрипции, а также протеаз клетки-хозяина [2–16], есть основание предполагать, что именно этот процесс обеспечивает снижение вирусной продукции, являясь эффективным средством защиты организма животных и человека от вирусной инфекции.

Учитывая тот факт, что S-нитрозирование различных внутриклеточных компонентов не осуществляется непосредственно молекулами NO, а обеспечивается одноэлектронно-окисленной формой этих молекул – катионами нитрозония (NO^+), связывающимися вместо протонов с тиоловыми группами тиолсодержащих белков и низкомолекулярных соединений, необходимо понимание механизма превращения NO в NO^+ в клетках животных и человека.

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, М-ДНКЖ – моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ – биядерная форма динитрозильных комплексов железа, МНКЖ – мононитрозильные комплексы железа, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат, GSH – восстановленный глутатион, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, в/б – внутрибрюшинно.

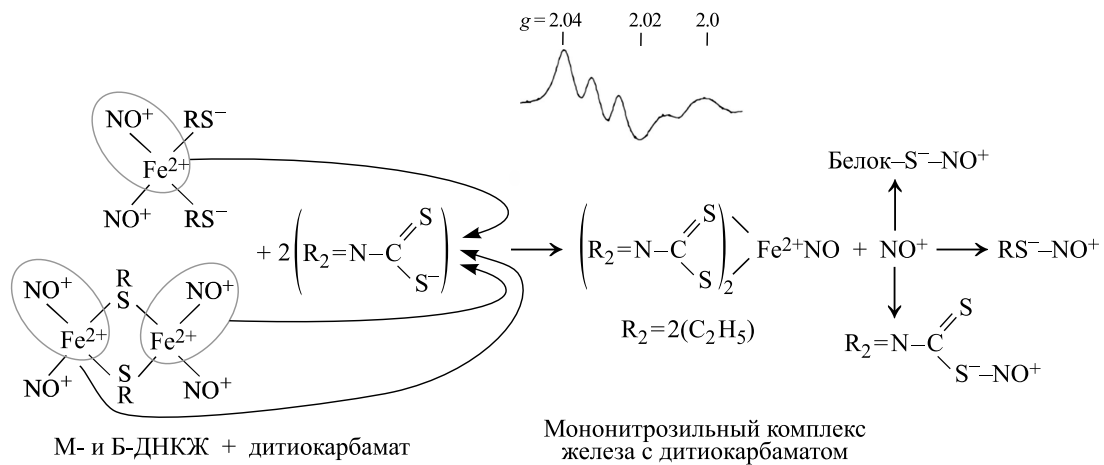


Схема 2. Механизм превращения М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с производными дитиокарбамата. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе дитиокарбамата. Наверху приводится зарегистрированный при 77 К сигнал ЭПР со значениями g-фактора 2.04 и 2.02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом [29, 30].

В настоящей работе мы изучили противовирусную активность катионов нитрозония в отношении вируса SARS-CoV-2 на сирийском хомячке (животная модель COVID-19), используя Б-ДНКЖ с глутатионом + производное дитиокарбамата (диэтилдитиокарбамат – ДЭТК) как систему, способную путем аэрозольного введения этих соединений поставлять катионы нитрозония в организм этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения. В экспериментах использовали сульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), N-ацетил-L-цистеин, диэтилдитиокарбамат натрия и нитрит натрия (Sigma, США).

Вирусы. В работе использовали штамм SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020, полученный из Государственной коллекции микроорганизмов ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская область). Инфекционный вирус выделяли в культуре клеток *Vero E6*, аликвоты вируса были заморожены и хранились при температуре $-80^{\circ}C$. Титр стока составлял не менее 10^6 ЦПД₅₀/мл. Для исследований использовали вирус пассажа 4. Титр вирусной суспензии определяли методом конечных разведения на клетках *Vero E6* по методу Рида и Менча [31]. Работы, связанные с живым вирусом, проводили в условиях максимальной изолированной лаборатории, соответствующей международным требованиям BSL3+, в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, имеющего разрешение на проведение таких исследований.

Культуры клеток. В работе использовали линию клеток *Vero E6*, полученную из коллекции культур клеток ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Выращивание монослоя клеток *Vero E6* осуществляли в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США). В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса использовали ту же среду, но с 2% эмбриональной сыворотки.

Животные. В эксперименте использовали самцов и самок аутбредных сирийских хомячков массой тела 80–100 г. Животные были получены из Питомника лабораторных животных ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Хомячкам подкожно имплантировали транспондеры (чипы) IPTT-300 (BMDS, США) для бесконтактного измерения температуры и идентификации и помещали по два в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 суток до заражения. Во время экспериментов в клетках поддерживали температуру $22-24^{\circ}C$ и относительная влажность 40–55%. Хомячков взвешивали, измеряли температуру и оценивали на клинические признаки болезни ежедневно.

Для определения оптимальных концентраций вводимых аэрозольно соединений использовали самцов аутбредной линии мышей CD1 массой тела 18–20 г. Животные были получены из вивария Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Модель инфекции SARS-CoV-2 в сирийских хомячках. Модель заражения хомячков вирусом SARS-CoV-2 была описана ранее [32].

В работе использовали шесть групп животных (две опытных и одна контрольная), по восемь хомячков (четыре самца и четыре самки) в каждой.

Перед заражением хомячков анестезировали внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция). Заражение анестезированных животных производили интраназально инокуляцией вируса пипеткой в объеме 50 мкл, в дозе 50 ИД₅₀. Через 120 ч после заражения всех животные подвергали эвтаназии методом трансервикальной дислокации. Проводили вскрытие, забор тканей носовых ходов и легких. Полученные с помощью механического гомогенизатора (FastPrep-24, MP Biomedical, США) 10%-е гомогенаты тканей осветляли центрифугированием при 10000 об/мин (ротор SW28, Beckman Coulter, США). Аликвоты осветленных образцов использовали для определения количества РНК вируса в образцах методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени через суррогатный показатель Ct (число циклов) и для определения концентрации в ЦПД₅₀/мл инфекционного вируса методом титрования на культуре клеток *Vero E6*.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для выделения РНК использовали набор «РИБО-преп» («Амплиценс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили реагентами для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Набор реагентов «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область) использовали для амплификации фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2. Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией производителя.

Определение инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах на перевиваемой культуре клеток *Vero E6*. Клетки *Vero E6* высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1.5 \cdot 10^4$ клетки/луночка. В день эксперимента были сделаны последовательные десятикратные разведения вируса в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбрио-

нальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США), в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали 4%-м раствором забуференного формалина с последующим окрашиванием 0.1% кристаллическим фиолетовым. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как ЦПД. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида–Менча [31] и выражали в lg ЦПД₅₀/мл (lg TCID₅₀/мл).

Введение соединений. Аэрозольное введение соединений проводили в вертикальной динамической камере в течение 30 мин. Рабочий расход воздуха через камеру составлял 10 л/мин. Во внутренний объем камеры одновременно помещали восемь хомячков. Диспергирование проводили распылителем «Омрон» с расходом воздуха 6 л/мин. В распылитель заливали 10 мл 10 мМ водного раствора препаратов. Отбираемый аэрозоль улавливали с помощью пробоотборника МЦ-2, соединяемого с выходным штуцером камеры. Объемная скорость отбора проб аэрозоля в пробоотборнике составляла 10.0 ± 0.5 л/мин, объем сорбирующей жидкости (дистиллированная вода) — 10 мл.

Аналогичным образом вводили ингаляционным путем те же соединения аутбредным мышам CD 1, не зараженным коронавирусом.

Введение препарата зараженным коронавирусом сирийским хомячкам проводилось в течение четырех суток дважды в сутки, первое введение через 1 ч после заражения. Через 120 ч после заражения животных подвергали эвтаназии (методом трансервикальной дислокации) с последующим вскрытием и забором тканей носовой полости и легких (в асептических условиях) для определения в них количества РНК вируса в гомогенатах тканей методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени через показатель Ct (число циклов) и методом титрования на культуре клеток *Vero 6* (lg TCID₅₀/мл).

Синтез биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом. При синтезе Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) использовали способность S-нитрозотиолов, как это показано на схеме 3, образовывать в реакции с ионами Fe²⁺ и тиолами соответствующие М-ДНКЖ.

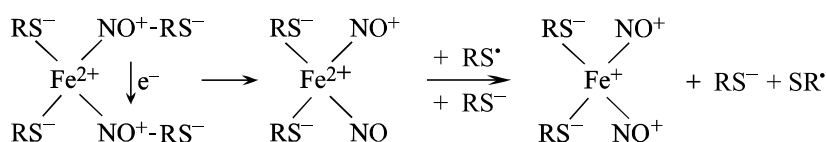


Схема 3. Механизм образования М-ДНКЖ в реакции S-нитрозотиолов, Fe²⁺ и тиолов [33].

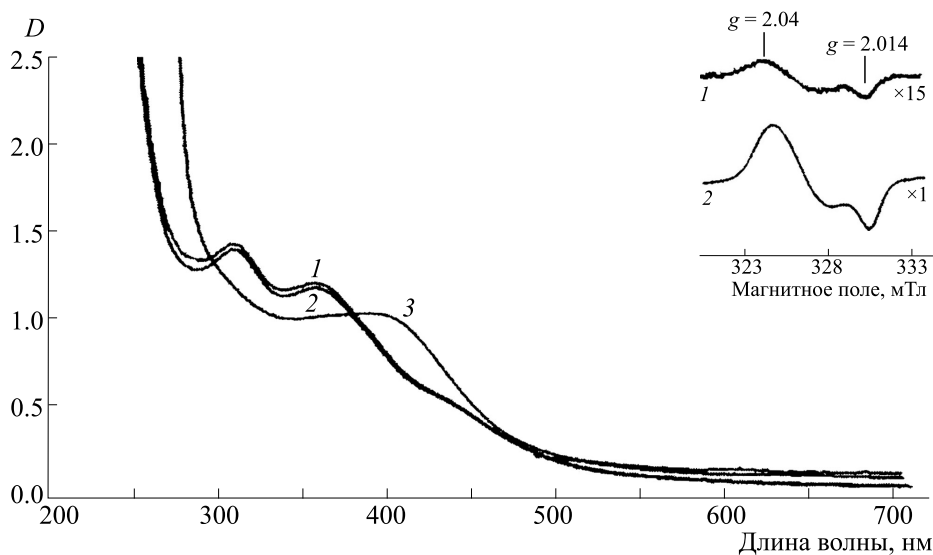


Рис. 1. Спектры оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH и М-ДНКЖ-GSH при концентрации 0.46 мМ (соответственно спектры 1 и 3); на вставке – ЭПР-сигнал М-ДНКЖ-GSH (сигнал 2.03 со значениями тензора g -фактора, равными $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$) [25].

В соответствии со схемой 3 ионы Fe^{2+} связывают по две молекулы S-нитрозотиолов на ион с последующим диспропорционированием этих молекул, что сразу же приводит к образованию М-ДНКЖ, характеризующихся, как уже указывалось выше, сигналом ЭПР с $g_{ср} = 2.03$ (сигналом 2.03). При низкой концентрации тиолов в растворе М-ДНКЖ конденсируются в

соответствии со схемой 4 в Б-ДНКЖ-диамагнитные комплексы, не дающие сигнала 2.03. Их концентрацию можно было оценить по интенсивности двух полос оптического поглощения на 310 и 360 нм (приведены на рис. 1) с коэффициентами экстинкции в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

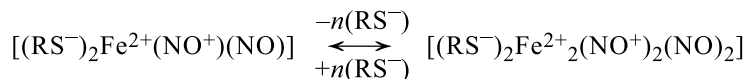


Схема 4. Равновесное взаимопревращение М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Равновесие сдвигается влево при повышении в растворе уровня тиолов (RS^{-}), ионизованных по тиоловой группе [34].

Синтез 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH проводили в соответствии с методом, описанным в работе [35]. Для этого в 15 мМ раствор HEPES-буфера при pH 7.2–7.4 последовательно вводили глутатион, ферросульфат и нитрит натрия в концентрации соответственно 40, 20 и 20 мМ, тщательно перемешивая раствор после каждого введения. Введение глутатиона приводило к подкислению раствора этого буфера до pH 3.6–3.8; для надежного предотвращения образования гидроксидных комплексов железа при последующем добавлении в раствор глутатиона ферросульфата до введения последнего pH раствора понижали добавлением серной кислоты до pH 1–2. Последнее гарантировало также более эффективное образование в растворе S-нитрозоглутатиона после добавления в реакционный раствор нитрита натрия. За этим процессом следили по интенсивно-

сти полосы поглощения на 334 нм, характерной для S-нитрозоглутатиона с $\epsilon = 0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [36]. Обычно образование S-нитрозоглутатиона в концентрации 20 мМ завершалось при комнатной температуре в течение полутора часов. После этого pH раствора, окрашенного из-за наличия в нем S-нитрозоглутатиона в розовый цвет, повышали до pH 7.3–7.5 капельным добавлением крепкого (100 мМ) раствора NaOH – при этом раствор приобретал оранжевую окраску, обусловленную начавшимся в соответствии со схемой 3 образованием М-ДНКЖ-GSH. Раствор оставляли на ночь на воздухе при комнатной температуре. За это время в соответствии со схемами 3 и 4 половина железа (10 мМ) включалась в М-ДНКЖ-GSH, а затем в Б-ДНКЖ-GSH, тогда как другая половина железа включалась в водонерастворимые гид-

Таблица 1. Вирусная нагрузка в тканях носовой полости и тканях легких хомячков, интраназально инфицированных вирусом SARS-CoV-2 с последующим аэрозольным лечением препаратами Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК

Соединение	Вирусная нагрузка SARS-CoV-2			
	в тканях носовой полости		в тканях легких	
	lg TCID ₅₀ /vk	Ст*	lg TCID ₅₀ /ml	Ст*
Б-ДНКЖ-GSH	4.1 ± 0.5	23.83 ± 1.27	4.4 ± 0.8	20.67 ± 2.13
Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК	2.7 ± 0.4	27.28 ± 3.44	2.4 ± 0.4	30.33 ± 1.18
Плацебо	5.0 ± 0.5	19.80 ± 2.19	3.7 ± 0.4	25.96 ± 1.60

Примечание. * – Более низкие пороговые значения числа циклов (Ст) указывают на более высокие вирусные нагрузки.

роокисные комплексы, выпадавшие в осадок. На следующий день этот осадок удаляли фильтрованием раствора на бумажном фильтре.

В результате получали прозрачный раствор Б-ДНКЖ-GSH в концентрации 10 мМ, который замораживали в жидком азоте и хранили в замороженном состоянии при температуре не выше –18°C до использования в экспериментах на животных.

На рис. 1 приводятся спектры поглощения полученного описанным выше методом препарата Б-ДНКЖ-GSH (спектр 1) с полосами поглощения на 310 и 360 нм (раствор разбавлен до концентрации 0.5 мМ). Спектр не изменялся в течение часа при подкислении раствора до pH 1.0 (спектр 2). На вставке приводится сигнал ЭПР 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (сигнал 2.03, спектр 1), обусловленный 5%-й примесью М-ДНКЖ. При добавлении к этому раствору 10 мМ GSH и повышении pH с 7.5 до 10.5 Б-ДНКЖ полностью переходил в М-ДНКЖ. Спектр поглощения последнего с полосой на 400 нм и сигнал 2.03 представлены на рис. 1 соответственно кривой 3 и ЭПР-сигналами на вставке.

Измерение спектров ЭПР изолированных тканей нативных (незараженных) животных. После проведения эксперимента у нативных (незараженных) животных (сирийские хомячки, мыши) проводили эвтаназию методом трансервикальной дислокации для последующего определения локализации ДНКЖ и МНКЖ-ДЭТК в изолированных образцах крови и тканях легких и печени животных методом ЭПР. Забор крови и тканей органов осуществляли в асептических условиях. Образцы (легкие, печень и кровь) помещали в пластмассовые трубки диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте. Для последующего измерения спектров ЭПР в препаратах замороженных тканей трубки с замороженными в них тканями извлекали из жидкого азота и постепенно, нагревая в руках, поршнем выдавливали образцы тка-

ней в жидкий азот, образцы цилиндрической формы помещали в жидком азоте в палец Дьюара соответствующей формы, после чего регистрировали в этих образцах спектры ЭПР при соответствующих параметрах ЭПР-радиоспектрометра (Bruker, Германия) или модифицированного ЭПР-радиоспектрометра («РадиоПан», Польша). В качестве эталонного образца (стандарта) при определении концентрации М-ДНКЖ, возникавших в тканях животных, использовали раствор М-ДНКЖ-GSH, сигнал ЭПР которого (ЭПР-сигнал 2) приводится на рис. 1. Поскольку плотность ткани легкого примерно в два раза меньше плотности воды, после оценки содержания М-ДНКЖ в этом органе в соответствии со стандартом, полученную величину удваивали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка эффективности соединений Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК при аэрозольном введении. Анализ результатов, приведенных в табл. 1, по данным метода ОТ-ПЦР (Ст) показывает, что при проведении лечения животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH достоверно снижается вирусная нагрузка в тканях носовой полости в 16 раз ($p = 0.0006$, по критерию Манна–Уитни) по сравнению с контрольными животными (плацебо). При этом по инфекционному титру (lg TCID₅₀/мл) достоверное снижение вирусной нагрузки ни в тканях носовой полости, ни в тканях легких зафиксировано не было ($p > 0.005$, по критерию Манна–Уитни).

Для системы соединений Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК при их последовательном введении определена достоверная противовирусная активность. По данным метода ОТ-ПЦР (Ст) отмечено снижение уровня накопления РНК в тканях легких в 21 раз ($p = 0.0007$, по критерию Манна–Уитни), в тканях носовой полости – в 16 раз ($p = 0.0025$, Манн–Уитни). Методом титрования в тканях носовой полости определено еще большее снижение вирусной нагрузки – в 200 раз

Таблица 2. Вирусная нагрузка в тканях носовой полости и тканях легких хомячков, интраназально инфицированных вирусом SARS-CoV-2 с последующим аэрозольным лечением препаратами ДЭТК и ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH

Соединение	Вирусная нагрузка SARS-CoV-2			
	в тканях носовой полости		в тканях легких	
	lg TCID ₅₀ /ml	Сt*	lg TCID ₅₀ /ml	Сt*
ДЭТК	5.3 ± 0	11.59 ± 2.04	5.5 ± 0	13.31 ± 1.28
ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH	5.3 ± 0	10.78 ± 0.44	5.2 ± 0.3	14.60 ± 0.86
Плацебо	5.5 ± 0	9.60 ± 2.02	4.3 ± 0.1	15.54 ± 1.84

Примечание. * – Более низкие пороговые значения числа циклов (Сt) указывают на более высокие вирусные нагрузки.

($p = 0.0002$, по критерию Манна–Уитни). При исследовании тканей легких наблюдалось снижение вирусной нагрузки в 20 раз ($p = 0.0002$, по критерию Манна–Уитни).

В соответствии со схемой 2 такая последовательность введения в дыхательные пути хомячков Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК должна приводить к накоплению в тканях дыхательных путей высвобождающихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, что, по-видимому, и обеспечило подавление инфекции SARS-CoV-2.

Результаты, полученные после аэрозольного введения зараженным хомячкам соединений ДЭТК или ДЭТК с последующим аэрозольным введением Б-ДНКЖ-GSH, показали (табл. 2), что при такой комбинации введения соединений достоверное снижение вирусной нагрузки в чувствительных тканях органов-мишеней по двум исследуемым параметрам по сравнению с контрольными животными (плацебо) зафиксировано не было.

ЭПР-измерение тканей сирийских хомячков. На рис. 2 приведены одни из типичных спектров

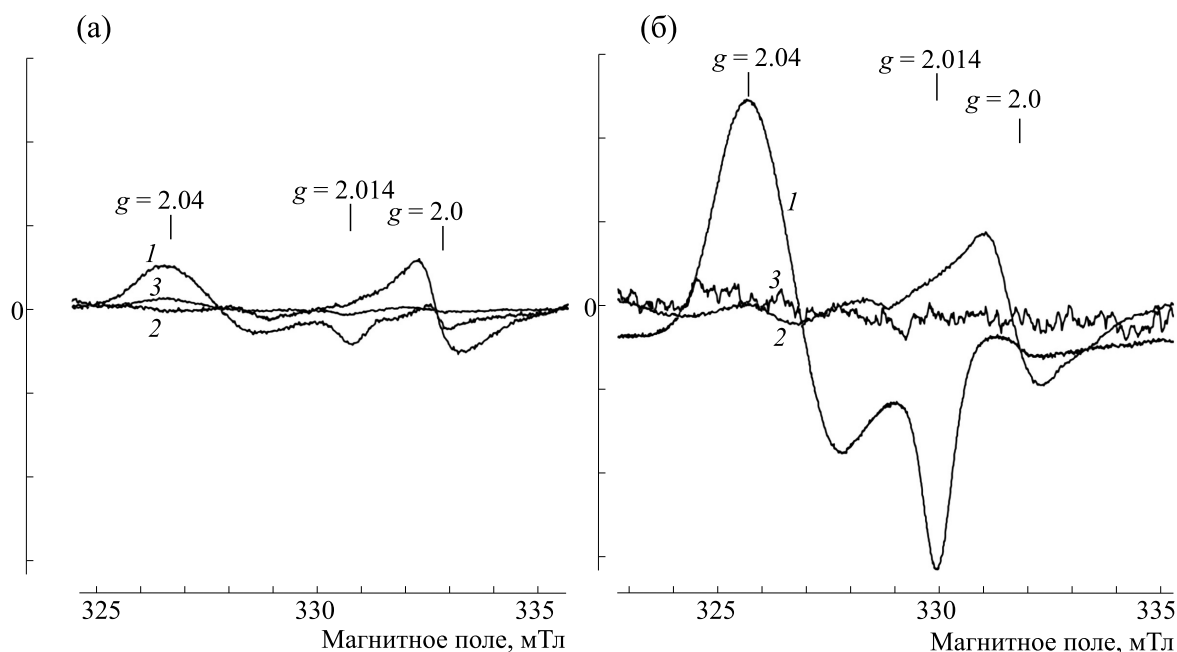


Рис. 2. Спектры ЭПР легких (1), печени (2) и крови (3) хомячков, подвергнутых ингаляции распыленным 10 мМ раствором ДНКЖ (а) и 10 мМ растворами сначала ДНКЖ, а затем ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК) (б). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре Bruker при 77 К, СВЧ-мощности 5 мВт, амплитуде высокочастотной модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

ЭПР, зарегистрированных при 77 К в крови, легких и печени здоровых (незараженных) хомячков после аэрозольного введения в течение 30 мин 10 мл 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а) и спектры ЭПР тех же тканей хомячков при том же способе введения 10 мл 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH с последующим 30-минутным введением 10 мМ раствора ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК, рис. 2б). В обоих случаях наибольший сигнал 2.03 (сигнал ЭПР появляющихся в тканях М-ДНКЖ) наблюдался в легких. При ингаляции животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH концентрация М-ДНКЖ в этом органе варьировала в пределах 30–40 мкмоль/кг влажной ткани. В крови эта величина варьировала в пределах 3–5 мкмоль/л, а в печени сигнал 2.03 практически не обнаруживался. При ингаляции животных сначала растворами Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК (ДНКЖ + ДЭТК), судя по интенсивности сигнала 2.03, уровень М-ДНКЖ в легких достигал 140–160 мкмоль/кг, т. е. в среднем повышался в четыре-пять раз по сравнению с величиной, наблюдавшейся при ингаляции животным только Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а). В печени содержание М-ДНКЖ достигало 3 мкмоль/кг, в крови сигнал 2.03 не обнаруживался (рис. 2б).

На рис. 3 приведены спектры ЭПР, зарегистрированные в крови, легких и печени хомячков после обработки в течение 30 мин распыленным 10 мМ раствором ДЭТК с последующим аэрозольным введением 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH. Судя по интенсивности сигнала 2.03 в этих тканях, наибольшее количество М-ДНКЖ обнаруживалось в легких (30–40 мкмоль/кг), максимальная концентрация в печени достигала 10 мкмоль/кг, а в крови – 0.5 мкмоль/кг.

ЭПР-измерение тканей мышей. Аэрозольное введение мышам 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH объемом 10 мл в течение 40 мин приводило, судя по интенсивности сигнала 2.03, к появлению М-ДНКЖ в легких и печени в концентрации соответственно 0.5–1.2 и 1.5–2.0 мкмоль/кг (рис. 4а), т. е., в отличие от сирийских хомячков, аэрозольно вводимые Б-ДНКЖ-GSH достаточно эффективно переходили из легких в кровь, а оттуда в печень. Тем не менее в крови регистрировался лишь очень слабый сигнал 2.03. При последующем введении этим животным 10 мл распыленного 10 мМ раствора ДЭТК уровень появляющихся в тканях мышей М-ДНКЖ практически не повышался. При увеличении концентрации ДЭТК до 50 мМ существенно, в три-четыре раза, увеличивалась концентрация М-ДНКЖ во всех исследованных тканях животных (рис. 4б). При этом в легких уровень М-ДНКЖ варьировал в пределах 1.5–3.0 мкмоль/кг, в печени – 0.8–1.4 мкмоль/кг, а в крови – 0.3–0.5 мкмоль/л.

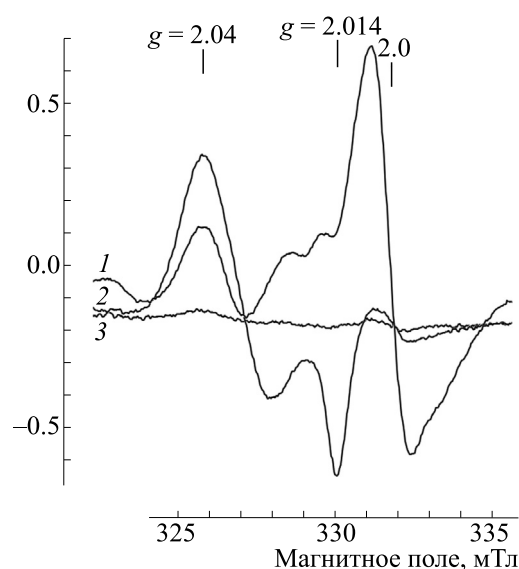


Рис. 3. Спектры ЭПР легких (1), печени (2) и крови хомячков, подвергнутых 30-минутной ингаляции распыленным 10 мМ раствором ДЭТК с последующей 30-минутной ингаляцией распыленным 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH (ДЭТК + ДНКЖ). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре Bruker при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

При обратной последовательности аэрозольного введения мышам – сначала 50 мМ раствора ДЭТК, а затем 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH – соотношение содержания возникающих в тканях мышей М-ДНКЖ не менялось: (рис. 5а) оно оставалось наибольшим в легких (в пределах 6–10 мкмоль/кг), в крови достигало уровня 0.8 мкмоль/кг, в печени – 1.5–3.0 мкмоль/кг (рис. 5). При этом наряду с сигналом 2.03 в печени животных обнаруживался сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК – комплексов, возникавших в результате взаимодействия ДЭТК с ДНКЖ (в соответствии со схемой 2). Сигнал ЭПР этих комплексов характеризовался (в полном соответствии с работой [37]) значениями g -фактора, равными $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.02$, $g_{cp} = 2.033$, и разрешенной триплетной сверхтонкой структурой при g_{\perp} (рис. 5б).

Сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в «чистом виде» обнаруживался в легких после ингаляции животных только 50 мМ раствором ДЭТК (рис. 6а). Концентрация МНКЖ при этом не превышала 0.4 мкмоль/кг. При последующем внутрибрюшинном (в/б) введении этим животным Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг массы животных сигнал МНКЖ-ДЭТК в легких маскировался сигналом 2.03, обусловленным примесью крови (рис. 6а). В крови этих животных концен-

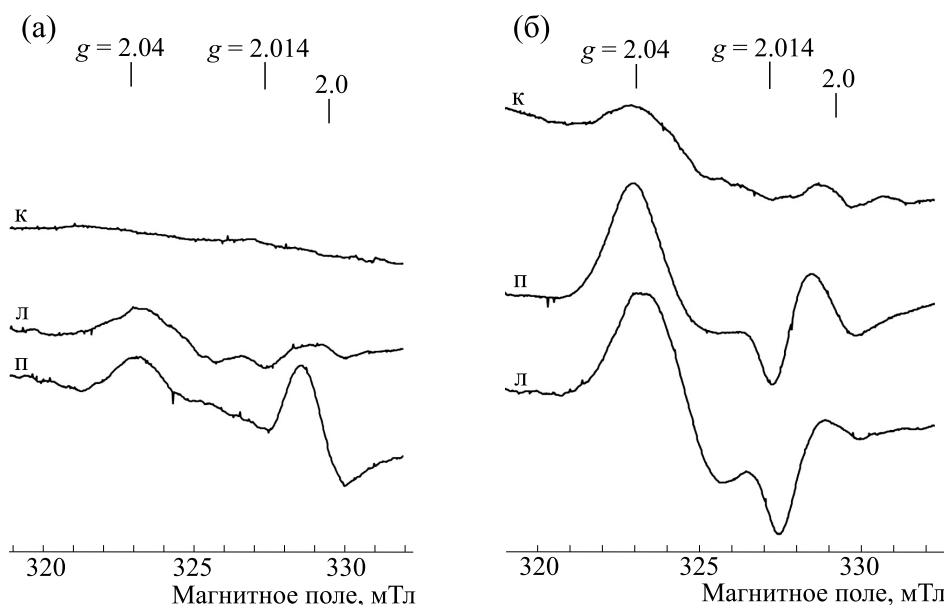


Рис. 4. Сигнал 2.03 в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей, подвергнутых 40-минутной ингаляции 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH (а) с последующей их 40-минутной ингаляцией 50 мМ раствором ДЭТК (б). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре «РадиоПан» при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

трация М-ДНКЖ достигала 30 мкмоль/л (рис. 6а). Как и в легких, в печени сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в «чистом виде» обнаруживался после ингаляции животных только 50 мМ раствором ДЭТК, при этом концентрация этих комплексов достигала 3.0 мкмоль/кг (рис. 6а). Как и

в легких, сигнал МНКЖ-ДЭТК в печени маскировался сигналом 2.03 после в/б введения мышам Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг (рис. 6а).

Заметный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК в легких и печени регистрировался в них после аэрозольного введения мышам 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-

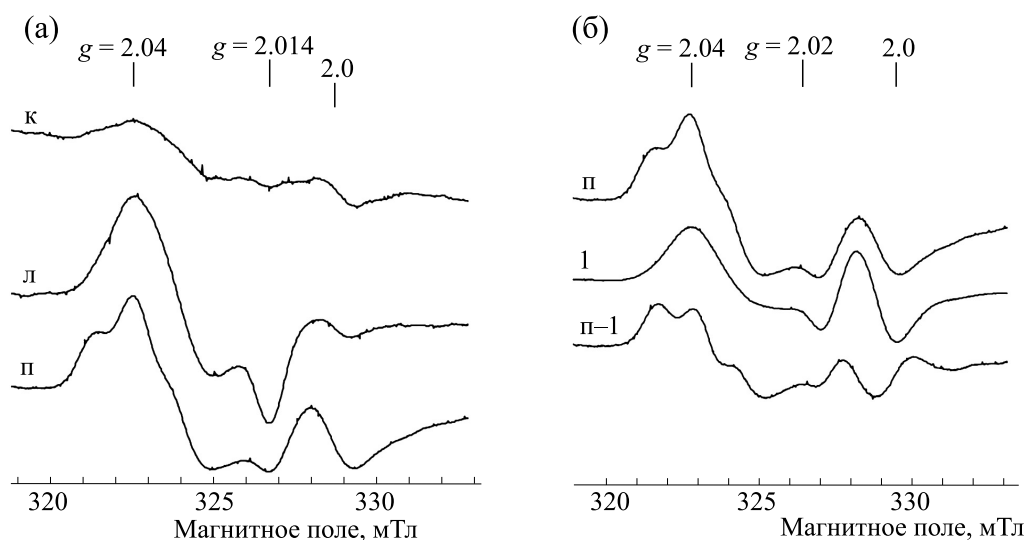


Рис. 5. (а) – Спектры ЭПР, зарегистрированные в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей, подвергнутых 40-минутной ингаляции распыленным 50 мМ раствором ДЭТК с последующей ингаляцией этих животных 10 мМ раствором Б-ДНКЖ-GSH. (б) – Демонстрация спектра ЭПР, зарегистрированного в печени мышей (п), как суммы сигнала 2.03 (1) и сигнала МНКЖ-ДЭТК (п-1). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре «РадиоПан» при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт, амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ и одинаковом усилении радиоспектрометра.

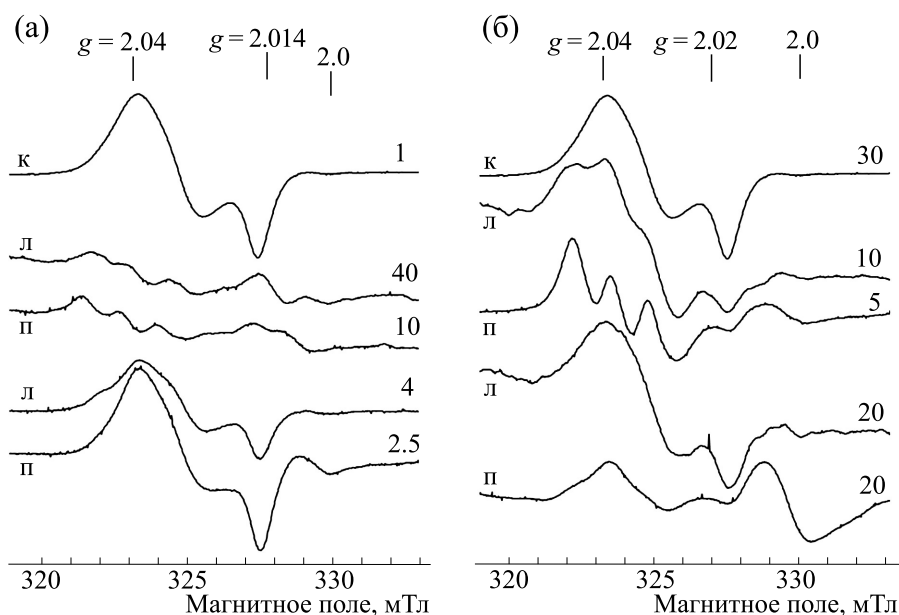


Рис. 6. Спектры ЭПР, зарегистрированные в крови (к), легких (л) и печени (п) мышей. (а) – Животные были подвергнуты в течение 40 мин ингаляции 50 мМ распыленным раствором ДЭТК (спектры 40 и 10) с последующим в/б введением этим животным Б-ДНКЖ-GSH в дозе 100 мкмоль/кг массы животных (спектры 4, 2.5 и 1). (б) – Животные были подвергнуты в течение 40 мин ингаляции 10 мМ распыленным раствором Б-ДНКЖ-GSH (спектры 30, 20 и 10) с последующим введением им ДЭТК в дозе 0.5 мМ/кг массы животных (спектры 10 и 5). Сигнал при $g = 2.0$ обусловлен эндогенными свободными радикалами. Спектры зарегистрированы на радиоспектрометре РадиоПан при 77 К, СВЧ мощности 5 мвт и амплитуде ВЧ модуляции магнитного поля 0.5 мТ. Относительное усиление радиоспектрометра указано цифрами на правой стороне спектров.

GSH с последующим в/б введением им ДЭТК в дозе 500 мкмоль/кг массы животных (рис. 6б). В легких на этот сигнал накладывался сигнал 2.03, так что суммарная концентрация МНКЖ-ДЭТК и М-ДНКЖ в этой ткани составляла 5.0 мкмоль/кг при концентрации М-ДНКЖ, возникавших после начального введения мышам Б-ДНКЖ-GSH, в 1 мкмоль/кг (рис. 6б). В печени концентрация образующихся у животных МНКЖ-ДЭТК достигала 10 мкмоль/кг ткани при концентрации М-ДНКЖ, возникавших после начального аэрозольного введения мышам Б-ДНКЖ-GSH, в 0.6 мкмоль/кг (рис. 6б). В крови образование МНКЖ-ДЭТК в аналогичных опытах не обнаружено: после в/б введения ДЭТК сохранялись М-ДНКЖ в концентрации 0.5 мкмоль/л, появившиеся в крови после ингаляции мышам Б-ДНКЖ-GSH (рис. 6б).

Значительное различие концентрации образующихся МНКЖ-ДЭТК и М-ДНКЖ в печени (как и в легких), очевидно, было обусловлено включением ДНКЖ в эти ткани преимущественно биядерной ЭПР-неактивной формы этих комплексов. Такое же заключение следует из опытов, в которых после аэрозольного введения мышам раствора Б-ДНКЖ-GSH им вводили в/б раствор N-ацетил-L-цистеина при нейтральных значениях рН в дозе 100 мкмоль/кг. Как в легких, так и в

печени животных интенсивность сигнала 2.03 после такой обработки достоверно (в соответствии со схемой 2) повышалась в два раза: включение в эти ткани N-ацетил-L-цистеина обеспечивало превращение части Б-ДНКЖ в М-ДНКЖ. Более слабый в этом отношении эффект N-ацетил-L-цистеина по сравнению с действием ДЭТК на Б-ДНКЖ определялся, по нашему мнению, высоким сродством ДЭТК к железо-мононитрозильной группе, обеспечивающим практически полное превращение Б-ДНКЖ в МНКЖ-ДЭТК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что комбинация соединений Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК обладает выраженной противовирусной активностью в отношении вируса SARS-CoV-2. В соответствии со схемой 2 такая последовательность введения в дыхательные пути животных Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК должна приводить к накоплению в тканях дыхательных путей и легких хомячков высвобождающихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, что и могло, в соответствии с высказанной в работе [16] одним из соавторов настоящей статьи гипотезой, обеспечивать подавление инфекции COVID-19.

