

СОДЕРЖАНИЕ

Том 67, номер 6, 2022

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата
А.Ф. Ванин, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев 1045
- Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии
А.А. Бывалов, В.С. Белозёров, Б.А. Ананченко, И.В. Коньшев 1056
- Обзор математических моделей, описывающих механические движения в молекуле ДНК
М.В. Беженар, А.А. Елкина, Х.Л. Эрнандес Касерес, М.Г. Барышев, А.О. Сулима, С.С. Джимаков, В.А. Исаев 1068
- Возможные фазовые эффекты в дисперсии глобулярного белка в диапазоне температур нативного состояния
С.П. Рожков, А.С. Горюнов 1079
- Исследование методом ЯМР ^1H влияния *трет*-бутилового спирта на коллаген I
М.Н. Машкин, В.А. Машкина, С.Г. Козлова 1089
- Взаимодействие молекул сывороточного альбумина, жирных кислот и графенов наночастиц шунгитового углерода в водной дисперсии по данным спектроскопии комбинационного рассеяния воды в диапазоне больших волновых чисел
С.П. Рожков, А.С. Горюнов, В.А. Колодей, Л.А. Пронькина, Н.Н. Рожкова 1093
- Неэквивалентность мономеров в димерной структуре бактериальной фоторегулируемой аденилатциклазы
А.М. Кулакова, М.Г. Хренова, А.В. Немухин 1101
- Папаиноподобная протеаза PLpro коронавируса SARS-COV-2 как противовирусная мишень для ингибиторов активного центра и белок-белковых взаимодействий
П.В. Ершов, Е.О. Яблоков, Ю.В. Мезенцев, Г.Н. Чуев, М.В. Федотова, С.Е. Кручинин, А.С. Иванов 1109
-

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

- Димеризация свободного и ассоциированного с мембранами фотосистемы II белка PsbO при облучении УФ-светом
М.С. Христин, Т.Н. Смолова, А.А. Хоробрых 1122
- Вклад фосфолипидов ядерной мембраны в формирование электрокинетического потенциала
Л.А. Минасбекян, А.В. Неркарян 1131
- Применение базовых изотопных уравнений для описания динамики микробиологических процессов: перераспределение дейтерия
В.А. Вавилин, Л.Я. Локшина 1143

Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на лимфоциты крови человека	
<i>А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман</i>	1158
Активность и каталитические характеристики сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии	
<i>Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев</i>	1163
Альтернативные фотосенсибилизаторы для фотохимиотерапии на основе лекарственных препаратов – производных нитрофурана	
<i>Г.Ж. Парра, Л.П. Феррейра, Г.П. Борисевич, Ю.Е. Борисевич</i>	1176
Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки	
<i>А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман</i>	1185

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Причинно-следственная связь между физиологическими и патологическими процессами в мозге и в желудочно-кишечном тракте: ось «мозг – кишечник»	
<i>В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина</i>	1192
Влияние нелинейности упругих свойств роговицы на результаты тонометрии по Шютцу: оценка на основе двухкомпонентной математической модели	
<i>И.Н. Моисеева, А.А. Штейн</i>	1209
Пуринергические механизмы адаптации различных типов двигательных единиц в условиях аллергической перестройки	
<i>А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин</i>	1220
Исследование кинетики транспорта радиофармацевтических соединений на основе фолиевой кислоты, меченных галлием-68	
<i>А.С. Лунёв, К.А. Лунёва, Ф.И. Василевич, М.Г. Рахимов, А.А. Ларенков</i>	1224
Гиперкальциевая модель для выявления постсинаптических эффектов АТФ	
<i>А.Е. Хайруллин, С.Н. Гришин, А.Ю. Теплов, А.А. Еремеев, Т.В. Балтина, А.У. Зиганшин</i>	1232
Оценка тромбообразования при имплантации в артерию кролика полиуретанового сосудистого протеза, обработанного азотной плазмой	
<i>В.С. Чудинов, И.Н. Шардаков, В.В. Литвинов, Г.Г. Фрейнд, С.Ю. Солодников, В.В. Маслова</i>	1236
Разработка медицинских сенсорных систем в пульмонологии на основе измерения электрического импеданса	
<i>В.Ю. Мишланов, А.Л. Зувев, Я.В. Мишланов</i>	1243
Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота в лечении COVID-19	
<i>Е.В. Печёнкин, А.В. Коврижкин, А.В. Пекшев, А.Б. Ваганов, Н.А. Шаратов, А.Ф. Ванин</i>	1251
К теории явления суперкомпенсации на основе модели нелинейного переторможенного осциллятора	
<i>А.А. Зайцев, С.В. Сазонов</i>	1262
Модель эффекта Брока–Зульцера	
<i>С.И. Ляпунов, И.И. Шошина</i>	1269
Формальное математическое описание концепции интеллекта в модельной задаче о влиянии наблюдений на квантовые процессы	
<i>Л.Ю. Щурова, В.А. Намиот</i>	1277
Сравнительный анализ методов оценки скорости старения популяций	
<i>В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Н.А. Ермакова</i>	1288

Contents

Vol. 67, No. 6, 2022

Molecular Biophysics

- Nitrosonium Cation Release from Dinitrosyl Iron Complexes during Superoxide Anion- or Ethylenediaminetetraacetate-Induced Decomposition of These Complexes
A.F. Vanin, V.D. Mikoyan, and N.A. Tkachev 1045
- Specific and Non-Specific Interactions of *Yersinia pseudotuberculosis* Lipopolysaccharide with Monoclonal Antibodies Assessed by Atomic Force Microscopy
A.A. Byvalov, V.S. Belozherov, B.A. Ananchenko, and I.V. Konyshv 1056
- Review of Mathematical Models Describing the Mechanical Motion in a DNA Molecule
M.V. Bezhenar, A.A. Elkina, J.L. Hernandez Caceres, M.G. Baryshev, A.O. Sulima, S.S. Dzhimak, and V.A. Isaev 1068
- Possible Phase Effects in Dispersion of a Globular Protein in the Temperature Range of the Protein's Native State
S.P. Rozhkov and A.S. Goryunov 1079
- A ^1H NMR Study of the Effect of *tert*-Butyl Alcohol on Collagen I
M.N. Mashkin, V.A. Mashkina, and S.G. Kozlova 1089
- Interaction between Serum Albumin Molecules, Fatty Acids and Graphenes of Shungite Carbon Nanoparticles in Aqueous Dispersion Based on Raman Spectroscopic Analysis of Water in the High Wavenumber Region
S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov, V.A. Kolodey, L.A. Pron'kina, and N.N. Rozhkova 1093
- Non-Equivalence of Monomers in the Dimeric Structure of a Bacterial Light-Regulated Adenylyl Cyclase
A.M. Kulakova, M.G. Khrenova, and A.V. Nemukhin 1101
- SARS-COV-2 Coronavirus Papain-like Protease PLpro as an Antiviral Drug Target for Inhibitors of Active Site and Protein-Protein Interactions
P.V. Ershov, E.O. Yablokov, Yu.V. Mezentssev, G.N. Chuev, M.V. Fedotova, S.E. Kruchinin, and A.S. Ivanov 1109
-

Cell Biophysics

- Dimerization of the Free and Photosystem II-Associated PsbO Protein upon Irradiation of UV Light
M.S. Khristin, T.N. Smolova, and A.A. Khorobrykh 1122
- Contribution of Nuclear Membrane Phospholipids to the Formation of Elektrokinetic Potential
L.A. Minasbekyan and A.V. Nerkararyan 1131
- Application of the Basic Isotope Equations for Description of the Dynamics of Microbiological Processes: Deuterium Redistribution
V.A. Vavilin and L.Y. Lokshina 1143
- Mechanism of Cytotoxic Activity of Aurum Polyacrylate against Human Blood Lymphocytes
A.K. Chigasova, L.A. Ostrovskaya, and D.B. Korman 1158
- Activity and Catalytic Characteristics of Rat Liver Mitochondrial Succinate Dehydrogenase at Moderate Hypothermia
R.A. Khalilov, A.M. Dzhafarova, and V.R. Abdulaev 1163

Alternative Photosensitizers for Photochemotherapy Based on Medicinal Drugs That are Derivatives of Nitrofuran	
<i>G.G. Parra, L.P. Ferreira, G.P. Borissevitch, and I.E. Borissevitch</i>	1176
Aurum Polyacrylate: Mechanism of Cytotoxic Action on Tumor Cells	
<i>A.K. Chigasova, L.A. Ostrovskaya, and D.B. Korman</i>	1185

Complex Systems Biophysics

Causal Relationship between Physiological and Pathological Processes in the Brain and in the Gastrointestinal Tract: the Brain–Gut Axis	
<i>V.P. Reutov and E.G. Sorokin</i>	1192
Influence of Nonlinearity of the Elastic Properties of the Cornea on the Results of Schiötz Tonometry: Estimation on the Basis of a Two-Component Mathematical Model	
<i>I.N. Moiseeva and A.A. Stein</i>	1209
Purinergic Mechanisms of Adaptation of Different Types of Motor Units in the Conditions of Allergic Reorganization	
<i>A.E. Khairullin, A.Yu. Teplov, S.N. Grishin, and A.U. Ziganshin</i>	1220
Kinetic Study of Folate-Based Radiopharmaceuticals Labeled by ^{68}Ga	
<i>A.S. Lunev, K.A. Lunyova, F.I. Vasilevich, M.G. Rakhimov, and A.A. Larenkov</i>	1224
A High Calcium Level-Based Model for Identifying Postsynaptic Effects of ATP	
<i>A.E. Khairullin, S.N. Grishin, A.Yu. Teplov, A.A. Eremeev, T.V. Baltina, and A.U. Ziganshin</i>	1232
Assessment of Thrombus Formation during Implantation of a Polyurethane Vascular Prosthesis Treated with Nitrogen Plasma in the Rabbit Artery	
<i>V.S. Chudinov, I.N. Shardakov, V.V. Litvinov, G.G. Friend, S.Yu. Solodnikov, and V.V. Maslova</i>	1236
An Electric Impedance-Based Construction of Medical Sensor Systems in Pulmonary Medicine	
<i>V.Ju. Mishlanov, A.L. Zuev, and Ya.V. Mishlanov</i>	1243
High Dose Inhalation with Gaseous Nitric Oxide Flow in COVID-19 Treatment	
<i>E.V. Pechyonkin, A.V. Kovrizhkin, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, N.A. Sharapov, and A.F. Vanin</i>	1251
To the Theory of the Supercompensation Phenomenon Based on a Model of a Nonlinear Overdamped Oscillator	
<i>A.A. Zaitsev and S.V. Sazonov</i>	1262
A Model of the Broca–Sulzer Effect	
<i>S.I. Lyapunov and I.I. Shoshina</i>	1269
Formal Mathematical Description of Intelligence Concept in a Model Problem on the Influence of Observations on Quantum Processes	
<i>L. Yu. Shchurova and V.A. Namiot</i>	1277
Comparative Analysis of Methods for Estimating the Rate of Population Aging	
<i>V.I. Dontsov, V.N. Krut'ko, and N.A. Yermakova</i>	1288

УДК 577.3

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ ИЗ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ИХ РАСПАДЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНИОНОВ СУПЕРОКСИДА ИЛИ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА

© 2022 г. А.Ф. Ванин*, #, В.Д. Микоян*, Н.А. Ткачев*

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

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

Поступила в редакцию 14.09.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

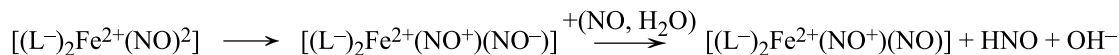
Оптическим методом продемонстрирован полный распад биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом под действием стократного избытка анионов супероксида калия (KO₂) или ЭДТА. В соответствии с резонансной структурой [(RS⁻)₂Fe²⁺(NO⁺)₂(NO)₂], характерной для этих комплексов, их распад, вызванный взаимодействием супероксида с тиоловыми и NO-компонентами комплексов, приводил к высвобождению в раствор катионов нитрозония (NO⁺), превращавшихся в результате гидролиза в анионы нитрита, в количестве, равном половине нитрозильных (NO⁺, NO) лигандов в комплексах. При распаде этих комплексов, вызванном ЭДТА как хелатором железа, высвобождавшиеся катионы NO⁺ не гидролизировались, а связывались с третичными аминами в ЭДТА. При этом биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом трансформировались в высокоспиновые (S = 3/2) мононитрозильные комплексы, регистрируемые методом ЭПР. Полученные результаты полностью согласуются с представлениями о динитрозильных комплексах железа с тиолсодержащими лигандами, как соединениях, способных в живых организмах выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония.