Результаты вышеприведенных ЭПР-исследований здоровых хомячков и мышей, подвергавшихся ингаляции распыленными растворами Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК в различной их последовательности, позволяют утверждать, что, действительно, при ингаляционном введении сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК в тканях органов-мишеней вируса SARS-CoV-2 – дыхательных путей и легких может накапливаться заметное количество катионов нитрозония.

Неожиданный результат этих исследований состоит в том, что в легких при такой последовательности введения указанных соединений здоровым хомячкам не удалось (рис. 2) наблюдать образование ЭПР-активных МНКЖ-ДЭТК, как это ожидалось в соответствии со схемой 2. Единственный эффект, который обнаруживался при дополнительной ингаляции хомячкам раствора ДЭТК после ингаляции им раствора Б-ДНКЖ-GSH, состоял в значительном (трех-четырёхкратном) повышении интенсивности сигнала 2.03, регистрируемого в легких (рис. 2а,б). Если учесть, что вводившиеся животным Б-ДНКЖ-GSH-комплексы ЭПР-неактивны, а сигнал 2.03 обусловлен моноядерной формой ДНКЖ, указанное выше его усиление могло быть обусловлено (в соответствии со схемой 4) появлением в ткани легких дополнительного количества тиолов, обеспечивающих превращение ДНКЖ в М-ДНКЖ. Это означает, что при включении в эти ткани ДЭТК последний, как тиолсодержащий агент, мог повышать внутриклеточный восстановительный потенциал, обеспечивая тем самым восстановление дисульфидов до тиолов. Другой, по-видимому, более реальный механизм повышения уровня восстановительных агентов (или снижения внутриклеточного окислительного потенциала) мог состоять в следующем. ДЭТК, реагируя с ДНКЖ, действительно мог обеспечивать в соответствии со схемой 2 образование МНКЖ-ДЭТК – комплекса, который, в соответствии с результатами работы [38], мог активно связывать анионы супероксида, нейтрализуя их прооксидантное действие. Если учесть, что легкие находятся непосредственно в контакте с кислородом воздуха, следует ожидать наличие в тканях легких значительного количества супероксид-анионов, которого могло оказаться достаточным для распада МНКЖ-ДЭТК при связывании этих комплексов с анионами супероксида. Такой распад мог быть обусловлен, например, изомеризацией в нитрат пероксинитрита, образующегося при связывании супероксида с молекулой NO в лигандной сфере железа в МНКЖ-ДЭТК [38], что должно было приводить к распаду этих комплексов. Кроме того, связанный с МНКЖ-ДЭТК пероксинитрит мог при каталитическом действии железа окислять ДЭТК до его димерной дисульфидной формы (дисульфорама) что также должно было при-

водить к распаду этих комплексов. Такого рода распад МНКЖ-ДЭТК мог приводить к распаду всех этих комплексов, что и могло быть причиной того, что в наших опытах нам не удалось зафиксировать превращение Б-ДНКЖ-GSH при аэрозольном введении сирийским хомячкам раствора Б-ДНКЖ, а затем раствора ДЭТК. При этом катионы нитрозония должны были (в соответствии со схемой 2) высвободиться из Б-ДНКЖ и показывать противовирусное действие, регистрируемое по вирусной нагрузке в тканях органов-мишеней сирийских хомячков.

В результате действия аэрозольно вводимого раствора ДЭТК в легких и печени мышей обнаруживалось образование МНКЖ-ДЭТК (рис. 6а), причем в печени их концентрация была на порядок выше, чем в легких. Появление этих комплексов скорее всего было обусловлено генерацией в легких и печени эндогенного NO, образующего вместе со слабосвязанным внутриклеточным («свободным») железом и ДЭТК соответствующие МНКЖ. Поскольку в легких, контактирующих с атмосферным кислородом, очевидно должно было продуцироваться значительное количество анионов супероксида, их действие, как указывалось выше, должно было приводить, во-первых, к распаду значительной части (существенно большей, чем в печени) МНКЖ-ДЭТК и, во-вторых, могло приводить к исчезновению в легких поступающего в них ДЭТК. В результате при последующей, после ДЭТК, аэрозольной обработке животных раствором Б-ДНКЖ реакция этих комплексов с ДЭТК становилась невозможной, комплексы МНКЖ-ДЭТК не возникали и не могли обеспечить снижение уровня анионов супероксида и тем самым повышение внутриклеточного восстановительного потенциала. Это и могло приводить к тому, что не обнаруживалось, судя по сигналу 2.03, повышение количества ЭПР-активных М-ДНКЖ, как это имело место в опытах при обработке хомячков сначала распыленным раствором Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК (рис. 2 и 3). Концентрация М-ДНКЖ, возникающих в легких в опытах с ингаляцией хомячков растворами сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-GSH (рис. 3), была такой же, как в опытах с ингаляцией этих животных только раствором Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а).

В отличие от сирийских хомячков, у которых М-ДНКЖ, определяемые в организме животных после аэрозольного введения Б-ДНКЖ-GSH, локализовались преимущественно в легких, у мышей при тех же условиях эксперимента М-ДНКЖ накапливались и в легких, и практически в той же концентрации в печени. Этот феномен, очевидно, был обусловлен ослаблением у мышей гемато-тканевого барьера, т.е. более легким проникновением различных веществ (как Б-ДНКЖ, так и ДЭТК) из клеток в кровь и обратно. Это и при-

водило к тому, что при ингаляции мышей сначала раствором ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-GSH оба этих вещества, поступаая в печень, могли образовывать ЭПР-регистрируемые в этой ткани МНКЖ-ДЭТК (рис. 5). В более значительном количестве эти комплексы появлялись в печени, если Б-ДНКЖ-GSH после аэрозольного введения ДЭТК вводили мышам внутривентриально (рис. 66). Характерно, что и при таком способе введения соединений уровень образующихся в печени МНКЖ-ДЭТК был выше, чем в легких.

В заключение следует отметить, что в проведенной нами ранее работе [39] при оценке методом ЭПР локализации М-ДНКЖ в органах крыс при аэрозольном введении Б-ДНКЖ-GSH наблюдалась, как и у сирийских хомячков, преимущественная локализация М-ДНКЖ в тканях легких. Можно предполагать, что у человека (при возможном использовании схемы Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК для лечения COVID-19) появляющиеся при распаде ДНКЖ катионы нитрозония будут преимущественно локализоваться в тканях легких и дыхательных путей, оказывая местное противовирусное действие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. О. Быкова, Н. В. Горбунов, А. П. Волгарёв и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **112**, 617 (1991).
2. G. Karupian and N. Harris, J. Exp. Med., **181**, 2171 (1995).
3. C. J. Lowenstein, S. L. Hill, A. Lafond-Walker, et al., Clin. Invest., **92**, 1837 (1996).
4. E. Peterhans, Biol Trace Element Res., **56**, 107 (1997).
5. C. S. Reiss and T. Kamatsu, J. Virol., **72**, 4547 (1998).
6. T. Akaike and H. Maeda, Immunology, **101**, 300 (2000).
7. S. Åkerstrom, M. Mousavi-Jazi, J. Klingstrom, et al., J. Virol., **78**, 1966 (2005).

8. J. Martel, Y.-F. Ko, J. D. Young, et al., Microbes and Infection, **22**, 168 (2020).
9. J. Wu, Nitric Oxide Biol. Chem., **102**, 39 (2020).
10. F. Sodano, E. Gazzano, R. Fruttero, et al., Molecules, **27**, 2337 (2022).
11. E. Keaerts, L. Vijgen, L. Chen, et al., Int. J. Infect. Dis., **8**, 223 (2004).
12. W. Xu, S. Zheng, R. A. Dweik, et al., Free Radic. Biol. Med., **41**, 19 (2006).
13. G. Regev-Shoshani, S. Vimalnathan, B. McMullin, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **31**, 48 (2015).
14. E. U. Uehara, B. de Stefano Shida, and C. A. de Brito, Inflamm. Res., **64**, 845 (2015).
15. M. Colosanti, T. Persichini, G. Venturino, et al., IUBMB Life, **48**, 25 (1999).
16. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 818 (2020).
17. J. S. Stamler, Cell, **78**, 931 (1994).
18. K. M. Miranda, M. G. Espey, and D. A. Wink, J. Inorg. Biochem., **79**, 237 (2000).
19. T. A. Heinrich, R. S. da Silva, K. M. Miranda, et al., Br. J. Pharmacol., **169**, 1417 (2013).
20. M. Boese, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, et al., J. Biol. Chem., **270**, 2924 (1995).
21. C. A. Bosworth, J. C. Toledo, J. W. Zmiewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 4671 (2009).
22. M. F. Foster, L. Liu, M. Zhang, et al., Biochemistry, **48**, 792 (2009).
23. A. F. Vanin, Austin J. Analyt. Pharmaceut. Chem., **5**, 1109 (2018).
24. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
25. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 421 (2020).
26. A. F. Vanin, Appl. Magn. Res., **51**, 851 (2020).
27. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing Cambridge, UK, 2019).
28. N. Lehnert, E. Kim, H. N. Dong, et al., Chem Rev., **121**, 14682 (2021).
29. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **29**, 4 (2013).
30. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
31. L. J. Reed and H. A. Muench, Am. J. Hyg., **27**, 493 (1938).
32. J. F. W. Chan, A. J. Zhang, S. Yuan, et al., Clin. Infect. Dis., **71**, 2428 (2020).
33. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, Nitric Oxide Biol. Chem., **1**, 191 (1997).
34. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **23**, 136 (2011).
35. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **35**, 110 (2013).
36. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* (Elsevier, Amsterdam, 2004).
37. A. F. Vanin, Methods Enzymol., **301**, 269 (1999).
38. A. F. Vanin, X. Liu, A. Samouilov, et al., Biochim. Biophys. Acta, **1474**, 365 (2000).
39. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика, **66**, 1 (2021).

Antiviral Activity of Nitrosonium Cations against SARS-CoV-2 on a Syrian Hamster Model

A.V. Shipovalov*, A.F. Vanin**, O.V. Pyankov*, E.G. Bagryanskaya***, V.D. Mikoyan**,
N.A. Tkachev**, N.A. Asanbaeva***, and V.Ya. Popkova**

*State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor of the Russian Federation,
Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

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

***N.N. Vorozhtsov Institute for Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

The antiviral action of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione and diethyldithiocarbamate against SARS-CoV-2 virus was demonstrated in a Syrian hamster model after subsequent aerosol exposure of SARS-CoV-2-infected animals to the solutions of said compounds. EPR assays on intact hamsters exposed by the aerosol route to the same dose of these solutions showed that iron complexes and diethyldithiocarbamate are predominantly found in lung tissues. These results have been compared with similar measurements made on intact mice: the levels of the said reagents which were present in the lungs and liver were really in the same range. It is suggested that the release of nitrosonium cations from binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione occurs during the interaction of iron complexes towards diethyldithiocarbamate in the animal body. These cations caused S-nitrosation of host and viral cell proteases leading to suppression of SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, binuclear iron dinitrosyl complexes with glutathione, sodium diethyldithiocarbamate, nitrosonium cations

УДК 577.3

РОЛЬ КАТИОНА НИТРОЗОНИЯ В МЕХАНИЗМЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА ПРЕПАРАТОВ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2022 г. А.Ф. Ванин*, Л.А. Островская**, Д.Б. Корман**, Н.В. Блюхтерова**, В.А. Рыкова**, М.М. Фомина**

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия
E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 05.08.2022 г.

С целью изучения механизма противоопухолевого действия динитрозильных комплексов железа, генерирующих как монооксид азота (NO), так и катионы нитрозония (NO⁺), проведено исследование влияния диэтилдитиокарбамата, «ловушки» молекул NO, на противоопухолевую активность биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом или N-ацетилцистеином. Установлено, что эффективность этих комплексов *in vivo* в отношении солидных опухолей мышей сохраняется на свойственном им уровне или даже повышается при совместном применении с диэтилдитиокарбаматом. Предполагается, что эффект ингибирования роста опухоли под влиянием биядерных динитрозильных комплексов железа обусловлен высвобождением из этих комплексов катионов нитрозония, а не молекул оксида азота.

Ключевые слова: монооксид азота, катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, биядерные динитрозильные комплексы железа с N-ацетилцистеином, диэтилдитиокарбамат натрия, противоопухолевая активность *in vivo*, солидные опухоли мышей.

DOI: 10.31857/S0006302922050179, EDN: JKBAWP

Исследованиями последних лет установлено, что нарушение физиологических процессов, регулируемых монооксидом азота NO, может рассматриваться в качестве фактора, вызывающего развитие ряда патологических состояний, в том числе опухолевых заболеваний [1–3].

Показано, что монооксид азота в зависимости от относительного уровня NO может либо стимулировать опухолевый рост, либо вызвать гибель клеток, в связи с чем этот радикал часто характеризуют как «обоюдоострый меч». Уровни NO ниже или выше оптимальных для развития опухоли значений могут активировать трансдукцию сигналов, ведущих к ингибированию опухолевого

роста и гибели клеток. Высокие концентрации NO способны также модулировать противоопухолевую иммунную защиту [1].

Ранее нами было обнаружено, что генерирующие оксид азота моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа с различными тиолсодержащими лигандами обладают способностью ингибировать развитие ряда солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и аденокарцинома Са-755). Показан также определенный цитотоксический эффект некоторых динитрозильных комплексов железа в отношении клеток опухоли человека (культура MCF7) [4–11].

На основании анализа собственных экспериментальных и многочисленных литературных данных А.Ф. Ваниным был предложен механизм биологической активности динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), согласно которому эти комплексы способны выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония NO⁺. При этом предполагается, что,

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, Б-ДНКЖ-Г – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, МНКЖ-ДЭТК – мононитрозильные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом, Б-ДНКЖ-АЦЦ – биядерные динитрозильные комплексы железа с N-ацетилцистеином, в/в – внутривенно, в/б – внутривнутрибрюшинно, п/к – подкожно.

противоопухолевое и цитотоксическое действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может определяться их способностью высвобождать при распаде как нейтральные молекулы NO, так и катионы нитрозония (NO^+) [2].

С целью выяснения вопроса о том, какой из указанных компонентов ДНКЖ – молекулы оксида азота NO или катионы нитрозония NO^+ – может оказывать решающее противоопухолевое действие были проведены целенаправленные эксперименты с использованием диэтилдитиокарбамата натрия (ДЭТК), являющегося «ловушкой» для молекул NO, в качестве инструмента исследования [12–14].

Было установлено, что ДЭТК при контакте с биядерным динитрозильным комплексом железа, содержащим глутатион (Б-ДНКЖ-Г), перехватывает на себя из железо-динитрозильной группы комплекса железо-мононитрозильный фрагмент с образованием устойчивых ЭПР-регистрируемых мононитрозильных комплексов железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), которые практически не высвобождают нейтральные молекулы NO [13, 14].

При этом второй нитрозильный лиганд в железо-динитрозильной группе высвобождается в форме катиона нитрозония NO^+ , связывающегося с тиолами различного происхождения с образованием соответствующих S-нитрозотиолов, что и может определять сохранение противоопухолевого и цитотоксического действия Б-ДНКЖ в присутствии ДЭТК [2, 12].

Именно таким путем было показано, что цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-Г или Б-ДНКЖ с меркаптсукцинатом на опухолевые клетки MCF7 [13], а также цитотоксическое действие Б-ДНКЖ-Г на бактерии *Escherichia coli* [14] определяется способностью этих комплексов выступать в качестве доноров катиона нитрозония NO^+ .

Использование вышеописанного подхода позволило также предположить, что и в условиях *in vivo* катионы нитрозония NO^+ играют определяющую роль в реализации противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г [12].

В продолжение исследования механизма противоопухолевого действия динитрозильных комплексов железа в данной работе проведено изучение влияния различных режимов применения ДЭТК на противоопухолевую активность биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего разные лиганды – глутатион (Б-ДНКЖ-Г) и N-ацетил-цистеин (Б-ДНКЖ-АЦЦ), а также дана оценка противоопухолевого эффекта самого ДЭТК на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали сульфат железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, N-ацетилцистеин и нитрит натрия (Sigma, США).

Газообразный NO получали в реакции сульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М растворе HCl с последующим разделением NO и примесного диоксида азота (NO_2) методом низкотемпературной сублимации жидкой смеси этих газов в вакуумированной системе [15].

Диэтилтиокарбамат натрия ДЭТК. Применяли конвенционный препарат диэтилдитиокарбамата натрия ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N-CS}_2$, Sigma, США).

Биядерная форма ДНКЖ с глутатионом. Синтез Б-ДНКЖ-Г проводили согласно описанному ранее «простейшему» методу синтеза ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [16]. В соответствии с этим методом синтез 5 мМ раствора ДНКЖ с глутатионом осуществляли следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на воздухе добавляли 62 мг глутатиона (20 мМ), вызвавшего подкисление раствора до pH 4.0, с последующим введением в него 28 мг (10 мМ) сульфата железа, приводившего к дальнейшему снижению pH до 3.8. После этого в раствор добавляли 6.9 мг (10 мМ) нитрита натрия, что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерного для S-нитрозоглутатиона, реакция заканчивалась через полтора часа с образованием 10 мМ этого соединения. После этого pH раствора повышали до 7.2, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся процессом образования Б-ДНКЖ-Г в растворе при участии S-нитрозоглутатиона, Fe^{2+} и глутатиона [16]. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в Б-ДНКЖ-Г требовалось несколько часов. Полученный раствор после удаления образовавшегося за это время осадка гидроокиси трехвалентного железа путем фильтрования через фильтровальную бумагу замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Оценку полученного количества Б-ДНКЖ-Г (молекулярная масса 846 Да) проводили оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм, характеризующихся коэффициентами экстинкции, равными, соответственно, 4600 и 3700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ [15]. Согласно этой оценке концентрация Б-ДНКЖ-Г в растворе составляла 5 мМ.

Биядерная форма ДНКЖ с N-ацетилцистеином. Синтез Б-ДНКЖ-АЦЦ проводили путем обработки газообразным NO (при давлении 150 мм рт. ст.) 1 мл раствора сульфата железа в дистиллированной

воде и ацетилцистеина в 15 мМ НЕРЕС-буфера (рН 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим смешиванием этих растворов в присутствии NO, как было описано ранее [15]. Концентрация сульфата железа в этой смеси составляла 5 мМ. После пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего двухвалентного железа в ДНКЖ-АЦЦ, NO удаляли из аппарата откачкой, раствор полученного Б-ДНКЖ-АЦЦ замораживали и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию препарата Б-ДНКЖ-АЦЦ оценивали по интенсивности полосы его оптического поглощения на 360 нм.

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 80 инбредных мышах линии BDF₁ – гибридах первого поколения f₁(C₅₇Bl/6 × DBA₂) – и линии Balb/c, самках с массой тела 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России».

В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли мышей – карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол и аденокарцинома Са-755, перевиваемые подкожно в соответствии со стандартной методикой [17].

Препарат Б-ДНКЖ-Г вводили животным в водном растворе в суточной дозе 2 мкМ/кг внутривенно (в/в), внутрибрюшинно (в/б) или подкожно (п/к) на протяжении пяти-восьми суток после перевивки опухоли.

Препарат Б-ДНКЖ-АЦЦ вводили животным в виде водного раствора в суточной дозе 2 и 10 мкМ/кг п/к на протяжении девяти суток после перевивки опухоли.

В зависимости от условий эксперимента водные растворы ДЭТК вводили в суточных дозах 10 или 50 мг/кг в/б при комбинированном применении через 1 ч или 15 мин после введения Б-ДНКЖ-Г или Б-ДНКЖ-АЦЦ, либо в моно-ре-

жиме на протяжении пяти-десяти суток после перевивки опухоли.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена при сопоставлении кинетики роста опухолей в группах контрольных и леченых животных. Показателем ростиингибирующего эффекта препарата служил коэффициент торможения роста опухоли TPO (%), который определяли из соотношения: $TPO = (P_C - P_T)/P_C$ (%), где P_C и P_T – объем (или масса) опухоли в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a – длина, b – ширина и высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли использовали величину плотности опухолевой ткани, равную 1 г/см³ [17].

Каждая группа животных, получавших терапевтическое воздействие, состояла из шестидесяти мышей при восьми-десяти животных в контроле. Наблюдение за животными продолжали в течение всего периода развития опухоли, вплоть до гибели животных.

Статистическая обработка данных проведена путем оценки размеров опухолей (массы опухолей) у контрольных и леченых животных с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлены результаты, характеризующие противоопухолевую активность ДЭТК при индивидуальном применении, а также данные, полученные при совместном применении ДЭТК и динитрозильных производных железа, содержащих различные лиганды – Б-ДНКЖ-Г и

Таблица 1. Противоопухолевая активность ДЭТК при различных режимах введения на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза (мг/кг/сутки) и режим введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли мышей, г		ТРО, %
			леченые	контрольные	
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1, 4, 7, 10, 13 сутки	26	0.72 ± 0.2	3.00 ± 0.3	76
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1–5 сутки	21	0.78 ± 0.1	2.07 ± 0.2	62
Карцинома легких Льюис	50 мг/кг, в/б, восьмикратно, 1–4 и 7-10 сутки	28	3.1 ± 0.2	8.00 ± 0.3	61
Аденокарцинома Акатол	50 мг/кг, в/б, пятикратно, 1–5 сутки	23	3.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	24
Аденокарцинома Са-755	10 мг/кг, в/б, девятикратно, 1–9 сутки	21	7.51 ± 0.6	9.43 ± 0.6	20

Б-ДНКЖ-АЦЦ, на моделях солидных опухолей мышей.

Противоопухолевая активность диэтилдитиокарбамата. Изучение противоопухолевого действия ДЭТК, примененного в моно-режиме, проведено в отношении трех солидных опухолей мышей – карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Са-755 при различных схемах применения препарата.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, ДЭТК проявляет противоопухолевую активность в отношении карциномы легких Льюис, вызывая ингибирование роста опухоли на 61–76% по сравнению с контролем. Очевидно, что эффективность ДЭТК при в/б введении в суточной дозе 50 мг/кг зависит от режима его применения. Наибольшее торможение роста опухоли (76%) отмечено при введении препарата интермиттирующим курсом пятикратно на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки. Применение ДЭТК пятикратно ежедневно с первых по пятые сутки, либо восьмикратно на первые-четвертые и седьмые-десятые сутки оказалось менее эффективным и приводило к торможению роста опухоли соответственно на 62 и 61% по сравнению с контролем (табл. 1).

Аденокарциномы Акатол и Са-755 малочувствительны к действию ДЭТК. Торможение роста этих опухолей под влиянием ДЭТК составляет 24 и 20% при в/б применении соответственно в дозах 50 мг/кг пятикратно и 10 мг/кг девятикратно (табл. 1).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлена способность ДЭТК к ингибированию опухолевого роста (карцинома легких Льюис) в условиях *in vivo*.

Противоопухолевая активность совместного применения Б-ДНКЖ-Г и диэтилдитиокарбамата на модели карциномы легких Льюис. Влияние ДЭТК на противоопухолевую активность Б-ДНКЖ-Г изучено для различных режимов их сочетанного

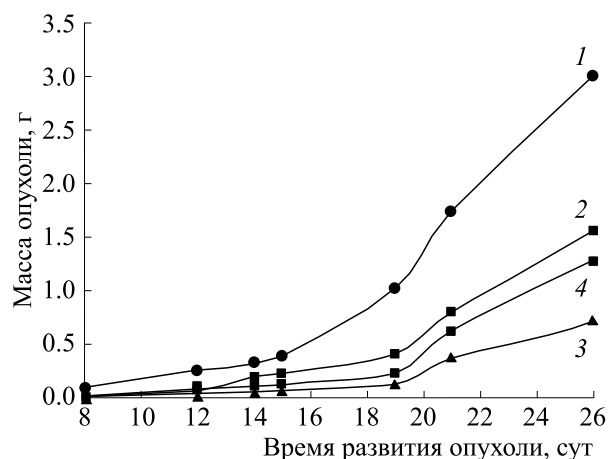


Рис. 1. Влияние сочетанного пятикратного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с часовым интервалом на кинетику развития карциномы легких Льюис: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/в; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг (250 мкМ/кг), в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/в + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли

применения при сохранении постоянных суточных доз препаратов – 50 и 2 мкМ/кг соответственно. Исследовано влияние интервала между применением препаратов (1 ч либо 15 мин), а также пути введения Б-ДНКЖ-Г (в/в, в/б, п/к) на эффект воздействия ДЭТК, всегда вводимого в/б после инъекции животным динитрозильного комплекса железа.

Введение Б-ДНКЖ-Г (в/в) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом, пятикратно. Эффективность сочетанного и индивидуального применения препаратов при в/в пятикратном (на первые, четвертые, седьмые, десятые и тринадцатые сутки после перевивки опухоли) введении Б-ДНКЖ-Г характеризуют данные, представленные на рис. 1 и в табл. 2.

Таблица 2. Влияние сочетанного пятикратного применения Б-ДНКЖ-Г (в/в) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 1 ч на развитие карциномы легких Льюис

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/кг в/в	26	1.55 ± 0.1	48
ДЭТК	50 мг/кг в/б	26	0.72 ± 0.2	76
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/кг в/в + 50 мг/кг в/б	26	1.28 ± 0.3	57
Контроль	—	26	3.00 ± 0.3	—

Примечание. Препараты вводили на 1, 4, 7, 10, 13 сутки.

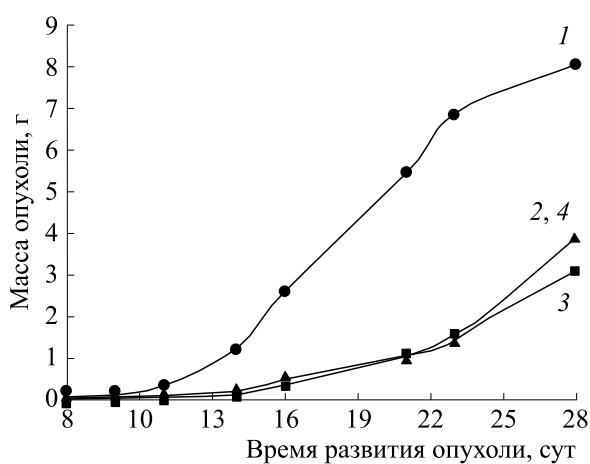


Рис. 2. Влияние совместного восьмикратного применения препаратов Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с часовым интервалом на кинетику развития карциномы легких Льюиса: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/б; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг, в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, в/б + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли.

Как видно, Б-ДНКЖ-Г при в/в введении в суточной дозе 2 мкМ/кг вызывал 48%-е торможение роста опухоли, а ДЭТК, введенный в/б пятикратно в суточной дозе 50 мг/кг ингибировал рост опухоли на 76% по сравнению с контролем. Эффект совместного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК (через час после введения Б-ДНКЖ-Г) соответствовал почти 57%-му ингибированию опухолевого роста по сравнению с контролем (рис. 1, табл. 2).

Таким образом, сочетанное применение ДЭТК и Б-ДНКЖ-Г (в/в) с часовым интервалом приводило лишь к незначительному повышению

противоопухолевого эффекта Б-ДНКЖ-Г (с 50 до 60%). При этом введение одного ДЭТК оказалось наиболее эффективным (76%) по сравнению с влиянием других воздействий. Во всех этих случаях подавление роста опухоли наблюдалось в течение недели после окончания введения животным указанных агентов (тринадцатые сутки после перевивки опухоли), после чего начинался постепенный рост опухоли.

Введение Б-ДНКЖ-Г (в/б) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом, восьмикратно. Эффективность сочетанного и индивидуального применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК при в/б восьмикратном (с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли) введении препаратов характеризуют данные, представленные на рис. 2 и в табл. 3.

Как видно из представленных данных, Б-ДНКЖ-Г как при индивидуальном в/б восьмикратном применении, так и при введении по той же схеме в комбинации с ДЭТК вызывает торможение развития опухоли на 52%. ДЭТК при применении в моно-режиме ингибирует рост опухоли на 62% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 3).

Таким образом, и в данной серии экспериментов при в/б введении Б-ДНКЖ-Г, также как и при в/в применении препарата, показано, что дополнительное введение ДЭТК не оказывает влияния на исходную противоопухолевую активность динитрозильного комплекса железа с глутатионом (табл. 2 и 3).

Введение Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин, пятикратно. Результаты изучения противоопухолевой эффективности сочетанного и индивидуального пятикратного применения препаратов при п/к введении Б-ДНКЖ-Г и в/б введении ДЭТК с интервалом в 15 мин ха-

Таблица 3. Влияние сочетанного в/б восьмикратного применения Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК с интервалом в 1 час на развитие карциномы легких Льюиса

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/ кг, в/б	28	3.8 ± 0.2	52
ДЭТК	50 мг/кг, в/б	28	3.1 ± 0.2	61
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/ кг, в/б + 50 мг/кг, в/б	28	3.8 ± 0.3	52
Контроль	—	28	8.00 ± 0.3	—

Примечание. Препараты вводили с первых по четвертые и с седьмых по десятые сутки после перевивки опухоли.

рактируют данные, представленные на рис. 3 и в табл. 4.

Б-ДНКЖ-Г при введении п/к оказывает, как и следовало ожидать, менее выраженное противоопухолевое действие, чем при введении в/в и в/б – торможение роста опухоли составляет соответственно 34, 48 и 52% по сравнению с контролем (табл. 2–4, рис. 1–3).

Применение ДЭТК через 15 мин после Б-ДНКЖ-Г приводит к повышению ингибирующей рост опухоли способности динитрозильного комплекса при п/к введении с 34 до 51% (рис. 3, табл. 4).

Очевидно, что в экспериментах как с введением в/в и в/б, так и с п/к введением Б-ДНКЖ-Г совместно с ДЭТК, являющимся «ловушкой» для молекул NO, обнаруживается сохранение и даже некоторое повышение (при в/в и п/к применении Б-ДНКЖ-Г) исходной противоопухолевой активности Б-ДНКЖ-Г. При этом наиболее заметное влияние ДЭТК на активность Б-ДНКЖ-Г показано при введении препаратов с интервалом в 15 мин (по сравнению с часовым перерывом между введениями).

Этот факт можно рассматривать как свидетельство того, что эффект ингибирования роста опухоли под влиянием Б-ДНКЖ-Г обусловлен, вероятно, главным образом образованием в физиологических условиях катионов нитрозония (NO^+), а не присутствием молекул оксида азота (NO).

Косвенным подтверждением высказанного предположения могут служить данные, полученные в экспериментах на аденокарциноме Акатол по изучению влияния ДЭТК на противоопухолевую активность препарата полиакрилата золота

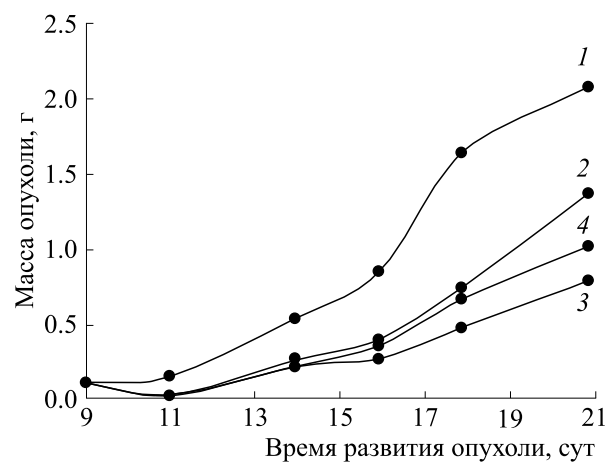


Рис. 3. Влияние совместного пятикратного применения препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин на кинетику развития карциномы легких Льюиса: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, п/к; 3 – ДЭТК, 50 мг/кг, в/б; 4 – Б-ДНКЖ-Г, 2 мкМ/кг, п/к + ДЭТК, 50 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по пятые сутки после перевивки опухоли.

(аурумакрил), механизм действия которого не связан с генерацией монооксида азота и нитрозония. Было показано, что сочетанное применение этих препаратов в половинных дозах приводило к существенному снижению эффективности аурумакрила, примененного в полноценной терапевтической дозе в моно-режиме (неопубликованные данные).

Противоопухолевая активность совместного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ и дизилдитиокарбамата на модели аденокарциномы Ca-755. С целью

Таблица 4. Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 15 мин на развитие карциномы легких Льюиса

Препарат	Суточная доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	2 мкМ/кг, п/к	21	1.36 ± 0.2	34
ДЭТК	50 мг/кг, в/б	21	0.78 ± 0.1	62
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	2 мкМ/кг, п/к + 50 мг/кг в/б	21	1.01 ± 0.1	51
Контроль	–	21	2.07 ± 0.2	–

Примечание. Препараты вводили с первых по пятые сутки после перевивки опухоли.

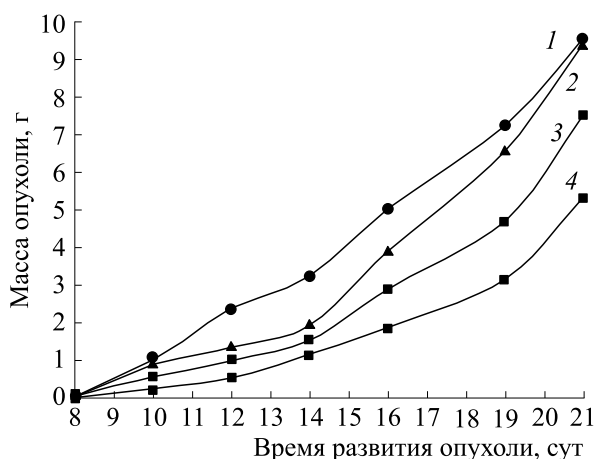


Рис. 4. Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ (п/к) и ДЭТК (в/б) с часовым интервалом на кинетику развития аденокарциномы Са-755: 1 – контроль; 2 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 2 мкМ/кг, п/к; 3 – ДЭТК, 10 мг/кг (50 мкМ/кг), в/б; 4 – Б-ДНКЖ-АЦЦ, 2 мкМ/кг, п/к + ДЭТК, 10 мг/кг, в/б. Введение препаратов с первых по девятые сутки после перевивки опухоли

изучения влияния природы лиганда на чувствительность динитрозильного комплекса железа к действию ДЭТК проведено изучение противоопухолевой эффективности сочетанного применения этого препарата и биядерного динитрозильного комплекса железа, содержащего N-ацетилцистеин, на модели аденокарциномы Са-755.

Ранее нами было установлено, что Б-ДНКЖ-АЦЦ, примененный в/в либо в/б десятикратно в дозе 10 мкМ/кг, вызывает торможение роста аде-

нокарциномы Акатол на 60% по сравнению с контролем [11].

Отметим, что в серии опытов, представленных в настоящей статье, использован другой режим введения Б-ДНКЖ-АЦЦ, отличающийся от применявшегося в цитируемой работе [11]. Так, препарат вводился в дозе 2 мкМ/кг, п/к, а не в использовавшейся ранее дозе 10 мкМ/кг, вводившейся в/в или в/б.

ДЭТК вводился в дозе 10 мг/кг, в/б, также уменьшенной в пять раз по сравнению с применявшейся ранее дозой 50 мг/кг.

Полученные результаты представлены на рис. 4 и в табл. 5.

Представленные данные свидетельствуют о том, что, как и следовало ожидать, снижение в пять раз доз применяемых препаратов приводит к практически полному исчезновению их наблюдавшегося ранее противоопухолевого эффекта. Так, Б-ДНКЖ-АЦЦ, как уже отмечалось ранее, при применении в дозе 10 мкМ/кг, в/в либо в/б десятикратно, вызывал торможение роста опухоли на 60% по сравнению с контролем, а при введении п/к в дозе 2 мкМ/кг не оказывал противоопухолевого действия. Эффект ДЭТК, вызывавшего при применении в/б в дозе 50 мг/кг торможение роста опухоли (карцинома Льюис) на 61–76% по сравнению с контролем, снижается до 20% при в/б введении препарата в дозе 10 мг/кг.

Вместе с тем следует отметить, что при совместном применении этих препаратов в заведомо неэффективных малых дозах наблюдается досто-

Таблица 5. Влияние сочетанного применения Б-ДНКЖ-АЦЦ (п/к) и ДЭТК (в/б) с интервалом в 1 ч на развитие аденокарциномы Са-755

Препарат	Доза и путь введения	Время оценки эффекта, сутки	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-АЦЦ	2 мкМ/кг, п/к	21	9.43 ± 0.8	0
ДЭТК	10 мг/кг, в/б	21	7.51 ± 0.6	20
Б-ДНКЖ-АЦЦ + ДЭТК	2 мкМ/кг, п/к + 10 мг/кг, в/б	21	5.34 ± 0.4	43
Контроль	—	21	9.43 ± 0.6	—

Примечание. Препараты вводили с первых по девятые сутки после перевивки опухоли.

верное торможение аденокарциномы Са-755 на 43% по сравнению с контролем (рис. 4, табл. 5).

Исходя из полученных данных можно предположить, что наблюдающийся эффект ингибирования роста опухоли при совместном применении даже весьма низких доз препаратов Б-ДНКЖ-АЦЦ и ДЭТК обусловлен присутствием катионов нитрозония (NO^+) на фоне «дезактивации» под влиянием ДЭТК молекул NO , генерируемых Б-ДНКЖ-АЦЦ.

В заключение следует отметить, что проведенное исследование влияния ДЭТК на противоопухолевую активность биядерных динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды – Б-ДНКЖ-Г и Б-ДНКЖ-АЦЦ, показало, что эффективность этих препаратов сохраняется на свойственном им уровне или даже повышается при совместном применении с ДЭТК. При этом очевидно, что эффект взаимодействия ДЭТК с ДНКЖ существенным образом зависит от природы лиганда, содержащегося в динитрозильном комплексе, режима применения препарата и вида опухоли.

Можно полагать, что полученные в представленной работе данные подтверждают высказанное ранее предположение о том, что наблюдающийся эффект весьма вероятно обусловлен способностью ДЭТК разрушать в опухолях ДНКЖ с высвобождением из них катионов нитрозония (NO^+), что и приводит к сохранению или даже некоторому усилению противоопухолевого действия препаратов при их совместном применении.

Есть основание предполагать, что изменение порядка введения животным Б-ДНКЖ и ДЭТК на обратный, т. е. вместо Б-ДНКЖ + ДЭТК вводить ДЭТК + Б-ДНКЖ, может существенно повысить противоопухолевую активность этих препаратов. Это предположение следует из результатов опытов, изложенных в цитированной ранее работе [2], касающихся образования МНКЖ-ДЭТК из ДНКЖ в тканях животных *in vivo* в зависимости от порядка введения животных ДНКЖ и ДЭТК. Из этих результатов следует, что эффективность высвобождения NO^+ из ДНКЖ в организме животных должна повышаться при введении ДНКЖ после ДЭТК. Это предположение планируется проверить в ближайшее время.

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. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и А. Ф. Ванин, Биофизика, **66**, 259 (2021). DOI: 10.31857/S000630292102006X
2. А. Ф. Ванин, Биохимия (2022), *в печати*.
3. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
4. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **59**, 508 (2014).
5. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **60**, 152 (2015).
6. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **60**, 1157 (2015).
7. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, *Austin J. Reprod. Medicine & Infertility*, **2**, 1109 (2015).
8. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **62**, 591 (2017).
9. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **64**, №6, 1216 (2019).
10. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **65** (5), 1009 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920050191
11. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **66** (6), 1223 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060193
12. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., Биофизика, **66** (6), 1217 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060181
13. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.*, **79** (1), 93 (2021).
14. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др., Биофизика, **67**, 942 (2022).
15. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136 (2010).
16. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. O. Shvydkiy, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **35**, 110 (2013).
17. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.

Role of the Nitrosonium Cation in Mechanism Underlying Antitumor Effects of Drugs in Combination with Dinitrosyl Iron Complexes

A.F Vanin*, L.A. Ostrovskaya**, D.B. Korman**, N.V. Bluhterova**,
V.A. Rykova**, and M.M. Fomina**

*Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The aim of this study was to explore the mechanism of antitumor action of dinitrosyl iron complexes, which generate both nitrogen monoxide (NO) and nitrosonium cations (NO⁺). For this reason, the effect of diethyldithiocarbamate, used in spin trapping of NO radicals, on the antitumor activity of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione or N-acetyl cysteine, was studied. It was found that the effectiveness of these drugs in vivo against solid tumors of mice was kept as expected or even increased when these drugs were used in combination with diethyldithiocarbamate. It is assumed that the tumor growth inhibitory effect of dinitrosyl iron complexes is probably due mainly to the presence of nitrosonium cations, but not nitric oxide molecules released from these complexes.

Keywords: nitrogen monoxide, nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, binuclear dinitrosyl iron complexes with N-acetyl cysteine, diethyldithiocarbamate, antitumor activity in vivo, solid tumors of mice

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОННОГО И ПРОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА ОПУХОЛЕВЫЙ ОТВЕТ СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И РЕАКЦИИ КОЖИ У МЫШЕЙ В РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

© 2022 г. О.М. Розанова*, #, Е.Н. Смирнова*, Т.А. Белякова**, ##, Н.С. Стрельникова**, А.Е. Шемяков*, **, А.В. Смирнов**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

**Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева,
Академический пр., 2/110, Протвино, Московская область, 142281, Россия

##E-mail: belyakovata@lebedev.ru

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

Изучено влияние последовательности действия протонного излучения в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного в дозе 5 Гр при сочетанном облучении солидной формы асцитной карциномы Эрлиха на опухолевый ответ и лучевые реакции кожи у мышей-опухоленосителей в ранние и отдаленные сроки. Обнаружено, что облучение мышей нейтронами как до, так и после облучения протонами эффективно подавляло рост солидной асцитной карциномы Эрлиха в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых у мышей через 15–40 суток после терапии, облучение нейтронами после облучения протонами приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с действием только пучка протонов, однако облучение нейтронами до протонов оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. Показано также, что частота рецидивирования опухолей в группах животных при комбинированном облучении значительно выше, а общая продолжительность жизни ниже по сравнению с группой мышей, облученных только протонным излучением.

Ключевые слова: нейтроны, протоны, асцитная карцинома Эрлиха, лучевые реакции кожи, рецидивы, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302922050180, EDN: JKСJQG

В последнее десятилетие во всем мире интенсивно развиваются центры лучевой терапии, оснащенные установками для протонной терапии опухолей, которая является перспективным методом лечения многих видов онкологических заболеваний. Протонная терапия особенно подходит в тех случаях, когда альтернативные методы терапии не обеспечивают адекватного терапевтического эффекта, а традиционная лучевая терапия представляет высокий риск для пациента. На сегодняшний день более 250 тыс. пациентов получили протонную терапию, которая с успехом применяется для лечения как наиболее распро-

страненных, так и редких видов онкологических заболеваний; применение протонной терапии оказалось особенно эффективным при терапии опухолей головного мозга и в педиатрии [1, 2]. В протонной терапии используется основное преимущество протонов, а именно специфическое распределение поглощенной дозы: относительно низкая энергия частиц на входе в биологическую ткань; наличие пика Брэгга, т.е. максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине непосредственно в опухоли; резкое падение энергии до нуля после пика, которое позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани [3]. В медицинских центрах применяют два основных способа формирования дозовых полей для равномерного облучения всего объема мишени при протонной терапии опухолей: метод пассивного рассеяния и метод скани-

Сокращения: ОБЭ – относительная биологическая эффективность, ОСК – опухолевые стволовые клетки, ЛПЭ – линейная потеря энергии, ТСПП – тонкий сканирующий пучок протонов, АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, СПЖ – средняя продолжительность жизни.

рования карандашным пучком, при которых формируется модифицированная кривая Брэгга. Технология сканирования карандашным пучком позволяет проводить максимально эффективную протонную терапию с модулированной интенсивностью, за счет снижения дозовой нагрузки на здоровые ткани, чего трудно достичь при пассивном рассеянии; кроме того, не требует подготовки специальных компенсаторов и коллиматоров для конкретного пациента, что сокращает сроки и стоимость лечения [4].

Известно, что коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) для протонов, характеризующий степень воздействия излучения на биологические структуры относительно гамма- или рентгеновского излучения, не высок, и согласно рекомендациям Международной комиссии по радиационным единицам составляет 1.1 при расчете доз протонной терапии в клинических условиях [5–7]. Для дальнейшего расширения и совершенствования протонной терапии в последние годы были разработаны подходы и методики с целью усиления эффекта протонного излучения с использованием FLASH-терапии [8], нанозансеров [9], схем гипофракционирования [10, 11], а также в сочетании с другими видами облучения и гипертермией [12]. Эти направления в исследованиях обусловлены не только стремлением увеличить ОБЭ протонов и, следовательно, эффективность лучевой терапии, но и сменой научных парадигм о происхождении и развитии онкологических заболеваний, а также о причинах возникновения их рецидивов [13]. В последние годы сформировалось представление о сложном клеточном строении злокачественных образований и присутствия в них опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают способностью не только формировать опухоль и поддерживать ее рост, но и имеют более высокую резистентность к действию редкоизионизирующих излучений по сравнению с другими клетками опухоли [14]. Многие факты также указывают на то, что именно ОСК отвечают не только за радиорезистентность таких агрессивных опухолей головного мозга как мультиформная глиобластома, но и за возникновение рецидивов после радиотерапии других видов онкологических заболеваний [9]. Показано, что излучения с высокими значениями линейной потери энергии (ЛПЭ), так называемые плотноионизирующие, к которым относятся протоны, ионы углерода и нейтроны, способны преодолеть радиорезистентность ОСК за счет индукции в них нерепарируемых повреждений ДНК [15, 16], что делает лечение злокачественных новообразований эффективным не только за счет подавления роста опухоли, но и снижения частоты рецидивирования. Также установлено, что облучение протонами с энергией 3 МэВ в дозах, эквивалентных дозам гамма-излучения, более эф-

фективно снижало популяцию ОСК-подобных клеток карциномы легкого, а экспрессия генов, участвующих в гибели клеток, возрастала в десять раз [17].

В ряде исследований показана высокая эффективность нейтронов при лечении радиорезистентных и достаточно распространенных опухолей молочной железы, легкого, гортани, метастазов плоскоклеточного рака, опухолей слюнных желез, различных видов сарком [18, 19]. Особенностью биологического действия нейтронов является практически полное отсутствие зависимости развития повреждающего эффекта от насыщения клеток кислородом и фаз клеточного цикла, а также индуцирование нерепарируемых двунитевых разрывов ДНК, приводящих к гибели опухолевых клеток, в том числе и ОСК, в отличие от действия гамма-излучения [20, 21]. В исследованиях на культурах клеток и на различных видах животных установлено, что в зависимости от энергии частиц, дозы и радиочувствительности объекта ОБЭ нейтронов находится в диапазоне 1.2–8.0 [22]. Исследования клоногенной активности клеток мышшиной меланомы В-16 показали, что предварительное нейтронное облучение может усиливать действие фотонного облучения как аддитивно, так и синергетически, причем эффект зависит от соотношения дозы нейтронов и суммарной дозы [23]. Обнаружено, что одновременное воздействие нейтронов с энергией 14 МэВ и γ -излучения приводит к синергетическому биологическому действию при вкладе нейтронов в суммарную поглощенную дозу 15% или максимум 30% и его снижению до аддитивного при вкладе нейтронов 45%. В экспериментах на мышшах с использованием 30-суточной выживаемости ОБЭ импульсного и непрерывного γ -нейтронного излучения была определена в пределах 1.9–3.0 и зависела от режима воздействия и расстояния между активными зонами реактора и платформы с мышшами [24]. Современные тенденции использования быстрых нейтронов в лучевой терапии заключаются в замене их самостоятельного применения на схемы сочетанного гамма-нейтронного воздействия, в которых вклад нейтронов в суммарную очаговую дозу колеблется от 20 до 40% [25].

В предыдущих исследованиях нами при экстремальном гипофракционированном облучении тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в дозах 30+30 Гр [10] и 40+40 Гр [11] была показана эффективность воздействия на рост первичных опухолей, продолжительность периода ремиссии, частоту рецидивов и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышшей [26]. С учетом полученных результатов было высказано предположение, что появление вторичных опухолей происходит за счет сохранения единичных

наиболее радиоустойчивых опухолевых клеток, скорее всего ОСК. Поскольку имеются существенные доказательства, свидетельствующие о вкладе ОСК в формирование вторичных солидных злокачественных новообразований на более поздних сроках в месте расположения первичной опухоли, а также в других местах [27], то для повышения эффективности протонной терапии необходимо усилить воздействия на ОСК и снизить частоту рецидивирования.

Целью настоящей работы было исследование влияния последовательности действия протонного излучения в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного в дозе 5 Гр при сочетанном облучении солидной формы АКЭ на опухолевый ответ и лучевые реакции кожи у мышей-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах линии SHK в возрасте 8–9 недель массой 24–28 г. Мыши содержались в виварии ИТЭБ РАН в стандартных условиях и имели свободный доступ к сухому корму и воде [28]. Мышей контрольной и опытных групп содержали в одинаковых условиях на протяжении всего эксперимента. Было использовано 120 мышей, по 15–30 особей в каждой группе.

В качестве модели опухоли была выбрана солидная форма АКЭ [29]. Линия опухолевых клеток получена в РНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной инокуляции с интервалом 7–9 суток. У животных в асептических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 мин. Клетки АКЭ после центрифугирования тестировали на жизнеспособность с помощью красителя трипанового синего. Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева и суспендировали в физиологическом растворе в конечной концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро левой задней лапы. При такой имплантации опухолевых клеток частота индукции АКЭ у мышей через 5 суток составляла 100%, и животные гибли через 47 ± 5 суток.

Первое локальное облучение опухолей у мышей пучком протонов в пике Брэгга или нейтронами проводили на пятые сутки после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Перед каждым облучением мышей анестезировали внутривенной инъекцией селективных препаратов ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозировке 0.7 мг/кг и золетила 100 (Virbac, Франция) – 3.4 мг/кг.

В эксперименте использовалось сочетанное с нейтронами гипофракционированное облучение опухолей тонким сканирующим пучком протонов двумя фракциями по 40 Гр с интервалом 24 ч. Данный режим протонного облучения был выбран на основе наших предыдущих результатов [11], где была показана полная регрессия первичных опухолевых узлов у всех мышей, двукратное снижение частоты рецидивов и увеличение средней продолжительности жизни на 35% у мышей с облученной АКЭ, по схеме 40 + 40 Гр, в отличие от фракционированного облучения в дозах 30 + 30 Гр. Доза облучения нейтронами 5 Гр была выбрана с учетом величины ОБЭ непрерывных нейтронов с энергией 14 МэВ, равной 2.4–2.6, которая была определена на клетках мышины меланомы В-16 [30] и расчета доли нейтронов в суммарной дозе облучения около 15% для получения синергетического или аддитивного эффекта.

Опухоль у мышей в первой группе облучали только двумя фракциями ТСПП («протоны»), во второй группе предварительно за 3 ч до первой фракции ТСПП мышей с АКЭ облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны+протоны»), третью группу облучали нейтронами в дозе 5 Гр через 3 ч после второй фракции ТСПП («протоны+нейтроны»), а в четвертой группе опухоль однократно облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны»). Пятая (контрольная) группа включала необлученных мышей с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источникам излучений, анестезии и имитации условий облучения.

В качестве источника протонного излучения использовали комплекс протонной терапии «Прометеус» (Физико-технический центр ФИАН, Протвино, Московская обл.) [31]. Перед облучением мышь фиксировали пластиковыми зажимами на платформе из полипропилена таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела. Платформу наклонно погружали в водный фантом и получали томограмму с помощью компьютерного томографа с коническим пучком, интегрированного в ускоритель. Для каждой мыши был определен размер опухоли и рассчитан средний фактический объем облучения, который равнялся 0.47 см^3 . Этот объем был выбран на основе наших предыдущих работ, где была показана более высокая противоопухолевая эффективность и значительное увеличение СПЖ мышей при облучении ТСПП именно пальпируемого объема ткани по сравнению с облучением большего по классификации МКРЕ-62, так называемого планируемого объема [10, 26, 32].

Расчет дозы в заданном объеме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению

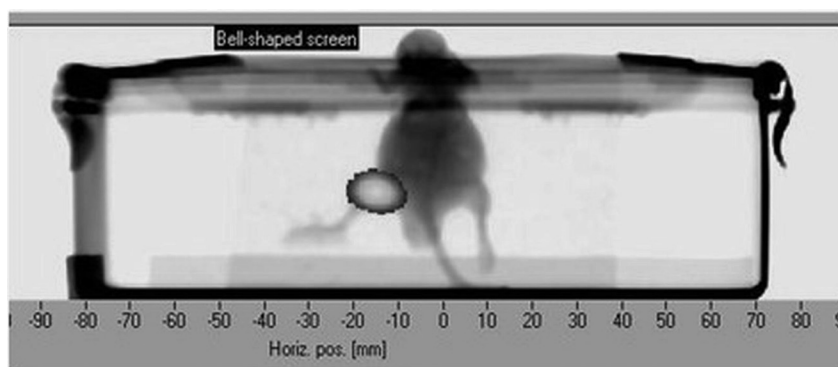


Рис. 1. Положение мыши в водном фантоме во время облучения тонким сканирующим пучком протонов.

min/макс дозы, которая позволяет получить равномерное распределение дозы. Верификацию положения каждой мыши при облучении производили с помощью лазерной системы позиционирования и съемки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм (рис. 1). Облучение заданного объема проводили с двух полей ТСПП, энергия протонов на выходе с направления 0° оставляла 98–104 МэВ, с направления 180° – 96–100 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом составляла 2.8–3.6 мм. Среднее значение ЛПЭ, рассчитанное по программе планирования, в модифицированном пике было равно 2.5 ± 0.5 кэВ/мкм. Облучение проходило в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс и цикличностью 1 импульс в 2 с. Контрольное облучение водного фантома осуществляли с установленными в нем дозиметрами. Дозиметрию протонного облучения проводили с помощью алмазного детектора (ИФТП, Россия) и пленки радиационного контроля Gafchromic EBT2 (США). Погрешность определения поглощенной дозы протонов составила около 5%.

Источником нейтронов служил портативный нейтронный генератор непрерывного действия НГ-14 (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал НМИРЦ Минздрава России, Обнинск, Калужская обл.). Принцип работы генератора заключается в ускорении до энергии 100–300 кэВ ионов дейтерия на тритиевую мишень. В результате реакции ${}^3\text{H}(d,n){}^4\text{He}$ образуются нейтроны с энергией ~ 14 МэВ и потоком нейтронов $\sim 10^{10}$ н/с [33]. Мышей, разделенных на подгруппы по пять животных в каждой, облучали нейтронами на полиметилметакрилатной платформе. Для локального облучения АКЭ левые задние лапы мышей фиксировали в центре платформы на расстоянии 5–6 см от мишени генератора таким образом, чтобы бедро мыши находилось в поле облучения (рис. 2). Технические параметры установки не позволяли проводить локальное облучение толь-

ко пальпируемого объема опухоли, поэтому была облучена вся левая лапа с опухолью. Мощность дозы нейтронов на выходе составила $41 \cdot 10^{-4}$ Гр/с. Мониторинг непрерывного потока нейтронов осуществлялся с помощью «Измерителя нейтронного потока автоматизированного» (ИНПА, разработки ВНИИА им. Н.Л. Духова, Москва). Погрешность определения поглощенной дозы составляла 12–15%.

За мышами наблюдали ежедневно на протяжении всей их жизни, для выявления опухолевого ответа определяли динамику роста АКЭ, регистрировали продолжительность ремиссии, частоту рецидивов опухолей и СПЖ мышей с рецидивами и полностью «вылеченных». Животных в терминальном состоянии подвергали эвтаназии, считая этот день датой гибели.

Динамику роста АКЭ определяли по объему опухоли дважды в неделю в течение месяца. Для вычисления объема опухоли у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра, и объем



Рис. 2. Положение мышей во время облучения нейтронами на нейтронном генераторе НГ-14.

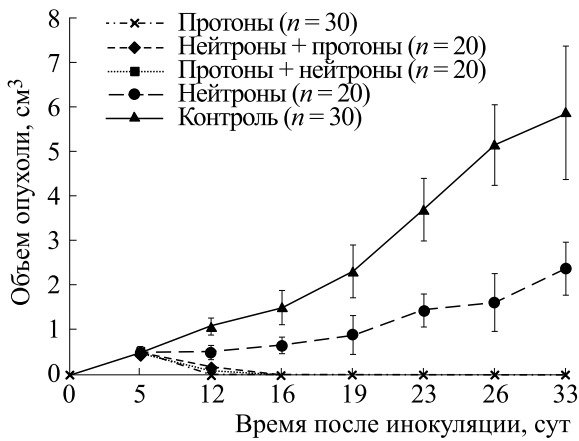


Рис. 3. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее значение \pm SD, $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем.

опухоли в см^3 рассчитывали по следующей формуле [34]:

$$V = \pi/6 \cdot d1 \cdot d2 \cdot d3,$$

где $d1-d3$ — три ортогональных диаметра. Для оценки острых кожных реакций после облучения опухоли, локализованной на бедре левой задней лапы мыши, использовали шкалу оценки радиационной токсичности RTOG/EORTC [35]. За мышами ежедневно наблюдали с первых по сороковые сутки после облучения и оценивали общее количество животных с кожными реакциями, тип и степень повреждений и продолжительность заживления. После максимального проявления реакций у мышей повреждения кожи купировали с помощью консервативной терапии 15% раствором диметилсульфоксида (ОАО «Татхимфарм-

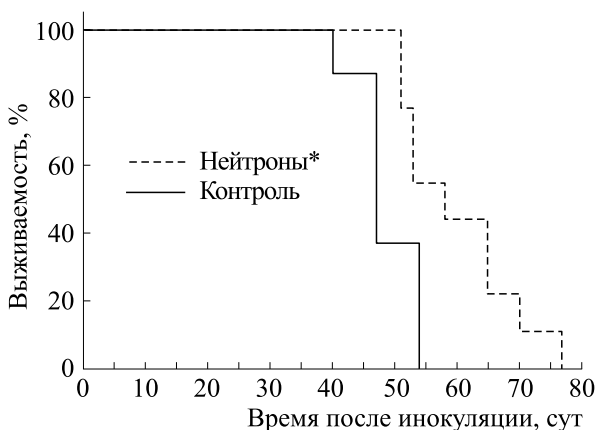


Рис. 4. Динамика гибели мышей-опухоленосителей после облучения нейтронами в дозе 5 Гр по сравнению с контрольной группой (* — $p \leq 0.05$).

препараты», Россия) и линиментами или мазями оксикортом (Тархоминские фармацевтические заводы Польфа, Польша) и флуцинаром (Jelfa SA, Польша).

Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью критерия Стьюдента; в остальных случаях использовали непараметрический U -критерий Манна–Уитни. Показатели выживаемости мышей сравнивали с помощью непараметрических критериев: критерия Гехана–Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены кривые роста АКЭ у мышей после облучения нейтронами и протонами в разной последовательности. Во всех группах как при сочетанном, так и только при протонном облучении у всех мышей наблюдалась регрессия первичного опухолевого узла через неделю после облучения и отсутствие вторичного роста опухоли в течение месяца.

В группе мышей с АКЭ, облученной только нейтронами, у всех животных наблюдался рост опухоли, но скорость роста по сравнению с необлученным контролем была значительно ниже. Время задержки роста опухоли [36], которое вычислялось как разница между средним временем роста опухоли (время, необходимое для того, чтобы опухоль стала в пять раз больше по отношению к исходному объему) в группе нейтронного облучения и необлученного контроля, составило 15 суток, затем опухоли увеличивались с одинаковой скоростью. На рис. 4 представлена динамика гибели мышей с АКЭ в группе, облученной нейтронами, по сравнению с необлученными мышами-опухоленосителями. Задержка роста опухолей после нейтронного облучения увеличила максимальную продолжительность жизни мышей с опухолями до 77 суток по сравнению с контролем, где она равна 54 суткам, а СПЖ животных облученной группы увеличилось на 15 суток (рис. 4).

Одновременно у мышей оценивали тяжесть и течение острых лучевых поражений кожи в области облучения. В связи с тем, что пальпируемый объем опухоли был соизмерим с размером лапы животного, и опухолевый узел примыкал к кожным покровам, то при облучении кожа получила значительную дозу. Время латентного периода развития повреждений кожи в группе нейтроны составило 16 суток, кожные поражения наблюдались у 50% мышей и достигали максимальной

Таблица 1. Ранние лучевые реакции кожи у мышей после облучения АКЭ нейтронами и протонами по классификации RTOG/EORTC-95

Лучевые реакции	Развитие лучевых реакций, %			
	нейтроны	протоны	нейтроны + протоны	протоны + нейтроны
0 – нет проявлений	50%	–	–	–
1 – умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит	10%	–	–	28.6%
2 – яркая эритема, островковый влажный эпидермит, умеренный отек	–	4.2%	–	–
3 – сливной влажный эпидермит, отек с давлением	–	50%	12.5%	57.1%
4 – язва, кровотечение, некроз, глубокое повреждение тканей	40%	45.8%	87.5%	14.3%

степени у 40% животных к 30 суткам после облучения. В экспериментальных группах протонного и сочетанного облучения время латентного периода было одинаковым и составляло 10–12 суток. В группе «нейтроны+протоны» кожные реакции на 13-е сутки наблюдались у 100% мышей, в группе «протоны» – у 70.8%, а в группе «протоны+нейтроны» – только у 43% мышей. Период проявления выраженных лучевых поражений кожи составлял 5–7 суток для всех групп, однако тяжесть кожных реакций была различна: в группе «нейтроны+протоны» самая тяжелая четвертая степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов, наблюдалась у 87.5%, в группе «протоны» – у 46%, а в группе «протоны + нейтроны» – только у 14% мышей. Кроме того, в группе «протоны + нейтроны», в которой наблюдали самую низкую частоту общего количества кожных реакций, у 29% мышей лучевые поражения были легкими и не развивались более первой степени (умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит) (табл. 1).

Облучение опухоли только нейтронами в дозе 5 Гр приводило к развитию самой тяжелой степени кожных повреждений у 40% мышей, почти столько же, что и при действии двух фракций по 40 Гр протонного излучения, а сочетанное облучение нейтронами до протонов почти в два раза увеличивало частоту наиболее тяжелых кожных реакций по сравнению с одним только протонным облучением. Неожиданным оказалось то, что в варианте, где мыши облучались нейтронами после ТСПП, наблюдалась самая благополучная картина лучевых последствий: низкая доля мышей с четвертой степенью поражения кожи, и у 30% мышей была небольшая степень выраженности поражений. Длительность репаративного периода повреждений кожи была практически одинаковой для всех облученных животных, и составляла 30–35 суток с момента появления первых реакций, но волосяной покров в месте облучения опухоли восстановился к 40 суткам в

группе «нейтроны + протоны» только у 28%, в группе «протоны» – у 45% и в группе «протоны + нейтроны» – у 50% мышей. Таким образом, по нескольким параметрам, характеризующим повреждение кожи (доля мышей с кожными реакциями, соотношение разных степеней тяжести, скорости восстановления повреждений), показано влияние последовательности облучения разными типами излучения, поскольку предварительное облучение нейтронами в дозе 5 Гр перед протонным облучением значительно усиливает эту категорию побочных последствий, что приводит к дополнительной интоксикации мышей, связанной с острым и хроническим воспалением, и может существенно влиять на более отдаленные последствия.

Далее мы наблюдали за отдаленными лучевыми последствиями только у мышей с полной регрессией опухолевых узлов. Через 35–46 суток после последнего облучения во всех группах наблюдали первые случаи возобновления роста опухолей у мышей. Средняя продолжительность безрецидивного периода в группе «протоны» составила 85 суток, а в группах с разной последовательностью излучений срок ремиссии был ниже и составлял 43 и 60 суток (табл. 2). СПЖ мышей без рецидивов в группах с воздействием нейтронов и протонов была достоверно меньше (118 и 124 суток) по сравнению с группой мышей, облученных только протонами (278 суток). СПЖ мышей с рецидивами в группе «протоны» составляла 115 суток после облучения; в группах «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны» она была меньше, 65 и 80 дней соответственно.

На рис. 5 показана выраженность таких отдаленных эффектов, как доля мышей без опухолей, количество погибших мышей без опухолей и появление рецидивов на 60-е сутки (рис. 5а) и на 90-е сутки (рис. 5б) в зависимости от последовательности облучения. На 60-е сутки после облучения количество излеченных животных в группе «протоны» было значительно больше ($p \leq 0.05$) по

Таблица 2. Средняя продолжительность безрецидивного периода и СПЖ мышей после сочетанного воздействия нейтронов и протонов

Условия облучения	Время появления первой рецидивной опухоли, сут	Средняя продолжительность безрецидивного периода, сут	СПЖ мышей, сут	
			С рецидивами	Без рецидивов
протоны (40+40 Гр)	35	85	115	278
нейтроны (5 Гр) + протоны (40+40 Гр)	39	43*	65*	118*
протоны (40+40 Гр) + нейтроны (5 Гр)	46	60	80	124*

Примечание. * – $p \leq 0.05$ по сравнению с группой протонного воздействия.

сравнению с таковым в группе «протоны + нейтроны»; максимальная гибель у мышей наблюдалась в группе «протоны + нейтроны», а количество рецидивов во всех группах было одинаковым. На 90-е сутки после облучения количество погибших животных в группе «протоны + нейтроны» значительно увеличилось, что не наблюдалось в других группах. Количество животных с рецидивами опухолей в группе «протоны» увеличилось почти вдвое, а в группе «протоны + нейтроны» – в полтора раза. У мышей, подвергшихся комбинированному облучению, все случаи возобновления роста опухоли наблюдались в течение пяти-двенадцати недель после облучения, в отличие от мышей, облученных только протонами, у которых возобновление роста опухоли наблюдалось в более поздние сроки, через 19–35 недель (рис. 6). На протяжении всего периода наблюдения доля мышей с возобновившимся ростом опухоли той же локализации, что и первичная, составил 36% в группе «протоны» и 50 и

43% – соответственно в группах «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны».

На рис. 7 показано время роста рецидивных опухолей у мышей после протонного и комбинированного облучения, которое определялось как время, необходимое для пятикратного увеличения исходного пальпируемого объема (0.47 см^3). Времена роста рецидивов, полученные для всех животных, усредняли по каждой группе и рассчитывали время задержки роста опухоли как разницу между временем роста рецидивных опухолей экспериментальной группы и необлученного контроля [36]. Время задержки роста опухоли в группе «протоны» на 13-е сутки отличалось относительно контрольной группы, а для групп «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны» было таким же, как и в контроле. Таким образом, в группе «протоны» рецидивные опухоли росли медленнее, чем в группах комбинированного облучения.

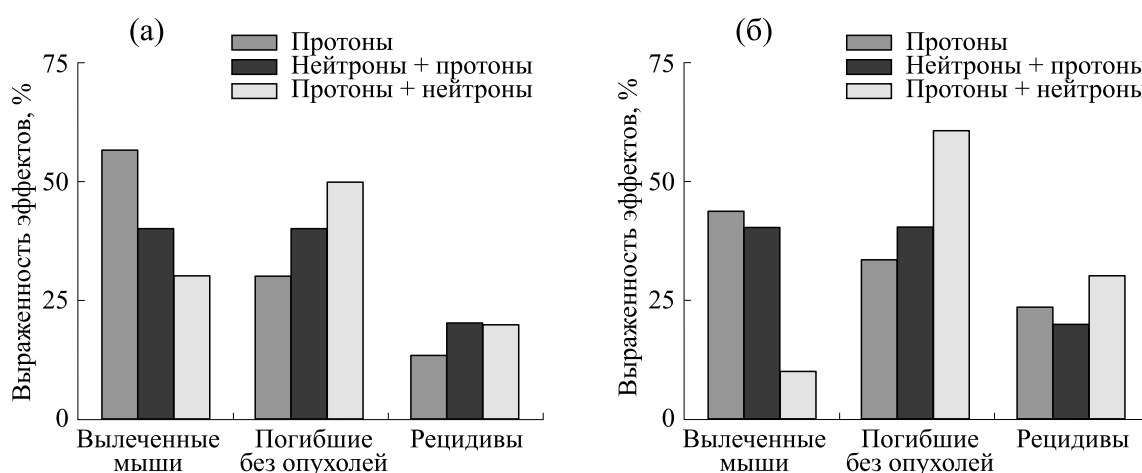


Рис. 5. Отдаленные эффекты у мышей с АКЭ после протонного и комбинированного облучения: на 60-е сутки (а) и на 90-е сутки (б).

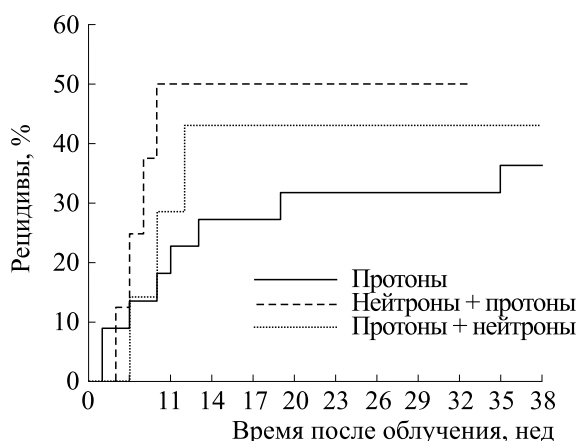


Рис. 6. Динамика появления вторичных опухолей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

«Вылеченные» мыши, у которых опухолевый узел не развивался в месте облучения на протяжении всей жизни, в группах, подвергшихся комбинированному облучению, погибли раньше, чем в группе, подвергавшейся только протонному облучению. Максимальная продолжительность жизни в группе «нейтроны + протоны» составила 7 месяцев, в группе протоны + нейтроны – 11 месяцев, в группе протоны – 21 месяц.

Таким образом, анализ таких отдаленных последствий облучения, как время ремиссии, частота и скорость роста вторичных опухолей, продолжительность жизни мышей-опухоленосителей показал, что дополнительное воздействие нейтронов как до, так и после протонного облучения значительно ухудшает эти показатели эффективности терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

По сравнению с фотонным излучением радиобиологическое действие адронов (протонов, нейтронов и ионов углерода) характеризуется индукцией преимущественно летальных повреждений ДНК и практически не зависит от фазы клеточного цикла. Протонное облучение значительно снижает коэффициент усиления кислорода в ткани, сводит к минимуму ускоренную репопуляцию опухолевых клеток, подавляет их способность к метастазированию и более эффективно повреждает радиорезистентные ОСК, что, как правило, является причиной возникновения вторичных злокачественных новообразований [1, 7]. В настоящее время происходит смена классических представлений о механизмах возникновения, роста и взаимодействия структурных компонентов опухоли, метастазирования и рецидива [37]. Это объясняется тем, что ключевым звеном в индук-

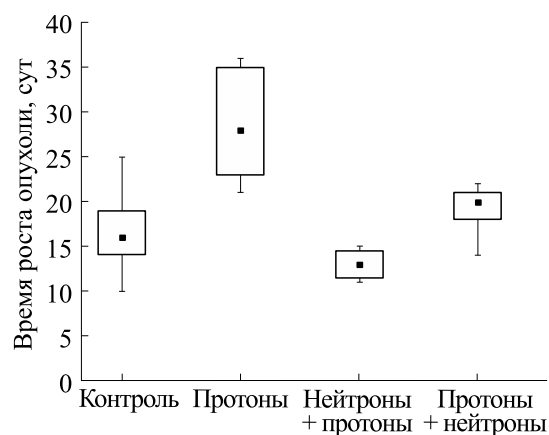


Рис. 7. Время роста рецидивных опухолей у мышей после протонного и комбинированного облучения.

ции развития опухоли считается достаточно небольшое количество (обычно всего 1–4%) ОСК, обладающих свойствами стволовых клеток: способностью к самовосстановлению, обновлению и дифференцировке, относительно более высокой радиорезистентностью и способностью к метастазированию. Показано, что количество ОСК в культурах различных тканей увеличивается после однократного облучения в диапазоне доз 1–10 Гр, а опухолевые не стволовые клетки погибают при увеличении дозы. После фракционированного рентгеновского облучения *in vivo* в суммарной дозе 10 Гр у всех больных раком верхних дыхательных путей увеличилось относительное количество ОСК [8]. По сравнению с гамма-излучением эквивалентные дозы низкоэнергетических протонов с энергией 3 МэВ более эффективно снижали популяцию клеток ОСК-подобной карциномы легкого; при этом экспрессия генов, участвующих в клеточной гибели, возросла в десять раз [17]. Эти результаты дают основание для более интенсивных поисков новых путей в адронной терапии для контроля резистентности новообразований к лучевой терапии и снижения частоты рецидивов, и одним из таких способов, на наш взгляд, является гиподифракционированное высокодозное протонное облучение [10]. Представляется очевидным, что эксперименты на клеточных культурах не позволяют оценить реакцию сложной многофункциональной структуры опухоли, содержащей клетки с разной чувствительностью или даже совершенно противоположными ответами на одни и те же дозы облучения. Важнейшими критериями эффективности современной терапии онкологических заболеваний являются длительность безрецидивного периода, частота рецидивов и продолжительность жизни больных. В связи с этим для разработки новых схем фракционированного облучения при протонной тера-

пии необходимы модели опухолей на животных, позволяющие не только оценивать ранние противоопухолевые эффекты и реакции нормальных здоровых тканей, но и отслеживать динамику ремиссии, индукции рецидивов и выживания животных.

Здесь мы предприняли попытку повысить противоопухолевую эффективность облучения протонами в сочетании с нейтронным излучением в разной последовательности. Показано, что комбинированное облучение мышей нейтронами в дозе 5 Гр как до, так и после двукратного протонного облучения также, как и при облучении только пучком протонов, эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, которая служили моделью ответа здоровых тканей, наблюдаемых через 15–40 сут после радиационной терапии, облучение нейтронами после протонного облучения приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с одним протонным облучением, однако облучение нейтронами перед протонным облучением оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. В работе [38] было показано, что воздействие излучения с высокой ЛПЭ (ионы углерода, нейтроны) перед облучением протонами приводит к более низкой выживаемости клеток китайского хомячка V14-150 (фибросаркома) по сравнению с облучением сначала протонами. Авторы предположили, что повреждения клеток, вызванные протонами с низкой ЛПЭ, репарируются в промежутке между фракциями, а повреждения, вызванные частицами с высокой ЛПЭ, были в основном нерепарируемы. Таким образом, порядок воздействия излучениями с низкой и высокой ЛПЭ при комбинированном воздействии на клетки имеет значение. В работе [39] отметили, что последовательность гамма-излучения и нейтронов при фракционированном облучении опухолей у животных и доля нейтронов в кумулятивной дозе имеют большое значение, поскольку облучение нейтронным излучением в дозе 2.5 Гр следует за фракционированным гамма-облучением. Облучение в дозе 28 Гр более эффективно подавляло рост опухоли и не влияло на кожные реакции по сравнению с облучением нейтронами до гамма-облучения.