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

DOI: 10.31857/S0006302922060011, EDN: LITINT

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) при их разрушении способны высвобождать катионы нитрозония (NO⁺), образующие с присутствующими тиолами S-нитрозотиолы, а в их отсутствие — гидролизующиеся (в реакции с анионами гидроксила) до анионов нитрита [1–8]. Эта способность ДНКЖ определяется существованием железо-ди-

нитрозильных фрагментов (ЖДНФ) этих комплексов в одной из их резонансных структур, описываемой как Fe²⁺(NO⁺)(NO). Такая структура возникает в результате реакции диспропорционирования двух молекул NO, связывающихся с катионом двухвалентного железа, с последующим протонированием образующегося аниона нитроксила и его выходом из лигандного окружения железа (см. схему [2, 9]):



Включение вместо аниона нитроксила третьей молекулы NO и приводит к образованию указанной выше резонансной структуры ЖДНФ. В соответствии с ней резонансные структуры моно- и би-

ядерных форм ДНКЖ (М- и Б-ДНКЖ), включающие в себя различные анионные (L⁻) лиганды, могут быть представлены соответственно как [(L⁻)₂Fe²⁺-(NO⁺)(NO)] и [(L⁻)₂Fe²⁺(NO⁺)₂(NO)₂].

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, ЖДНФ — железо-динитрозильные фрагменты, М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ — моно- и биядерные формы динитрозильных комплексов железа, МНКЖ — мононитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, GS-NO — S-нитрозоглутатион.

При включении в ДНКЖ в качестве анионных лигандов соединений, не содержащих тиоловых групп, комплексы становятся неустойчивыми из-за гидролиза катионов нитрозония, входящих в состав этих комплексов. Потеряв эти катионы, М- и Б-ДНКЖ превращаются в моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ) (формула $[(L^-)_2Fe^{2+}-(NO)]$). Что касается высвобождающихся катионов нитрозония, они переходят в раствор, где гидролизуются до анионов нитрита (при сохранении нейтральных значений pH).

Иная ситуация реализуется для ДНКЖ при включении в них тиолсодержащих анионных (RS^-) лигандов, характеризующихся в отличие от других лигандов высокой электрон-донорной активностью. Перенос электронной плотности с атомов серы на катионы нитрозония приводит к нейтрализации положительного заряда на этих лигандах и тем самым к подавлению их гидролиза (взаимодействия катионов нитрозония с анионом гидроксила) [3, 5–9]. В результате резко повышается стабильность ДНКЖ, что и обеспечивает функциональную активность этих комплексов в живых организмах как доноров нейтральных молекул NO и катионов нитрозония (NO^+). Соответственно, при удалении тиолсодержащих лигандов из ДНКЖ в результате окисления их тиоловых групп или их блокаде тиоловыми реагентами ДНКЖ начинают распадаться с высвобождением катионов нитрозония, гидролизующихся до нитрита [5–8].

Что касается образования S-нитрозотиолов в ходе распада ДНКЖ, такого рода процесс наблюдался нами только при кислотной обработке этих комплексов. В этих условиях ДНКЖ распались из-за протонирования тиолов, с последующим их выходом из лигандного окружения железа и связыванием с катионами нитрозония, высвобождающимися из ДНКЖ [5–8].

Во всех этих опытах количество катионов нитрозония, высвобождавшихся из ДНКЖ, было в точности равно количеству железа в составе этих комплексов. Таким образом, поскольку каждый атом железа в ЖДНФ связан с двумя нитрозильными лигандами, можно было утверждать, что при распаде фрагментов половина этих лигандов должна высвобождаться в форме катионов нитрозония, а другая половина – в форме нейтральных молекул NO, что находится в полном соответствии с вышеприведенной резонансной структурой ЖДНФ в моно- и биядерной формах ДНКЖ.

В настоящей работе мы проверили, сохраняется ли эта закономерность для Б-ДНКЖ с одним из типичных представителей тиолсодержащих лигандов – глутатионом при распаде этих комплексов под действием анионов супероксида, ре-

агирующих в составе ДНКЖ с молекулами NO [10], или под действием одного из достаточно сильных хелаторов переходных металлов – анионов этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), способных, как мы предполагали, замещать при избыточной концентрации молекулы глутатиона в биядерных динитрозильных комплексах железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) с последующей (в соответствии с вышесказанным) трансформацией последних в МНКЖ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК). Предполагалось, что при обоих воздействиях из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH могли бы высвободиться катионы нитрозония, связывающиеся с тиоловой группой глутатиона с образованием S-нитрозоглутатиона (GS-NO).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), глутатион, надпероксид (диоксид) калия (KO_2), нитрит натрия и этилендиаминтетраацетат калия (ЭДТА) (Sigma, США). Газообразный NO получали в реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0.1 M HCl с последующей очисткой NO методом низкотемпературной сублимации [11].

Синтез биядерных ДНКЖ с глутатионом. Комплексы синтезировали обработкой газообразным NO (при давлении 100 мм рт. ст.) 1 мл раствора ферросульфата в дистиллированной воде и 4 мл 10 mM раствора глутатиона в 15 mM HEPES-буфере (pH 7.4), помещенных соответственно в верхнюю и нижнюю части аппарата Тунберга, с последующим пятиминутным встряхиванием аппарата и смешиванием этих растворов в присутствии NO, как это описано в работе [11]. Концентрация ферросульфата в этой смеси составляла 5 mM. После последующего пятиминутного встряхивания смеси, приводившей к включению всего железа в Б-ДНКЖ-GSH, NO удаляли откачкой, раствор полученного комплекса замораживали и использовали после разморозки в экспериментах.

Концентрацию Б-ДНКЖ-GSH оценивали по интенсивности одной из полос его оптического поглощения (на 360 нм) с коэффициентом поглощения (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ, равным $3700 M^{-1}cm^{-1}$) [11].

Оптические и ЭПР-измерения. Оптические измерения растворов проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu, Europa GmbH, Германия), используя плоскую кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. ЭПР измерения проводили при 77 K на модифицированном ЭПР-спектрометре RadioPan (Польша) при мощности СВЧ 5 мВт и ам-

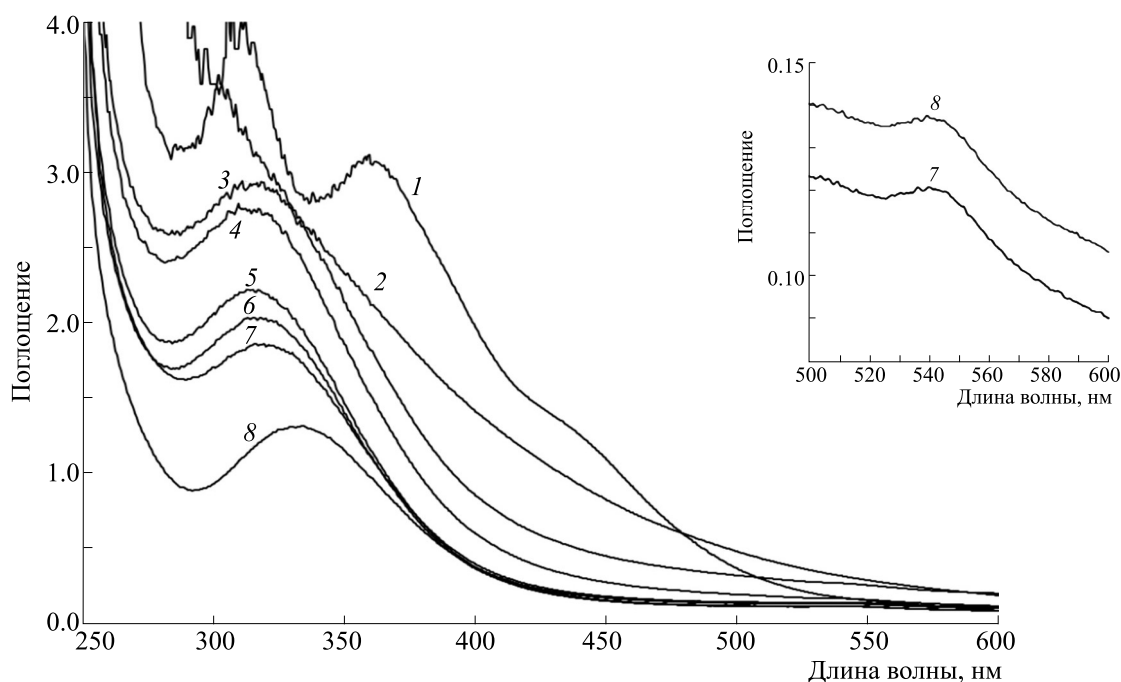


Рис. 1. Эволюция спектра поглощения 0.9 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (кривая 1) после добавления к нему в качестве донора O_2^- 100 мМ KO_2 (кривая 2) с последующим добавлением в раствор 100 мМ GSH и серной кислоты – кривые 3–8, запись соответственно через 1, 5, 30, 45, 60 и 90 мин после добавления GSH в диапазоне значений оптического поглощения $D = 0–4.0$. Врезка – кривые 7 и 8, записанные в диапазоне 500–600 нм и $D = 0–0.14$.