При всех последовательностях облучения, использованных в нашей работе, наблюдалось полное подавление опухолевого роста, но реакции нормальных тканей сильно различались. У мышей с опухолями, подвергшихся комбинированному облучению, такие показатели эффективности лечения, как продолжительность ремиссии, частота повторного роста опухоли и СПЖ были значительно хуже, чем у животных, облученных только протонами. Из-за специфики распределения поглощенной энергии в веществе при дей-

ствии на опухоли частиц с высокими значениями ЛПЭ, таких как нейтроны, облучению подвергаются и здоровые ткани, что вызывает радиационные повреждения в клетках, окружающих опухоль. В нашей работе мы облучали опухоль, локализованную в бедре мыши, в которой количество миелокариоцитов в семь-восемь раз больше, чем в голени или предплечье [40]; предположительно, локальное облучение этой области нейтронами способствует дополнительному подавлению восстановления кроветворения, что приводит к уменьшению продолжительности жизни после комбинированного облучения. Кроме того, при локальном облучении нейтронами в относительно небольшой дозе охватывался больший объем здоровой ткани, окружающей опухоль, чем при высокоточном облучении сканирующим пучком протонов, что также могло негативно сказываться на состоянии мышей в отдаленные сроки. Ранее нами при облучении опухоли протонами была показана зависимость СПЖ мышей от объема облучения нормальной ткани, окружающей опухоль [26]. Возможно, негативное влияние комбинированного облучения на отдаленные последствия, связано и с тем, что ОБЭ нейтронов при прохождении возрастает обратно пропорционально дозе, что оказывает более сильное повреждающее действие на нормальные ткани вне опухоли [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регистрация ранних и отдаленных последствий по нескольким критериям, позволяет более полно оценить эффективность схем облучения и, вероятно, эту информацию следует учитывать при выборе терапии той или иной опухоли в зависимости от ее локализации, размера, формы, близости к критическим органам и возможный вклад повреждения кожи в последствия лечения. Полученные данные выявили сложные закономерности реакции опухоли и здоровых тканей в зависимости от последовательности облучения при комбинированном воздействии излучений разного качества. На современном этапе развития протонной терапии становится очевидной необходимость дальнейшего накопления экспериментальных радиобиологических данных для корректного определения ОБЭ протонов в терапевтических условиях на моделях опухолей и нормальных тканей *in vivo* методами, аналогичными тем, что применяются для доклинических и клинических испытаний лекарственных средств.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Лычагину, С.Н. Корякину и Т.С. Хозяшевой – сотрудникам отдела радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба (филиала НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск) за помощь в орга-

низации и проведении эксперимента по облучению нейтронами на оборудовании Центра.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на базе ФТЦ Физического института им. П.Н. Лебедева и ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по теме ГЗ № 075-00381-21-00 и за счет частичной финансовой поддержки из средств договора между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН № 06/20.

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. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA). Эксперименты получили одобрение Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН, все процедуры проводились в соответствии с нормативно-правовыми актами по содержанию и использованию лабораторных животных (протокол №8/2020 от 17.02.2020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Blanchard, G. B. Gunn, A. Lin, et al., *Semin. Radiat. Oncol.*, **28** (1), 53 (2018).
2. S. Baliga, L. Gandola, B. Timmermann, et al., *Pediatric Blood Cancer*, **9**, (2020).
3. F. Tommasino and M. Durante, *Cancers (Basel)*, **7** (1), 353 (2015).
4. T. Bortfeld, H. Paganetti, and H. Kooy, *Med. Physics*, **32** (6), 2048 (2005).
5. H. Suit, T. DeLaney, S. Goldberg, et al., *Radiother Oncol.*, **95** (1), 3 (2010).
6. A. Luhr, C. Neubeck, M. Krause, et al., *Clin. Translat. Radiat. Oncol.*, **9**, 35 (2018).
7. H. Paganetti, E. Blakely, A. Carabe-Fernandez, et al., *Med. Physics* **46** (3), 53 (2019).
8. E. S. Diffenderfer, I. I. Verginadis, M. M. Kim, et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106** (2), 440 (2020).
9. Y. Liu, P. Zhang, F. Li, et al., *Theranostics*, **8** (7), 1824 (2018).
10. В. Е. Балакин, А. Е. Шемяков, С. И. Заичкина и др., *Биофизика*, **61** (4), 808 (2016).
11. T. Belyakova, V. Balakin, S. Zaichkina, et al., in *Proc. Int. Conf. on Radiation Applications in Physics, Chemistry, Biology, Medical Sciences, Engineering and Environmental Sciences* (2019), p. 110.
12. S. Tran, E. Puric, M. Walser, et al., *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20180883 (2020).
13. H. Ghaffari, J. Beik, A. Talebi, et al., *Clin. Translat. Oncol.*, **20** (12), 1502 (2018).
14. C. R. Arnold, J. Mangesius, I. I. Skvortsova, et al., *Front. Oncol.*, **10**, 164 (2020).
15. S. Chiblak, Z. Tang, B. Campos, et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **95** (1), 112 (2016).
16. E. T. Vitti and J. L. Parsons, *Cancers (Basel)*, **11** (7), 946 (2019).
17. H. Narang, A. Kumar, N. Bhat, et al., *Mutat. Res.*, **780**, 35 (2015).
18. M. F. Timoshchuk, P. Dekker, D. S. Hippe, et al., *Oral Oncol.*, **88**, 51 (2019).
19. H. Cash, R. A. Harbison, N. Futran, et al., *Laryngoscope*. **131** (3), 541 (2021).
20. А. Д. Каприн и С. Е. Ульяненко, *Медицина: целевые проекты*, **23**, 56 (2016).
21. Y. Hirota, S. Masunaga, N. Kondo, et al., *J. Radiat. Res.*, **55** (1), 75 (2014).
22. B. Jones, *Front. Oncol.*, **10**, 1537 (2020).
23. Е. Е. Бекетов, Е. В. Исаева и С. Н. Корякин, *Радиация и риск*, **21** (3), 82 (2012).
24. С. Е. Ульяненко, С. Н. Корякин, Е. В. Исаева и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **56** (6), 598 (2016).
25. Е. В. Исаева, Е. Е. Бекетов, Н. В. Наседкина и др., *Радиация и риск*, **28** (1), 59 (2019).
26. В. Е. Балакин, А. Е. Шемяков, С. И. Заичкина и др., *Биофизика*, **62** (1), 161 (2017).
27. C. Peitzsch, A. Tyutyunnykova, K. Pantel, et al., *Seminars Cancer Biol.*, **44**, 10 (2017).
28. J. A. Smith, F. A. van den Broek, J. C. Martorell, et al., *Laboratory Animals*, **41** (2), 143 (2007).
29. S. Mishra, A. Tamta, M. Sarikhani, et al., *Sci. Rep.*, **8** (1), 5599 (2018).
30. E. V. Isaeva, E. E. Beketov, S. N. Koryakin, et al., *Radiat. Protection Dosimetry*, **161** (1–4), 478 (2014).
31. V. E. Balakin, A. L. Bazhan, V. A. Alexandrov, et al., in *Proc. 27th Russian Particle Accelerator Conf.* (2021), p. 120.
32. *ICRU Report 62: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy* (International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, 1999).
33. С. В. Сыромуков, Р. В. Добров, А. В. Степнов и др., *Атомная энергия*, **112** (6), 350 (2014).
34. B. Sorensen, M. Horsman, J. Alsner, et al., *Acta Oncol.*, **54** (9), 1623 (2015).
35. J. D. Cox, J. Stetz, and T. F. Pajak, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **31** (5), 1341 (1995).
36. K. Ando, S. Koike, A. Uzawa, et al., *J. Radiat. Res.*, **46** (1), 51 (2005).

37. R. French and S. Pauklin, *Int. J. Cancer*, **148** (12), 2884 (2021).
38. M. Troshina, E. Koryakina, V. Potetnya, et al., in *Proc. Eighth international conference on radiation in various fields of research* (2020), p. 126.
39. G. M. Obaturov, V. A. Sokolov, S. E. Ulyanenko, et al., *Radiat. Biol. Radioecology*, **37** (4), 475 (1997).
40. Г. С. Стрелин, Н. К. Шмидт, Н. Н. Сильченко и др., *Эффект экранирования части костного мозга при фракционированном облучении организма* (Медицина, Л., 1978).

Early and Remote Sequence Effect of Neutron and Proton Irradiation on the Tumor Response of Solid Ehrlich Carcinoma and Skin Reactions in Mice

O.M. Rozanova*, E.N. Smirnova*, T.A. Belyakova**, N.S. Strelnikova**,
A.E. Shemyakov*, **, and A.V. Smirnov**

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

***Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Akademicheskii proezd 2/110, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

The present study evaluated the sequence effect of proton (at a total dose of 80 Gy) and neutron radiation (at a dose of 5 Gy) on tumor response and skin reactions in mice bearing solid tumor of Ehrlich ascites carcinoma exposed to combined radiation. It was shown that neutron radiation used either before or after proton radiation effectively reduces proliferation of solid Ehrlich ascites carcinoma in mice for one month after irradiation. Our work showed that parameter values for the frequency and severity of radiation-induced skin reactions in mice at 15–40 days postirradiation were much better when animals were exposed to neutrons after proton therapy, as opposed to those obtained after the use of only proton therapy. However, neutron exposure process before proton irradiation was rather damaging sequence than another one. It was also found that the tumor relapse rate in the groups of animals exposed to combined radiation was higher, and the overall lifespan was shorter than that in the group of mice irradiated only with protons.

Keywords: neutrons, protons, Ehrlich ascites carcinoma, radiation-induced skin reaction, tumor relapses, mice

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ КУСТОДИОЛА НА СОХРАННОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ ГАЗОВОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ СМЕСИ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И КИСЛОРОДА

© 2022 г. А.Е. Гурин*,#, Е.Л. Гагаринский*, Е.Е. Фесенко (мл.)*

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

#E-mail: gurinae@pbcras.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

После доработки 01.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Проведена оценка влияния консервирующего раствора «Кустодиол» на сократимость и частоту сердечных сокращений изолированного сердца крысы при пролонгированной гипотермической (+4°C) газовой консервации под давлением 6.5 атм смеси монооксида углерода и кислорода с продолжительностью хранения 6, 12 и 24 ч. Показано, что «Кустодиол», являющийся золотым стандартом хранения сердца в России, не проявляет синергических эффектов при сочетанном использовании с консервирующей газовой смесью. После 12 ч хранения сократимость в группе «Кустодиол/газовая смесь» по показателю давления, развиваемого левым желудочком, снизилась до $34 \pm 9\%$ от показателя интактного контроля, принятого за 100%. В то же время в группе без «Кустодиола» данный показатель оказался достоверно выше, составив $61 \pm 9\%$. При сроках хранения 6 и 24 ч мы не зафиксировали достоверные отличия давления, развиваемого левым желудочком, в обеих группах при уровнях падения сократимости порядка 75% (6 ч) и 30% (24 ч) от контроля. Показана высокая сохранность сердца при консервации органа, не отмытого от крови. Данный факт может найти свое применение при длительной газовой гипотермической консервации с применением кровяной кардиопротекции или протекции с добавлением элементов крови к кристаллоидным растворам.

Ключевые слова: монооксид углерода, кустодиол, консервирующий раствор, газ, орган, хранение, сердце, крыса, консервация, гипотермия.

DOI: 10.31857/S0006302922050192, EDN: JKOUKG

Количество выполняемых трансплантаций сердца в России и мире ограничено в силу таких причин, как дефицит органов из-за строгих условий отбора доноров и малое время хранения трансплантата сердца. Используемый в клинической практике метод сохранения донорских органов – статическая холодовая консервация [1], в основе которого лежит синергическое действие гипотермии (4°C) и протективных консервирующих растворов, имеет ряд недостатков, главным из которых является малый срок хранения, составляющий для сердца всего 4–6 ч. В связи с этим в последнее время получили развитие такие направления исследований, как оптимизация существующих консервирующих растворов, кислородная перфузия и нормотермическая аппа-

ратная перфузия [2–4]. Одним из новых методов, обещающих перспективы серьезной пролонгации предельных сроков хранения донорского сердца, является газовая гипотермическая консервация под давлением газовых смесей на основе монооксида углерода.

Монооксид углерода привычно считается токсичным газом, обладающим высокой аффинностью к гемоглобину, за счет чего блокирует доставку кислорода кровью к тканям организма. Данная молекула относится к группе тканевых газовых мессенджеров и способна легко проникать через мембрану клеток, обладает высокой скоростью диффузии в тканях как при физиологических температурах, так и в условиях гипотермии. Показано, что эндогенный СО играет существенную роль в регуляции сосудистого тонуса, функции тромбоцитов, эндотелиальных клеток и апоптоза [5]. Ранее на биомодели изолированного сердца различных лабораторных животных было показано трех-четырёхкратное продление сроков хране-

Сокращения: ОГП – оксигенированная гипотермическая перфузия; ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком; НОРЕ – гипотермическая кислородная перфузия (Hypothermic oxygenated perfusion).

ния трансплантата под действием газовой смеси, состоящей из монооксида углерода и кислорода [6–8], значительно превышающее 4–6 ч, достигаемых в стандартных консервирующих растворах «Кустодиола» или «Виаспана» [9]. В России золотым стандартом в трансплантологической практике является «Кустодиол». Данный раствор обеспечивает приемлемую защиту от ишемических повреждений при погружении трансплантата в раствор при сроках хранения до 4 ч [10].

Как сочетаются использование консервирующего раствора и газовая консервация? Растворы, которые пробуют использовать для перфузии коронарного русла перед непосредственно газовой консервацией, разнятся, включая раствор Кребса–Хенселейта, «Виаспан» и др. [7, 11]. В исследовании, выполненном в нашей лаборатории [8], использовали раствор «Евро-Коллинз». Является ли пролонгация времени хранения органа результатом сочетанного действия монооксида углерода и консервирующего раствора или при хранении органа под избыточным давлением газовой смеси обработка органа консервирующим раствором не требуется? Целью данного исследования стал сравнительный анализ восстановления функциональной активности сердец, прошедших и не прошедших обработку раствором «Кустодиола», основным консервирующим агентом, применяемым в России, после газовой гипотермической консервации под избыточным давлением газовой смеси, состоящей из монооксида углерода и кислорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230 ± 25 г ($n = 36$).

Экспериментальную газовую смесь готовили, как описано в методике [8]. После наркотизации крысы смесью, состоящей из 80 мкл препарата «Золетил 100» (Valdepharm, Франция) и 20 мкл препарата «Ксила» (Interchemie Werken "De Adelaar" B.V., Нидерланды), животное фиксировали на столике и проводили продольную срединную лапаротомию. Далее в нижнюю полую вену вводили раствор гепарина (ООО «Славянская аптека», Россия) объемом 1 мл из расчета 50 МЕ/мл. Спустя 5 мин проводили продольную срединную стернотомию и выделяли сердце с частью аорты длиной не менее 1 см. В рамках исследования был проведен анализ следующих групп:

I. Группа «Контроль» (3 крысы) – нативное сердце, не подвергавшееся хранению.

II. Группа «Кустодиол» (9 крысы) – хранение в стандартном консервирующем растворе «Кустодиол» (Dr. F.KOHLER CHEMIE GmbH, Герма-

ния) при температуре 4°C. Время хранения – 6, 12 и 24 часа.

III. Группа «Кустодиол+СО» (12 крысы) – хранение под давлением газовой смеси 6.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1 : 1 при 4°C после обработки раствором «Кустодиола». Время хранения – 6, 6 (ОГП, см. ниже), 12 и 24 ч.

IV. Группа «Кровь+СО» (12 крысы) – хранение под давлением газовой смеси 1.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1 : 1 при 4°C. Время хранения – 6, 6 (ОГП), 12 и 24 ч.

Для групп: II и III перед консервацией проводили остановку сердца при помощи охлажденного (4°C) раствора «Кустодиола». В аорту вводили канюлю и фиксировали ее лигатурой. Далее сердце промывали охлажденным консервирующим раствором в течение 5 мин на установке для перфузии по Лангендорфу собственного изготовления с подключенным термостатом MiniStat 230 (Huber, Германия). По достижении состояния кардиopleгии сердце снимали с канюли и помещали в камеру для консервации. В группе IV остановку сердца и отмывку его от крови не проводили, сразу после выделения орган помещали в камеру для консервации.

Камеру на основе химического реактора Vivor (Premex, Швейцария) (материал – сталь) [8] предварительно охлаждали до температуры 4°C. С целью поддержания влажности в камере во время консервации на дно наливали дистиллированную воду до уровня в 1 см. После помещения сердца в камеру проводили продувку последней экспериментальной газовой смесью с целью вытеснения воздуха. Далее плотно закрывали камеру и нагнетали газовую смесь до достижения требуемого избыточного давления. Камеру помещали в емкость, наполненную водой (4°C) для стабилизации температуры и убирали на хранение в холодильник (4°C). После хранения камеру извлекали из холодильника и проводили дегазацию в течение 15 мин, плавно в ручном режиме сбрасывая давление до атмосферного. Все работы с газом выполняли под вытяжкой.

Сердце крысы после консервации подключали к стенду isolatedHEART-SR (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Германия). Перфузию осуществляли оксигенированным раствором Тироде при температуре 37°C и давлении 80 мм рт. ст. В левый желудочек вводили латексный баллон собственного изготовления объемом 0.5 мл, подключенный к датчику для регистрации развиваемого давления и частоты сердечных сокращений. После 30-минутного периода стабилизации проводили снятие экспериментальных данных при помощи программного обеспечения isolated HEART. Исследуемые параметры регистрировали в интервале с тридцатой по сороковую минуты работы сердца на стенде. В данном

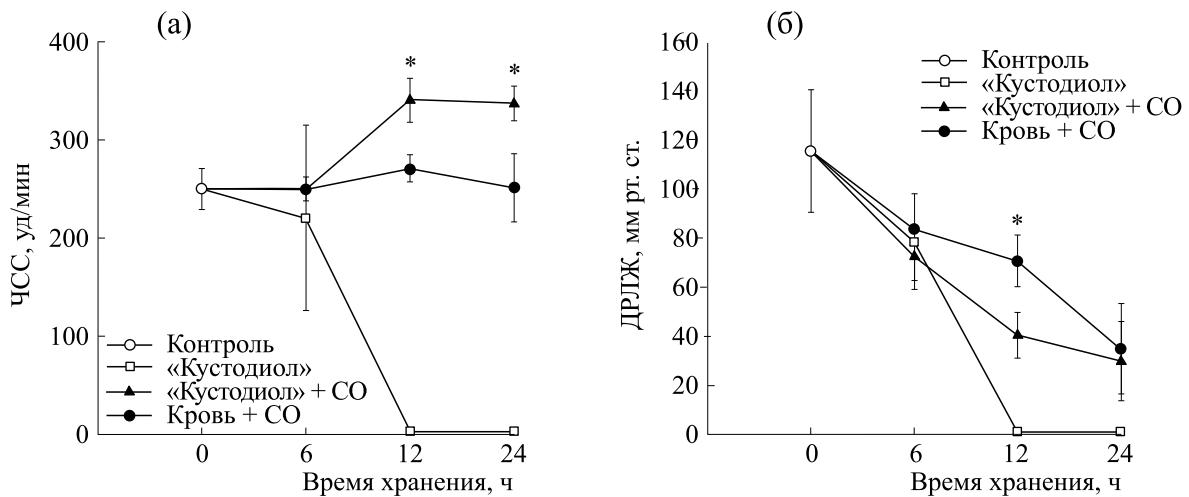


Рис. 1. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 6-, 12- и 24-часовой консервации при 4°C в группах: I «Контроль» ($n = 3$) – сердце, не подвергнутое процедуре консервации; II «Кустодиол» ($n = 9$) – хранение в консервирующем растворе «Кустодиол»; III «Кустодиол + CO» ($n = 9$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси CO/O₂ (1 : 1), после обработки органа консервирующим раствором «Кустодиол»; IV «Кровь+CO» ($n = 9$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси CO/O₂ (1 : 1). (а) – Частота сердечных сокращений, (б) – давление в левом желудочке. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение, статистическую значимость различий оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни (* – $p < 0.01$), звездочки показывают достоверность различий экспериментальных данных между группами «Кустодиол+CO» и «Кровь+CO» на одинаковых временных интервалах.

временном промежутке отбирали 10 точек с диастолическим давлением в интервале от 5 до 10 мм рт. ст.

Для групп III «Кустодиол+CO», время хранения 6 часов и IV «Кровь+CO», время хранения 6 часов были проведены дополнительные эксперименты (6 крыс). После подключения сердца к стенду был добавлен период оксигенированной гипотермической перфузии (ОГП) раствором Тироде. Начальная температура раствора составляла 10°C, спустя 5 мин перфузии осуществляли плавный нагрев раствора до 37°C в течение 15 мин. После нагрева раствора и сердца до нужной температуры выполняли описанные ранее манипуляции.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США); данные выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Значения с $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка функциональной активности изолированного сердца крысы после 6–24 часов газовой гипотермической консервации. Показатели частоты сердечных сокращений в группе II «Кустодиол» регистрировали только после 6 ч гипотермического хранения. Они составили 220 ± 99 уд/мин (рис. 1а) при уровне нативного контроля 250 ± 21 уд/мин

(группа I «Контроль»). При 12-часовом и 24-часовом хранении сердце в группе «Кустодиол» не восстановило функциональную активность. В группе III «Кустодиол+CO» после 6 ч консервации показатель частоты сердечных сокращений составил 250 ± 12 уд/мин, после 12 и 24 ч консервации – 340 ± 22 и 365 ± 51 уд/мин соответственно. В группе IV «Кровь+CO» показатели достоверно не отличались от нативного контроля на всех временных интервалах гипотермической консервации, составив 249, 272 ± 15, 244 ± 54 уд/мин для 6, 12 и 24 ч хранения органа.

Анализ групп II «Кустодиол», III «Кустодиол+CO» и IV «Кровь+CO» со сроками хранения 6, 12 и 24 ч при температуре 4°C показал, что с увеличением времени консервации наблюдается постепенное снижение силы сокращения левого желудочка во всех представленных группах (рис. 1б). Так, спустя 6 ч консервации давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), снизилось со 116 ± 25 мм рт. ст. (группа I «Контроль») до 79 ± 20 и 73 ± 10 мм рт. ст. для групп II «Кустодиол» и III «Кустодиол+CO». В группе IV «Кровь+CO» восстановление функциональной активности наблюдали только в одном эксперименте из трех; при этом среднее значение ДРЛЖ составило 84 мм рт. ст. После 12 ч хранения в группе II «Кустодиол» не регистрировали восстановления функциональной активности. В группах III «Кустодиол+CO» и IV «Кровь+CO» показатель ДРЛЖ составил 40 ± 10 и 71 ± 11 мм рт. ст. соответственно. Спустя 24 ч хранения показатели ДРЛЖ данных

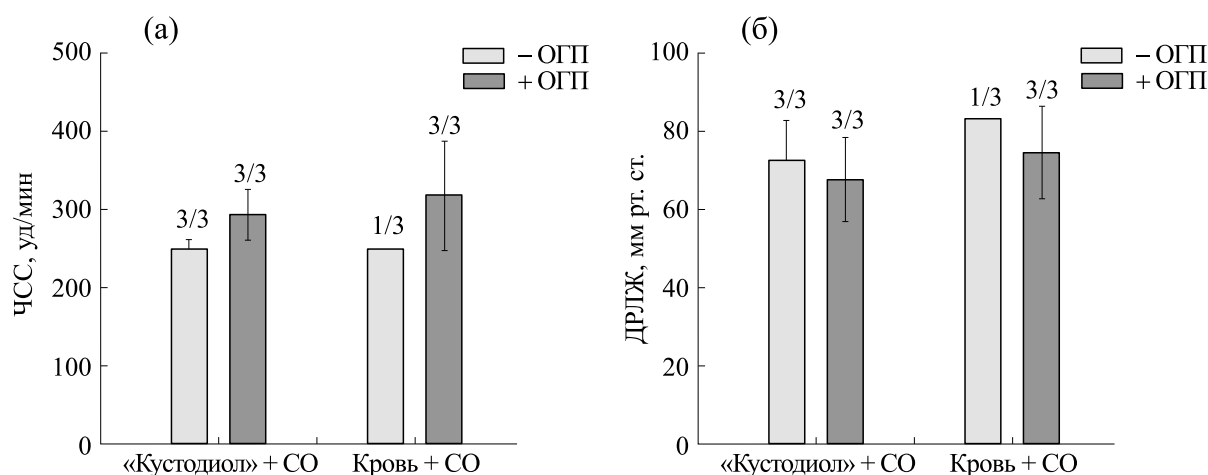


Рис. 2. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 6-часовой консервации при 4°C в группах: III «Кустодиол + СО» ($n = 3$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси СО/О₂ (1 : 1), после обработки органа консервирующим раствором «Кустодиол»; IV «Кровь + СО» ($n = 3$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси СО/О₂ (1 : 1); «-ОГП» – сердца, перфузированные по стандартному протоколу; «+ОГП» – сердца, подвергнутые оксигенированной гипотермической перфузии. (а) – Частота сердечных сокращений, (б) – давление в левом желудочке. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

групп снизились до 31 ± 9 и 35 ± 19 мм рт. ст. соответственно.

Оценка влияния оксигенированной гипотермической перфузии на восстановление функциональной активности изолированного сердца крысы после 6-часовой газовой гипотермической консервации. С целью повышения выживаемости в группе «Кровь+СО» на временном интервале 6 ч было принято решение добавить в процесс восстановления сердца стадию короткой оксигенированной гипотермической перфузии. После введения ОГП все сердца экспериментальных групп III «Кустодиол+СО» и IV «Кровь+СО» восстановили функциональную активность и не имели достоверных отличий по показателям частоты сердечных сокращений и ДРЛЖ. Частота сердечных сокращений составила 293 ± 33 уд/мин в группе «Кустодиол+СО» и 318 ± 70 уд/мин в группе «Кровь+СО». Давление, развиваемое левым желудочком, составило при этом 68 ± 11 мм рт. ст. в группе «Кустодиол+СО» и 75 ± 12 мм рт. ст. в группе «Кровь+СО» соответственно (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании нами была продемонстрирована важность тщательного подбора консервирующего кардиоплегического раствора при газовой гипотермической консервации сердца, на примере использования раствора «Кустодиола». «Кустодиол», являющийся наряду с «Виаспаном», одним из двух наиболее популярных растворов хранения донорских органов в мире [9] и основным консервирующим раствором в России [12], продемонстрировал относительно низкую эффек-

тивность при консервации сердца в газовой смеси СО+О₂. После 12 ч хранения показатель ДРЛЖ в группе III «Кустодиол+СО» снизился до $34 \pm 9\%$ от показателя интактного контроля, принятого за 100%. В то же время в группе IV «Кровь+СО» данный показатель оказался достоверно выше, составив $61 \pm 9\%$. При сроке хранения 24 ч мы не зафиксировали достоверных отличий ДРЛЖ в обеих группах. При этом частота сердечных сокращений в группе III «Кустодиол+СО» возросла после 12 ч хранения в среднем на $36 \pm 9\%$ от контроля, что может быть связано с компенсацией потери сократимости левого желудочка. Полученные результаты могут быть объяснены в аспекте известных и предполагаемых механизмов действия использованных в процессе консервации компонентов: газовой смеси и раствора «Кустодиола».

Монооксид углерода входит в группу тканевых газовых мессенджеров, обладает высокой реакционной способностью, играет важную роль в регуляции физиологических и патологических реакций, а также повышает эффективность консервации органов теплокровных животных, значимо пролонгируя срок гипотермического хранения. [7, 8, 13, 14]. К основным эффектам воздействия монооксида углерода на ткани относят сосудорасширяющие (регуляция тонуса гладкой мускулатуры), противовоспалительные, (регуляция экспрессии и высвобождения различных цитокинов) и антиапоптотические (ингибирование клеточного пути апоптоза в митохондриях при определенных условиях) [15]. О втором компоненте газовой смеси – кислороде известно, что он оказывает положительное влияние на сохранность

органа при консервации. Так, присутствие кислорода в растворе эсмолаола при многодозной кристаллоидной кардиоплегии обеспечивает полную защиту миокарда в течении 90 мин при 37°C и превосходит классический способ консервации раствором St. Thomas. [16]. В работе [17] было показано, что многодозная кислородная холоднокровная кардиоплегия превосходит однократную дозу раствора «Кустодиола» в отношении сохранения систолической функции левого желудочка после 60-минутного пережатия аорты на модели свиньи. Ранее в работе [18] мы предположили, что протективное действие смеси газов при консервации обусловлено сочетанным действием на клеточное дыхание, которое приводит к поддержанию определенного предположительно сниженного, но стабильного уровня аэробного метаболизма в процессе консервации. Поддержание последнего не дает клеткам переключиться на анаэробный тип дыхания, сопровождающийся накоплением молочной кислоты, снижением продукции АТФ и далее каскадом гипоксических нарушений. Другим важным механизмом протективного действия газовой смеси может быть защита от апоптоза, т.к. апоптотическая гибель клеток трансплантата до и после реперфузии, с активацией инициаторных и эффекторных каспаз, оказывает значимую роль в инициировании воспаления и последующем некротическом повреждении тканей [19]. Монооксид углерода взаимодействует в клетке со множеством содержащих в своем составе переходные металлы (Fe, Cu) структур, основным из которых является гем [20]. Воздействуя на митохондрии, монооксид углерода путем снижения проницаемости мембраны, ингибирования высвобождения цитохрома C, подавления активации каспазы-3 и каспазы-9 предотвращает апоптоз при ишемии—реперфузии [21–24].

Действие раствора «Кустодиола» направлено на сохранение ионного баланса в условиях остановки работы Na^+/K^+ -насоса, вызванной истощением внутриклеточной АТФ, предотвращение клеточного отека за счет высокой осмолярности, снижение в целом энергетических потребностей ткани миокарда, что поддерживает восстановление сократительной функции сердца после имплантации и реперфузии [25]. По-видимому, описанные свойства в значительной мере теряют смысл в условиях поддержания стабильного уровня аэробного метаболизма в тканях. В то же время, часть компонентов, входящих в состав раствора, может стать источником цитотоксичности. Так, показано, что механизм токсичности гистидина, усиливающего осмотическую компоненту раствора «Кустодиола», обусловлен проникновением его в клетки и образования окислительно-восстановительных комплексов с клеточным хелатируемым железом с последующей

генерацией активных форм кислорода [26]. Недавно был описан новый тип токсического действия, связанный с действием хлоридов и Cl-активированной индукцией апоптоза [27].

В нашей работе в группе «Кровь+СО» при сроке хранения органа, равном 6 ч, наблюдалась быстрая остановка сердца в двух экспериментах из трех после подключения к перфузионному стенду. Было высказано предположение о необходимости удаления накопленных метаболитов и возможном ишемически-реперфузионном повреждении органа за счет более высокого уровня активности митохондриального комплекса при малом времени хранения, а также повышения уровня сукцината при тепловой ишемии до момента консервации. Для снижения возможных повреждающих факторов реперфузии мы использовали протокол медленного отогрева с перфузией холодным оксигенированным раствором в течении 5 мин при 10°C и последующем отогреве в течении 15 мин до 37°C. Все сердца восстановили функциональную активность левого желудочка; полученные данные достоверно не отличались в группах «Кровь+СО» и «Кустодиол+СО», составив при этом $64 \pm 11\%$ и $58 \pm 10\%$ ДРЛЖ от начального значения. Описанный выше подход гипотермической кислородной перфузии (Hypothermic oxygenated perfusion –НОРЕ) в последнее время активно исследуется с целью улучшения состояния ишемизированных органов и их восстановления до момента трансплантации реципиенту. В различных исследованиях продемонстрировано положительное воздействие НОРЕ на уменьшение окислительного стресса, улучшение функции органов и снижение гибели клеток [28]. Применение НОРЕ в течении 3 ч способствует обращению вспять метаболического истощения печени крыс, вызванного гипотермическим хранением [28]. В исследовании [28] было показано, что одночасовое лечение НОРЕ после 60-минутной тепловой ишемии *in situ* с последующим 6-часовым хранением в холоде привело к улучшению выживаемости печени свиней после трансплантации. В результате использования данного подхода не наблюдалось ни одного случая первичной нефункциональности, определяемой тяжелой коагулопатией, отсутствием функции печени и тяжелым ацидозом [29]. В работе на крысиных сердцах 30-минутной НОРЕ было достаточно для восстановления клеточных уровней АТФ, а также для уменьшения повреждения клеток и сердечной дисфункции во время нормотермической перфузии сердец после 20-минутной тепловой ишемии.

В нашем исследовании показано, что «Кустодиол», являющийся золотым стандартом хранения сердца в России, не проявляет синергических эффектов при сочетанном использовании с консервирующей газовой смесью. При этом показана

высокая сохранность сердца при консервации органа, не отмытого от крови. Данный факт может найти свое применение при длительной газовой гипотермической консервации с применением кровяной кардиоплегии или плегии с добавлением элементов крови к кристаллоидным растворам. Показано, что данные варианты плегии при малых временах хранения в условиях стандартной консервации обеспечивают более высокую защиту миокарда по сравнению с кристаллоидными растворами [30, 31]. Использование кровяной кардиоплегии и газовой смеси CO+O₂ может стать перспективным вариантом для улучшения выживаемости трансплантата и сохранения его функции при временах хранения от 6–24 ч. Другим возможным направлением применения газовой консервации с использованием крови может стать сохранение травматически ампутированных конечностей в результате раздалвления и отрыва [32]. При данном типе повреждения не всегда возможно оперативно обнаружить главную артерию для введения раствора с целью сохранения ткани. Дальнейшее исследование и адаптация данного подхода для травматически потерянных конечностей может дать дополнительное время, необходимое для транспортировки в медицинское учреждения с целью реплантации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90132\20.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. А. Альсов, А. Ф. Фомичев, Д. В. Доронин и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов, **20** (1), 110 (2018).
2. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, Ю. В. Дмитриев и др., Регионарное кровообращение и микроциркуляция, **13** (3), 4 (2014).
3. О. Н. Резник, А. Е. Скворцов, Я. Г. Мойсюк, Альманах клинич. медицины, **48** (3), 193 (2020).
4. T. M. Suszynski, M. D. Rizzari, W. E. Scott, et al., J. Cardiothorac. Surg., **8**, 105 (2013).
5. Е. Г. Старикова, Дис. ... д-ра мед. наук (Сибирский государственный медицинский университет, 2014).
6. A. Nakao, J. S. Neto, S. Kanno, et al., Am. J. Transplant., **5** (2), 282 (2005).
7. N. Hatayama, M. Inubushi, M. Naito, et al., Sci. Rep., **6**, 32120 (2016).
8. Е. Е. Фесенко, Е. Л. Гагаринский, А. С. Аверин и др., Биофизика, **65** (4), 780 (2020).
9. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, М. С. Васильева и др., Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, **9** (4), 353 (2010).
10. D. M. Rudd and G. P. Dobson, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **142** (6), 1552 (2011).
11. C. Suzuki, N. Hatayama, T. Ogawa et al., Int. J. Mol. Sci., **21** (22), 8858 (2020).
12. <https://www.rlsnet.ru/regdoc/kustodiol-p-n01465601-52408>.
13. A. Nakao and A. M. Choi, N. Murase, J. Cell. Mol. Med., **10** (3), 650 (2006).
14. W. Adach and B. Olas, Future Med. Chem., **11** (1), 61 (2019).
15. H. H. Kim and S. Choi, Int. J. Mol. Sci., **19** (8), 2381 (2018).
16. J. D. McCully, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **124** (2), 219 (2002).
17. T. Fannelop, G. O. Dahle, P. R. Salminen, et al., Ann. Thorac. Surg., **87** (4), 1205 (2009).
18. А. Е. Гурин, Е. Л. Гагаринский, Е. Е. Фесенко (мл.), Биофизика, **66** (5), 964, (2021).
19. K. S. Ozaki, S. Kimura, N. Murase, Transplantation Rev., **26** (2), 125 (2012).
20. D. Němeček, M. Dvořáková, and M. Sedmíková, Int. J. Biochem. Mol. Biol., **8** (1), 1 (2017).
21. C. S. Queiroga, A. S. Almeida, C. Martel, et al., J. Biol. Chem., **285** (22), 17077 (2010).
22. X. Wang, Y. Wang, H. P. Kim, et al., J. Biol. Chem., **282** (3), 1718 (2007).
23. M. Kondo-Nakamura, K. Shintani-Ishida, K. Uemura, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **393** (3), 449 (2010).
24. H. B. Barner, Ann. Thorac. Surg., **52** (6), 1354 (1991).
25. T. Radovits, L. Lin, J. Zotkina, et al., J. Heart Lung Transplantation, **27** (2), 208 (2008).
26. U. Rauen, S. Klempt, and H. de Groot, Cell Mol. Life Sci., **64** (2), 192 (2007).
27. S. Loganathan, T. Radovits, K. Hirschberg, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **139** (4), 1048 (2010).
28. P. Dutkowski, K. Furrer, Y. Tian, et al., Ann. Surg., **244** (6), 968 (2006).
29. O. de Rougemont, S. Breitenstein, B. Leskosek, et al., Ann. Surg., **250** (5), 674 (2009).
30. S. M. Minasian, M. M. Galagudza, Y. V. Dmitriev, et al., Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg., **20** (4), 510 (2015).
31. M. Sobieraj, M. Kilanowska, P. Ładziński, et al., Kardiochir. Torakochirurgia Pol., **15** (2), 86 (2018).
32. S. B. Wijayaratna, H. J. Suraweera, M. D. Lamawansa, et al., Injury, **39** (2), 203 (2008).

Influence of Custodiol on Preservation of the Isolated Rat Heart during Hypothermic Storage in a High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen

A.E. Gurin*, E.L. Gagarinsky*, and E.E. Fesenko (Jr.)*

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

The effects of Custodiol, a preservation solution, on heart rate and contractility in the isolated rat heart were evaluated following a prolonged hypothermic (+4°C) preservation in a 6.5 atm gas mixture of carbon monoxide and oxygen. The isolated rat hearts were preserved under 6.5 atm for 6, 12 and 24 hours. It has been shown that Custodiol, which in Russia is the gold standard for heart preservation, does not exert synergistic effects when used in combination with a protective gas mixture. In the rat hearts after being preserved with the use of Custodiol solution under high pressure of gas mixture for 12 hours, left ventricular contractility fell to $34 \pm 9\%$ of the intact control, taken as 100%. At the same time, in the hearts preserved without the use of Custodiol, this value was significantly higher, $61 \pm 9\%$. After 6 and 24 hours of preservation, there were no significant differences in pressure generated by the left ventricle between rat hearts preserved with and without the preservation solution: contractility reduced by about 75% (6 hours) and 30% (24 hours) as compared to control. It was shown that the heart was preserved better if the blood was not washed out. This fact can find its application in long-term gas hypothermic preservation with the use of blood cardioplegia or plegia with addition of blood elements to crystalloid solutions.

Keywords: carbon monoxide, Custodiol, preservation solution, gas, organ, preservation, heart, rat, conservation, hypothermia

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ В БИОФИЗИКЕ, НЕВРОЛОГИИ И ДРУГИХ ОБЛАСТЯХ, ОТРАСЛЯХ И РАЗДЕЛАХ МЕДИЦИНЫ

© 2022 г. В.П. Реутов*, #, Л.А. Давыдова**, ##, Е.Г. Сорокина***, ###

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутлерова, 5а, Москва, 117485, Россия
#E-mail: valentinreutov@mail.ru

**Белорусский государственный медицинский университет, просп. Дзержинского, 83, Минск, 220116, Беларусь
##E-mail: la-davydova@yandex.by

***Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Ломоносовский просп., 2, Москва, 119991, Россия
###E-mail: sorokelena@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 05.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Описан один из методов создания нового центра местной нейрогуморальной регуляции – метод ганглиопексии, основанный на образовании новых нервных и сосудистых связей. Анализируются перспективы развития этого метода. Обсуждаются также новые концепции о циклах оксида азота и супероксидного анион-радикала. Анализируется их возможная роль в защите клеток и организма в целом от оксидативного и нитрозативного стресса, развивающихся в тех случаях, когда (в 5–30% случаев) наблюдается появление деструктивных изменений в перемещенном ганглии, приводящих к сосудистым осложнениям и повышению риску летальности. Также анализируются механизмы, способные защитить нервные клетки, предотвратить развитие в них деструктивных изменений и снизить риск летальности.

Ключевые слова: ангиогенез, ганглиопексия, клеточные технологии, нитраты, нитриты, оксиды азота, циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала, принцип цикличности, голографический принцип.

DOI: 10.31857/S0006302922050209, EDN: JKPWNC

Идея никогда не рождается в толпе; она зарождается обыкновенно в уме одного человека; если этот человек выделяется из толпы и увлекает ее за собой, то он вскоре находит других людей, которые имеют с ним родственность, и тогда составляется научная школа.

Георг Брандес (1842–1927)

Одной из актуальных задач современной биологии и медицины является восстановление функции органа, нарушенной в результате разрыва его связей с центральной нервной системой (ЦНС) вследствие заболевания, травмы или трансплантации органа [1–10]. В настоящее время метод *tissue engineering* – это процветающая область исследований в тканевой инженерии кожи, печени, спинного мозга, сосудов и во многих других областях регенеративной медицины от кардиологии и невропатологии до урологии [3–15].

Сокращение: ЦНС – центральная нервная система.

Цель тканевой инженерии – конструирование и выращивание вне организма человека живых, функциональных тканей или органов для последующей трансплантации пациенту с целью замены или стимуляции регенерации, поврежденных органа или ткани [16–20, 21]. Иными словами, на месте дефекта должна быть восстановлена *трехмерная* структура ткани.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Изготовление живых структур с желаемой топологией, структурой и функциональными свойствами. Изготовление живых структур с желаемой топологией, структурой и функциональными свойствами требует междисциплинарных подходов и усилий практиков в области физических/биофизических, биологических и технических наук [22–27]. Известны исследования Института регенеративной медицины в Северной Каролине (США) и его директора – профессора Дж.Э. Атала (рис. 1) [2, 16–19].

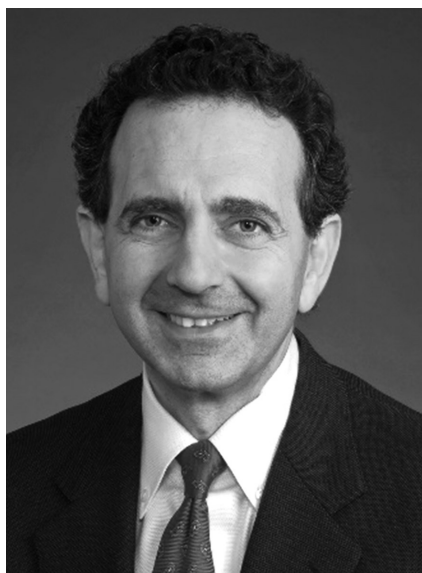


Рис. 1. Джон Энтони Атала (род. 1958, Перу). В настоящее время проф. Дж. Э. Атала – директор Института регенеративной медицины, Wake Forest in North Carolina (США), заведующий кафедрой урологии Медицинской школы, Wake Forest in North Carolina (США), профессор отделения передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины 1-го Московского Государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Один из пионеров регенеративной медицины. В 2011 г. д-р Э. Атала был избран членом Института медицины Национальной академии наук и назван «Врачом года» (номинация журнала «Scientific American») за его вклад в изучение регенерации клеток, тканей и органов.

Известны также биологические инженерные подходы без применения каркасов, основанные на 3D-печати [21, 23, 25–30]. Авторы ряда работ описывают методы, в которых используют собирающиеся в структуры многоклеточные единицы, основанные на принципах морфогенеза раннего развития, такие как сортировка клеток и слияние тканей, использование плюропотентных стволовых клеток [31–36]. Нередко современные методы требуют подготовки структур тканей и органов *in vitro* с последующей их имплантацией [37–40]. Однако по мере развития метода тканевой инженерии становится очевидным, что в конечном итоге наилучший подход состоит в том, чтобы, основываясь на механизмах самосборки и самоорганизации клеток и используя врожденную способность тканей к регенерации внутри самого организма, предложить естественные или природные способы восстановления структуры и функции тканей. Основоположником таких подходов создания тканеинженерных конструкций и метода ганглиопексии является белорусский ученый академик Давид Моисеевич Голуб (1901–2001) (рис. 2) [41–57]. Его ученики и последовате-



Рис. 2. Академик НАН Беларуси Давид Моисеевич Голуб (1901–2001). Аналогов исследований, которые проводил Д.М. Голуб, долгое время не было ни в нашей стране, ни за рубежом. Для школы Д.М. Голуба характерен широкий комплекс эмбриологических, анатомических, гистологических, гистохимических методов с применением методов люминесцентной и электронной микроскопии. В 1998 г. Международный Биографический Центр (Кембридж, Великобритания) включил Д.М. Голуба в число 2000 выдающихся ученых XX столетия в связи с особым вкладом в области анатомии и эмбриологии.

ли в медицинской практике внедрили и реализовали достижения этого ученого [42, 43, 45, 48, 50, 52, 54–57].

Достижения белорусских и российских ученых. Идеи нервизма, трофической функции нервной системы и развития нервно-дистрофического процесса как основы развития любого патологического процесса, были весьма популярны в годы творческой активности Д.М. Голуба. Этими идеями были пронизаны труды известных физиологов – И.М. Сеченова, И.П. Павлова, Л.А. Орбели, А.Д. Сперанского. Достаточно вспомнить, что основной труд А.Д. Сперанского «Элементы построения теории медицины» восемь раз номинировался на соискание Нобелевской премии еще при жизни ученого и при поддержке первого русского Нобелевского лауреата по физиологии и медицине академика И.П. Павлова [58]. Ученики А.Д. Сперанского – Г.Н. Крыжановский и Я.И. Ажипа, создавшие труды, вошедшие в историю физиологии XX века, – были преемниками и продолжателями идей вышеназванных ученых-классиков физиологии. Настоящая работа включает, продолжает и развивает идеи указанных ученых. Она написана учениками Д.М. Голуба (Л.А.Д) и Я.И. Ажипы (В.П.Р.) [54, 59–61].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ОРГАНА, НАРУШЕННОЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ РАЗРЫВА ЕГО СВЯЗЕЙ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМОЙ

Одной из актуальных задач современной медицины, как указывалось выше, является восстановление функции органа, нарушенной в результате разрыва его связей с центральной нервной системой вследствие заболевания, травмы или трансплантации органа. В этом направлении с 60-х годов прошлого столетия проводились научные исследования в лаборатории морфологии Института физиологии НАН Республики Беларусь под руководством выдающегося белорусского ученого — эмбриолога и нейроморфолога, академика, доктора медицинских наук, профессора, лауреата Государственной премии СССР Д.М. Голуба.

Эмбриогенез вегетативной (автономной) нервной системы и выявление закономерностей дифференцировки тканей и органов в связи с их иннервацией в различные периоды развития организма человека и животных показал, что предпозвоночные и органные вегетативные узлы формируются в результате дисперсии (рассеивания) молодых нервных клеток из основного вегетативного узла (ганглия) [41–57]. Микроганглии появляются вблизи основного ганглия. Такие структуры связаны с основным ганглием нервными волокнами. Оказалось, что микроганглии можно рассматривать как морфологическую основу для создания новых центров местной нервной регуляции внутренних органов путем трансплантации ганглиев с сохранением нервно-сосудистых компонентов. В исследованиях белорусских ученых были отработаны методики пересадки вегетативных узлов в стенку различных органов (сердце, мочевого пузыря, предстательная железа и др.), а также в толщу поперечнополосатой мышцы. На основе данных литературы и, главным образом, данных опытов сотрудников лаборатории морфологии, стало очевидным, что наиболее благоприятные результаты были получены при пересадке вегетативного ганглия с сохранением нервно-сосудистой ножки для быстрого восстановления его межнейронных/межнейронных связей и кровоснабжения [42, 46, 54]. Наличие основных и окольных (дополнительных) связей между внутренними органами и ЦНС — это еще и возможность создания новых нервных связей внутренних органов в случае полной или частичной утраты их связей с ЦНС. Наличие перекрестных связей обеспечивает двустороннюю иннервацию внутренних органов, которые могут сыграть компенсаторную роль. В процессе формирования вегетативной нервной системы афферентные нервы встречаются на всем протяжении от спинномозговых узлов до внутренних органов.

Они образуют «многоступенчатую» афферентную иннервацию внутренних органов [42–56].

Идеи о реиннервации внутренних органов путем создания для них дополнительных источников иннервации привели к разработке новых методических приемов в практике создания тканеинженерных конструкций на базе *органопексии*, когда в качестве донора используется богатый нервами и сосудами орган (например, тонкая кишка, сальник). При подшивании их к денервированному органу они являются источником новообразованных сосудов и нервов для органа реципиента. Этот метод был успешно внедрен в медицинскую практику [62, 63]. Например, известны многочисленные случаи, когда во время автокатастрофы после серьезной травмы позвоночника (перелом поясничного отдела позвоночника) пациенты становятся инвалидами даже после успешной операции по восстановлению позвоночника, потому что оказываются в состоянии недержания мочи. Это обусловлено тем обстоятельством, что в результате повреждения нервов при травме перестают работать сфинктеры мочевого пузыря. Применение метода органопексии с подшиванием тонкой кишки к стенке денервированного мочевого пузыря эффективно решало эту проблему: приводило к тому, что уже через неделю огромное количество нервов прорастали в стенку мочевого пузыря. Белорусские урологи академик Н.Е. Савченко и профессор В.А. Мохорт разработали клинический вариант операции восстановления функции мочевого пузыря при его нейрогенных расстройствах. Этот метод был успешно внедрен в медицинскую практику и получил название илеовезикопексия [62, 63]. Указанные операции (илеовезикопексии) обеспечивали реиннервацию мочевого пузыря подшитым участком тонкой (подвздошной) кишки. Благодаря применению этого метода у пациента уже через две недели, после восстановления вегетативной иннервации начинали работать сфинктеры мочевого пузыря [62, 63].

В настоящее время достижения белорусских ученых успешно реализуются в Национальных медицинских центрах здоровья детей [64–67]. Например, в детской урологии существует большая распространенность нарушений уродинамики. По данным эпидемиологических исследований каждый пятый ребенок 5–7 лет имеет расстройства мочеиспускания [65–67]. Среди нефрологических и урологических больных частота данной патологии составляет 50–60%. Одной из наиболее частых причин нарушения уродинамики является гиперактивный мочевой пузырь [64–66]. У детей он встречается значительно чаще, чем принято считать. Формирование дисфункций мочевого пузыря обусловлено задержкой созревания нервно-гуморальной регуляции акта мочеиспускания, сопровождаются гипокси-

ей/ишемией и нарушением биоэнергетики гиперактивного мочевого пузыря и систем его нервного контроля и гуморальной регуляции. Имеются многочисленные статьи, в которых рассматриваются механизмы развития первичного и вторичного ночного энуреза, который является медицинским термином для обозначения состояния недержания мочи после своего первого дня рождения. Ученые и врачи пришли к выводу: энурезы различного происхождения часто недооценивают с точки зрения страданий детей и их семей, тем не менее, существуют эффективные варианты их лечения после постановки правильного и полного диагноза. При этом в сложных и запущенных случаях применение достижения белорусских ученых является одним из наиболее эффективных методов восстановления вегетативной иннервации мочевого пузыря. Нередко в течение двух-трех недель после применения метода органопексии с подшиванием тонкой кишки к стенке денервированного мочевого пузыря начинали активно работать его сфинктеры, а дети-пациенты и их родители забывали о заболевании гиперактивного мочевого пузыря [62–67]. Таким образом, методы *ганглиопексии* – трансплантации вегетативных ганглиев на нервно-сосудистой ножке с целью создания новых центров местной нервно-гуморальной регуляции нейрогенно пораженных внутренних органов, *органопексии* с подшиванием тонкой кишки к стенке денервированного мочевого пузыря и *трункопексии*, когда в орган вживляют дистальный конец перерезанного нерва, стали революционными методами реабилитации пациентов разного возраста. Авторами и разработчиками этих методов были белорусские ученые.

Таким образом, изучение белорусскими учеными динамики эмбриогенеза нервной системы у зародышей человека позволило установить ряд важных закономерностей формирования симпатического ствола и вегетативных сплетений. Выявлены основные этапы развития вегетативных ганглиев. Основные этапы развития вегетативных ганглиев были описаны ранее [59]. Они состоят из трех стадий: первая стадия – первичная сегментация (симпатический ствол представлен узлами, которые соответствуют сегментам спинного мозга); вторая стадия – слияние первичных узлов в сплошной нервно-клеточный тяж, вдоль которого перемещаются клеточные элементы в восходящем и нисходящем направлениях, что приводит к формированию многосегментарных дефинитивных узлов. На третьей стадии развития вегетативных ганглиев происходит обособление дефинитивных узлов, а затем дисперсия (рассеивание) части молодых нейронов из основного ганглия. В результате этого вблизи основного ганглия возникают мелкие, дополнительные

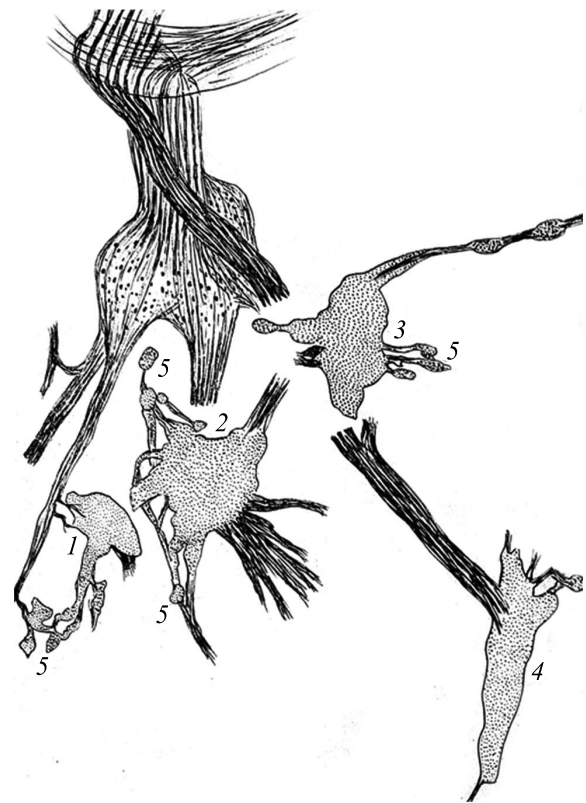


Рис. 3. Стадия дисперсии (стадия рассеивания) развития вегетативных узлов. 1 – Ресничный узел, 2 – крыловидноносовой узел, 3 – ушной узел, 4 – поднижнечелюстной узел, 5 – дополнительные микроганглии, возникшие в результате выселения нейронов из основных узлов. Графическая реконструкция (В.М. Дечко). Зародыш человека длиной 33 мм.

нервные узелки, которые связаны с основным ганглием пучками нервных волокон (рис. 3).

Быстрое восстановление кровоснабжения трансплантированного ганглия ведет к скорейшему восстановлению сохранившихся нейронов. По мере восстановления интраорганный капиллярной сети и установления контактов между рецепторными и эфферентными нейронами происходит восстановление сохранившихся нейронов [42, 68].

РОЛЬ СОСУДИСТОГО ФАКТОРА В ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ

Трансплантацией вегетативных ганглиев занимались многие исследователи для решения разных задач. В литературе имеются материалы, указывающие на важную роль сосудистого фактора при трансплантации органов. Большинство исследователей рассматривают дегенерацию нейронов пересаженного ганглия, в первую очередь, нарушением его кровоснабжения и возникновением состояния гипоксии/ишемии. Первые по-

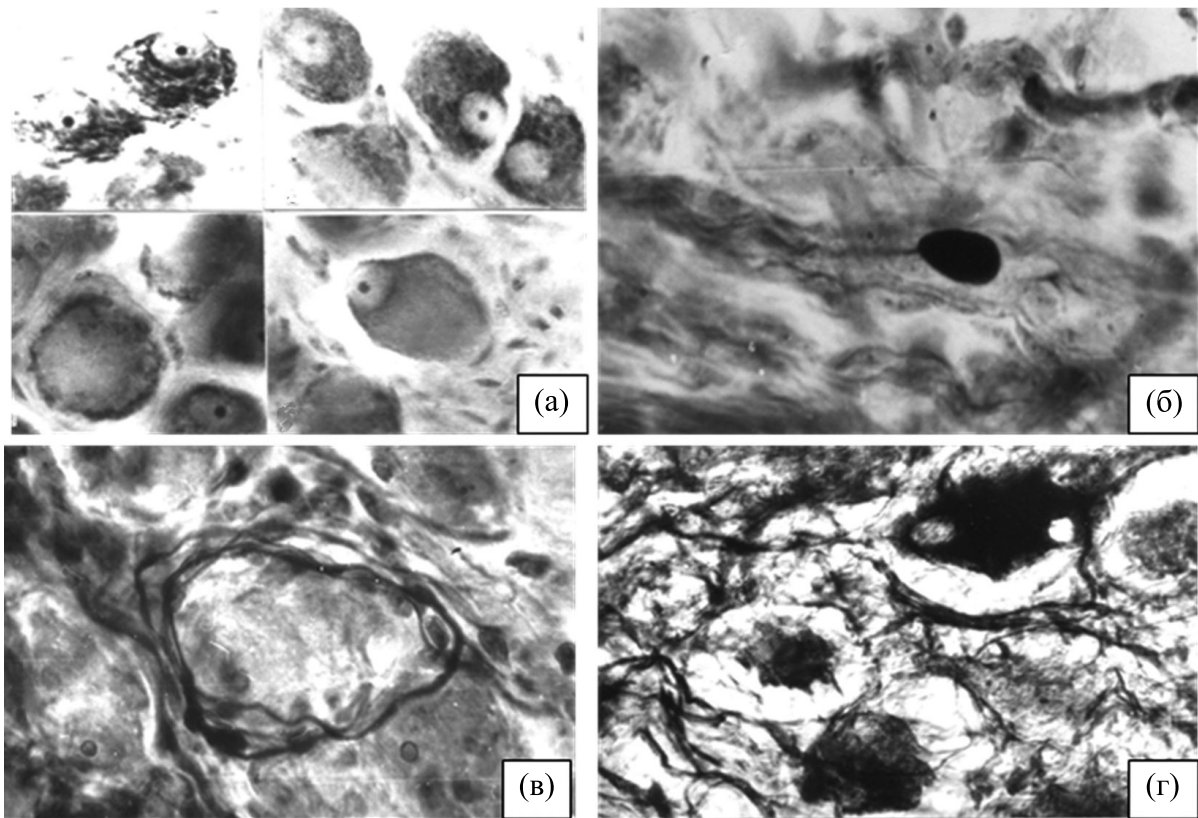


Рис. 4. Реакция нейронов и нервных волокон на трансплантацию ганглия. (а) – Нейроны каудального брыжеечного узла вторые сутки после операции в состоянии раздражения: смещение ядер на периферию, центральный, периферический и тотальный хроматолиз. Окраска по Нисслю. (б) – Колба роста, направленная в сторону мышцы. Срок наблюдения 1 месяц, импрегнация по Рассказовой. (в) – Перикапсулярное сплетение на эфферентном нейроне. Срок наблюдения 1 месяц. Импрегнация серебром по Рассказовой. (г) – Нейроны в состоянии перичеселлюлярного отека. Срок наблюдения 7 суток, импрегнация по Рассказовой.

пытки пересадки нервных ганглиев относятся к началу XX столетия [69–71]. Авторы проводили свободную трансплантацию чувствительных и симпатических ганглиев. Свободная пересадка каудального брыжеечного узла в стенку мочевого пузыря [42, 68] приводила к гибели почти всех нервных клеток. При пересадке того же узла в стенку мочевого пузыря или в толщу поперечно-полосатой мышцы с частичным сохранением его кровоснабжения по артериям, сопровождающим подчревные нервы, результат оказался наиболее оптимальным. Естественно было предположить, что нарушение при пересадке кровоснабжение ганглия компенсируется за счет ретроградного притока крови по артериям нервно-сосудистой ножки [68].

В дальнейшем операции по пересадке нервных ганглиев были усовершенствованы. Одна из таких реакций нейронов и нервных волокон на трансплантацию ганглия представлена на рис. 4. Однако при первых операциях положительного эффекта вообще не получали, так как вследствие анемии, нервные клетки погибали на шестые-де-

сятые сутки. Более устойчивыми оказывались отдельные чувствительные нейроны, расположенные по периферии узла. Успешной оказалась свободная трансплантация спинальных и симпатических ганглиев в богато васкуляризированные и иннервируемые ткани [42, 68]. Авторы, как правило, не находили серьезных деструктивных изменений в нейронах интрамуральных ганглиев трансплантата. Ряд исследователей отмечали, что лучшее приживание нейронов происходит при пересадке их в ткани, которые сами хорошо кровоснабжаются (мозг, мышца), а также в переднюю камеру глаза, жидкость которой является хорошей питательной средой.

Часть нейронов подвергается ретроградной дегенерации вследствие повреждения аксонов: набухание клеток, резкое смещение ядра на периферию, развитие центрального хроматолиза. Описанные изменения обратимы. Максимально они выражены первые две недели, затем постепенно уменьшаются и к моменту восстановления аксона исчезают. На отдельных двигательных нейронах выявляются синаптические окончания,

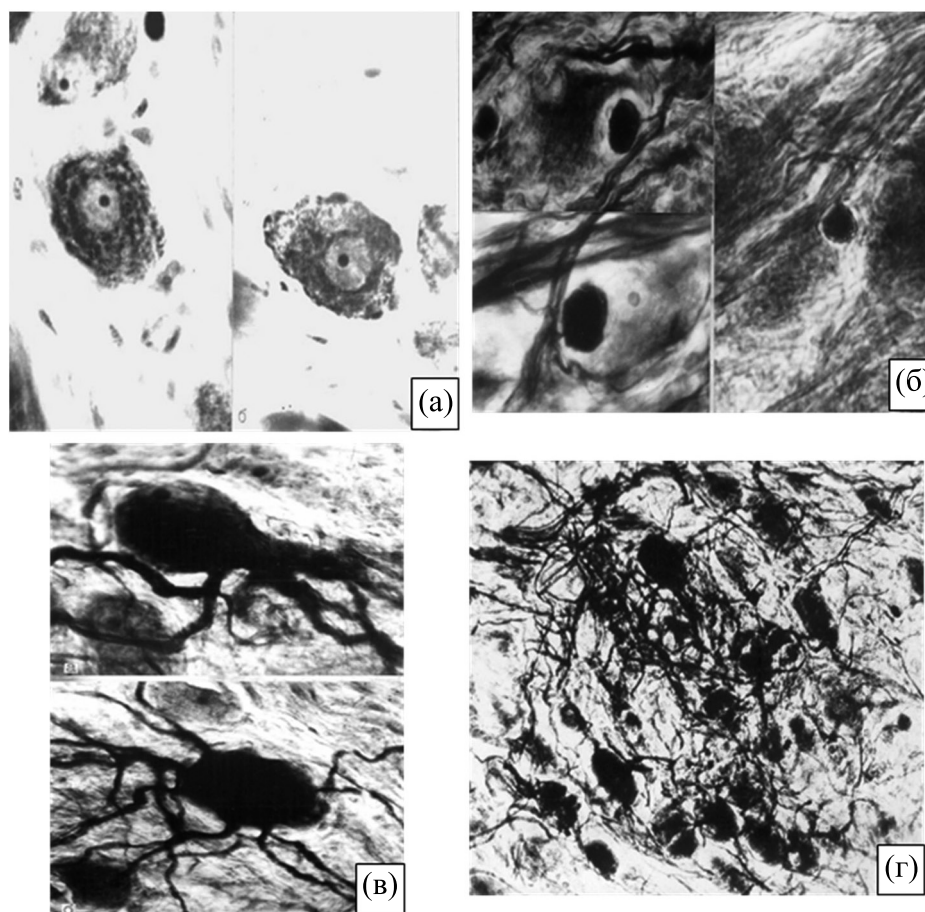


Рис. 5. Состояние нейронов трансплантированного ганглия (микрофотографии). (а) — Вещество Ниссля в нейронах трансплантированного ганглия в виде крупных глыбок и мелких зерен, заполняющих всю цитоплазму. Срок наблюдения пять с половиной месяцев. Окраска по Ниссля. (б) — Синаптические окончания на эфферентных нейронах каудального брыжеечного узла. Срок наблюдения 4 месяца. Импрегнация серебром по Рассказовой. (в) — Рецепторные нейроны пересаженного ганглия. Срок наблюдения 7 месяцев. Импрегнация серебром по Рассказовой. (г) — Многоклеточный дендритический гломерул. Срок наблюдения 4 месяца. Импрегнация серебром по Рассказовой.

имеющие вид темноимпрегнированных гипертрофированных бляшек. Вместе с тем уже в этом сроке в узле наблюдаются признаки регенерации, которые проявляются избыточным ростом нервных волокон и появлением колб роста (рис. 4б,в). Часть клеток изменяется позже вследствие утраты связи с преганглионарным волокном, подвергаясь транснейрональной дегенерации (нейроны сморщенные, атрофированные, теряют отростки, нарушаются ядерно-плазменные отношения, синаптические окончания деформированы). Эти изменения прогрессируют и приводят к гибели нейронов (рис. 4г).

Через 2.5–4 месяца среди сохранившихся клеток много двигательных нейронов, между которыми выделяются рецепторные клетки, которые называют также клетками Догеля II типа (рис. 5). К этим клеткам относят мультиполярные клетки с длинными дендритами. Клетками Догеля I типа называют эффекторные клетки, имеющие корот-

кие дендриты и длинный аксон. Клетки Догеля II типа не имеют синапсов. Другими словами, преганглионарные нейроны на них не оканчиваются. Поэтому Догель называл их чувствительными нейронами II типа. Эти клетки имеют разную форму — овальную, грушевидную, вытянутую. Выделяют также клетки Догеля III типа, которые представляют собой вставочные (ассоциативные) элементы, соединяющие своими отростками несколько клеток I и II типа. Их дендриты короткие, но более длинные, чем у клеток I типа. Однако они тоже не выходят за пределы данного ганглия, а образуют корзинчатые разветвления, оплетающие тела других клеток данного ганглия. Аксон клетки Догеля III типа идет в другой ганглий и там вступает в синаптическую связь с клетками I типа. Как правило, количество поврежденных нейронов заметно уменьшается к четырем месяцам после операции.

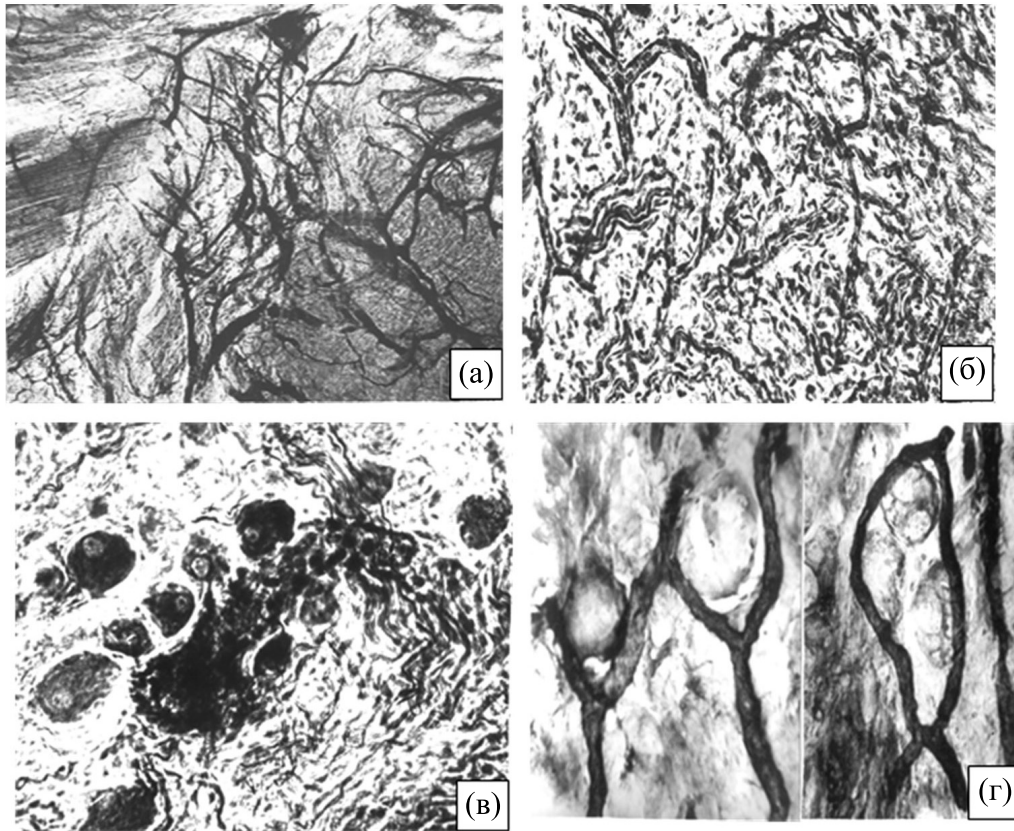


Рис. 6. Новообразованные кровеносные сосуды (капилляры) пересаженного ганглия. (а) – Новообразованные капилляры. Срок наблюдения 10 месяцев. Инъекция сосудов водным раствором туши. (б) – Новообразованные капилляры в соединительной ткани вокруг пересаженного узла. Срок наблюдения 4 месяца. Импрегнация по Рассказовой. (в) – Нейроны ганглия вокруг капилляра. Срок наблюдения пять с половиной месяцев. Импрегнация по Рассказовой. (г) – Капиллярные петли, окружающие нейроны; характеризуются высокой активностью щелочной фосфатазы. Срок наблюдения – 1 месяц. Метод Гомори.

Основное значение для сохранения нейронов каудального брыжеечного узла при трансплантации, как указывалось выше, имеет восстановление его кровоснабжения. В норме в каудальном брыжеечном узле основную массу (87%) составляют капилляры. Об их функциональной активности свидетельствует высокая концентрация щелочной фосфатазы эндотелия сосудов и хорошая окраска капилляров (рис. 6). Интенсивность кровоснабжения на периферии узла выше, чем в центре. В условиях пересадки нарушенное кровоснабжение ганглия быстро компенсируется за счет расширения сосудов, сопровождающих подчревные нервы (рис. 6а). Дополнительным источником кровоснабжения трансплантированного ганглия являются многочисленные капилляры, прорастающие из большой поясничной мышцы, по ходу которых наблюдается скопление нервных клеток (рис. 6б,в).

В каждой капиллярной петле ганглия содержится от одного до одиннадцати нейронов. Однако чаще всего встречаются один-два нейрона

(51,9%), как и в интактном ганглии. Из мышцы, на которую был трансплантирован узел, растет большое количество сосудов. Вначале это только капилляры диаметром от 1 до 3 мкм. К пяти месяцам появляются артериолы и вены, а к семи-двенадцати месяцам – артерии и вены диаметром 45–48 мкм. Артерии, сопровождающие подчревные нервы, значительно расширяются, достигая в диаметре 114–115 мкм.

Наряду с новообразованными капиллярами отмечаются многочисленные новообразованные нервные волокна в соединительной ткани, окружающей трансплантированный узел (рис. 7а). Первые нервные волокна наблюдаются уже через семь суток после операции, они безмякотные, тонкие и извитые. Через год после трансплантации количество нервных волокон значительно возрастает. Можно предположить, что одним из источников новообразованных нервов являются регенерирующие ветви подчревных нервов. Они образуют пучки, которые прорастают в мышцу, обеспечивая ее реиннервацию (рис. 7б).

Сохранению и восстановлению двигательных нейронов способствуют чувствительные клетки Догеля II типа, которые своими многочисленными отростками охватывают большое количество эфферентных нейронов, контактируя с ними (рис. 7в). Возможно, такие контакты между рецепторными и эфферентными нейронами играют определенную роль в сохранении и восстановлении моторных нейронов при их децентрализации.

НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ В РАЗВИТИИ МЕТОДА ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЯХ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

В данном подразделе мы хотели бы рассмотреть настоящее и будущее в развитии метода тканевой инженерии в различных областях регенеративной медицины. Во введении мы отмечали, что метод *tissue engineering* — это один из наиболее развивающихся методов, включающих различные подходы и приемы работы на самых разных структурно-функциональных уровнях организации живой материи [1–21, 72]. Он используется в тканевой инженерии кожи, сердца, сосудов, головного и спинного мозга. В настоящее время трудно назвать хотя бы одну область регенеративной медицины, где бы не использовали методы тканевой инженерии. Кратко назовем лишь некоторые области.

Метод тканевой инженерии в кардиологии [72–82]. Кардиология — это один из наиболее обширных разделов медицины, занимающийся изучением сердечно-сосудистой системы человека. Основными задачами кардиологии являются исследования строения и развития сердца и сосудов, их функций, а также заболеваний, включая изучение причин их возникновения, механизмов развития, клинических проявлений, вопросов диагностики, а также разработку эффективных методов их лечения и профилактики. Одним из перспективных направлений в кардиологии является использование плюрипотентных стволовых клеток для решения задач тканевой инженерии в кардиологии.

Знания о биологии плюрипотентных стволовых клеток продвинулись до такой степени, что теперь ученые и медики могут генерировать большинство клеток человеческого тела в лаборатории. Кардиомиоциты, полученные из плюрипотентных стволовых клеток, могут быть использованы как при проведении операций, так и для разработки новых лекарственных препаратов. В настоящее время плюрипотентные стволовые клетки находятся в активной фазе клинических испытаний для лечения сердца [73–81].