плитуде высокочастотной модуляции магнитного поля 0.2 мТл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Действие супероксида на Б-ДНКЖ-GSH. Введение в 0.9 мМ раствор Б-ДНКЖ-GSH в 15 мМ HEPES-буфере порошка KO_2 в конечной концентрации 100 мМ приводило к резкому повышению рН раствора – с 7.5 до 11 и, судя по быстрому исчезновению спектра поглощения этого комплекса (рис. 1, кривая 1), к его практически мгновенному распаду. Вместо исходного спектра регистрировалось монотонно возрастающее при переходе к коротковолновой области оптическое поглощение (рис. 1, кривая 2), обусловленное, очевидно, в основном комплексами трехвалентного железа, высвободившегося из распавшихся ДНКЖ и включившегося при щелочных рН в полимерные гидроокисные комплексы. При последующем добавлении в раствор глутатиона в концентрации 100 мМ и серной кислоты, снижавших рН раствора до 1.0–1.5, в растворе сразу же регистрировалась полоса поглощения на 315 нм, приведенная на рис. 1 (кривая 3). При выдерживании этого раствора на воздухе при комнатной температуре максимум этой полосы по мере снижения поглощения гидроокисных комплексов железа сдвигался за 1.5 ч к 334 нм (рис. 1, кривые 4–8).

Этот сдвиг заканчивался формированием полосы поглощения на этой длине волны (кривая 8 на рис. 1) и слабой полосы на 543 нм (рис. 1, врезка) – полос, характерных для оптического поглощения S-нитрозотиолов [4]. Таким образом, обработка продукта распада Б-ДНКЖ-GSH избытком глутатиона в сильно кислой среде вела к образованию GS-NO. Такое превращение мог испытывать только нитрит, который, очевидно, появлялся (наряду с гидроокисными комплексами железа) в растворе Б-ДНКЖ-GSH, распавшихся под действием супероксида. В соответствии с информацией, приведенной во «Введении», нитрит мог возникать из катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-GSH, с их последующим гидролизом.

Это предположение согласуется с количеством образовавшегося GS-NO, которое можно было определить исходя из величины оптического поглощения на 334 нм (кривая 8 на рис. 1). Она составила 0.5, что соответствовало концентрации GS-NO, равной 0.5 мМ. Эта величина оказалась равна концентрации катионов нитрозония – одного из двух нитрозильных лигандов в составе ЖДНФ, которые могли бы (в соответствии с вышесказанным во «Введении») выделиться из каждого из этих фрагментов ДНКЖ при их распаде.

При повторении опытов, аналогичных проиллюстрированным на рис. 1, но с другими исход-

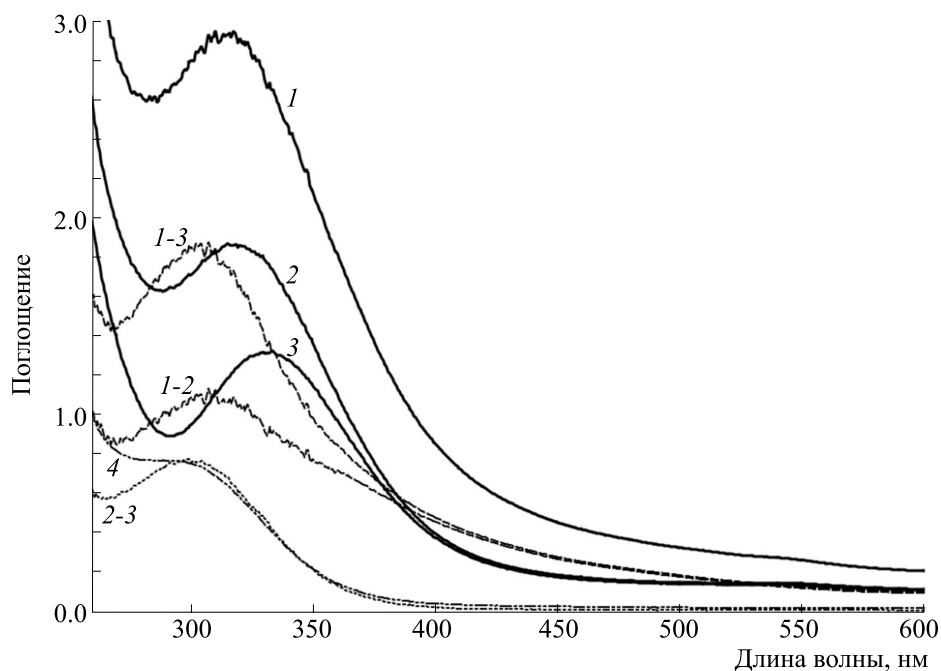


Рис. 2. Результаты вычитания кривых 2 и 3 из кривой 1, а также кривой 3 из кривой 2 (кривые 1-2, 1-3 и 2-3 соответственно). Кривые 1, 2 и 3 соответствуют кривым 3, 7 и 8, приводимым на рис. 1. Кривая 4 – спектр поглощения 0.5 мМ водного раствора FeCl_3 при pH 2.0.

ными концентрациями Б-ДНКЖ-GSH (0.7 и 0.5 мМ), также было получено точное соответствие этих концентраций и концентрации образующихся GS-NO (0.7 и 0.5 мМ). Проверка разброса экспериментальных результатов по трем повторам показала, что среднее отклонение от средней величины концентрации образующихся GS-NO не превышало 10%. Столь четко выраженное равенство между концентрацией Б-ДНКЖ-GSH (в пересчете на атом железа в этих комплексах) и GS-NO, образующихся в вышеописанных опытах, делает весьма правдоподобным наше предположение о высвобождении из распадающихся под действием анионов супероксида одного из двух нитрозильных лигандов в составе ЖДНФ в форме катиона нитрозония с последующим его превращением в анион нитрита.

Следует отметить, что при десятикратном снижении уровня KO_2 , т.е. при соотношении Б-ДНКЖ-GSH и KO_2 , равном 1:10, распад Б-ДНКЖ-GSH не обнаруживался.

Встает вопрос, какой процесс при выдерживании продуктов распада Б-ДНКЖ-GSH в кислой среде в присутствии 100 мМ глутатиона мог приводить к выявлению в этой системе GS-NO? Ответ был получен в результате приведенного на рис. 2 вычитания кривых 2 и 3 из кривой 1 (соответствующих кривым 7, 8 и 3 на рис. 1). Это вычитание показало, что постепенное формирование полосы, характерной для GS-NO, происходило в

результате ослабления полосы на 300 нм, обусловленной оптическим поглощением ионов Fe^{3+} , спектр поглощения 0.5 мМ раствора которых приводится на рис. 2 (кривая 4). Это ослабление, очевидно, было обусловлено восстановлением этих ионов до двухвалентного состояния, в котором эти ионы характеризуются слабым оптическим поглощением.

Аналогичный результат был получен в опытах, в которых pH 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH был сначала поднят до щелочных значений – до 11.0, а затем были добавлены 50 мМ KO_2 . Как и в предыдущих опытах, это добавление приводило, судя по исчезновению спектра оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH, к его распаду и появлению интенсивного бесструктурного поглощения во всем диапазоне спектра (рис. 3, кривая 3), обусловленного, очевидно (как следует из дальнейшего), в основном гидроокисными комплексами уже не трех-, а двухвалентного железа. При последующем добавлении в раствор глутатиона в концентрации 100 мМ и подкислении серной кислотой до pH 1.0–1.5 в растворе сразу же регистрировали полосу поглощения на 325 нм (рис. 3, кривая 4). При последующей инкубации этого раствора на воздухе при комнатной температуре, приводившей к снижению бесструктурного поглощения гидроокисных комплексов железа из-за их осаждения, максимум исходной кривой 4 за 1 ч сдвигался к 330 нм. Этот сдвиг сопровождался

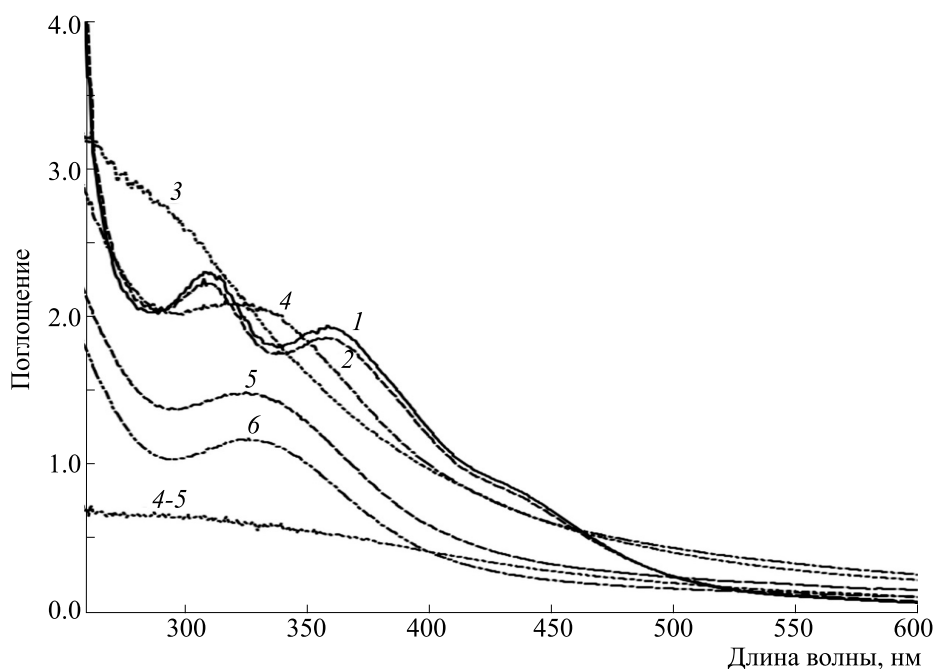


Рис. 3. Эволюция спектра поглощения 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (кривая 1, pH 7.5) с последующими соответственно повышением pH раствора до 11.0 (кривая 2), добавлением к нему 50 мМ KO_2 (кривая 3) и далее введением в раствор 100 мМ GSH и серной кислоты — кривые 3–8, запись соответственно через 1, 5, 30, 45, 60 и 90 мин. Кривая 4-5 — разность кривых 4 и 5.

появлением слабой полосы на 543 нм. Эти изменения однозначно свидетельствовали о появлении в растворе GS-NO, возникавшего в результате S-нитрозирования глутатиона азотистой кислоты, появлявшейся, в свою очередь, из нитрита в кислой среде. Что касается последнего, он появлялся в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождавшихся в присутствии супероксида из Б-ДНКЖ-GSH.

Что касается менее значительного с течением времени сдвига максимума полосы поглощения GS-NO в этих опытах (с 325 до 330 нм) по сравнению с аналогичным сдвигом, приведенным на рис. 1 (с 315 до 334 нм), оно могло быть обусловлено меньшей крутизной в этой области оптического поглощения, наложенного на полосу поглощения GS-NO на рис. 3, по сравнению с приведенным поглощением на рис. 1 (можно соответственно сравнить разностные кривые 4–5 и 1–2). Большая крутизна этого поглощения на рис. 1, по-видимому, была обусловлена значительным вкладом в него оптического поглощения трехвалентного железа. Последнее, очевидно, определялось тем, что высвобождающееся в этих опытах из Б-ДНКЖ-GSH двухвалентное железо могло окисляться до Fe^{3+} перекисью водорода (в реакции Фентона), образующейся в большем количестве при добавлении супероксида к Б-ДНКЖ-GSH при нейтральных, чем при щелочных pH, как это имело место в опытах, иллюстрируемых соответственно на рис. 1 и 3.

Повышение pH 0.9 или 0,5 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH до щелочных значений при добавлении к ним избытка супероксида (соответственно 100 или 50 мМ) можно было предотвратить и тем самым заблокировать распад Б-ДНКЖ-GSH, используя для этого растворы HEPES с высокой концентрацией буфера. Результаты такого рода опытов на 0.5 мМ растворе Б-ДНКЖ-GSH в 500 мМ HEPES-буфере при pH 7.5, обработанном от 200 до 1000 мМ KO_2 приведены на рис. 4а. Как следует из него, добавление 200 мМ KO_2 практически не влияло на устойчивость Б-ДНКЖ-GSH и только при повышении концентрации KO_2 до 1 М начинался распад этого комплекса. Величина pH при этом практически не изменялась. Это означало, что емкости буфера было достаточно для нейтрализации анионов гидроксила, уровень которых должен был бы (в отсутствие этого буфера) повышаться в результате связывания протонов с анионами супероксида. Эта нейтрализация достигалась высвобождением из HEPES-буфера соответствующего количества протонов, так что анионов супероксида начинало «не хватать» для их реакции с молекулами NO в составе Б-ДНКЖ, которая приводила бы к распаду этих комплексов и высвобождению из них катионов нитрозония. В результате, как это следует из рис. 4 (кривые 2–4),

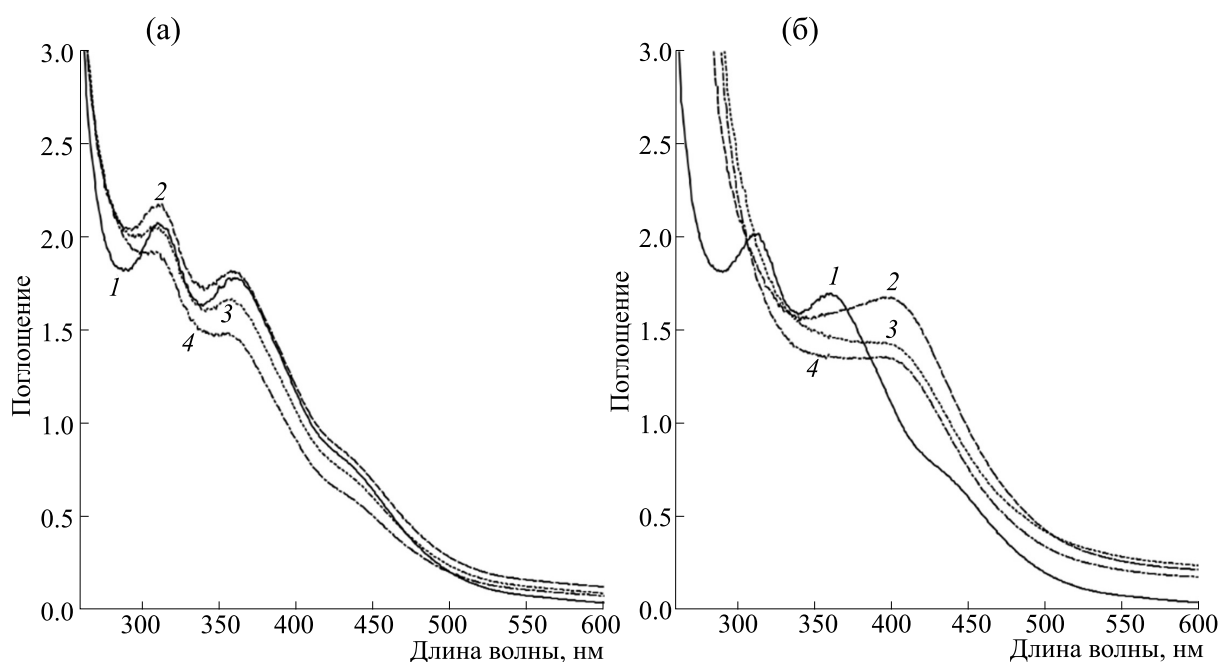


Рис. 4. Эволюция спектра поглощения 0.5 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH: (а) – в 500 мМ НЕРЕС-буфере, рН 7.5 (кривая 1), через 5 мин после добавления к нему 200 мМ CO_2 (кривая 2), через 5 мин после добавления к предыдущему еще 500 мМ CO_2 (кривая 3) и еще 500 мМ CO_2 (кривая 4); добавление CO_2 не привело к заметному повышению рН раствора; (б) – в 15 мМ НЕРЕС-буфере, рН 7.5 (кривая 1), после введения в раствор 100 мМ GSH и повышения рН до 11.0 (кривая 2) и далее сразу или через 10 мин после добавления 50 мМ CO_2 (кривые 3 и 4).

комплексы не распались, и, как следствие, катионы нитрозония в форме нитрита или GS-NO в этих опытах не обнаруживались.

Таким образом, распад Б-ДНКЖ-GSH под действием анионов супероксида, необходимый для высвобождения в раствор катионов нитрозония, в водных растворах мог достигаться только при щелочных значениях рН (при рН 10–11), т. е. в условиях подавления реакции протонов с анионами супероксида, способными разрушать Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [10].

Встает вопрос, можно ли было в этих условиях предотвратить превращение высвобождающихся из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония в нитрит в результате их гидролиза – связывания с анионами гидроксила, а именно, обеспечить связывание катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, как одного из представителей тиолсодержащих соединений, с образованием соответствующего S-нитрозотиола – GS-NO. Очевидно, что для этого необходимо было поднять концентрацию свободного глутатиона (не включенного в Б-ДНКЖ) до высокого уровня с тем, чтобы обеспечить его конкуренцию с анионами гидроксила в реакции с катионами нитрозония.

Такого рода опыты были поставлены на 0.5 мМ растворе Б-ДНКЖ-GSH в 15 мМ НЕРЕС-буфере, рН 7.5, в который добавляли 100 мМ GSH с последующим подщелачиванием раствора до

рН 11–12. В результате вместо спектра поглощения с полосами на 310 и 360 нм, характерного для исходного Б-ДНКЖ-GSH, регистрировался спектр с полосой поглощения на 400 нм, характерный для мономерной формы ДНКЖ-М-ДНКЖ-GSH (рис. 4в, кривые 1 и 2). Такое превращение закономерно следовало из-за повышения уровня молекул GSH с ионизованной по сере тиоловой группой в соответствии с химическим равновесием между Б- и М-ДНКЖ, определяемым уровнем ионизованных тиолов. Что касается действия на М-ДНКЖ анионов супероксида (добавлены 50 мМ CO_2), то, судя по незначительному снижению полосы поглощения на 400 нм, оно не приводило к заметному распаду этих комплексов и появлению в растворе GS-NO (рис. 4в, кривые 3 и 4). При последующем подкислении раствора вновь регистрировался спектр поглощения Б-ДНКЖ (данные не приведены).

Таким образом и в этих опытах нам не удалось обнаружить распад Б-ДНКЖ-GSH, что обеспечило бы появление в растворе катионов нитрозония, связывание которых с тиоловой группой глутатиона могло бы привести к образованию GS-NO. Не исключено, что в этих опытах разрушительное действие анионов супероксида на Б-ДНКЖ-GSH было предотвращено восстановительным действием на эти анионы тиоловых групп молекул глутатиона

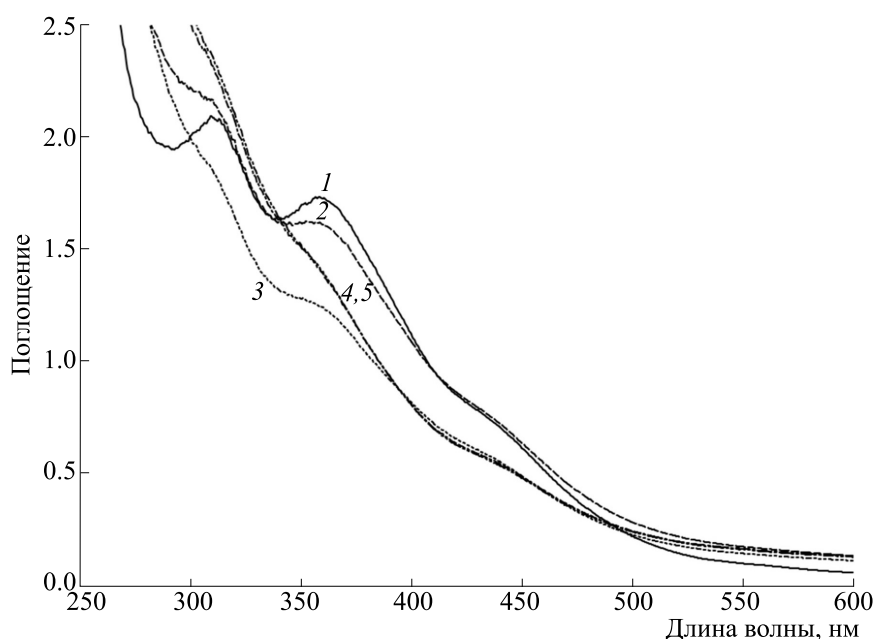


Рис. 5. Изменение спектра поглощения 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH, рН 7.4 (кривая 1) через 2 и 15 мин после добавления 50 мМ ЭДТА (кривые 2 и 3 соответственно) с последующим добавлением 50 мМ глутатиона при рН 1.0 (кривые 4 и 5, зарегистрированные через 2 и 20 мин после добавления GSH и последующего подкисления раствора).

Действие ЭДТА на Б-ДНКЖ-GSH. ЭДТА как хелатор металлов, в том числе железа, способен разрушать Б-ДНКЖ-GSH при введении в раствор в 100-кратной избыточной концентрации – 50 мМ против 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH, о чем свидетельствовало полное исчезновение спектра поглощения этого комплекса уже через 15 мин после добавления к нему ЭДТА (рис. 5, кривые 1–3).