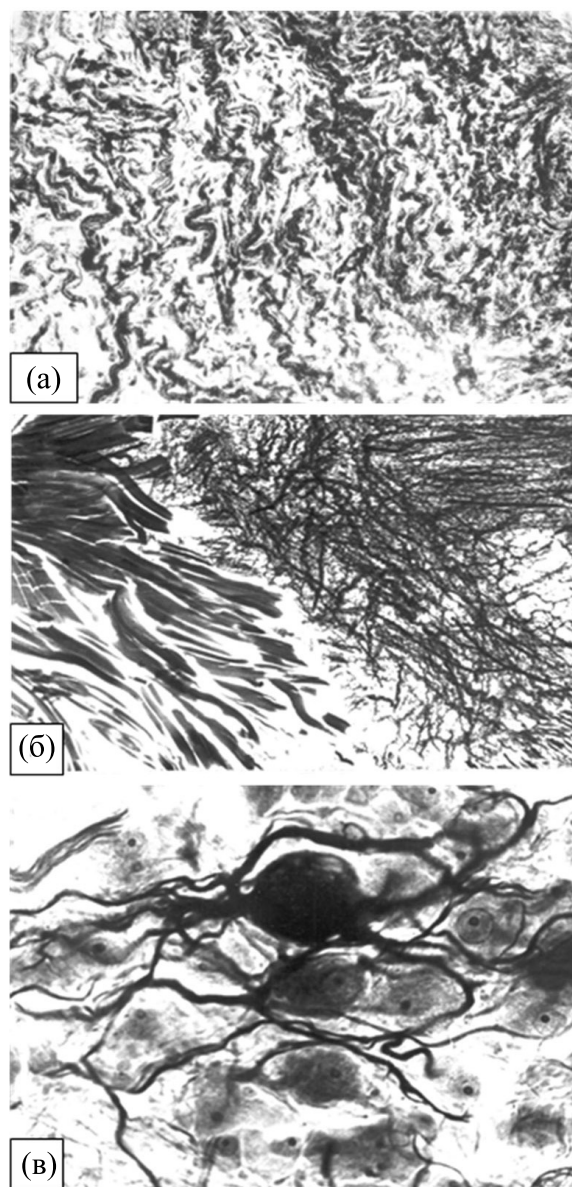


Рис. 7. Нервные волокна и рецепторные нейроны пересаженного ганглия. (а) — Новообразованные нервные волокна в соединительной ткани, окружающей трансплантированный узел. Срок наблюдения 4 месяца. Импрегнация серебром по Рассказовой. (б) — Новообразованные нервные волокна в сращении между трансплантированным узлом и мышцей. Срок наблюдения 7 месяцев. Импрегнация серебром по Рассказовой. (в) — Рецепторная клетка Догеля II типа. Срок наблюдения 7 месяцев. Импрегнация серебром по Рассказовой.

Метод тканевой инженерии в неврологии, невропатологии и психиатрии [83–90]. Неврология представляет собой обширную группу медико-биологических научных дисциплин, которая изучает нервную систему как в норме, так и в патологии. Согласно более развернутому определению неврология — это медико-биологическая наука,

изучающая строение и функции нервной системы в норме и патологии, закономерности ее фило- и онтогенеза, и, разрабатывающая методы распознавания, лечения и предупреждения ее заболеваний. Она включает анатомию, гистологию, эмбриологию и сравнительную анатомию нервной системы. Невропатология занимается изучением причин заболеваний нервной системы (этиология) и механизмов развития болезней (патогенез). Основная функция психиатрии состоит в диагностике и лечении психических расстройств. Она включает исследование различных нарушений адаптации, связанных с настроением, поведением, познанием и восприятием. Оказалось, что метод тканевой инженерии был успешно адаптирован для решения ряда актуальных задач этого направления медико-биологических наук. Рассмотрим лишь некоторые аспекты применения перспективного метода тканевой инженерии в неврологии, невропатологии и психиатрии.

В последние десятилетия активно развиваются представления об «инграммах» и «инграммных клетках», как субстратах для хранения памяти [83–86]. Авторы ряда работ исследуют и анализируют новую роль микроглии в синаптической пластичности, познании и заболеваниях. Разветвленная микроглия, традиционно считавшаяся функционально покоящейся в нормальном мозге, на самом деле очень динамична и пластична. Ослабление или потеря синапсов приводит к забыванию связанных воспоминаний [86]. Новые методы тканевой инженерии в неврологии и психиатрии способны проникнуть в «банк данных памяти и воспоминаний» человека [84–86]. Согласно современным представлениям инграмма – это полная, вплоть до мельчайших подробностей, запись каждого ощущения, имевшегося в момент полной или частичной бессознательности, вызывающая в дальнейшем отключение от рационального мышления или поведения (абerrацию) у человека. Инграммы составляют основу многих психосоматических и психических заболеваний человека [85, 86]. Считается, что в подсознании человека может одновременно находиться множество инграмм. Они могут активироваться («всплывать») под влиянием ассоциативных образов или обстоятельств и вызывать болезненное состояние организма. Считается также, что синапсы между «инграммными клетками» являются субстратами для хранения памяти, а ослабление или потеря этих синапсов приводит к забыванию связанных воспоминаний [84–86]. Исследователи обнаружили, что поглощение синаптических компонентов микроглией в гиппокампе здоровых взрослых мышей приводит к деградации памяти. Истощение микроглии или ингибирование микроглиального фагоцитоза предотвращало забывание и диссоциацию клеток

инграммы. Ученые продемонстрировали, что микроглия регулирует забывание зависимым от комплемента и активности образом [84]. Это было доказано путем введения фактора ускорения распада комплемента CD55. Комплементом называется сложный комплекс белков, формирующий каскадные системы, способные к быстрому, многократно усиленному ответу на действие первичного сигнала или патогенного фактора. Многократное усиление каскадных систем происходит за счет того, что продукт одной реакции служит катализатором последующей реакции (каскадный процесс). Кроме того, оказалось, что микроглия вовлечена как в процесс, связанный с нейрогенезом, так и в процессы деградации памяти, не связанные с нейрогенезом [85–89]. Литературные данные [85–89] позволяют считать, что имеются основания, допускающие комплемент-зависимую элиминацию синапсов с участием микроглии. Не исключено, что этот механизм можно рассматривать как один из механизмов, участвующих в процессах забывания отделенных воспоминаний [85–89]. Нарушение функции микроглии может вызывать синаптическую дисфункцию и избыточную потерю синапсов на ранних стадиях заболевания, вызывая ряд последующих патологий. Авторы работы [90] пришли к выводу, что будущее исследований механизмов обучения и памяти будет включать использование сложных молекулярных, клеточных, физиологических и поведенческих подходов, которые позволят установить причинно-следственную связь между нейронами, микроглией, памятью и другими функциями мозга. Результаты этих исследований могут быть использованы для лечения заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также другие нервно-психические расстройства. Болезнь Альцгеймера (известна также как сенильная деменция альцгеймеровского типа) – это нейродегенеративное заболевание, впервые описанное в 1907 г. немецким психиатром А. Альцгеймером (1864–1915). Как правило, эта болезнь обнаруживается у людей старше 65 лет. Однако существуют и ранние формы болезни Альцгеймера. Общемировая заболеваемость на начало и первое десятилетие XXI века (2006 г.) оценивалась в 26.6 млн человек. Болезнь Альцгеймера активно прогрессирует. Ученые и врачи предполагают, что к 2050 г. число больных может вырасти до 100 млн человек. Болезнь Альцгеймера характеризуется синаптической дисфункцией, сопровождающейся микроскопически видимым накоплением внеклеточных патологических белковых отложений (β -амилоидных и тау-белковых отложений) и клеточной дистрофией с вовлечением, как нейронов, так и глии [90]. На поздних стадиях болезни Альцгеймера наблюдается выраженная потеря синапсов и нейронов в нескольких по-разному пораженных об-

ластях мозга. Недавние исследования прогрессирующей болезни Альцгеймера с использованием посмертных образцов мозга продемонстрировали прямое участие микроглии в синаптических изменениях. Варианты гена аполипопротеина Е и триггерных рецепторов, экспрессируемых на миелиоидных клетках, определяют активность микроглии, а также метаболизма липидов в клетках ЦНС. Авторы рассматривают данные, которые могут помочь объяснить аномальный метаболизм липидов, активацию микроглии и патофизиологию синапсов, которые взаимосвязаны при болезни Альцгеймера [90].

Метод тканевой инженерии кровеносных сосудов [91–93]. Сосудистый анастомоз – это соединение между двумя кровеносными сосудами, например между артериями (артерио-артериальный анастомоз), между венами (венозно-венозный анастомоз) или между артерией и веной (артерио-венозный анастомоз). Французский сосудистый хирург А. Каррель (1873–1944) считается изобретателем сосудистых анастомозов методом оригинального сосудистого шва «конец в конец» (1905–1906). После этого изобретения восстановление и замена кровеносных сосудов стали ключом к лечению острых травм, а также хронического атеросклеротического заболевания. Известно, что артерии выполняют различные механические и биологические функции, такие как проведение крови к тканям, взаимодействие с системой свертывания крови и модулирование сопротивления кровотоку. В ранних исследованиях по замене артерий использовались искусственные материалы. В последние десятилетия применяются полимерные ткани. Благодаря достижениям в инженерии соединительных тканей, в том числе артерий, регенеративная медицина достигла такого высокого уровня развития, что эти методы стали основой хирургического лечения сосудистых заболеваний человека [91–93].

ПЕРСПЕКТИВЫ

Основная цель работы состояла не только в том, чтобы проанализировать перспективные методы тканевой инженерии, которая в настоящее время использует все современные методы физики и биофизики, неврологии и биологии, включая методы физиологии и медицины, описанные зарубежными учеными. Особое внимание в этом обзоре мы уделили исследованиям белорусских ученых, которые, опираясь на достижения российских ученых, создали новое направление в хирургии, трансплантологии/ трансплантации органов, неврологии и в других областях медицины. Однако при создании нового центра местной нейрогуморальной регуляции (метод ганглиопексии, основанный на образовании новых нервных и сосудистых связей) нередко (в 5–30% случаев)

наблюдается развитие деструктивных изменений в перемещенном ганглии, приводящих к сосудистым осложнениям, повышающих риск летальности. Причины этого явления до сих пор до конца неизвестны, механизмы не ясны, и, практически никто не знает, как можно предотвратить риск летального исхода после операций, связанных с трансплантацией вегетативных ганглиев с целью создания новых центров местной нервно-гуморальной регуляции пораженных внутренних органов. В этой работе мы хотели бы обсудить механизмы, которые способны защитить нервные клетки и предотвратить развитие в них деструктивных изменений.

Эти механизмы исследовались и развивались независимо от белорусских коллег в совершенно другом медико-биологическом контексте. Еще в 70-х годах XX века один из авторов этой работы обратил внимание на циклические процессы с участием активных форм азота и кислорода. Циклические изменения концентрации NO и $\bullet\text{O}_2$ в различных клетках тканей и в целом организме давали основания предполагать, что эти активные соединения управляются циклами NO и $\bullet\text{O}_2^-$ и являются существенной частью регуляторных механизмов клеток тканей живых организмов, защищающих клетки и организм в целом от развития оксидативного и нитрозативного стресса [94, 95]. Анализ данных литературы и результатов собственных исследований привели к формулировке и обоснованию концепций *цикла оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* [96–108]. Результаты этих исследований, их обобщения были доложены в Стокгольме в Каролинском институте и включены в работу, опубликованную в *Nature Chemical Biology* [109].

Важную роль в обосновании концепции *циклов оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* сыграли обнаруженные многочисленные нитритредуктазные реакции с участием гемсодержащих белков – гемоглобина, миоглобина, цитохромоксидазы ($\text{cyt } a + a_3$) и цитохрома P-450, которые в условиях гипоксии/ишемии способны восстанавливать ионы NO_2^- в NO. Вместе с NO-синтазными реакциями они дополнили цепочку нитритредуктазных реакций и привели к обоснованию концепции *цикла оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* [96, 101–103]. В последние десятилетия ученые разных стран мира обнаружили множественные формы гемоглобинов, как в клетках тканей млекопитающих, так и в клетках других организмов, прошедших стадии адаптации к появлению кислорода в процессе эволюции жизни на нашей планете. Одним из таких глобинов является цитоглобин (нейроглобин) центральной и периферической нервной системы с молекулярной массой 17 кДа, содержащий около

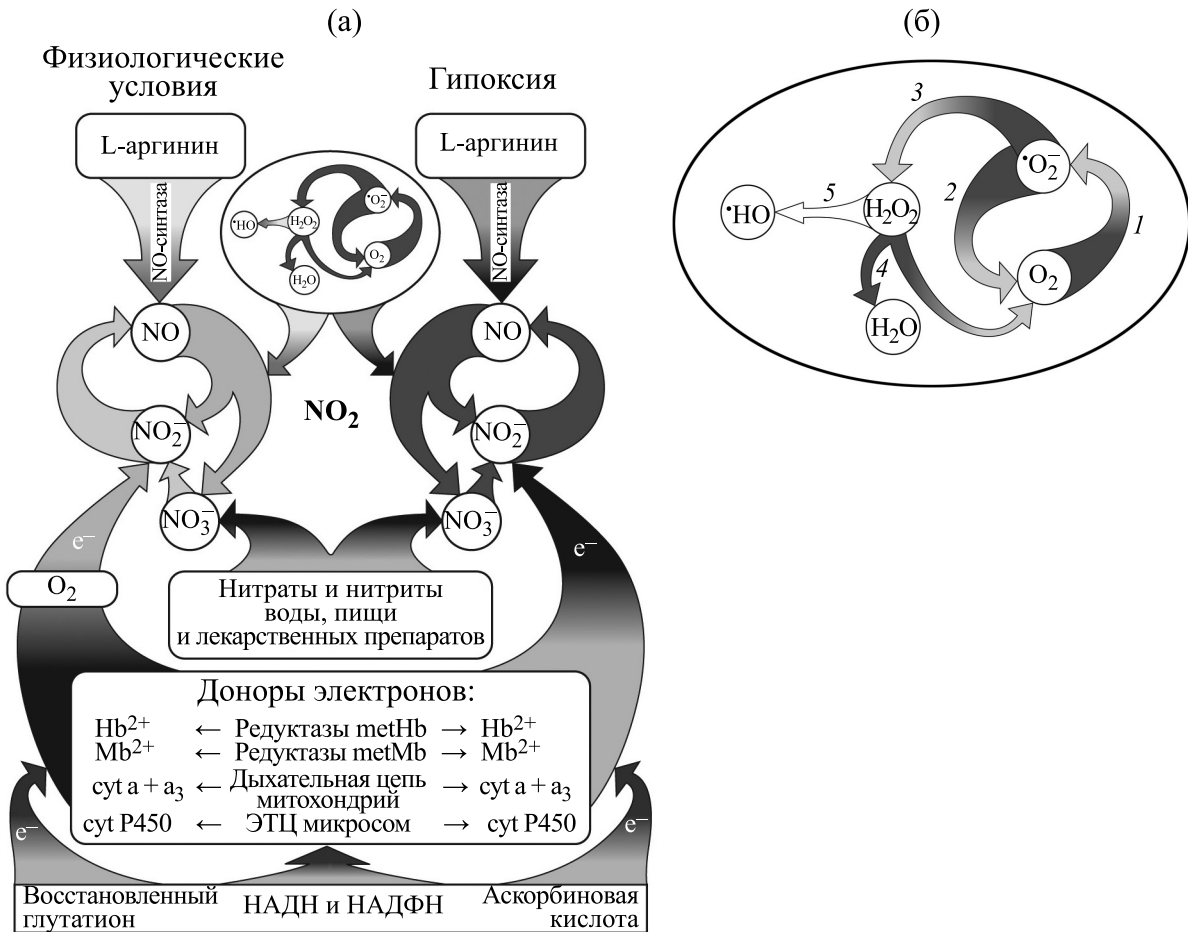


Рис. 8. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б).

150 аминокислотных остатков, последовательность которых приблизительно на 20% совпадает с таковой гемоглобина и миоглобина [110, 111]. Он также присутствует в сетчатке, эндокринных тканях и в спинномозговой жидкости. Этот белок получил второе название – нейроглобин. Первые нейроглобин был обнаружен в Германии в 2000 г., а результаты исследования были опубликованы в журнале Nature [112]. В указанных работах высказывается идея о защитной функции гемсодержащих белков от оксидативного и нитрозативного стресса (в результате связывания избытка NO и $\cdot\text{O}_2^-$). Эти идеи мы высказывали еще в 1970–1990 гг., анализируя нитритредуктазную активность гемсодержащих белков и роль циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала в защите клеток от повреждающего воздействия активных форм азота и кислорода (рис. 8). Почему эти циклы оказались столь важными для защиты клеток живых организмов от повреждений?

Общее содержание железа (Fe^{2+}) в организме составляет примерно 3–4 г. Около 70% всего же-

леза включено в состав гемоглобина эритроцитов. Гемоглобин составляет примерно 98% массы всех белков эритроцита. За счет своей структуры гемоглобин участвует в переносе O₂ и в связывании NO. Кроме того, гемоглобин переносит CO₂ от тканей к легким. Остальные 25–30% железа хранятся в виде миоглобина, цитохромов, в том числе цитохрома c, цитохромоксидазы (cyt a + a₃), цитохрома P-450, нейроглобинов, гуанилатциклазы, каталазы, пероксидазы. Кроме того, Fe²⁺ входит в состав белков, не содержащих гемогруппы – железосерных белков и флавопротеинов, содержащих железо. В связи с этим в настоящее время идея о том, что одна из основных функций всех Fe²⁺-содержащих белков и низкомолекулярных соединений состоит не только в переносе кислорода на большие расстояния, но и в связывании и нейтрализации NO и $\cdot\text{O}_2^-$, становятся все более популярными [111–117]. Без этой функции гемсодержащих белков жизнь в условиях наличия кислорода в атмосфере не могла бы развиваться, а живые организмы не смогли бы адаптироваться к

относительно новым условиям существования, возникших после появления кислорода на нашей планете. Недаром классики биологии в своих обобщениях приходили к выводу, что «история кислорода – это история жизни на Земле» (Л. Траубе). Выдающийся отечественный биофизик Н.В. Тимофеев-Ресовский неоднократно говорил в своих выступлениях: «любое биологическое исследование оказывается оправданным лишь в том случае, если оно имеет более близкий или далекий, но обязательно эволюционный выход». Он был солидарен с обобщающими выводами физиолога академика Л.А. Орбели: «мы должны стремиться к тому, чтобы каждую функцию ...рассмотреть с точки зрения истории ее формирования. Это есть вопрос об изучении эволюции функций. В одном случае мы просто прослеживаем исторический путь развития тех или иных функциональных отношений, а во втором случае мы подходим к пониманию того, в чем заключается эволюционный процесс, почему именно так протекал эволюционный процесс на основе тех функциональных превращений, которые возникали в живых организмах». На протяжении более 40 лет мы стремились установить преемственную связь развиваемых нами концепций с идеями классиков науки – Р. Вирхова, А. Пуанкаре, Л.А. Орбели, А.Д. Сперанского. Продолжая исследования и обобщение новых данных, полученных с коллективами современных ученых (Л.М. Чайлахяном, Н.В. Самосудовой, Н.П. Ларионовой) [118–131], Н.С. Косицыным [132], Л.М. Рошалем [133–135, 141, 142], В.Г. Пинелисом [136–142], Б.И. Ходоровым [139], В.М. Чертоком [144–146], В.Н. Гуриным [147] и В.Н. Швалевым [104, 145, 149–154], мы стремились связать их в единую логическую систему. Формулируя новые обобщения, мы видели, что они легко встраиваются в существующую систему знаний, и дополняют идеи нервизма, развиваемые на протяжении последних 250 лет [155]. Это позволило нам выйти на теорию *типового патологического процесса*, активно развиваемую в последние десятилетия [106]. Оказалось, что концепции циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала [95–106], *принципы цикличности и голографический принцип* [101–103, 105], над которыми мы работали на протяжении последних десятилетий, хорошо дополняют теорию типового патологического процесса [106, 156–161].

Самым существенным моментом для современной биологии и медицины мы считаем следующие выводы: 1) патология начинается с нарушения *нормальных регуляторных циклов*, которые поддерживают основные биохимические и физиологические показатели в пределах нормы; 2) *циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала с их гемсодержащими белками и системами антиоксидантной защиты (ферментативной и не-*

ферментативной) не допускают прямого взаимодействия NO и $\cdot\text{O}_2^-$ и образования диоксида азота (NO_2) и OH -радикалов, способных разрушать практически все компоненты клеток и субклеточных структур. Именно эти циклы, в первую очередь, обеспечивают нормальное протекание энергетических процессов, сопряженных с процессами дыхания; 3) нарушение указанных выше циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала ведет к переходу от нормы к развитию различных патологических процессов. Патологический процесс, развивающийся при пандемии COVID-19, не стал исключением [162–164]. Он оказался зависимым от оксидативного и нитрозативного стресса, а вещества ивер(о)мектин (полициклическое соединение, содержащее OH -группы), и ловушка NO – диэтилдитиокарбомат – оказались способными снизить смертность от COVID-19 в сотни раз [162–164].

Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала (рис. 8), выполняющие защитную функцию клеток и организма в целом, составили ядро концепции типового патологического процесса и обобщающей концепции развития патологических процессов [97–107]. Наши идеи о нитритредуктазных реакциях гемсодержащих белков, о которых мы писали еще в 70–80-х годах XX века [94], были поддержаны учеными США и Европы [109, 113–116]. Что же предшествовало развитию указанных выше концепций цикла оксида азота и супероксидного анион-радикала (рис. 8)?

В цикле оксида азота можно выделить NO -синтазную компоненту (L -аргинин $\rightarrow \text{NO}$), осуществляющую синтез NO в присутствии кислорода, и нитритредуктазную компоненту, активность которой резко возрастает в отсутствие кислорода (гипоксия/ишемия). Ионы NO_2^- , образующиеся из L -аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин, миоглобин и цитохромы (*cyt a + a₃*, *cyt P-450*), замыкать в цикл цепочку (L -аргинин $\rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$). Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы NO_2^- начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В цикле супероксидного анион-радикала происходят: 1) – восстановление O_2 и образование супероксидного анион-радикала; 2) и 3) – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксиддисмутазой; 4) – разложение пероксида водорода (H_2O_2) на воду (H_2O) и молекулярный кислород (O_2), осуществляемое ферментом каталазой; пе-

роксид водорода (H_2O_2) также разлагается с образованием двух молекул $\bullet OH$ -радикала. Циклическая регуляция активных форм азота и кислорода обеспечивает превращение этих активных, высокореакционных соединений в менее активные вещества. При нарушении циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала появляются еще более активные молекулы диоксида азота (NO_2) и пероксинитритов, вновь распадающихся на NO_2 и $\bullet OH$ -радикалы, которые повреждают основные компоненты живых организмов.

Анализ данных литературы о химических реакциях взаимодействия NO с O_2 и $\bullet O_2^-$ позволил нам сделать следующие выводы.

1. Скорость реакции убывания NO при взаимодействии с O_2 относительно невелика и соответствует скорости реакции первого порядка ($k = 0.124 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$) [165].

2. С гемсодержащими белками NO может взаимодействовать, образуя нитрозильный комплекс с Fe^{2+} в активном центре. Константа скорости взаимодействия, как правило, варьирует в пределах 10^3 – $10^7 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ в зависимости от состояния железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) и окружения гема [166].

3. Одновременное повышение содержания активных форм азота (NO и продуктов его превращения) и кислорода ($\bullet O_2^-$) приводит к тому, что они начинают взаимодействовать друг с другом в общих местах их образования со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными природными антиоксидантами, входящими в состав живых организмов. Скорость реакции NO с $\bullet O_2^-$ настолько высокая, что она ограничена только скоростью диффузии молекул друг к другу. Константы скоростей реакций для взаимодействия NO и $\bullet O_2^-$ (6.7 ± 0.9) $\cdot 10^9 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, что в 10^5 (или в 100000) раз выше, чем с известными природными фенольными антиоксидантами.

Согласно последним данным константы скорости взаимодействия 19 фенольных природных антиоксидантов в реакциях с супероксидным анион-радикалом оказались сопоставимыми. Они находятся в интервале $(6.8$ – $11.0)\cdot 10^4 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, что можно связать с небольшим влиянием структурных особенностей, в частности, с числом и положением гидроксильных групп, а также стерическими эффектами заместителей [167–169]. Поэтому при одновременном появлении достаточного количества для непосредственного взаимодействия NO и $\bullet O_2^-$ практически все антиоксидантные системы живых организмов оказываются

выключенными, а NO и $\bullet O_2^-$ начинают активно продуцировать $\bullet NO_2$, $\bullet OH$ -радикалы и анионы пероксинитритов, которые после протонирования вновь превращаются в $\bullet NO_2$ и $\bullet OH$ -радикалы. Эти соединения могут участвовать в цепных свободно радикальных процессах и способны повреждать практически все компоненты клеток. Именно поэтому все патологические процессы, развивающиеся при гипоксии/ишемии, воспалительных процессах и развитии иммунных и аутоиммунных заболеваний, связанные с образованием NO , $\bullet O_2^-$, $\bullet NO_2$ и $\bullet OH$ -радикалов, оказались зависимыми от циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. Эта способность указанных циклов, содержащих систему гемсодержащих белков и антиоксидантных систем (ферментативных и неферментативных), обусловлена связыванием или переводом NO , $\bullet O_2^-$ в менее активное состояние.

Эти идеи, высказанные химику (по образованию), вице-президенту АН СССР, академику АН СССР Ю.А. Овчинникову, и идеи о защитной роли циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала (в самой простейшей форме) были поддержаны для дальнейшего их воплощения в решение практических задач здравоохранения. Дело в том, что на протяжении 18 лет в СССР (1962–1980 гг.) отмечалось снижение средней продолжительности жизни. Причины этого явления были неизвестны. Поэтому на первом этапе преодолеть снижение средней продолжительности жизни в СССР стремились именно за счет увеличения количества врачей, больниц и поликлиник. За 69 лет в СССР (1922–1991 гг.) количество докторов в стране выросло более чем в 60 раз, с 10.9 тыс. в 1921 г. до 667.3 тыс. в 1990 г. Перед Великой Отечественной войной на 10000 человек населения приходилось 7.4 врача, перед развалом СССР – 45. В 70-х годах XX века, после того, как число врачей на территории СССР (1/6 часть суши) стало превышать все мыслимые пределы (около 20–25% мировых показателей) (табл. 1), а проблема сокращения средней продолжительности жизни в СССР продолжала усугубляться, потребовались принципиально новые идеи, воплощение которых было отмечено как одно из наиболее ярких достижений Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН [170]. Суть этого достижения состояла в том, что снижение нитратно-нитритного фона, нитритредуктазной активности ферментативных систем млекопитающих, а вместе с ними и концентраций NO и NO_2 в организме населения в СССР, привело к остановке катастрофического снижения средней продолжительности жизни населения СССР (рис. 9). В дальнейшем это положило нача-

Таблица 1. Количество врачей в СССР и других странах (обобщающий анализ по данным, представленным на сайтах Интернета)

	Годы	Численность врачей всех специальностей	
		Всего, тыс. человек	На 10000 человек населения
СССР	1966	577.7	24.6
РСФСР		328.3	25.8
Украинская ССР		114.0	24.8
Белорусская ССР		19.8	22.6
Узбекская ССР		19.5	17.9
Казахская ССР		23.4	18.9
Грузинская ССР		16.4	35.5.
Азербайджанская ССР		11.6	24.1
Литовская ССР		7.0	23.1
Молдавская ССР		6.3	18.5
Латвийская ССР		7.5	32.6
Киргизская ССР		5.3	19.4
Таджикская ССР		4.1	15.4
Армянская ССР		6.3	28.1
Туркменская ССР		4.2	21.4
Эстонская ССР		4.0	30.7
Англия	1963	(79.1)	(14.7)
Индия	1961	83.3	1.9
Иран	1964	8.4	3.7
Италия	1961	81.2	16.3
Пакистан	1960	8.7	0.9
США	1964	360.3	18.6
Турция	1963	10.1	3.3
Федеративная Республика Германии	1965	110.4	19.3
Франция	1964	75.2	15.4
Япония	1964	139.6	14.3

лу роста данного показателя в период 1980–1990 гг. на 3–5 лет в разных регионах страны (рис. 9). После решения этой проблемы стало ясно, что решение Н.С. Хрущева в мае 1957 г. по-

высить урожайность сельскохозяйственных культур – кормовой базы для мелкого, крупного рогатого скота и птиц – с целью догнать и обогнать США по производству мяса, масла и молока с по-

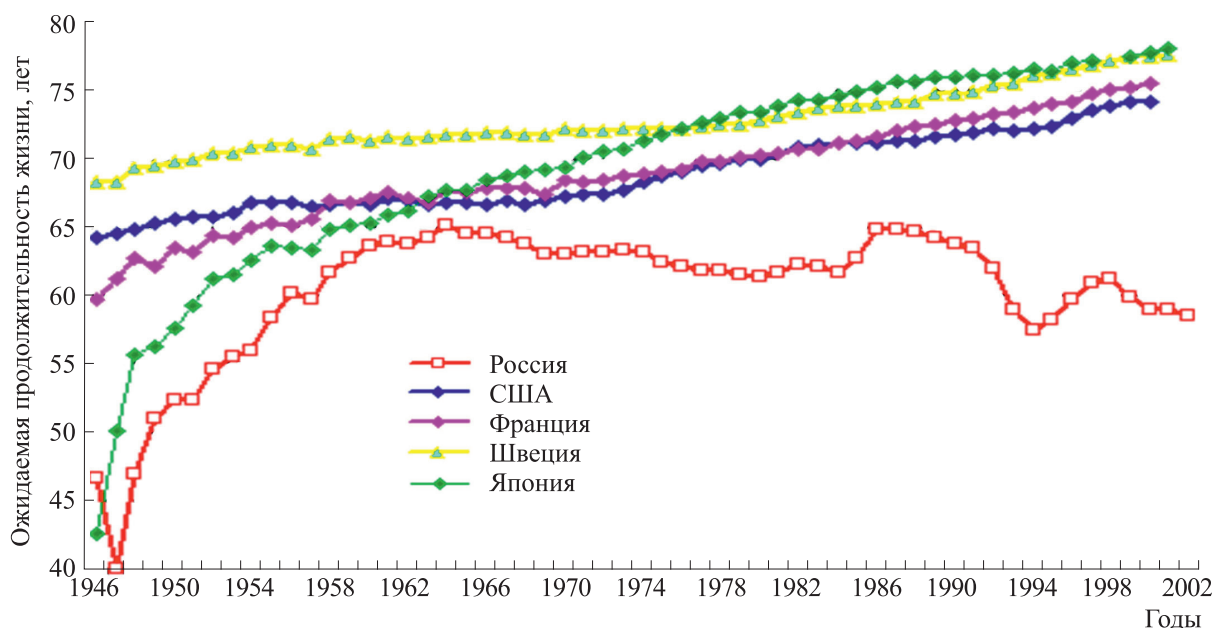


Рис. 9. Продолжительность жизни в СССР/России, США, Франции, Швеции и Японии (1946–2002 гг.). Источник: Human Mortality Database, http://c.avsim.su/i?u=http://www.demoscope.ru/weekly/2004/0169/img/t_graf01_1.gif.

мощью химизации сельского хозяйства (азотных удобрений), стало основной причиной снижения средней продолжительности жизни в СССР. Эта причина в виде повышенного химического фона нитратов и нитритов в воде и пищевых продуктах, а также окислов азота в воздухе воздействовала на здоровье, продолжительность жизни и демографические показатели на протяжении по крайней мере 18 лет (с латентным периодом в 5 лет). После выяснения причины снижения средней продолжительности жизни в СССР (1983) о нитратах и нитритах узнали практически все жители страны. Начиная с 1985 г. эту проблему стали активно решать в НИИ канцерогенеза АМН СССР/РАМН, Онкологическом научном центре АМН СССР/РАМН (ныне НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России), а спустя 6 лет (1989–1992 гг.) – в Институте питания АМН СССР/РАН и других институтах РАН и РАМН.

В конечном итоге высказанные идеи и обнаруженные одним из соавторов статьи механизмы способствовали тому, что в тяжелые годы перестройки, низких цен на нефть, пустых прилавков в магазинах СССР, численность населения за 10 лет (1980–1990) выросла на 24.1 млн человек (с 264.5 млн человек в 1980 г. до 288.6 млн человек в 1990 г.). К началу 1991 г. численность населения (по текущей оценке) возросла до 289.2 млн человек. Независимо от того, в каком бы качестве нашу страну или наши страны не рассматривать – СССР, одну или две страны из содружества стран СНГ (Беларусь или Россию) – за последние 100 лет (1922–2022) это был самый высокий прирост

численности населения, а выполнение этого проекта оказалось самым дешевым проектом за все годы существования АН СССР/РАН (оплата стипендии одному аспиранту – В.П. Реутову).

Указанные выше механизмы не потеряли своей актуальности в настоящее время применительно практически ко всем патологическим процессам, которые развиваются на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, активации иммунных и аутоиммунных процессов [98, 99, 104, 109, 132–143, 149–154, 171–178]. Эти же механизмы развиваются при решении задач тканеинженерных конструкций, связанных с созданием нового центра местной нейрогуморальной регуляции, основанного на образовании новых нервных и сосудистых связей [59]. Поэтому у нас есть все реальные основания для того, чтобы показать, что те 5–30% случаев при решении указанных выше задач тканеинженерных конструкций, когда наблюдается развитие деструктивных изменений в перемещенном ганглии, приводящих к сосудистым осложнениям и повышению летальности обусловлены общими обсуждаемыми нами механизмами. Хотя, как указывалось выше, до сих пор причины этого явления не были известны, механизмы не ясны, и практически никто не знал, как можно предотвратить риск летального исхода после операций, связанных с трансплантацией вегетативных ганглиев с целью создания новых центров местной нервно-гуморальной регуляции пораженных внутренних органов. Мы предполагаем, что в результате объединения усилий бело-

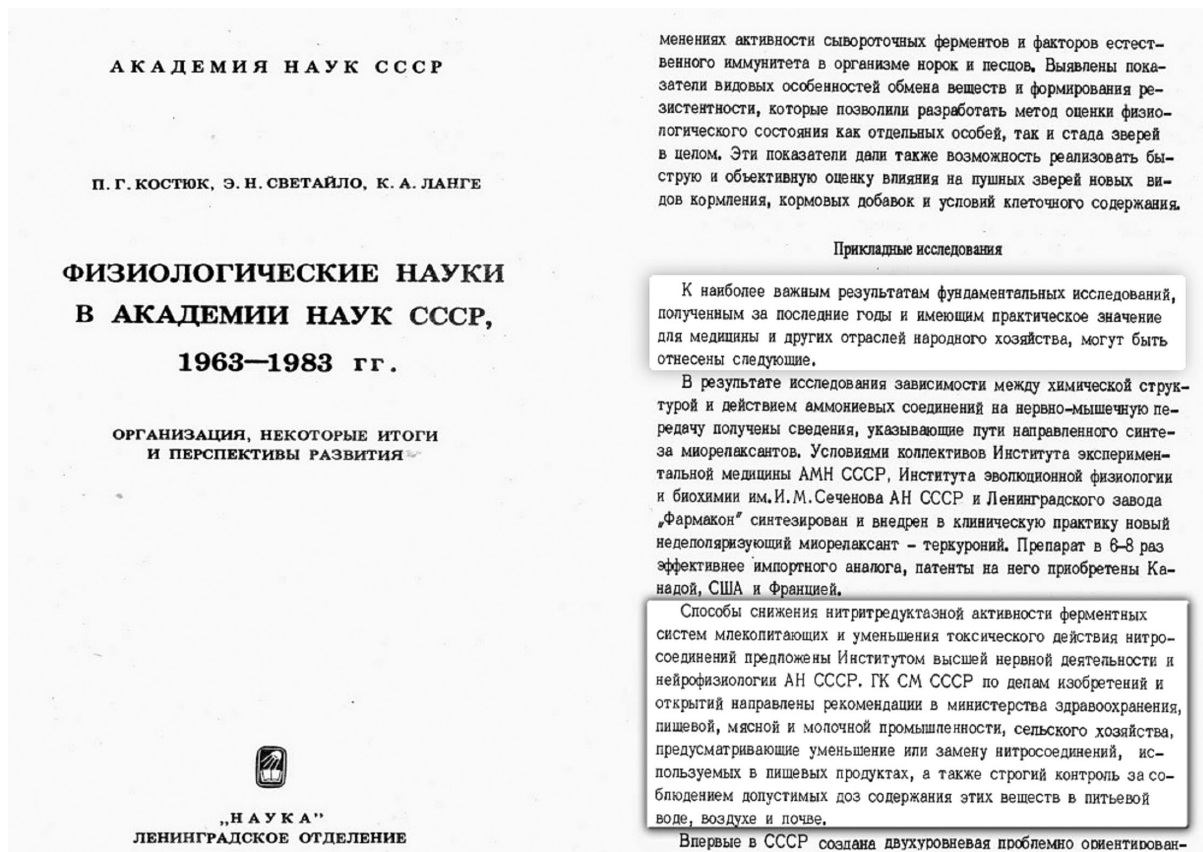


Рис. 10. Отчет по Отделению физиологии АН СССР (1963–1983 гг.) акад. АН СССР П.Г. Костюка, Э.Н. Светайло и К.А. Ланге [170].

русских ученых и авторов этой статьи удастся решить указанную выше актуальную задачу.