Этот результат коррелировал с изменением спектра ЭПР Б-ДНКЖ-GSH: последний (рис. 6, сигналы *a* и *b*) становился идентичным спектру ЭПР комплексов, возникавших при обработке газообразным NO раствора Fe^{2+} (0.5 мМ) + ЭДТА (50 мМ) (рис. 6, сигналы *c, d* и *e, f* соответственно). Отсюда следует, что распад Б-ДНКЖ-GSH под действием избыточной дозы ЭДТА был обуслов-

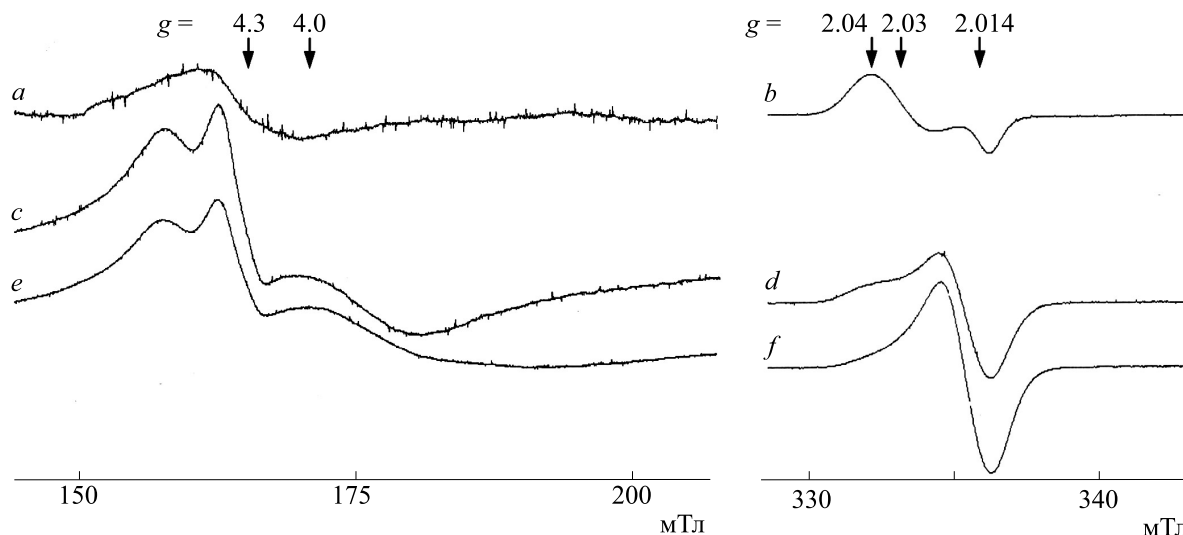


Рис. 6. Спектры ЭПР исходного 0.5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH (сигналы *a* и *b*), того же комплекса после его обработки стократным избытком ЭДТА (сигналы *c* и *d*) и комплексов, образующихся после обработки газообразным NO раствора 0.5 мМ $FeSO_4$ + 50 мМ ЭДТА (сигналы *e* и *f*). Спектры зарегистрированы при 77 К при относительном усилении спектрометра при регистрации сигналов *a–f*, соответственно равном 100, 10, 20, 1, 10 и 1.

лен замещением тиолсодержащих лигандов в этих комплексах молекулами ЭДТА при сохранении в них нитрозильных лигандов. При этом, судя по сигналам, представленным в спектре ЭПР, появлялись два типа парамагнитных центров, ответственных за эти сигналы – ДНКЖ с ЭДТА с $S = 1/2$, дающие сигнал ЭПР в диапазоне значений g -фактора 2.04–2.014 (рис. 6, сигналы d и f) [12], и высокоспиновые комплексы с $S = 3/2$, дающие сигналы ЭПР в районе значений g -фактора 4.0–4.3 (рис. 6, сигналы c и e). Сравнительно узкий сигнал с $g = 4.3$ был обусловлен примесными комплексами Fe^{3+} , тогда как более широкий сигнал при $g = 4.0$ представлял собой низкополевую компоненту широкого сигнала ЭПР с $g = 4.0$ и 2.0, обусловленного МНКЖ-ЭДТА [12, 13]).

Исходя из результатов расчета методом двойного интегрирования соотношения интегральной интенсивности сигналов ЭПР высокоспинового МНКЖ с цитратом ($S = 3/2$) и низкоспинового ДНКЖ с тем же лигандом ($S = 1/2$), проведенного нами в работе [14] при соответствующем соотношении амплитуды этих сигналов (первой производной их ЭПР поглощения), было показано, что даже при десятикратном превышении амплитуды сигнала ЭПР низкоспиновых ДНКЖ по сравнению с амплитудой сигнала высокоспиновых МНКЖ при $g = 4.0$ вклад низкоспиновых ДНКЖ в интегральное ЭПР-поглощение обоих типов парамагнитных центров не превышал нескольких процентов по сравнению с вкладом в это поглощение высокоспиновых МНКЖ. Поскольку, как это следует из рис. 6, именно такое соотношение было характерно для амплитуды сигналов ЭПР ДНКЖ-ЭДТА и МНКЖ-ЭДТА, можно говорить о доминирующем вкладе высокоспиновых МНКЖ-ЭДТА в интегральное ЭПР-поглощение раствора этого комплекса + ДНКЖ-ЭДТА, соответствующем концентрации железа, использованного при синтезе этих комплексов – 0.5 мМ. Такая же концентрация характерна и для МНКЖ-ДЭТК, образующегося при распаде Б-ДНКЖ-GSH при действии на него ЭДТА (сигнал c на рис. 6). Последнее следует из равенства амплитуды сигналов e и c , зарегистрированных при относительном усилении 20 и 10.

Следует отметить, что при десятикратном снижении уровня ДЭТК, т.е. при соотношении Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, равном 1 : 10, распад Б-ДНКЖ-GSH не обнаруживался.

Таким образом, при действии ЭДТА на Б-ДНКЖ-GSH железо-мононитрозильные группы из железо-динитрозильных фрагментов Б-ДНКЖ-GSH практически полностью переходили на ЭДТА с образованием соответственно МНКЖ-ДЭТК. Другая часть (другая половина) нитрозильных лигандов из Б-ДНКЖ-GSH должна была в форме катионов нитрозония переходить

в раствор с последующим их гидролизом до анионов нитрита. Содержание этих анионов, как и в вышеприведенных опытах с воздействием на Б-ДНКЖ-GSH анионов супероксида, можно было оценить, действуя на анионы нитрита глутатионом при кислых значениях pH, что приводило бы к образованию GS-NO.

Как следует из данных, приводимых на рис. 5 (кривые 4 и 5), образование GS-NO в такого рода опытах не обнаруживалось. Спрашивается, куда могли исчезать катионы нитрозония? Ответ следующий – они могли связываться с ЭДТА, а именно, с входящими в него третичными аминогруппами с образованием ионов нитрозоаммония (R_3N^+NO), распадающихся при комнатной температуре в результате разрыва N–C-связи [15]. Реализация реакции катионов нитрозония с третичными аминами в ЭДТА, а не реакции катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, могла быть обусловлена добавлением в раствор ЭДТА в концентрации, в 100 раз превышающей концентрацию глутатиона, определяемой количеством Б-ДНКЖ-GSH.

Как низкоспиновые ДНКЖ-ЭДТА, так и высокоспиновые МНКЖ-ЭДТА оказались неустойчивыми. Первые исчезали в присутствии газообразного NO в течение 10–15 мин, очевидно, в результате гидролиза входящих в их состав катионов нитрозония, тогда как высокоспиновые МНКЖ распадались в течение 20–30 мин после откачки газообразного NO из аппарата Тунберга, в котором они были синтезированы, в результате их денитроирования.

Взаимодействие ЭДТА с катионами нитрозония, продуцируемыми азотистой кислотой. Связывание катионов нитрозония с аминогруппами ЭДТА можно было показать в опытах с использованием азотистой кислоты как донора этих катионов. Эти опыты сводились к следующему: 1 мМ растворы $NaNO_2$ в 15 мМ HEPES-буфере, не содержавших и содержавших 100 мМ ЭДТА (кривые 2 и 3), подкисляли на 15 мин до pH 1–2 с последующим добавлением к этим растворам 100 мМ глутатиона с тем, чтобы оптическим способом оценить концентрацию GS-NO, образующегося в реакции глутатиона и азотистой кислоты, возникшей в кислой среде из нитрита. Предполагалось, что часть катионов нитрозония, входящих в состав азотистой кислоты, успеет за 15 мин необратимо связаться с аминогруппами ЭДТА, что должно было привести к снижению концентрации образующегося GS-NO по сравнению с концентрацией этого вещества, возникшего в тех же опытах в растворе нитрита в отсутствие ЭДТА. Проведенные оптические измерения полностью подтвердили это предположение. Интенсивность полосы поглощения на 334 нм, обусловленной GS-NO, возникшим в растворе в отсут-

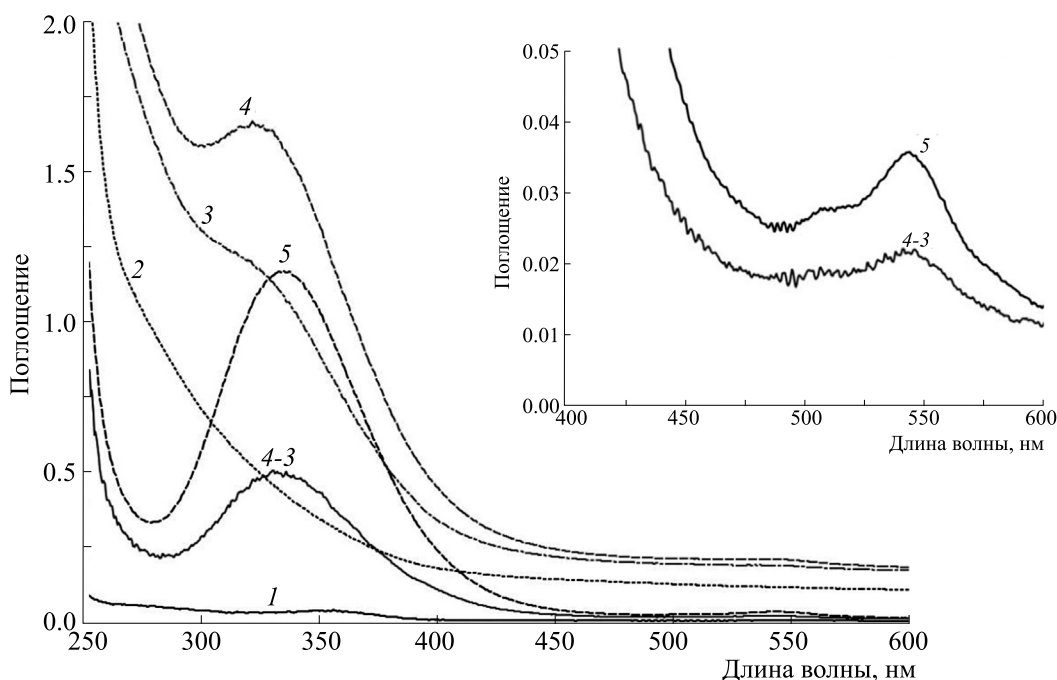


Рис. 7. Спектры поглощения 100 мМ раствора глутатиона (кривая 1), 1 мМ раствора нитрита натрия (кривая 2), 1 мМ раствора нитрита натрия + 100 мМ ЭДТА (кривая 3), 1 мМ раствора нитрита натрия, подкисленного на 15 мин до рН 1–2 с последующим добавлением 100 мМ глутатиона (кривая 4). Кривая 4-3 получена вычитанием кривой 3 из кривой 4, кривая 5 – спектр поглощения 1 мМ раствора нитрита натрия, подкисленного на 15 мин с последующим добавлением 100 мМ глутатиона. На врезке приведены спектры поглощения растворов, характеризующихся кривой 5 и кривой 4-3 в области 400–600 нм.

ствии ЭДТА (рис. 7, кривая 5), существенно превосходила аналогичное поглощение GS-NO, возникавшего в растворе нитрита в присутствии ЭДТА (кривая 4-3, полученная вычитанием кривой 3 из кривой 4). Кривая 4 представляла собой оптическое поглощение раствора нитрита + ЭДТА, подкисленного на 15 мин с последующим добавлением глутатиона, тогда как кривая 3 – оптическое поглощение раствора нитрита + ЭДТА без подкисления и последующего добавления глутатиона. Глутатион сам по себе не давал заметного оптического поглощения в регистрируемой области оптического спектра (рис. 7, кривая 1).

Полученное различие в концентрации GS-NO в растворах, соответствующих кривым 5 и 4-3 дает основание предполагать, что катионы нитрозония, высвобождавшиеся из Б-ДНКЖ-GSH, распадавшиеся в присутствии ЭДТА, могли частично связываться с аминогруппами ЭДТА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат проведенных нами исследований полностью согласуется с развиваемыми нашей группой представлениями о том, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут выступать в качестве доноров как молекул NO, так и катионов нитрозония, причем при определенных

условиях [7, 8] оба этих компонента ДНКЖ могут высвобождаться при распаде комплексов в одинаковом количестве. Хотя в наших опытах нам не удалось наблюдать предполагавшегося образования GS-NO при связывании с глутатионом высвобождающихся из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, об их появлении в растворе можно было судить по косвенным данным. Так, например, о высвобождении катионов нитрозония из железо-динитрозильных фрагментов при действии на них анионов супероксида при стократном избытке можно было судить по накоплению в растворе анионов нитрита. Их количество, которое оценивалось по уровню образовавшихся из них в кислой среде в присутствии глутатиона молекул GS-NO, в молярном отношении было равно половине нитрозильных лигандов в исходных Б-ДНКЖ-GSH.

В принципе, высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония могли быть обнаружены по количеству GS-NO, которые могли бы возникать при связывании катионов нитрозония с тиоловой группой молекул глутатиона, тем более что константа этой реакции по данным работы [16] на три-четыре порядка превышала реакцию связывания катионов нитрозония с анионами гидроксила – реакцию гидролиза этих катионов до анионов нитрита. В этих опытах мы

не обнаружили сколько-нибудь заметного образования GS-NO, по-видимому, из-за окисления глутатиона до его дисульфидной формы избытком добавлявшегося в раствор диоксида (надпероксида) калия (KO₂).

Что касается высвобождения из Б-ДНКЖ-GSH молекул NO в опытах с обработкой этих комплексов анионами супероксида, говорить об этом не приходится из-за полного исчезновения этих молекул в составе ЖДНФ в результате их реакции со стократным избытком анионов супероксида, добавлявшихся к раствору Б-ДНКЖ-GSH. Именно взаимодействие молекул NO с анионами супероксида, приводившее к трансформации NO в составе ДНКЖ в пероксинитрит [10], обеспечивало распад этих комплексов и тем самым высвобождение из них катионов нитрозония. Что касается молекул пероксинитрита, образовавшихся в составе ДНКЖ, после их предполагаемой изомеризации в анионы нитрата они выходили в этой форме из ДНКЖ, что и приводило к распаду этих комплексов.

Аналогичный результат, а именно высвобождение из Б-ДНКЖ-GSH в равном соотношении молекул NO и катионов нитрозония, наблюдалось нами при обработке этих комплексов стократным избытком ЭДТА. Такая обработка приводила к трансформации 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH в парамагнитные ЭПР-регистрируемые высокоспиновые МНКЖ-ЭДТА с $S = 3/2$, возникавшие практически в той же концентрации – 0.5 мМ (рис. 6). Эта трансформация, очевидно, была обусловлена высвобождением из исходных Б-ДНКЖ-GSH 0.5 мМ катионов нитрозония, что и приводило к превращению этих комплексов в МНКЖ-ДЭТК при сохранении в них соответственно 0.5 мМ молекул NO, имевшихся в исходных Б-ДНКЖ-GSH. Что касается появившихся при этом низкоспиновых ДНКЖ-ДЭТК с $S = 1/2$, их содержание в растворе было пренебрежимо мало по сравнению с количеством МНКЖ-ДЭТК.

Высвобождение катионов нитрозония из Б-ДНКЖ-GSH в результате их связывания с третичными аминами в составе ЭДТА, по видимому, было обусловлено следующим. При замещении глутатионовых лигандов в Б-ДНКЖ молекулами ЭДТА, не содержащими тиоловой группы, электронная плотность на нитрозильных лигандах снижалась, они вновь приобретали положительный заряд и могли, как электрофилы, легко связываться с нуклеофилами, в данном случае с третичными аминами в ЭДТА.

Обнаруженное в нашей работе связывание катионов нитрозония с имеющимися в ЭДТА третичными аминами показывает, что при рассмотрении химических превращений катионов нитрозония в живых организмах не следует

сосредотачиваться только на характерных для этих катионов реакций гидролиза и их взаимодействия с тиолами, приводящих соответственно к превращению этих катионов в анионы нитрита или S-нитрозотиолы. Соответствующие сведения о разнообразных реакциях – реакциях нитрозонирования с различными электрофильными соединениями, в которые, в частности, в живых организмах, могут включаться катионы нитрозония, можно найти, например, в монографии [15] или в обзоре [17].

Таким образом, проведенные нами исследования дают основание полагать, что реализация изученных нами процессов в живых организмах, а именно реакция появляющихся в них ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами с анионами супероксида или хелаторами железа может приводить к появлению в живых организмах высвобождающихся из ДНКЖ молекул NO и катионов нитрозония, оказывающих на процессы жизнедеятельности как позитивное, регуляторное, так и негативное, цитотоксическое действие [18].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ф. Ванин, И. В. Маленкова, П. И. Мордвинцев и др., *Биохимия*, **58**, 1094 (1993).
2. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
3. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, Article ID 878236 (2011).
4. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4 (2013).
5. A. F. Vanin, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, **5**, 1103 (2018).
6. A. F. Vanin, *Cell. Biochem. Biophys.*, **77**, 279 (2019).
7. A. F. Vanin, *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851 (2020).
8. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 421 (2020).
9. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **67**, 434 (2022).
10. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37 (2008).
11. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136 (2011).
12. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica*, **93**, 63 (1983).
13. A. Wanat, T. Schnepf, G. Stochel, et al., *Inorg. Chem.*, **41**, 4 (2002).

14. A. F. Vanin, N. A. Sanina, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 82 (2007).
15. D. L. H. Williams, *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2007).
16. V. G. Kharitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28158 (1995).
17. Г. И. Бородкин и В. Г. Шубин, *Успехи химии*, **86**, 18 (2017).
18. А. Ф. Ванин, *Биохимия*, № 11 (2022) (в печати).

Nitrosonium Cation Release from Dinitrosyl Iron Complexes during Superoxide Anion- or Ethylenediaminetetraacetate-Induced Decomposition of These Complexes

A.F. Vanin*, V.D. Mikoyan*, and N.A. Tkachev*

*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

An optical method has been applied to demonstrate a complete decomposition of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione after the addition of a 100-fold excess of potassium superoxide anions (KO_2) or EDTA. According to the resonance structure $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$ of these complexes, their decomposition, induced by the interaction of thiol- and NO-components of the complexes with the superoxide ion, led to nitrosonium (NO^+) cation release into the solution. Due to the hydrolysis reaction, nitrosonium cations are converted into nitrite anions in the amount equal to half of nitrosyl ligands presented in these complexes. When the complexes were decomposed by EDTA as an iron chelator, NO^+ cations released from the complexes were not hydrolyzed but bound to tertiary amino groups in EDTA. At the same time, through the use of EPR method it was found out that dinitrosyl iron complexes with glutathione were transformed into high spin ($S = 3/2$) mononitrosyl iron complexes. These findings support the concept that dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands are compounds that can serve as donors to both neutral NO molecules and nitrosonium cations in living organisms.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, nitrosonium cations, superoxide anions, nitrite

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pseudotuberculosis* С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ, ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2022 г. А.А. Бывалов*, **, #, В.С. Белозёров*, **, Б.А. Ананченко*, И.В. Коньшев*, **

*Вятский государственный университет, Московская ул., 36, Киров, 610000, Россия

**Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Первомайская ул., 50, Сыктывкар, 167982, Россия

#E-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Методом атомно-силовой микроскопии проведена оценка силы связи зонда, функционализированного липополисахаридом *Yersinia pseudotuberculosis*, с моноклональными антителами, иммобилизованными на слюде, а также вклада в это взаимодействие неспецифических факторов. Показано отсутствие выраженных взаимодействий между «чистым» зондом и «чистой» или обработанной тем или иным способом слюдой. Модификация «чистой» слюды (3-аминопропил)триэтоксисиланом вызывала повышение силы взаимодействия с кантилевером, покрытым липополисахаридом. Обработка аминированной слюды глутаровым альдегидом приводила к еще большему возрастанию силы неспецифического связывания. Последующая иммобилизация моноклональных антител на слюде, предварительно обработанной (3-аминопропил)триэтоксисиланом и затем глутаровым альдегидом, вызывала резкое ослабление взаимодействия, существенно менее выраженное при использовании антител, комплементарных липополисахариду, по сравнению с гетерологичными антителами. Сила специфической связи с антителами антигенов, характеризующихся склонностью к агрегации, таких как липополисахариды, по степени выраженности может уступать неспецифическому компоненту взаимодействия, включающему «деагрегацию», «развертывание» агломератов биомолекул, иммобилизованных на поверхность зонда и слюды.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сила связи, липополисахарид, моноклональные антитела.

DOI: 10.31857/S0006302922050023, EDN: LIYGNE

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — один из наиболее информативных биофизических методов, широко используемый в различных областях биологии. Сфера применения АСМ включает, в частности, исследование силовых характеристик взаимодействия биообъектов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [1–5]. Измеряемая сила таких взаимодействий составляет, как правило, от единиц-десятков пиконьютонов до десятков-сотен наноньютонов [6]. Среди используемых модельных систем есть такие, на которых можно с достаточно высокой вероятностью оценивать единичные межмолекулярные

взаимодействия. Для большинства же систем измеряются сложные, многокомпонентные взаимодействия, определяемые совокупностью отдельных, далеко не всегда идентифицируемых, межмолекулярных связей [6, 7]. При проведении подобных исследований, направленных на определение силы специфической связи между двумя целевыми биомолекулами, одной из серьезных и трудноразрешимых проблем является выявление чисто «специфического» сигнала, свидетельствующего о разрыве определяемой связи, на фоне неспецифических сигналов фотодетектора. Понятия «специфическая» и «неспецифическая» связь достаточно относительны и иногда они трактуются по-разному. Под специфическим взаимодействием обычно понимается лишь такое взаимодействие, которое является предметом данного исследования. Специфическое связыва-

Сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ЛПС — липополисахарид, МКАт — моноклональные антитела, АРТЕС — (3-аминопропил)триэтоксисилан, ГА — глутаровый альдегид, ФБР — фосфатный буферный раствор.

ние для одного эксперимента может являться неспецифическим для другого, имеющего иную цель. Так, при оценке силы связи в системе «антиген—антитело» для некоторых бактериальных белков (например, иммуноглобулинсвязывающих белков ряда бактерий, в том числе *Yersinia pseudotuberculosis* [8]) взаимодействие с Fc-участком антител рассматривается как специфическое, а все остальные — как неспецифические. Однако в подавляющем большинстве исследований иммунохимических взаимодействий проводится оценка силы специфического взаимодействия антигенной детерминанты с Fab-фрагментом комплементарных антител. В настоящей работе именно так трактуется специфическое взаимодействие, а под неспецифическим понимаются иные сопутствующие (дополнительные) силы связи.