В завершение нашего обзора хотелось бы отметить тот незаметный, но существенный вклад ученых, возглавлявших АН СССР/РАН, которые смогли предвидеть долговременные последствия некоторых открытий. Еще раз подчеркнем, что достижение Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР было поддержано вице-президентом АН СССР академиком АН СССР Ю.А. Овчинниковым, а другим ученым — академиком-секретарем Отделения физиологии АН СССР академиком АН СССР П.Г. Костюком — это достижение было отнесено к научным достижениям, имеющим наибольшее практическое значение для физиологии, медицины и народного хозяйства (рис. 10) [170]. Несомненно, что без поддержки директора ИВНД и НФ АН СССР/РАН академика РАН П.В. Симонова эта работа также не могла бы развиваться и выполняться в те годы, когда о роли НО в реализации проблем памяти и обучения никто еще не думал и не обсуждал ее в контексте нейрофизиологии не только в нашей стране, но и в мире. Эти ученые заботились о результатах, спо-

собных изменить медико-биологические перспективы науки в своей стране. О некоторых ученых, оказывавших поддержку практически всем нашим исследованиям, мы написали в статьях и книгах [148, 171–180].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отдавая должное перспективным методам тканевой инженерии, развиваемым и описанным зарубежными учеными, особое внимание в этом обзоре мы уделили исследованиям белорусских ученых, которые, опираясь на достижения российских ученых, создали новое направление в биофизике, неврологии и медицине. Именно они стояли у истоков развития этого метода — метода создания нового центра местной нейрогуморальной регуляции, основанного на образовании новых нервных и сосудистых связей.

Анализируя литературные данные и результаты собственных исследований, мы пришли к важному выводу. Он состоит в том, что при многих патологических процессах, протекающих на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов и активации иммунных/аутоиммунных

процессов наблюдается химический или свободнорадикальный резонанс. В ходе этого свободно-радикального резонанса в течение короткого времени повышенные концентрации NO и $\bullet\text{O}_2^-$ взаимодействуют друг с другом с очень высокими скоростями и завершаются образованием высокотоксичных и высокореакционных соединений — NO₂, OH-радикалов, пероксинитритов, которые вновь превращаются в NO, NO₂ и OH-радикалы, замыкая, тем самым, патогенетический цикл. Это такие реакции, которые способны к *цепным свободнорадикальным процессам*, разрушающим практически все компоненты клеток и субклеточных структур. Однако если снизить концентрацию NO или $\bullet\text{O}_2^-$ при помощи ингибиторов NO-синтаз, ловушек NO (например, диэтилдитиокарбамата — дисульфирама) и/или ингибиторов свободно радикальных процессов с участием NO или $\bullet\text{O}_2^-$, то можно влиять практически на все патологические процессы, протекающие на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов и активации иммунных/аутоиммунных процессов. У нас есть все основания предполагать, что эти же процессы и механизмы развиваются при решении как задач, связанных с геморагическим, ишемическим инсультами [181–187], а также задач тканеинженерных конструкций, которые включают создание нового центра местной нейрогуморальной регуляции, основанного на образовании новых нервных и сосудистых связей [41–57]. Поэтому мы полагаем, что, используя ингибиторы NO-синтаз, ловушки NO (типа диэтилдитиокарбамата) и/или ингибиторы свободно радикальных процессов с участием NO или $\bullet\text{O}_2^-$ можно снизить количество летальных исходов в тех 5–30 % случаев, когда наблюдается развитие деструктивных изменений в перемещенном ганглии.

В завершение статьи мы хотели бы обратить внимание на механизмы, которые действуют с реализацией *принципов голографии и цикличности* практически на всех структурно-функциональных уровнях живых систем. Именно это обстоятельство создает условия для существования своеобразного общего знаменателя практически для всех патологических процессов при нарушении регуляторных циклических механизмов. Известно, что всякое обобщение до известной степени предполагает веру в единство и простоту природы (А. Пуанкаре). Что касается единства, то ученые, как правило, не встречают каких-либо затруднений. Вопрос заключается в том, *каким образом природа является единой* (А. Пуанкаре). На протяжении более 45 лет мы стремились раскрыть это единство. Анализируя многочисленные данные литературы и результаты наших экспериментов, мы неоднократно писали, что ука-

занное выше единство обусловлено тем обстоятельством, что кроме *атомарного принципа существования материи*, который безоговорочно принимается всеми учеными, действуют еще *принцип цикличности* и *голографический принцип* [100–103]. Осознание этих принципов в XXI веке позволит понять, почему «все процессы осуществляются циклически, и, каждый процесс имеет свою цикличность» (Л.А. Орбели)? Почему любая патология — это, прежде всего, дисрегуляторная патология (Г.Н. Крыжановский)? Почему «не жизнь в ненормальных, условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата (Р. Вирхов). Почему о физиологии и патологии целого организма можно судить по целостности/интактности циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала? И, наконец, почему клеточная патология или патология клетки (по Р. Вирхову), в конечном счете, зависит от наличия или отсутствия оксидативного и нитрозативного стресса? Этот свободно радикальный стресс зависит от нормальной работы указанных выше регуляторных циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала с их многочисленными гемсодержащими белками, способными связывать или нейтрализовать активные формы азота и кислорода. Благодаря этим реакциям в условиях нормального функционирования циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала NO и $\bullet\text{O}_2^-$ не могут взаимодействовать между собой, минуя гемсодержащие белки указанных выше циклов, которые, тем самым, не допускают образования высокореакционных молекул NO₂ и OH-радикалов, способных разрушать практически все компоненты клеток и субклеточных структур. Учитывая константы скоростей реакции взаимодействия NO и $\bullet\text{O}_2^-$ между собой ($(6.7 \pm 0.9) \cdot 10^9$ л·моль⁻¹·с⁻¹), с гемсодержащими белками (10^3 – 10^7 л·моль⁻¹·с⁻¹) и этих же соединений с фенольными антиоксидантами (6.8 – 11.0)· 10^4 л·моль⁻¹·с⁻¹) становится очевидной более важная роль гемсодержащих белков, входящих в циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала, по сравнению с антиоксидантными системами.

О цикличности естествоиспытатели говорят приблизительно столько же, сколько и об атомах. Впервые понятие атом было сформулировано в V–IV веках до нашей эры древнегреческим ученым Демокритом. Понятие голографии, принципа голографии возникло значительно позже — в середине XX века, поскольку первая голограмма была получена в 1947 г. Осознание триединства *принципа цикличности, голографического принципа и атомарного принципа строения живой и неживой материи* может позволить подойти к созданию

новой парадигмы биологии и медицины XXI века, в которой *обобщающая концепция развития патологических процессов* станет составной частью элементов построения теории медицины. Об этих элементах построения теории медицины писал академик АН СССР А.Д. Сперанский [188, 189]. Он рассматривал *нервно-дистрофический процесс* как основной элемент построения теории медицины, а его основной труд на эту тему, как уже было сказано выше, восемь раз номинировался на Нобелевскую премию по физиологии и медицине при поддержке академика АН СССР И.П. Павлова [189]. Если учесть все эти обстоятельства, все вышесказанное может позволить по-новому осознать значение изложенных выше идей и представлений о переходе от нормы к патологии, включая представления об активной и пассивной составляющих нейронального возбуждения и его глиального сопровождения [190].

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. F. Berthiaume, T. J. Maguire, and M. L. Yarmush, *Annu Rev Chem Biomol Eng.*, **2**, 403 (2011).
2. G. Orlando, K. J. Wood, R. J. Stratta, et al., *Transplantation*, **91**(12), 1310 (2011).
3. N. J. Turner, T. J. Keane, and S. F. Badylak, *Birth Defects Res. C Embryo Today*, **99** (3), 149 (2013).
4. C. T. Laurencin and Y. Khan, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 160 (2012).
5. M. D. Kwan and M. T. Longaker, *Transplantation*, **86** (2), 206 (2008).
6. R. Langer and J. Vacanti, *J. Pediatr. Surg.*, **51** (1), 8 (2016).
7. G. Banfi and M. M. Corsi, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **25** (Suppl. 2), S1 (2011).
8. J. L. Gilbert, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **96** (2), 273 (2011).
9. J. F. Stoltz, J. Magdalou, P. Netter, and N. de Isla, *Biomed. Mater. Eng.*, **19** (4–5), 269 (2009).
10. K.V. Hellman and R.M Nerem, *Tissue Eng.*, **13** (12), 2823 (2007).
11. K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, et al., *Biofabrication*, **2** (2), 022001 (2010).
12. K. E Andersson and G. J. Christ, *Mol. Interv.*, **7** (2), 79 (2007).
13. D. J. Williams and I. M. Sebastine, *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, **152**(6), 207 (2005).
14. D. M. Olszewska-Słonica and T. A. Drewna, *Wiad Lek.*, **59** (7–8), 585 (2006).
15. S. N. Jayasinghe, *Biomed Mater.*, **3** (3), 030201 (2008).
16. A. Atala, *Curr. Urol. Rep.*, **2** (1), 83 (2001).
17. S. V. Murphy and A. Atala, *Nat. Biotechnol.*, **32** (8), 773 (2014).
18. M. N. Patel and A. Atala, *Sci. World J.*, **11**, 2567 (2011).
19. Z. Wang, S. J. Lee, H. J. Cheng, et al., *Acta Biomater.*, **70**, 48 (2018).
20. H. Budharaju, A. Subramanian, and S. Sethuraman, *Biomater. Sci.*, **9** (6), 1974. (2021).
21. S. Heid and A. R. Boccaccini, *Acta Biomater.*, **113**, 1, (2020).
22. A. Chakraborty, A. Roy, S. P. Ravi, and A. Paul, *Biomater. Sci.*, **9** (19), 6337. (2021).
23. X. Cui, J. Li, Y. Hartanto, et al., *Adv. Health. Mater.*, **9** (15), e1901648. (2020).
24. S. Piluso, G. A. Skvortsov, M. Altunbek, et al., *Biofabrication*, **13** (4), (2021).
25. S. Kyle, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah, and I. S. Whitaker, *Adv. Healthc. Mater.*, **6** (16) (2017).
26. Y. Zhao, Y. Li., S. Mao, et al., *Biofabrication*, **7** (4), 045002. (2015).
27. A. Malekpour and X. Chen, *J. Funct. Biomater.*, **13** (2), 40 (2022).
28. S. Strauß, B. Schroth, and J. Hubbuch, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 831350 (2022).
29. Y. Gu, A. Forget, and V. P. Shastri, *Adv. Sci. (Weinh)*, **9** (3), e2103469 (2022).
30. J. Lin, A. R. Sun, J. Li, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 764212 (2021).
31. Z. T. Olmsted and J. L. Paluh, *Nat. Commun.*, **12** (1), 3020 (2021).
32. S. Müntz, P. Koch, J. Kesavan, et al., *Methods*, **133**, 65 (2018).
33. F. Serrano, W. G. Bernard, A. Granata, et al., *Stem Cells Dev.*, **28** (2), 81 (2019).
34. P. Hofbauer, S. M. Jahnel, N. Papai, et al., *Cell*, **184** (12), 3299 (2021).
35. M. Zhu and M. Zernicka-Goetz, *Cell*, **183** (6), 1467. (2020).
36. K. Klimczewska, A. Kasperczyk, and A. Suwińska, *Curr. Top Dev. Biol.*, **128**, 105 (2018).
37. K. Muguruma, A. Nishiyama, H. Kawakami, et al., *Cell Rep.*, **10** (4), 537 (2015).
38. K. Muguruma, *Methods Mol. Biol.*, **1597**, 31 (2017).
39. G. A. Higuera, G. Iaffaldano, M. Bedar, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 8863 (2017).
40. C. J. Alexander and J. A. Hammer, *Cerebellum*, **18** (3), 406 (2019).
41. D. M. Golub, *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, **45**, 3 (1963).
42. D. M. Golub, F. B. Kheĭnman, I. I. Novikov, et al., *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, **76** (3), 5 (1979).
43. D. M. Golub and G. M. Bronovitskaia, *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, **80** (5), 47 (1981).
44. D. M. Golub, *Anat. Gistol. Embriol.*, **57** (10), 3 (1969).
45. D. M. Golub, R. M. Loyko, and I. I. Novikov, *Anat. Anz.*, **145** (5), 474 (1979).
46. D. M. Golub, *Folia Morphol. (Praha)*, **30** (2), 195 (1982).
47. D. M. Golub, *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, **38**, 85 (1960).
48. D. M. Golub, L. A. Lentiuk, I. I. Novikov, et al., *Arkh Anat Gistol Embriol.*, **83** (12), 36 (1982).

49. D. M. Golub, Verh. Anat. Ges., **63**, 317 (1969).
50. D. M. Golub, and P. I. Lobko, Arkh. Anat. Gistol. Embriol., **63** (10), 5 (1972).
51. D. M. Golub, Arkh. Anat. Gistol. Embriol., **44**, 34 (1963).
52. D. M. Golub, L. A. Leontiuk, V. A. Mokhort, et al., Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR, **12**, 19 (1987).
53. D. M. Golub, Arkh. Anat. Gistol. Embriol., **40**, 62 (1961).
54. D. M. Golub, L. A. Davydova, I. I. Novikov, and F. V. Kheinman, Arkh. Anat. Gistol. Embriol., **64** (5), 5 (1973).
55. D. M. Golub and R. V. Danilenko, Arkh. Anat. Gistol. Embriol., **89** (9), 28 (1985).
56. D. M. Golub, V. M. Dechko, and S. A. Kozey, *Development of the cranial nerves: Atlas*, Ed. by D. M. Golub (Minsk, 1977).
57. Д. М. Голуб, Докл. АН БССР, **11** (5), 464 (1967).
58. В. П. Реутов, Евразийское научное объединение, № 12 (82), 166 (2021).
59. Л. А. Давыдова и В. П. Реутов, Евразийское научное объединение, № 3-2 (37), 82 (2018).
60. В. П. Реутов и Л. А. Давыдова, Евразийское научное объединение, № 3-3 (49), 155 (2019).
61. Ia. I. Azhipa, G. A. Filiashina, V. P. Reutov, and I. N. Emel'ianenko, Izv. Akad. Nauk. SSSR. Biol. Ser., **6**, 819 (1982).
62. N. E. Savchenko and V. A. Mokhort, Urol. Nefrol. (Moscow), **38** (5), 38 (1973).
63. N. E. Savchenko, Urol. Nefrol. (Moscow), **3** (3), 7 (1985).
64. B. Haid and S. Tekgül, Eur. Urol. Focus., **2-3**, 198 (2017).
65. S. Ramsay, É. Lapointe, and S. Bolduc, Expert Opin. Pharmacother., **6**, 1 (2022).
66. G. Jang, Y. J. Im, J. Suh, and K. Park, Investig. Clin. Urol., **61** (2), 207 (2020).
67. M. Shim, W. J. Bang, C. Y. Oh, et al., Investig. Clin. Urol., **62** (3), 331 (2021).
68. Д. М. Голуб и Ф. В. Хейнман, Докл. АН БССР, **11** (10), 938 (1967).
69. G. Marinesco, Rev. Neurol., **15**, 241 (1907).
70. V. Nageotte, Rev. Neurolog., **17**, 933 (1907).
71. S. R. Cajal, Nature, **125**, 230 (1930).
72. E. Karbassi, A. Fenix, S. Marchiano, et al., Nat. Rev. Cardiol., **17**(6), 341 (2020).
73. H. G. Song, R. T. Rumma, C. K. Ozaki, et al., Cell, **22**(3), 340. (2018).
74. C. Chen, Y. Xi, and Y. Weng, Materials (Basel), **15** (6), 2164 (2022).
75. S. Han, J. Sun, S. He, et al., Am. J. Transl. Res., **11** (6), 3246 (2019).
76. E. Querdel, M. Reinsch, L. Castro, et al., Circulation, **143** (20), 1991 (2021).
77. C. von Bibra, A. Shibamiya, B. Geertz, et al., J. Mol. Cell Cardiol., **166**, 1 (2022).
78. K. Andrysiak, J. Stepniewski, and J. Dulak, Pflugers Arch., **473** (7), 1061 (2021).
79. F. Zhang and K. B. Pasumarthi, BioDrugs, **22** (6), 361 (2008).
80. F. Weinberger, K. Breckwoldt, S. Pecha, et al., Sci. Transl. Med., **8** (363), 363148 (2016).
81. L. Gao, Z. R. Gregorich, W. Zhu, et al., Circulation, **137** (16), 1712 (2018).
82. N. Rogozinski, A. Yanez, R. Bhoi, et al., Science, **25** (5), 104330 (2022).
83. J. H. Choi, S. E. Sim, J. I. Kim, et al., Science, **360** (6387), 430 (2018).
84. C. Wang, H. Yue, Z. Hu, et al., Science. **367** (6478), 688 (2020).
85. G. P. Morris, I. A. Clark, R. Zinn, and B. Vissel, Neurobiol. Learn. Mem., **105**, 40 (2013).
86. J. Cornell, S. Salinas, H. Y. Huang, and M. Zhou, Neural. Regen. Res., **17** (4), 705 (2022).
87. G. Piccioni, D. Mango, A. Saidi, et al., Int. J. Mol. Sci., **22** (5), 2342 (2021).
88. A. Mishra, R. Bandopadhyay, P. K. Singh, et al., Metab. Brain Dis., **36** (7), 1591 (2021).
89. P. J. Paasila, J. A. Aramideh, G. T. Sutherland, and M. B. Graeber, Front. Neurosci., **15**, 778822 (2022).
90. L. E. Niklason and J. H. Lawson, Science, **370** (6513), 8662 (2020).
91. D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, and D. Mantovani, Nat. Rev. Cardiol., **10** (7), 410 (2013).
92. M. X. Li, L. Li, S. Y. Zhou, et al., RSC Adv., **11** (50), 31783 (2021).
93. V. P. Reutov, Ia. I. Azhipa, and L. P. Kaiushin, Bull. Eksp. Biol. Med., **86** (9), 299 (1978).
94. V. P. Reutov, Ya. I. Azhipa, and L. P. Kayushin, Proc. Acad. Sci. USSR. Ser. Biol., No 3, 408 (1983).
95. В. П. Реутов, Успехи биол. химии, **35** 189, (1995).
96. V.P. Reutov and E. G. Sorokina, Biochemistry (Moscow), **63** (7), 874 (1998).
97. В.П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин и Н.С. Косицын, *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих* (М., 1997).
98. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков и В. П. Реутов, Биохимия, **65** (4), 485 (2000).
99. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова и В. П. Реутов, Вестн. РАМН, № 4, 30 (2000).
100. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, Биохимия, **63** (7), 1029 (1998).
101. В. П. Реутов, Биохимия, **64** (5), 634 (1999).
102. В. П. Реутов, Вестн. РАМН, № 4, 35 (2000).
103. В. П. Реутов, Биохимия, **67** (3), 353 (2002).
104. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и В. Н. Швалев, Успехи физиол. наук, **43** (4), 73 (2012).
105. V. P. Reutov, E. G. Sorokina, and O. I. Sukmanskyy, Curr. Res. Biopolymers, **2**, 112. DOI: 10.29011/CRBP-112.000012
106. V. P. Reutov, N. V. Samosudova, and E. G. Sorokina, Biophysics, **64** (2), 233 (2019).
107. V. P. Reutov, Ia. I. Azhipa, and L. P. Kayushin, Izv. AN SSSR, Ser. Biol., No 3, 408 (1983).
108. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, Молекуляр. биология, **32** (2), 377 (1998).
109. J. O. Lundberg, M. T. Gladwin, A. Ahluwalia, et al., Nat. Chem. Biol., **5** (12), 865 (2009).
110. T. Burmester, B. Weich, S. Reinhardt, and T. Hankeln, Nature, **407** (6803), 520 (2000).
111. T. Burmester and T. Hankeln, J. Exp. Biol., **212** (Pt 10), 1423 (2009).
112. L. Moens and S. Dewilde, Nature, **407** (6803), 461 (2000).

113. K. Cosby, K. S. Partovi, et al., *Nat. Med.*, **9** (12), 1498 (2003).
114. M. T. Gladwin and D. B. Kim-Shapiro, *Blood*, **112** (7), 2636 (2008).
115. S. Shiva, Z. Huang, R. Grubina, et al., *Circ. Res.*, **100** (5), 654 (2007).
116. J. H. Crawford, T. S. Isbell, Z. Huang, et al., *Blood*, **107** (2), 566 (2006).
117. T. Dalsgaard, U. Simonsen, and A. Fago, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292** (6), H3072 (2007).
118. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, *Цитология*, **42** (1), 72 (2000).
119. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **378** (3), 417 (2001).
120. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, *Цитология*, **47** (3), 214 (2005).
121. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, *Морфология*, **129** (2), 84 (2006).
122. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, *Морфология*, **131** (2), 53 (2007).
123. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **146** (7), 13 (2008).
124. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **150** (8), 212 (2010).
125. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, *Морфология*, **140** (4), 13 (2011).
126. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **393** (5), 698 (2003).
127. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **401** (3), 419 (2005).
128. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, *Морфология*, **129** (2), 53 (2006).
129. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. П. Самосудова и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **432** (2), 276 (2010).
130. Н. П. Ларионова, Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **369** (6), 836 (1999).
131. Н. П. Ларионова, Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН*, **376** (5), 701 (2001).
132. Н. С. Косицын, В. П. Реутов и М. М. Свинов, *Молекуляр. биология*, **32** (2), 369 (1998).
133. Ж. Б. Семенова, Е. Г. Сорокина, Н. В. Базарная и др., *Физиол. журн.* **54** (4), 89 (2008).
134. Е. Г. Сорокина, Ж. Б. Семенова, О. В. Карасева, и др., *Нейроиммунология*, **14** (1–2), 60 (2017).
135. Е. Г. Сорокина, Ж. Б. Семенова, Н. А. Мамонтова и др., *Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **108** (3), 67 (2008).
136. Е. Г. Сорокина, Ж. Б. Семенова, В. П. Реутов и В. Г. Пинелис, *Нейроиммунология*, **1** (1), 267 (2002).
137. Е. Г. Сорокина, В. П. Реутов и В. Г. Пинелис, *Актуальные вопросы транспортной медицины*, **10** (133), (2007).
138. Е. Г. Сорокина, В. П. Реутов и В. Г. Пинелис, *Биол. мембраны*, **16** (3), 318 (1999).
139. Е. Г. Сорокина, В. П. Реутов, В. Г. Пинелис и Т. С. Коршунова, *Успехи физиол. наук* **25** (4), 70 (1994).
140. Е. Г. Сорокина, В. П. Реутов, Я. Е. Сенилова, и В. Г. Пинелис, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **143** (4), 419 (2007).
141. Е. Г. Сорокина, Ж. Б. Семенова, В. В. Алатырцев и др., *Аллергология и иммунология*, **10** (2), 280 (2009).
142. Е. Г. Сорокина, Ж. Б. Семенова, Н. А. Базарная и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **108** (3), 67 (2008).
143. Е. Г. Сорокина, В. П. Реутов, Я. Е. Сенилова, et al., *Bull. Experim. Biol. Med.*, **143** (4), 442 (2007).
144. В. П. Реутов и В. М. Черток, *Тихоокеанский мед. журн.*, № 2, 10 (2016).
145. В. П. Реутов, В. М. Черток и В. Н. Швалев, *Евразийское научное объединение*, № 1 (18), 36 (2016).
146. В. М. Черток, В. П. Реутов и В. Е. Охотин, *Тихоокеанский мед. журн.*, № 2, 7 (2012).
147. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин и др., *Успехи физиол. наук*, **38** (4), 39 (2007).
148. Л. В. Розенштраух и В. П. Реутов, *Успехи физиол. наук*, **41** (4), 93 (2010).
149. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., *Тихоокеанский мед. журн.*, № 1 (55), 10 (2014).
150. В. Н. Швалев, А. Н. Рогоза, В. П. Реутов и др., *Казанский мед. журн.*, **95** (2) 175 (2014).
151. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., *Морфологич. ведомости*, № 3, 6 (2012).
152. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., *Морфологич. ведомости*, № 1, 6 (2014).
153. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, В. Б. Сергиенко и др., *Казанский мед. журн.*, **97** (4) 598 (2016).
154. В. Н. Швалев, А. Н. Рогоза, Н. А. Тарский и др., *Тихоокеанский мед. журн.*, № 1 (67), 42 (2017).
155. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, № 9 (31), 34 (2017).
156. В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и Е. А. Степовая, *Физиология и патофизиология эритроцита* (Томск, 2004).
157. В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и Е. А. Степовая, *Клинический патоморфоз эритроцита. Атлас* (Томск, 2003).
158. В. В. Новицкий, Е. А. Степовая и И. Г. Баженова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **126** (8), 204 (1998).
159. В. В. Новицкий, Е. А. Степовая и В. Е. Гольдберг, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **127** (6), 680 (1999).
160. Н. В. Рязанцева и В. В. Новицкий, *Успехи физиол. наук*, **35** (1) 53 (2004).
161. *Типовые патологические процессы*, под ред. Ф.И. Висмонта и др. (Минск, 2013).
162. V. P. Reutov, E. G. Sorokina, N. V. Samosudova, and V. E. Okhotin, *Int. J. Psychiatry*, **6** (2), 33 (2021).
163. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, № 10 (80), 117 (2021).
164. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, *Евразийское научное объединение*, № 12 (82), 117 (2021).
165. *Справочник химика*, в 7 томах, под ред. чл.-корр. АН СССР Б.П. Никольского (Химия, М., 1962–1966).
166. А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко и Ю. А. Владимиров, *Успехи биол. химии*, **47**, 259 (2007).
167. С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь и Н. Е. Максимович, *Журн. Гродненского гос. мед. университета*, **16** (6), 639 (2018).

168. R. E Huie and S. Padmaja, *Free Radic. Res. Commun.*, **18** (4), 195 (1993).
169. Г. К. Зиятдинова, С. П. Захарова и Г. К. Будников, *Ученые записки Казанского университета*, **157** (2), 129 (2015).
170. П. Г. Костюк, Э. Н. Светайло и К. А. Ланге, *Физиологические науки в Академии наук СССР (1963–1983)*, (1983).
171. А. С. Базян и В. П. Реутов, *Биофизика*, **55** (3), 554 (2010).
172. А. С. Базян и В. П. Реутов, *Успехи физиол. наук*, **41** (1), 103 (2010).
173. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, Н. С. Косицын и В. Е. Охотин, *Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. Ретроспективный анализ идей, принципов и концепций* (М., 2003).
174. В. П. Реутов, *Биохимия*, **68** (3), 445 (2003).
175. В. П. Реутов, *Успехи физиол. наук*, **34** (2) 103 (2003).
176. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и Н. С. Косицын, *Успехи физиологических наук* **36** (4), 84 (2005).
177. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин и Н. С. Косицын, *Павел Васильевич Симонов и его концепция об «альтруистах» и «эгоистах». Воспоминания и эссе на современные темы* (М., 2007).
178. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и Н. С. Косицын, *Успехи физиол. наук*, **38** (1), 86 (2007).
179. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин и М. М. Свинов, *Успехи физиол. наук*, **40** (4), 94 (2009).
180. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, № 10 (68), 183 (2020).
181. А. Л. Крушинский, В. С. Кузенков, В. Е. Дьяконова и В. П. Реутов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (7), 38 (2010).
182. А. Л. Крушинский, В. С. Кузенков, В. Е. Дьяконова и В. П. Реутов, *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **114** (8), 21 (2014).
183. А. Л. Крушинский, В. С. Кузенков, В. Е. Дьяконова и В. П. Реутов, *Изв. РАН. Сер. биол.*, **1**, 77 (2015).
184. А. Л. Крушинский, В. П. Реутов и В. С. Кузенков, *Изв. РАН. Сер. биол.*, **3**, 329 (2007).
185. А. Л. Крушинский, В. П. Реутов и В. С. Кузенков, *Актуальные проблемы транспортной медицины*, **10** (4), 117 (2007).
186. В. Б. Кошелев, А. Л. Крушинский, В. С. Кузенков и В. П. Реутов, *Новости мед.-биол. наук*, **1**, 41 (2004).
187. В. С. Кузенков, В. П. Реутов и А. Л. Крушинский, *Вестн. МГУ, Сер. 16. Биология*, **16** (1), 3 (2010).
188. А. Д. Сперанский, *Элементы построения теории медицины* (М. 1955).
189. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, № 12 (82), 166 (1921).
190. Ю. С. Медникова, Д. Н. Воронков, Р. М. Худоерков и др., *Биофизика*, **66** (4) 756 (2021).

Tissue-Engineered Constructions in Biophysics, Neurology and Other Fields and Branches of Medicine

V.P. Reutov*, L.A. Davydova**, and E.G. Sorokina***

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

***Belarusian State Medical University, prosp. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116 Belarus*

****National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Lomonosovsky prosp. 2, Moscow, 119991 Russia*

This paper describes the ganglioplexy method, one of the methods for creating a new center of local neurohumoral regulation, based on the formation of new connections discovered between the nervous system and the vascular system. The prospects for the development of this method are studied. At the same time, novel concepts about the cycles of nitric oxide and superoxide anion radical are introduced. A possible role of these cycles is examined as a protection of cells and the body as a whole against oxidative and nitrosative stress, which reveal from (5–30% of cases) destructive changes in the displaced ganglion, leading to vascular complications and an increased risk of mortality. Mechanisms that can protect nerve cells, prevent the development of destructive changes in these cells and reduce the risk of mortality are also investigated.

Keywords: angiogenesis, ganglioplexy, cellular technologies, nitrates, nitrites, nitric oxide, nitric oxide and superoxide anion radical cycles, cyclicity principle and holographic principle

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ОПТИМАЛЬНОСТЬ ПРИЗНАКОВ ОРГАНИЗМА. ВИДОВАЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ КАК ПРОДУКТ ЭВОЛЮЦИИ

© 2022 г. Л.Л. Овсянников*, #

*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ
(Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991, Россия

#E-mail: tatiana-char@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.05.2022 г.

После доработки 18.05.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

Согласно дарвиновской теории естественного отбора в ходе конкуренции за ресурс выживает наиболее приспособленная популяция. Величины признаков особей выжившей популяции будем называть эволюционно-оптимальными. Строится модель биологического сообщества, состоящего из конкурирующих популяций и растительного ресурса. Модель включала уравнение динамики численности популяции, уравнение энергетического баланса половозрелой особи, уравнения динамики плотности пищевого ресурса. Для определения эволюционно-оптимальных значений признаков Ханиным и Семевским был предложен критерий, согласно которому эволюционно-оптимальные значения признаков доставляют максимум коэффициенту размножения, равному нулю в состоянии равновесия сообщества. Было показано, что существует эквивалентный критерий минимума получаемой особью энергии. С помощью этих критериев продемонстрирован метод определения эволюционно-оптимальных значений веса тела и толщины шерстного покрова особи. Предполагается, что видовая продолжительность жизни, как и другие признаки организма, также является продуктом эволюции. С помощью критерия минимума энергии, получаемой особью, определяется видовая продолжительность жизни как функция внешних факторов и других параметров организма. Полученные результаты были подтверждены численными экспериментами для конкретных значений параметров.

Ключевые слова: эволюционная оптимальность, равновесное состояние, конкуренция популяций, адаптивные признаки, продолжительность жизни.

DOI: 10.31857/S0006302922050210, EDN: JRBZVQ

В современной науке принято считать, что все признаки организмов являются адаптивными в том смысле, что являются результатом естественного отбора. С появлением компьютеров появилась возможность моделировать естественный отбор [1, 2] и определять величины признаков организмов, выживших в ходе отбора. Суть модели естественного отбора, предложенной в данной работе, состоит в следующем. Строится модель динамики простейшего биологического сообщества, состоящего из популяции организмов и пищевого ресурса, потребляемого популяцией. Модель включает уравнение динамики численности популяции, динамики плотности ресурса и уравнение энергетического баланса особи. На основе модели биологического сообщества строится модель конкуренции за ресурс популяций, отличающихся величинами какого-либо признака или со-

вокупности признаков. В результате на больших временных промежутках выживает только одна популяция, другие элиминируются. Значения признаков выжившей популяции будем называть эволюционно-оптимальными. В работах [3–11] было показано, что эволюционно-оптимальные значения признаков удовлетворяют некоторым критериям оптимальности, а в работах [12, 13] приводится обзор критериев оптимальности адаптивных признаков. Мы остановимся на критерии Ханина–Семевского [5, 7, 14], согласно которому совокупность значений признаков победившей популяции доставляет максимум коэффициенту размножения, равному нулю в состоянии равновесия.

В работах [1, 12, 13] представлен обзор экстремальных принципов, позволяющих определять эволюционно-оптимальные значения признаков.

Оказалось, что количество энергии, потребляемое особью выжившей популяции, минималь-

Сокращение: ПОЖ – половозрелый отрезок жизни.

но. В результате был сформулирован критерий минимума потребляемой энергии [15–18], используя который, можно определить эволюционно-оптимальные значения совокупности признаков.

В настоящей работе в качестве адаптивного признака рассматривается видовая продолжительность жизни. В работах [19–21] отмечается, что величина видовой продолжительности жизни является продуктом эволюции. Однако явной формализации этого понятия нет. Используя критерий минимума потребляемой энергии, получаем эволюционно-оптимальное значение видовой продолжительности жизни.

Согласно гомеостатической теории старения [20], причиной старения считается накопление оксидативных повреждений, приводящее к снижению с возрастом гомеостатических способностей организма. Из-за снижения гомеостатической способности доставка кислорода уменьшается, так что энергетический ресурс организма падает. Это ведет к тому, что коэффициент усвоения пищи уменьшается с возрастом. Это ведет к дефициту энергии, расходуемой на жизнедеятельность организма. Дефицит пополняется за счет жировых накоплений. При этом с увеличением возраста вес тела особи сначала растет, затем падает до начального значения P^0 (веса в момент наступления половой зрелости). В этот момент наступает смерть организма, поскольку жировые ткани организма уже исчерпаны, а дальнейшее пополнение энергии должно идти за счет тканей жизненно важных органов.

В работе также вводится коэффициент старения, устанавливающий зависимость коэффициента усвоения пищи от возраста.

КРИТЕРИИ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ОПТИМАЛЬНОСТИ

Рассмотрим простейшее биологическое сообщество, состоящее из популяции плотностью N и пищевого ресурса энергетической плотностью V . Уравнение динамики плотности популяции имеет вид

$$\frac{dN}{dt} = (f - d)N, \quad (1)$$

где f – плодовитость, d – смертность. Пусть смертность зависит от величины адаптивного признака (например, толщины шерстного покрова для северных животных h) и веса тела P . Эту зависимость аппроксимируем простейшим выражением

$$d = \frac{D_p}{P} + \frac{D_h}{h}, \quad (2)$$

где D_p и D_h – коэффициенты, учитывающие влияние внешних факторов.

Назовем выражение

$$F(f, P, h) = f - \left(\frac{D_p}{P} + \frac{D_h}{h} \right). \quad (3)$$

коэффициентом размножения.

Энергетический баланс организма особи. Питаясь растительной пищей, особь потребляет энергию в количестве

$$G = \frac{V}{N}, \quad (4)$$

где V – плотность энергии.

Полученную энергию организм расходует на следующие виды жизнедеятельности: основной обмен и передвижение (W_0), воспроизводство (W_f), развитие и функционирование адаптивного признака (W_h), привес (W_b). Таким образом, получаем

$$G = W_f + W_0 + W_h + W_b. \quad (5)$$

Напишем формулы, отражающие характер зависимости этих компонентов от различных параметров организма:

$$W_f = cf, W_0 = aP, W_h = Kh, W_b = b \frac{dP}{dt}, \quad (6)$$

где c , a , K и b – коэффициенты пропорциональности.

Предполагаем, что процессы в организме проходят гораздо быстрее, чем изменяется численность популяции. В результате $\frac{dP}{dt} \approx 0$, и как следствие $W_b \approx 0$. Подставив выражения (6) в формулу (5), получаем

$$G = cf + aP + Kh. \quad (6a)$$

Система уравнений (1), (4) и (6a) описывает динамику биологического сообщества. Положение равновесия определяется следующей системой:

$$F(f, P, h) = f - \left(\frac{D_p}{P} + \frac{D_h}{h} \right) = 0, \quad (7a)$$

$$G = cf + aP + Kh, \quad (7б)$$

$$G = \frac{V}{N}. \quad (7в)$$

Используя модель динамики биологического сообщества, составим модель конкуренции популяций, отличающихся значениями адаптивных признаков, которыми являются h и P .

МОДЕЛЬ КОНКУРЕНЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ

Пусть имеется k популяций. N_i – численность популяции с величинами признаков h_i и P_i .

Динамика численности i -й популяции описывается уравнением

$$\frac{dN_i}{dt} = (f_i - d_i)N_i, \quad (8)$$

$$\text{где } d_i = \frac{D_p}{P_i} + \frac{D_h}{h_i}.$$

Уравнение энергетического баланса особи i -й популяции имеет вид

$$G = cf_i + aP_i + Kh_i, \quad (9)$$

где G – количество энергии, получаемой особью с пищей. Оно одинаково для особей всех популяций и определяется выражением

$$G = \frac{V}{\sum N_i}. \quad (10)$$

Система уравнений (8)–(10) имеет k нетривиальных равновесных состояний, в которых численность только одной j -й популяции отлична от нуля. Численности остальных $(k - 1)$ популяций равны нулю.

$$N_j > 0, \quad (11a)$$

$$F_i = f_i - d_j = 0, \text{ если } i = j,$$

$$N_i = 0, \quad (11b)$$

$$F_i = f_i - d_i \neq 0, \text{ если } i \neq j \text{ и } i = \overline{1, k-1},$$

$$G_j = G = cf_j + aP_j + Kh_j, \quad (12)$$

$$N_j = \frac{V}{G}. \quad (13)$$

Равновесие (11) будет асимптотически устойчивым, если выполняется условие $F_i = f_i - d_i < 0$, или

$$F_j = \max(F_1, F_2, \dots, F_k) = 0. \quad (14)$$

Предложенная модель является математической формализацией дарвиновской теории естественного отбора, согласно которой в процессе конкуренции за ресурс выживает наиболее приспособленная популяция. Мерой приспособленности является коэффициент размножения F_j , удовлетворяющий выражению (14).