Взаимодействия между биологическими молекулами и различными субстратами намного сложнее, чем между небиологическими молекулами или поверхностями. Эта сложность обусловлена рядом факторов: одновременным участием множества различных молекул и различных нековалентных сил — ван-дер-ваальсовых, электростатических, сольватационных (гидратационных, гидрофобных), стерических, энтропийных и «специфических», а также гибкостью биологических макромолекул и текучестью мембран, если одним из участников взаимодействия является бактериальная клетка [9—11].

В силу различного толкования терминов «специфическое» и «неспецифическое» связывание, недостаточной изученности механизмов взаимодействия «нефункционализированный зонд — нефункционализированная подложка», влияния на это взаимодействие иммобилизованных биомолекул и др. доказательных общепринятых критериев идентификации специфических сигналов на силовых кривых до настоящего времени не представлено. Одни авторы принимают за неспецифическое связывание такое, которое на хронограмме сигнала отведения проявляется неизменностью угла его наклона до момента пересечения кривой базисной линии непосредственно после такового безотносительно к картине последующего сигнала [12, 13]. Многие авторы при оценке силовых характеристик взаимодействий ориентируются на силу последнего отрыва, который и отражает специфическое взаимодействие [14, 15]. В ряде экспериментов при наличии на хронограмме сигнала отведения нескольких скачков первый из них часто считают свидетельством разрыва неспецифической связи [16]. На гистограммах распределения сил отрыва за неспецифическое взаимодействие принимают, как правило, низкоамплитудные отрывы [17]. Существуют и иные подходы к разграничению специфической и неспецифической составляющих оцениваемой

связи, трактовка результатов подобных исследований во многом зависит от типа взаимодействующих биообъектов и условий проведения экспериментов.

В работах, направленных на количественное определение сил связи между биообъектами, в целях минимизации неспецифических взаимодействий существенным обстоятельством признается выбор способа иммобилизации на твердой фазе (зонд или подложка) целевых молекул. Так, прямой контакт между минеральным субстратом и биомолекулами приводит к изменению их пространственной ориентации и снижению подвижности, что вызывает ослабление специфического взаимодействия [5]. В этой связи для определения силы специфического взаимодействия предпочтительным признается использование гибких и длинных линкеров, например, полиэтиленгликоля, что позволяет более точно отделять исследуемое специфическое взаимодействие от неспецифической адгезии. Линкер обеспечивает присоединенной молекуле свободу вращения и тем самым делает сайты связывания более доступными. Кроме того, он обеспечивает прочное, ковалентное присоединение биомолекул к зонду с относительно низкой плотностью, что позволяет регистрировать единичные межмолекулярные взаимодействия, увеличивает расстояние между поверхностью и молекулой, что нивелирует возможные воздействия (например, электростатической природы) подложки или кантилевера на изучаемый процесс [5, 18, 19].

При выборе условий осуществления экспериментов такого рода и анализе получаемых результатов следует учитывать влияние ряда факторов на формирование неспецифической составляющей оцениваемых взаимодействий. Выраженность неспецифического связывания в значительной мере зависит от химического состава и физико-химических особенностей, в частности, ионной силы раствора, в котором проводится эксперимент [20—22]. При оценке результатов подобных исследований следует учитывать, что увеличение времени контакта функционализированного зонда с субстратом (*dwel time*), а также скорости нагружения (*loading rate*) приводит к усилению неспецифического взаимодействия [23]. В целях идентификации специфического сигнала, его обособления от неспецифической компоненты в состав реакционной среды включают компонент, комплементарный одной из целевых биомолекул, который препятствует специфическому связыванию. Его удаление (отмывание) из среды восстанавливает специфическое взаимодействие [24]. Для снижения вклада в оцениваемое взаимодействие неспецифической составляющей предлагается использование в реакционной среде детергентов (например, Твин 20), веществ с низкой реакционной способностью,

применяемых, в частности, в составе блокирующих буферов в иммунохимических реакциях, таких как бычий сывороточный альбумин [25]. Однако в полной мере избавиться от неспецифической составляющей регистрируемых сигналов взаимодействия практически невозможно. В этой связи важным представляется понимание структуры интегрального сигнала для каждого отдельного эксперимента, осуществляемого при тех или иных заранее заданных условиях.

В настоящей работе мы попытались оценить значимость неспецифической составляющей во взаимодействии липополисахарида (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, комплементарными и гетерологичными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биомолекулы, иммобилизуемые на поверхность кантилевера и слюды. Для функционализации поверхности кантилевера использовался ЛПС, выделенный из культуры клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b методом водно-фенольной экстракции по Вестфалу [26]. Клетки штамма-продуцента выращивали в жидкой питательной среде на основе гидролизата казеина при температуре 10°C, которая способствует образованию полноразмерных О-боковых цепей на молекуле ЛПС.

Поверхность слюды была покрыта моноклональными антителами (МКАт) двух типов: МКАт2, являющимися комплементарными эпиптопу на О-боковых цепях ЛПС [27], и МКАт7, комплементарными белковому эпиптопу внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* [28]. Перед использованием в процессе функционализации препараты ЛПС и антител центрифугировали при 13000 g в течение 15 мин и перед добавлением в реакционную смесь фильтровали через насадку Millipore с диаметром пор 0.22 мкм (Merck, Германия).

Аминирование поверхностей кантилевера и слюды. При изучении силового взаимодействия использовали кантилеверы PNP-DB (NanoWorld, Швейцария). Кантилеверы данного типа имеют зонд, заточенный методом термоокисления, за счет чего на его поверхности формируется тонкий слой оксида кремния [29]. В качестве подложки использовали слюду. Слюда относится к группе природных алюмосиликатов со слоистой структурой. При скалывании слюды формируется молекулярно-гладкая грань, содержащая на своей поверхности силанольные группы (Si-OH). Наличие на поверхности термоокисленного зонда и слюды силанольных групп позволяет проводить модификацию их поверхности с использованием органических силанов [30].

Перед проведением модификации для удаления загрязнений с поверхности зондов их подвер-

гали облучению ультрафиолетом в течение 15 мин, а слюду скалывали непосредственно перед модификацией. Модификацию аминными группами поверхностей кантилевера и свежесколотой слюды в течение полутора часов проводили в эксикаторе в атмосфере аргона, рядом с субстратами помещали две емкости, содержащие 30 мкл (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) (Sigma-Aldrich, США) и 10 мкл триэтиламина («Reachem», Россия). После инкубации слюду и зонд помещали в сушижаровой шкаф при температуре 60°C на 1 ч для десорбции несвязанных ковалентно с минеральными поверхностями молекул APTES.

Функционализация кантилевера. Функционализацию поверхности кантилевера препаратом ЛПС проводили с использованием Acetal-PEG-NHS [31]. Аминированный зонд помещали на 2 ч в 0.5 мл раствора хлороформа, содержащего 1 мг полиэтиленгликоля, любезно предоставленного доктором Н. Gruber (Institute for Biophysics, Johannes Kepler University of Linz, Linz, Austria), и 30 мкл триэтиламина. После окончания реакции зонд промывали трижды по 5 мин в хлороформе. Для перевода ацетальной группы полиэтиленгликоля в альдегидную зонд помещали в профильтрованный через насадку Millipore (размер пор — 0.22 мкм) 1%-й раствор лимонной кислоты в деионизированной воде на 10 мин. После активации ацетальной группы осуществляли промывку зонда в деионизированной воде трижды по 5 мин и помещали его на 1 ч в раствор, содержащий 100 мкл ЛПС (50–100 мкг/мл) и 20 мМ NaCNBH₃ (Sigma-Aldrich, США). Непосредственно перед этой операцией раствор ЛПС центрифугировали (13000 g, 15 мин), надосадочную жидкость фильтровали через насадку Millipore (размер пор — 0.22 мкм). Несвязавшиеся альдегидные группы блокировали добавлением в реакционную смесь 5 мкл 1 М моноэтаноламина («Reachem», Россия) с последующей инкубацией в течение 10 мин. Процесс функционализации завершали трехкратным отмыванием зонда деионизированной водой трижды по 5 мин и его сушкой с использованием фильтровальной бумаги.

Функционализация слюды. После окончания аминирования пластинки слюды помещали в 8%-й раствор глутарового альдегида (ГА) на 30 мин. Данного времени достаточно для связывания глутарового альдегида со свободными аминными группами на минеральной поверхности. Далее пластинки отмывали фосфатным буферным раствором (ФБР) трижды по 5 мин в объеме 3 мл, перенесли в ФБР, содержащий антитела в концентрации 50–100 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После функционализации пластинки тщательно отмывали ФБР. По окончании каждой из стадий функционализации

часть пластинок слюды отбирали и хранили в ФБР, оставшиеся подвергали последующим процедурам функционализации. Таким образом, кроме чистой (ничем не обработанной) слюды в работе использовали четыре типа пластин, обозначенных далее как «АРТЕS» (обработанные только АРТЕS), «ГА» (обработанные последовательно АРТЕS и ГА), «МКАт2» (обработанные последовательно АРТЕS, ГА и МКАт2), «МКАт7» (обработанные последовательно АРТЕS, ГА и МКАт7).

Иммуноферментный анализ. Подтверждение факта сенсбилизации слюды моноклональными антителами проводили с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого в лунки 96-луночного планшета помещали предварительно аминированные и обработанные препаратами антител стеклянные пластинки площадью $\sim 20 \text{ мм}^2$. Методика функционализации стекла была идентична той, которую использовали при функционализации слюды. Процедура твердофазного иммуноферментного анализа стандартна и описана ранее [32]. Результаты реакции оценивали по показателю $ОП_{492}$.

Атомно-силовая микроскопия. Изучение поверхности образцов слюды проводили полуконтактным методом на воздухе в режиме регистрации сигнала «высота» с использованием зондов NSG30 с радиусом закругления иглы 10 нм (TipsNano, Эстония). Сканирование проводили на микроскопе «NtegraPrima» («NT-MDT», Россия) при частоте развертки 1 Гц, изображения получены с разрешением 512×512 пикселей. Анализ полученных изображений и расчет показателей шероховатости проводили с помощью программного обеспечения Nova_Px v.3.4.0. Эффективность процедуры модификации и функционализации поверхности слюды оценивали по показателям шероховатости: R_a (среднеарифметическая шероховатость) и R_z (шероховатость поверхности по выбранным пяти максимальным высотам и впадинам) [33].

Силовая спектроскопия. Оценку силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия проводили с использованием атомно-силового микроскопа «Ntegra Prima» с измерительным вкладышем AU-208 и зондов PNP-DB (NanoWorld, Швейцария), имеющих радиус закругления около 10 нм и жесткость консоли 0.06 нН/нм. Все измерения проводили в жидкой среде (ФБР) при значении скорости нагружения (loading rate), равной 37 нН/с (скорость подведения и отведения образца была равна 0.5 мкм/с), время контакта зонда и образца – 1 с, частота дискретизации – 500 Гц.

Процедура проведения силовой спектроскопии изложена в работе [32]. Обработку силовых

кривых проводили в программе Nova_Px 3.4.0. Выбраковку графиков, имеющих отклонения, а также обработку прошедших выбраковку графиков и расчет силовых характеристик проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения, разработанного авторами. За отрыв программа принимала скачок сигнала фотодетектора, превышающий средний фоновый шум не менее чем в четыре раза. Значения оцениваемых параметров представлены в виде средних ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$).