Это выражение (впервые было получено М.А. Ханиным [14] и Ф.Н. Семевским [7]) будем называть критерием Ханина–Семевского. Используя критерий Ханина–Семевского, можно определить величины совокупности признаков особей популяции, победившей в ходе конкуренции за ресурс. Эти величины будем называть эволюционно-оптимальными. Проиллюстрируем определение эволюционно-оптимальных вели-

чин P и h с помощью критерия Ханина–Семевского.

Составим функцию приспособленности F . Для этого выразим f из формулы (7б) и подставим в формулу (7а). Получаем

$$F(G, P, h) = \frac{G - aP - Kh}{c} - \left(\frac{D_p}{P} + a \frac{D_h}{h} \right). \quad (14a)$$

Из совокупности пар выбираем пару P_i, h_i . Приравняем $F_i = F(P_i, h_i)$ нулю. Отсюда находим:

$$G_i = G(P_i, h_i) = aP_i + Kh_i + c \left(\frac{D_p}{P_i} + \frac{D_h}{h_i} \right).$$

Для остальных $(k - 1)$ пар определяем $F(G_j, P_j, h_j)$, где $j \neq i$. В том случае, если $F(G_j, P_j, h_j) < 0$, пара P_i, h_i будет эволюционно-оптимальной, т.е. популяция особи которой имеют эти значения победит в конкуренции.

Найдем глобальный максимум F . Для этого про дифференцируем уравнение (14а) по P и h , Приравняв нулю производные, получаем

$$P^* = \sqrt{\frac{D_p c}{a}}; \quad h^* = \sqrt{\frac{D_h c}{K}}. \quad (15)$$

Приравняв уравнение (14а) нулю и подставив выражения (15), получаем:

$$G^* = 2\sqrt{D_p c a} + 2\sqrt{D_h c K}. \quad (16)$$

Если среди совокупности k популяций со значениями P_i, h_i ($i = 1, 2, \dots, k$) имеется популяция со значениями (P^*, h^*) , то она и победит в конкуренции. Значения признаков выжившей популяции удовлетворяют критерию Ханина–Семевского, поскольку

$$F(G^*, P^*, h^*) = \max F(G^*, P_i, h_i) = 0$$

(величины остальных $(k - 1)$ значений отрицательны).

На числовом примере убедимся, что значения P^* и h^* удовлетворяют критерию Ханина–Семевского.

Пусть $a = 100$ ккал·кг⁻¹·сут⁻¹, $K = 120$ ккал·см⁻¹·сут⁻¹, $c = 91250$ ккал/особь, $D_p = 0.11$ кг·сут⁻¹, $D_h = 0.033$ см·сут⁻¹. В результате по формулам (15) и (16) получаем оптимальную совокупность $P^* = 10$ кг, $h^* = 5$ см, $G^* = 3200$ ккал·сут⁻¹. Подставив эти значения в выражение (14а), получаем $F(G^*, P^*, h^*) = 0$. При любой другой совокупности признаков $F(G^*, P, h) < 0$.

Полученные значения ($P^* = 10$ кг, $h^* = 5$ см) будут эволюционно-оптимальными в том смысле, что популяция с особями, имеющими данную совокупность значений выиграют конкуренцию у

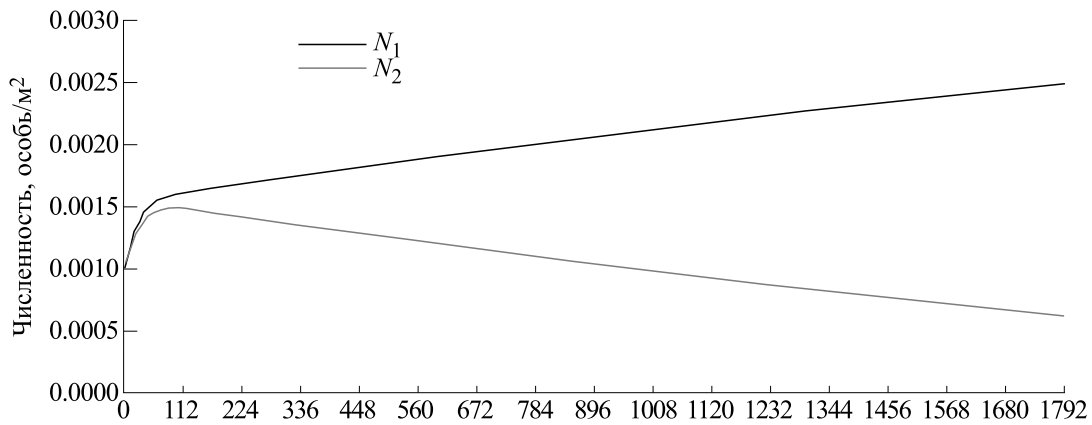


Рис. 1. Динамика конкуренции двух популяций, отличающихся значениями признаков.

популяций с другой совокупностью значений. Продemonстрируем это на модели конкуренции.

**МОДЕЛЬ КОНКУРЕНЦИИ
ДЛЯ ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ**

Имеются две популяции численностями N_1 и N_2 . Модель конкуренции имеет вид:

$$\frac{dN_1}{dt} = (f_1 - (\frac{D_p}{P_1} + \frac{D_h}{h_1}))N_1, \tag{17}$$

$$\frac{dN_2}{dt} = (f_2 - (\frac{D_p}{P_2} + \frac{D_h}{h_2}))N_2, \tag{18}$$

$$G = \frac{V}{N_1 + N_2}, \tag{19}$$

$$G = cf_1 + aP_1 + Kh_1, \tag{20}$$

$$G = cf_2 + aP_2 + Kh_2. \tag{21}$$

Проведем численные расчеты для конкретных значений параметров. Используем следующие начальные условия: $N_1(0) = N_2(0) = 0.001$ особей·м⁻², $V = 8$ ккал·м⁻²·сут⁻¹; значения признаков: $P_1 = P^* = 10$ кг, $h_1 = h^* = 5$ см, $P_2 = 8$ кг, $h_2 = 6$ см.

Результаты расчетов приведены на рис. 1. Видно, что выживает первая, наиболее приспособленная популяция, то есть та, которая удовлетворяет критерию Ханина–Семевского ($F(3200,10,5) = 0$, а $F(3200,8,6) = -0.00084$).

**КРИТЕРИЙ МИНИМУМА ПОЛУЧЕННОЙ
ЭНЕРГИИ**

В работах [15–18] показано, что эволюционно-оптимальные значения совокупности признаков

можно получить, используя критерий минимума получаемой энергии. Для этого из уравнения (7а) выразим f и подставим в формулу (7б). Получаем

$$G(P,h) = c(\frac{D_p}{P} + \frac{D_h}{h}) + aP + Kh. \tag{22}$$

Обозначим $G_i = G(P_i, h_i)$. Каждой паре значений (P_i, h_i) соответствует величина G_i . Согласно критерию минимума потребляемой энергии, в конкуренции побеждает популяция с такими значениями признаков, которые доставляют минимум потребляемой энергии G .

$$G^* = G(P^*, h^*) = \min G(P_i, h_i).$$

Алгоритм определения эволюционно-оптимальных значений пар (P_i, h_i) следующий: 1) для каждой пары значений (P_i, h_i) вычислить по формуле (22) величину G_i ; 2) выбрать пару, которой соответствует минимальное значение G .

Найдем значения признаков, доставляющих глобальный минимум функции G . Продифференцируем уравнение (22) по P и h . Приравняв нулю производные, получаем

$$P^* = \sqrt{\frac{D_p c}{a}}, h^* = \sqrt{\frac{D_h c}{K}}. \tag{23}$$

Соответствующее значение функции будет равно

$$G^* = G(P^*, h^*) = 2\sqrt{D_p c a} + 2\sqrt{D_h c K}. \tag{24}$$

Нетрудно убедиться, что $G^* = G(P^*, h^*) = \min G(P, h)$.

Как видно, эволюционно-оптимальные значения, полученные из критериев Ханина–Семевского (формула (15)) и энергетического (формула (23)), совпадают.

Убедимся в том, что значения признаков победившей популяции удовлетворяют критерию минимума потребляемой энергии. Для этого сравним $G_1 = G(P_1, h_1)$ и $G_2 = G(P_2, h_2)$. По формуле (4.1) получаем $G_1 = 3200 \text{ ккал} \cdot \text{сут}^{-1}$; $G_2 = 3276,5 \text{ ккал} \cdot \text{сут}^{-1}$. Как видим, количество потребляемой энергии у победившей популяции меньше.

Хотя оба представленных критерия эквивалентны, энергетический критерий более простой в понимании и использовании. В дальнейшем при определении эволюционно-оптимальных значений признаков организмов будем использовать энергетический критерий.

Эволюционно-оптимальное значение видовой продолжительности жизни. Естественно предположить, что видовая продолжительность жизни является таким же продуктом эволюции, как и структурно-функциональные признаки организма.

Применим вышеизложенную теорию для определения эволюционно-оптимального значения видовой продолжительности жизни.

Введем обозначения: T_M – промежуток от рождения до смерти. Его назовем *полной продолжительностью жизни*; t_0 – возраст наступления половой зрелости; $T = T_M - t_0$ – половозрелый отрезок жизни.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС ОРГАНИЗМА

В ареале произрастает растительность, которая служит пищей для популяции животных. В результате особи популяции получают энергию, которую расходуют на различные виды жизнедеятельности: основной обмен, передвижение, репродукцию, привес. Рассмотрим все компоненты, входящие в уравнение энергетического баланса.

Энергия, получаемая особью. Пусть V – плотность растительности, производимой в экосистеме в единицу времени. N – плотность численности популяции; q – удельная калорийность пищи. Количество энергии, потребляемое одной особью, составляет

$$G = \frac{V}{N} q. \quad (25)$$

Но не вся потребленная с пищей энергия усваивается организмом особи. Количество усвоенной особью энергии определяется выражением

$$G_p = G\phi, \quad (25a)$$

где ϕ – коэффициент усвоения пищевой энергии.

Влияние старения на коэффициент усвоения. Согласно гомеостатической теории старения

[20], едва ли не единственной причиной старения считается накопление оксидативных повреждений [22, 23], приводящее к снижению гомеостатических способностей организма с возрастом. Из-за снижения гомеостатической способности доставка кислорода уменьшается, так что энергетический ресурс организма падает. Поскольку расход энергии измеряется в кислородном эквиваленте, а количество кислорода в клетках организма падает с возрастом, то коэффициент усвоения пищевой энергии также уменьшается с возрастом. Эту зависимость будем аппроксимировать выражением

$$\phi = 1 - m\tau, \quad (26)$$

где τ – возраст взрослой особи ($\tau \in [0, T_M - t_0]$), t_0 – возраст наступления половой зрелости; T_M – полная продолжительность жизни; m – коэффициент старения. Предполагаем, что старение начинается с возраста наступления половой зрелости.

Подставив выражение (26) в формулу (25), получаем количество энергии, содержащееся в полученной пище:

$$G_p = \frac{V}{N} q\phi, \quad (27)$$

Для особи возраста T_M выражение (27) запишем в виде

$$G_p(T) = G(1 - mT), \quad (27a)$$

где $T = T_M - t_0$ – половозрелый отрезок жизни особи, $G = \frac{V}{N} q$.

Расход энергии на воспроизводство. Очевидно, что энергозатраты на воспроизводство пропорциональны плодовитости f и определяются выражением

$$W_f = cf, \quad (28)$$

где c – коэффициент пропорциональности, соответствующий энергии, затрачиваемой родителем на выкармливание одного потомка.

Затраты энергии на основной обмен и передвижение. Эти затраты определим известным выражением [24]:

$$W_0 = aP\gamma, \quad (29)$$

где P – масса тела. В дальнейшем упрощенно полагаем $\gamma = 1$.

Энергозатраты на привес. Данные затраты будем определять выражением

$$W_b = b \frac{dP}{d\tau}, \quad (30)$$

где b – удельная калорийность тела особи.

В результате уравнение энергетического баланса особи возраста τ примет вид

$$G_p = W_f + W_0 + W_b \quad (31)$$

или

$$G(1 - m\tau) = cf + aP + b \frac{dP}{d\tau}. \quad (31a)$$

Масса тела особи возраста T_M , как будет показано, равна P_0 , т.е. массе особи возраста t_0 . Перепишем уравнение энергетического баланса (31a) для особи возраста T_M :

$$G(1 - mT) = cf + aP_0 + b \frac{dP(T)}{dT}. \quad (32)$$

ДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА С УЧЕТОМ ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ

Предлагается аналитическая модель сообщества, учитывающая возрастную структуру популяции.

Пусть $n(\tau, t)$ — плотность численности популяции, т.е. численность особей возраста τ в момент времени t . Число особей в интервале возраста от t_1 до t_2 определяется выражением

$$N(t) = \int_{t_1}^{t_2} n(\tau, t) d\tau. \quad (33a)$$

Уравнение динамики плотности численности популяции представим известным уравнением Лотки [25].

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial n}{\partial \tau} = -d(\tau, t)n, \quad (33)$$

где $d(\tau, t)$ — смертность.

Граничное условие

$$n(0, t) = \int_{t_0}^{T_M} f(\tau)n(\tau, t) d\tau \quad (34)$$

определяет количество новорожденных в момент времени t . Здесь $f(\tau)$ — плодовитость (количество потомков, произведенных особью возраста τ), t_0 — возраст наступления половой зрелости, T_M — полная продолжительность жизни особи.

Смертность зависит от ряда причин: 1) внешние факторы определяются климатом, наличием хищников и паразитов; 2) внутренние факторы обусловлены физиологическим состоянием организма; 3) приспособляясь к условиям внешней среды, организм развивает адаптивные признаки \vec{a} , величина этих признаков также оказывает влияние на смертность. Таким образом, смерт-

ность зависит от следующих параметров: \vec{D} — учитывают постоянные факторы среды, $\vec{\beta}$ — учитывают физиологическое состояние организма, \vec{a} — адаптивные признаки. Тогда

$$d = d(\vec{D}, \vec{\beta}, \vec{a}). \quad (35)$$

В равновесии уравнение (33) принимает вид

$$\frac{dn}{d\tau} = -d(\tau)n \quad (36)$$

с начальным условием

$$n(0) = \int_{t_0}^{T_M} n(\tau)f(\tau)d\tau. \quad (37)$$

Решение уравнения (36) имеет вид

$$n(\tau) = n_0 \exp\left(-\int_0^{\tau} d(x)dx\right), \quad (38)$$

где $n_0 = n(0)$ — численность новорожденных. Подставив выражение (38) в уравнение (37), получаем

$$n_0 = n_0 \int_{t_0}^{T_M} f(\tau) \exp\left(-\int_0^{\tau} d(x)dx\right) d\tau. \quad (39)$$

Сократив обе части на $n_0 \neq 0$, получаем

$$\int_{t_0}^{T_M} f(\tau) \exp\left(-\int_0^{\tau} d(x)dx\right) d\tau - 1 = 0. \quad (40)$$

Уравнение (6.8) устанавливает связь между смертностью d и плодовитостью f в равновесном состоянии сообщества.

Динамика популяции, состоящей из двух возрастных групп — ювенильной и половозрелой. Ювенильные особи. Возраст: от момента рождения до возраста наступления половой зрелости t_0 ($\tau \in [0, t_0]$). Упрощенно полагаем, что ювенильные особи потребляют энергию только с молоком матери.

Плодовитость ювенильных особей равна нулю.

Смертность ювенилов d_U обусловлена внешними факторами и зависит от возраста.

Половозрелые особи. Возраст: $\tau \in [t_0, T_M]$, где T_M — продолжительность жизни особи (от рождения до смерти).

Плодовитость: упрощенно будем полагать, что плодовитость f постоянна во всех возрастах.

Смертность: упрощенно полагаем, что смертность половозрелых особей d_M обусловлена

внешними факторами и не зависит от возраста ($d_M = \text{const}$).

В результате численность новорожденных определяем формулой

$$n_0 = f \int_{t_0}^{T_M} n(\tau) d\tau, \quad (41)$$

где $n(\tau)$ — плотность численности половозрелых особей. Она определяется выражением

$$n(\tau) = n(t_0) \exp(-d_M \tau). \quad (42)$$

Плотность численности половозрелых особей в возрасте t_0 — $n(t_0)$ — определяется выражением

$$n(t_0) = n_0 \int_0^{t_0} \exp(-d_u \tau) d\tau, \quad (43)$$

где d_u — ювенильная смертность.

Обозначим через w выживаемость новорожденных:

$$w = \int_0^{t_0} \exp(-d_u \tau) d\tau. \quad (44)$$

Подставив выражение (44) в выражение (43), получаем

$$n(t_0) = n_0 w. \quad (45)$$

Подставим выражения (42) и (45) в формулу (41). Получаем

$$n_0 = f n_0 w \int_{t_0}^{T_M} \exp(-d_M \tau) d\tau. \quad (46)$$

Сократив обе части формулы (46) на $n_0 \neq 0$ и проинтегрировав, получаем

$$f w \frac{\exp(-d_M t_0) - \exp(-d_M T_M)}{d_M} = 1. \quad (47)$$

В том случае, если внешняя смертность равна нулю ($d_M = 0$), особи гибнут только от старости, дожив до предельного возраста T_M . Поскольку

$$\lim_{d_M \rightarrow 0} \frac{\exp(-d_M t_0) - \exp(-d_M T_M)}{d_M} = T_M - t_0,$$

получаем

$$f w (T_M - t_0) = 1. \quad (48)$$

Так как

$$T = T_M - t_0, \quad (49)$$

то подставив выражение (49) в уравнение (48), получаем

$$f = \frac{1}{wT}. \quad (50)$$

Формула (50) связывает плодовитость с длительностью половозрелого периода жизни особи и соответствует понятию сопряженности. Согласно этому понятию, высокая плодовитость

обуславливает высокую смертность и как следствие низкую продолжительность жизни. И наоборот, высокая продолжительность жизни обуславливает низкую плодовитость.

В природе наблюдаются виды с практически нулевой взрослой смертностью. При этом они имеют высокую продолжительность жизни. Например, калифорнийский кондор живет довольно долго (примерно 60 лет) и при этом имеет очень низкую плодовитость (один потомок за два года).

Если предположить, что смертность соответствует величине $d = \frac{1}{wT}$, то динамику плотности численности взрослых особей популяции можно представить выражением

$$\frac{dN}{dt} = (f - \frac{1}{wT})N.$$

В состоянии равновесия справедливо выражение (50). Подставив это выражение в формулу (31a), получаем дифференциальное уравнение динамики массы половозрелой особи в равновесном состоянии биологического сообщества:

$$G(1 - m\tau) = \frac{c}{wT} + aP + b \frac{dP}{d\tau} \quad (50a)$$

с начальным условием $P(0) = P_0$.

Это уравнение имеет аналитическое решение, которое приводим ниже. Обозначим $K = (G - \frac{c}{wT})/b$; $r = \frac{Gm}{b}$; $g = \frac{a}{b}$.

Получаем:

$$P(\tau) = (K + \frac{r}{g} - r\tau)/g + (P_0 - (K + \frac{r}{g})/g) \exp(-g\tau). \quad (51)$$

Продemonстрируем решение на конкретном примере.

Пусть значения параметров будут равны: $c = 585$ ккал, $b = 600$ ккал·кг⁻¹, $a = 100$ ккал·кг⁻¹·сут⁻¹, $P_0 = 1,4$ кг, $T = 25$ сут, $w = 1$, $G = 204$ ккал·сут⁻¹, $m = 0,01$ сут⁻¹. На рис. 2 изображен график зависимости массы особи от возраста τ для данных значений параметров.

Как видно из графика, сначала масса возрастает, достигая максимального значения в возрасте 7 суток. Это объясняется тем, что избыток массы образуется за счет образовавшихся жировых тканей организма. Затем масса снижается, поскольку полезная энергия, получаемая особью, уменьшается, и недостаток ее покрывается не только энергией, получаемой с пищей, но и за счет образовавшихся жировых тканей. Наконец, наступает

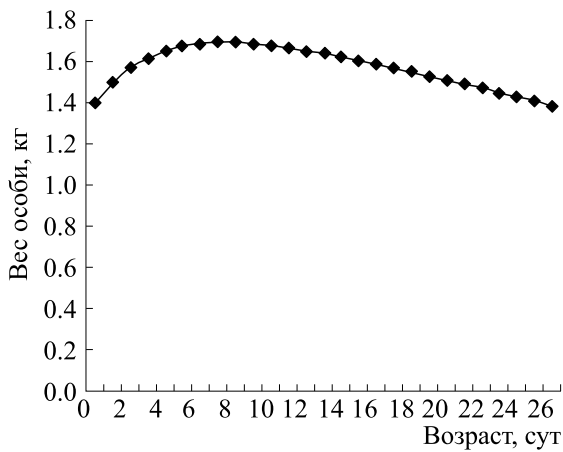


Рис. 2. Зависимость веса тела взрослой особи от ее возраста.

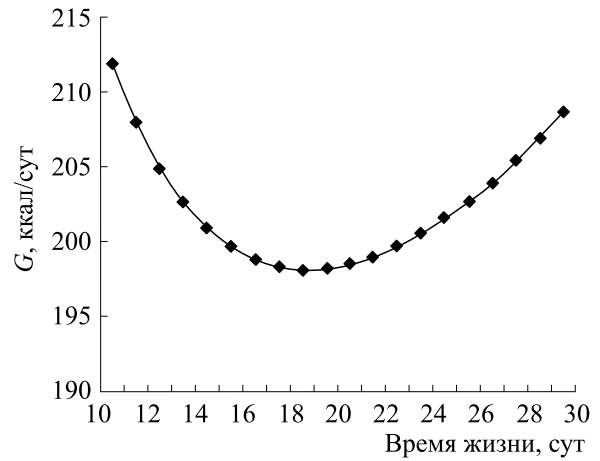


Рис. 3. Зависимость потребляемой энергии от продолжительности жизни особей популяции.

возраст T_M . В этом возрасте масса тела становится равной начальной массе P_0 . Запас жира исчерпан, и особь погибает, поскольку необходимая энергия будет пополняться за счет тканей жизненно важных органов.

Оптимальная величина продолжительности зрелого периода жизни T , при которой потребляемая энергия минимальна, является, согласно энергетическому критерию, также эволюционно-оптимальной величиной.

Уравнение (51) для особи возраста T_M примет вид

$$P_0 = (K + \frac{r}{g} - rT)/g + (P_0 - (K + \frac{r}{g})/g)\exp(-gT). \quad (51a)$$

Откуда получаем количество энергии, потребляемое каждой особью популяций в конце жизни (оно одинаково для взрослых особей любого возраста).

$$G(T) = \frac{aP_0 + c/(wT)}{1 + m/g - mT/(1 - \exp(-gT))}. \quad (52)$$

На рис. 3 изображен график зависимости потребляемой особью энергии от половозрелого периода жизни T .

Из рис. 3 видно, что при $T^* = 18$, $G^* = \min(G) = 198.1$. Это значит, что имеется оптимальная продолжительность жизни, при которой энергия, потребляемая особью минимальна.

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА

Уравнения динамики экосистемы представим в виде

$$\frac{dN}{dt} = (f - \frac{1}{wT})N, \quad (53a)$$

$$G = V_q/N, \quad (53б)$$

$$f = (G(1 - mT) - aP_0 - b \frac{dP(T)}{d\tau})/c, \quad (53в)$$

где N – плотность численности взрослых особей; $V_q = Vq$ (V – плотность пищевого ресурса, q – удельная калорийность ресурса).

В итоге получаем следующий алгоритм расчета биологического сообщества.

Шаг 1. Задаем начальные значения N_0 и f_0 . Решая численно дифференциальное уравнение (53а), получаем численность популяции на следующем (первом) временном шаге N_1 .

Шаг 2. Из уравнения (53б) находим G_1 .

Шаг 3. По формуле (53в) находим значение плодовитости f_1 на следующем временном слое. Переходим на шаг 1 и т.д.

Равновесные значения переменных сообщества имеют вид

$$\bar{f} = 1/(wT), \quad (54a)$$

$$G(T) = \frac{aP_0 + c/(wT)}{1 + m/g - mT/(1 - \exp(-gT))}, \quad (54б)$$

$$\bar{N} = V_q/\bar{G}. \quad (54в)$$

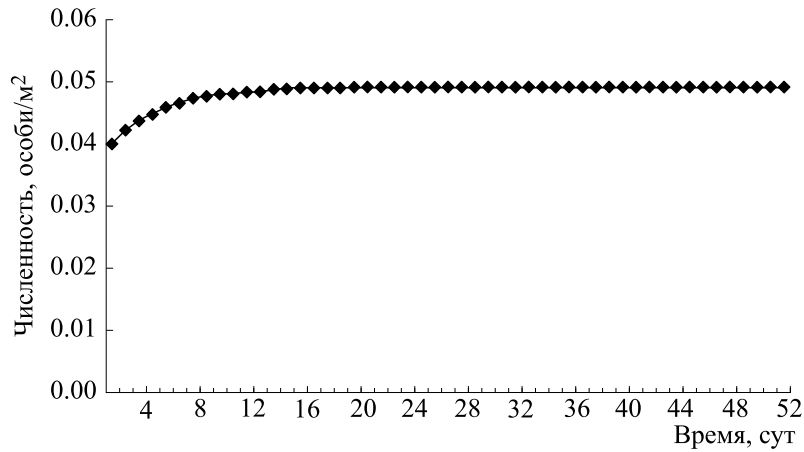


Рис. 4. Динамика численности популяции.

Продемонстрируем расчет динамики экосистемы на конкретном примере

Для этого решим систему уравнений (53) для конкретных значений параметров.

Пусть $N_0 = 0.04$ особь·м⁻² и $V_q = 11.2$ ккал·м⁻²·сут⁻¹. Для $T = 25$ сут мы получили энергию привеса $W_b(25) = -11.76$ ккал·сут⁻¹ и основного обмена $W_0(25) = W_0(0) = 140$ ккал·сут⁻¹.

На рис. 4 изображена динамика численности популяции. Как видим, численность стремится к величине $\bar{N} = 0.055$ особь·м⁻². Как показали расчеты, $f \rightarrow \bar{f} = 0.04$ сут⁻¹, $G \rightarrow \bar{G} = 202.7$ ккал·сут⁻¹.

Из графика на рис. 4 видно, что плотность численности стремится к равновесному состоянию, полученному из решения системы (53).

МОДЕЛЬ КОНКУРЕНЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ

Используя модель динамики биологического сообщества, построим модель конкуренции популяций с различной продолжительностью половозрелого отрезка жизни (ПОЖ). Покажем, что в соответствии с энергетическим критерием эволюционной оптимальности в конкуренции побеждает популяция с оптимальной продолжительностью жизни (доставляющей минимум потребляемой энергии). Напишем уравнения биологического сообщества, содержащего популяции с различными значениями ПОЖ.

Динамика численностей популяций:

$$\frac{dN_i}{dt} = (f_i - \frac{1}{T_i})N_i \quad (55)$$

Количество энергии, получаемое одной взрослой особью:

$$G = \frac{V_q}{\sum N_i} \quad (356)$$

Плодовитость особи i -й популяции получаем из выражений (54):

$$f_i = (G(1 + \frac{m}{g} - \frac{mT_i}{1 - \exp(-gT_i)}) - W_0)/c, \quad (57)$$

где W_0 — энергозатраты на основной обмен и передвижение особи в возрасте T_i . Они определяются формулой

$$W_0 = aP_0. \quad (58)$$

Рассмотрим три популяции со следующими значениями продолжительности жизни: $T_1 = 12$ сут, $T_2 = T^* = 18$ сут, $T_3 = 25$ сут. Этим величинам соответствуют следующие равновесные значения потребляемой энергии: $G(T_1) = 204.9$ ккал·сут⁻¹, $G(T_2) = 198.2$ ккал·сут⁻¹; $G(T_3) = 202.7$ ккал·сут⁻¹ и привесов: $Wb_1 = -8.4$ ккал·сут⁻¹, $Wb_2 = -10.0$ ккал·сут⁻¹; $Wb_3 = -11.4$ ккал·сут⁻¹.

Как видим, минимальное значение потребляемой энергии имеет популяция с продолжительностью жизни $T_2 = 18$ сут.

Для заданных значений продолжительности жизни и представленных значениях параметров решаем систему уравнений (55)–(57). Выберем следующие начальные условия: $N_1(0) = N_2(0) = N_3(0) = 0.013$ особь·м⁻².

На рис. 5 представлено решение этой системы. Из графика видим, что в соответствии с энергетическим критерием эволюционной оптимальности в конкуренции побеждает популяция с оптимальным значением адаптивного признака (в

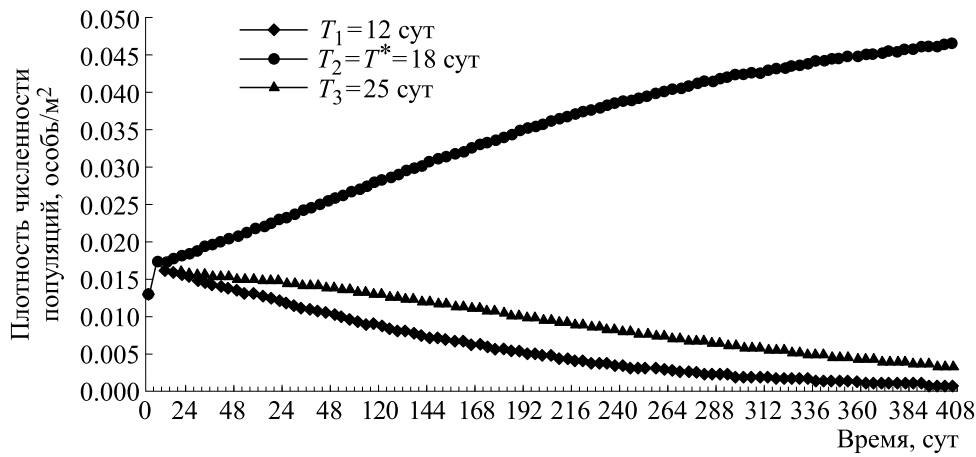


Рис. 5. Динамика численности конкурирующих популяций с разными значениями ПОЖ.

данном случае продолжительности жизни). При этом получаемая особью энергия минимальна.

Из графика видно, что выживает популяция особи которой имеют оптимальную продолжительность жизни $T^* = 18$ сут. Численности других популяций стремятся к нулю.

**УПРОЩЕННАЯ ФОРМУЛА
ЭВОЛЮЦИОННО-ОПТИМАЛЬНОГО
ЗНАЧЕНИЯ ПОЛОВОЗРЕЛОГО
ОТРЕЗКА ЖИЗНИ**

Напишем уравнение энергетического баланса взрослой особи возраста T в равновесном состоянии экосистемы:

$$G(1 - mT) = W_f(T) + W_0(T) + W_b(T), \quad (59)$$

где $W_f(T) = \frac{c}{wT}$, $W_0(T) = aP_0$, $W_b(T) = b \frac{dP(T)}{dt}$,
или

$$G(1 - mT) = \frac{c}{wT} + W_0(T) + b \frac{dP(T)}{dt}. \quad (60)$$

Как видим, расчеты для возраста T показывают, что энергозатраты на привес много меньше энергозатрат на основной обмен и передвижение ($W_b(T) \ll W_0(T)$). В результате полагаем $W_b(T) \approx 0$. Перепишем уравнение (60) в виде

$$G(1 - mT) \approx \frac{c}{wT} + W_0. \quad (61)$$

Отсюда количество полученной энергии будет равно

$$G \approx \left(\frac{c}{wT} + W_0 \right) / (1 - mT). \quad (61a)$$

Далее находим оптимальное T^* , доставляющее минимум G .

Продифференцировав уравнение (61a) по T и приравняв производную нулю, получаем

$$T^* = \frac{c}{wW_0} \left(\sqrt{1 + \frac{wW_0}{cm}} - 1 \right), \quad (62)$$

где $W_0 = aP_0$.

Эволюционно-оптимальная величина ПОЖ, полученная по упрощенной формуле $T^* = 16.7$ сут. Достоинством формулы (62) по сравнению с алгоритмом определения оптимума T численным методом в том, что выявлена явная зависимость видового ПОЖ от параметров организма.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что величины признаков организма являются продуктами эволюции и при этом удовлетворяют критерию эволюционной оптимальности Ханина–Семевского.
2. Определено существование эквивалентного критерия, критерия минимума потребляемой энергии, позволяющего более простым способом определять эволюционно-оптимальные значения адаптивных признаков организма.
3. В уравнении энергетического баланса организма учитывался тот факт, что коэффициент усвоения пищевой энергии уменьшается с возрастом пропорционально коэффициенту старения, который обусловлен накоплением окислительных повреждений клеток с возрастом.
4. Определена динамика веса тела взрослой особи от возраста, согласно которой, вес вначале растет до определенной величины, затем падает до первоначального значения. В этот момент происходит смерть организма.
5. Из системы уравнений равновесного состояния сообщества определяется зависимость потребляемой энергии от продолжительности жизни.
6. Используя критерий минимума потребляемой энергии, получаем эволюционно-оптимальную величину видового ПОЖ.

7. Справедливость предложенной теории подтверждалась моделью конкуренции за ресурс популяций с различными значениями видового ПОЖ. В процессе конкуренции выживала популяция с ПОЖ, доставляющим минимум потребляемой энергии.

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. А. П. Левич, *Искусство и метод в моделировании систем* (Москва–Ижевск, 2012).
2. А. В. Марков и Е. Б. Наймарк, *Количественные закономерности макроэволюции* (Геос, М., 1998).
3. Н. В. Волосова, Математические структуры и моделирование, **2** (38), 27 (2016).
4. Г. Ф. Гаузе, *The struggle for existence* (Hafner, New York, 1934).
5. И. Ф. Образцов и М. А. Ханин, *Оптимальные биомеханические системы* (Медицина, М., 1989).
6. Р. Розен, *Принцип оптимальности в биологии* (Мир, М., 1969).
7. Ф. Н. Семевский и С. М. Семенов, *Математическое моделирование экологических процессов* (Гидрометеиздат, Л., 1982).
8. А. Т. Терехин и Е. В. Будилова, Журн. общ. биологии, **62** (1), 286 (2001).
9. E. L. Charnov, *Life history invariants. Some exploration of sinnetry in evolutionary ecology* (Univ. Press, Oxford, 1993).
10. J. Kozlovski and J. Weiner, Amer. Nat., **149** (1), 423 (1997).
11. R. E. Ulanowicz, Ecol. Model., **220** (16), 1886 (2009).
12. П. В. Фурсова, Л. П. Левич и И. Л. Алексеев, Успехи соврем. биологии, **123** (2), 115(2003).
13. И. В. Волвенко, Биофизика, **57** (3), 476 (2012).
14. М. А. Ханин, Н. Л. Дорфман, И. Б. Бухаров и В. Г. Левадный, *Экстремальные принципы в биологии и физиологии* (Наука, М., 1978).
15. Л. Л. Овсянников и В. П. Пасекон, Журн. общ. биологии, **51** (5), 709(1990).
16. Л. Л. Овсянников и М. И. Шпитонков, Биофизика, **65** (1), 1171(2020).
17. Л. Л. Овсянников и Ю. М. Свиричев, Журн. общ. биологии, **14** (5), 621(1983).
18. Л. Л. Овсянников, Тр. Института системного анализа РАН, **69** (2), 78(2019).
19. Л. А. Гаврилов и Н. С. Гаврилова, *Биология продолжительности жизни* (Наука, М., 1991).
20. В. И. Новосельцев, Ж. А. Новосельцева и А. Н. Яшин, Успехи геронтологии, **12**, 149 (2003).
21. В. П. Скулачев, *Жизнь без старости*. <https://www.atpsyntase.info/Gero/ZhBS-2013.pdf>
22. В. К. Кольтовер, Успехи соврем. биологии, **96**, 85 (1983)
23. D. Harman, Exp. Gerontol., **33**, 95(1998)
24. M. Kleiber, Higaridia, **6**, 315 (1932).
25. A. J. Lotka, *Elements of Mathematical Biology* (Williams and Wilkins, Baltimore, 1925).

The Evolutionary Optimality of the Body's Features. Species Life Span as a Product of Evolution

L.L. Ovsyannikov*

*Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

According to Darwin's theory of natural selection, the fittest population can survive in competition for resources. The values of the traits of the fittest are referred to as evolutionarily optimal trait values. A model of a biological community that consists of populations that compete to get a hold of plant resources is being built. The model included the equation of population dynamics, the equation of the energy balance of a mature individual, the equations of the dynamics of the density of a food resource. To determine the evolutionarily optimal values of traits, Khanin and Semevsky proposed a criterion according to which the evolutionarily optimal values of traits deliver the maximum to the reproduction coefficient equal to zero in the equilibrium state of the community. It was shown that there is an equivalent criterion for the minimum energy received by an individual. Using these criteria, a method for determining the evolutionarily optimal values of body weight and the thickness of the coat of species was demonstrated. It is assumed that the species life span, like other traits of the organism, is also a product of evolution. Using the criterion of the minimum energy received by an individual, the specific life span is determined as a function of external factors and other parameters of the organism. The results obtained were confirmed by numerical experiments for specific parameter values.

Keywords: evolutionary optimality, equilibrium state, competition between populations, adaptive traits, life span