Общее число силовых кривых, описывающих взаимодействие чистого (ничем не обработанного) кантилевера с чистой слюдой – 1325; слюдой, покрытой МКАт2 – 1325; слюдой, покрытой МКАт7 – 1325; слюдой, покрытой АРТЕS – 325; слюдой, покрытой глутаровым альдегидом – 325; взаимодействие ЛПС-кантилевера с чистой слюдой – 1575; взаимодействие со слюдой, покрытой МКАт2 – 1575; слюдой, покрытой МКАт7 – 1575; слюдой, покрытой АРТЕS – 325; слюдой, покрытой глутаровым альдегидом – 325. Для программной выбраковки не подлежащих дальнейшему анализу графиков были предложены четыре критерия: 1) горизонтальность базисной линии на последних 100 точках, по которым определяются положение базисной линии и амплитуда шума; 2) отсутствие изменений сигнала в положительную область относительно базисной линии после последнего отрыва (линейность всей базисной линии); 3) линейность силовой кривой отведения по первым 40 точкам (плотный контакт между зондом и подложкой), которые используются для последующего пересчета показаний фотодетектора в значения силы; 4) отсутствие резких, превышающих шум, изменений сигнала в положительную область на силовой кривой от момента отведения кантилевера до пересечения с базисной линией (момент контакта). Силовые кривые, не соответствующие представленным выше критериям, в определении силовых характеристик не были использованы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы оценивали методом АСМ силовые характеристики взаимодействия между зондом, функционализированным препаратом ЛПС и слюдой, покрытой комплементарными к О-антигену липополисахарида антителами МКАт2. Для оценки влияния на названное специфическое взаимодействие иных факторов измеряли силу связи между этим зондом и «чистой», интактной слюдой, слюдой, аминированной с помощью АРТЕS, а также слюдой, обработанной АРТЕS с последующей инкубацией в растворе ГА, – две названные операции последовательно предшествуют обработке слюды антителами. Кроме того, дополнительным референс-

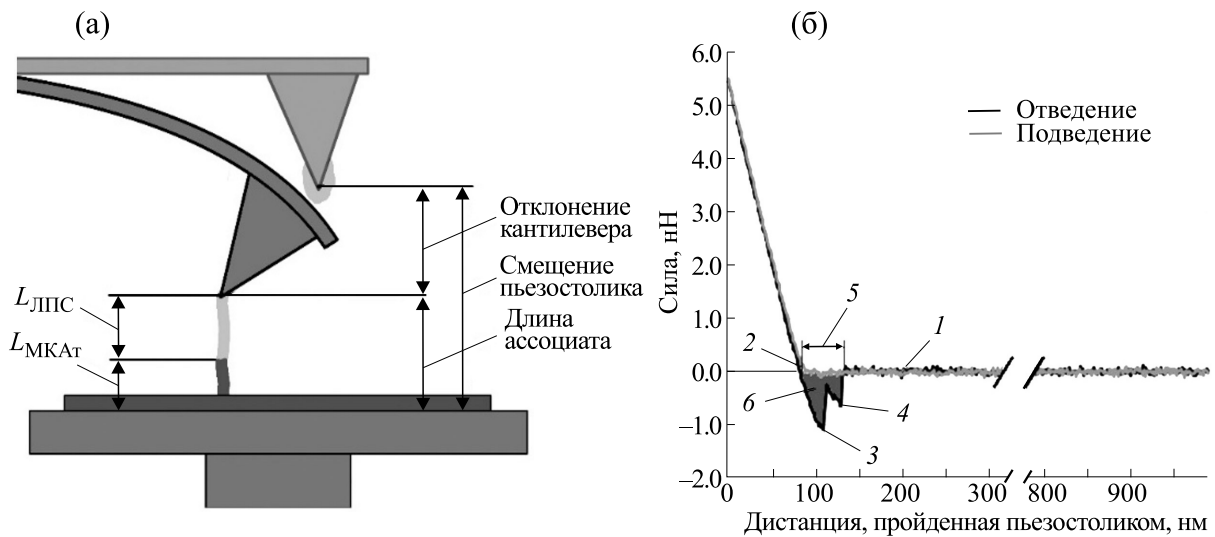


Рис. 1. (а) – Принципиальная схема измерения силовых характеристик взаимодействия методом АСМ. (б) – Пример силовой кривой взаимодействия «МКАт2 – ЛПС» где 1 – базисная линия, 2 – момент контакта зонда с субстратом, 3 – максимальная адгезия, 4 – момент разрыва последней связи, 5 – дистанция последнего отрыва, 6 – работа сил адгезии (площадь).

препаратом служила слюда, функционализированная по той же схеме, но с заменой антител МКАт2 на моноклональные антитела МКАт7, не взаимодействующие с ЛПС. Все пять вариантов слюды были использованы и для соответствующих измерений с «интактным», ничем не обработанным зондом этой же серии. Схематическое изображение процедуры экспериментов представлено на рис. 1а.

В предварительных экспериментах методом атомно-силовой микроскопии оценивали структуру поверхности слюды вышеуказанных пяти типов. Приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют о том, что каждая последующая операция обработки слюды, особенно иммобилизация антител, приводила к повышению ее шероховатости по показателям R_a и R_z . Иллюстрирует вышесказанное рис. 2, на котором представлены АСМ-изображения поверхности использованных в работе субстратов. Поверхность слюды, функ-

ционализированной антителами МКАт2 и МКАт7, характеризуется достаточно равномерным и плотным распределением отдельных агрегатов, имеющих приблизительно одинаковые размеры (рис. 2г,д). Аналогичная картина поверхности функционализированной слюды наблюдалась и при ином методе ковалентной иммобилизации антител [32]. Эффективность сенсibilизации поверхности слюды антителами была подтверждена методом твердофазного иммуноферментного анализа: средние значения OP_{492} для субстрата, обработанного МКАт2 и МКАт7, составили соответственно 1.981 и 1.551; в контроле (слюда, обработанная АРТЕS) это значение составило 0.291.

Для характеристики силы взаимодействия ЛПС-МКАт определяли несколько показателей, измеряемых при отведении пьезостолика от кантилевера (рис. 1а,б): количество отрывов (1); среднюю силу (амплитуду) всех отрывов (2); силу

Таблица 1. Шероховатость образцов слюды

№	Слюда	Шероховатость	
		R_a , нм	R_z , нм
1	Чистая	0.019 ± 0.002	0.089 ± 0.011
2	АРТЕS	0.031 ± 0.004	0.136 ± 0.029
3	ГА	0.041 ± 0.010	0.191 ± 0.038
4	МКАт2	0.330 ± 0.055	1.277 ± 0.332
5	МКАт7	0.277 ± 0.048	1.133 ± 0.260

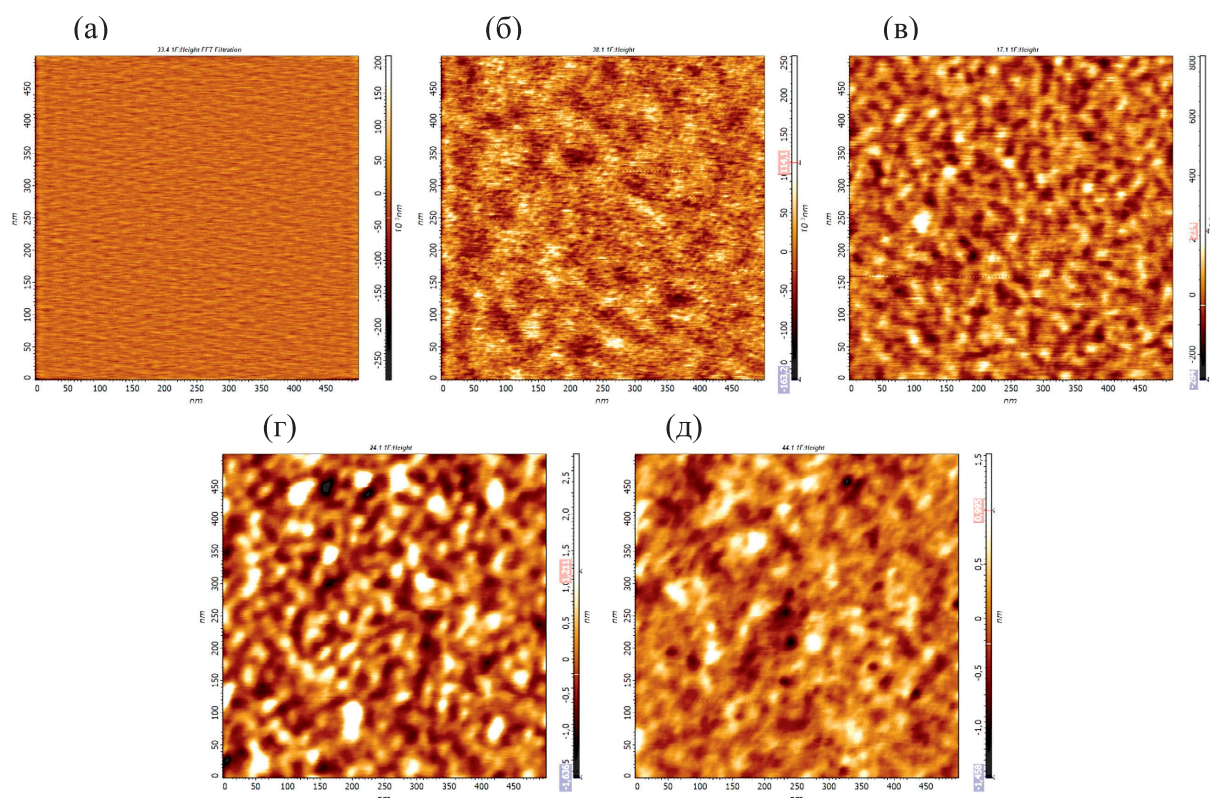


Рис. 2. АСМ-изображения поверхности свежесколотой слюды (а), слюды, обработанной АРТЕS (б), обработанной последовательно АРТЕS и ГА (в), обработанной последовательно АРТЕS, ГА, МКАт2 (г) или МКАт7 (д) при размерах области сканирования $0,5 \times 0,5$ мкм.

(амплитуду) последнего отрыва (3); дистанцию, на которой произошел последний отрыв (4); работу, затрачиваемую на разрыв всех связей и соответствующую площади между кривой отведения и базисной линией (5); максимальную адгезию, определяемую как наибольшее расстояние от точки на кривой отведения до базисной линии (6); длину ассоциата (агломерата) ЛПС-МКАт, под которой в данном эксперименте понимается расстояние от поверхности слюды до острия кантилевера в момент разрыва последней связи, определяемое как сумма длины ассоциата ЛПС ($L_{\text{ЛПС}}$) и длины ассоциата антители ($L_{\text{МКАт}}$) (7).

Обобщенные результаты оценки силовых характеристик взаимодействий представлены в табл. 2 в виде средних значений указанных выше показателей для всех десяти пар объектов.

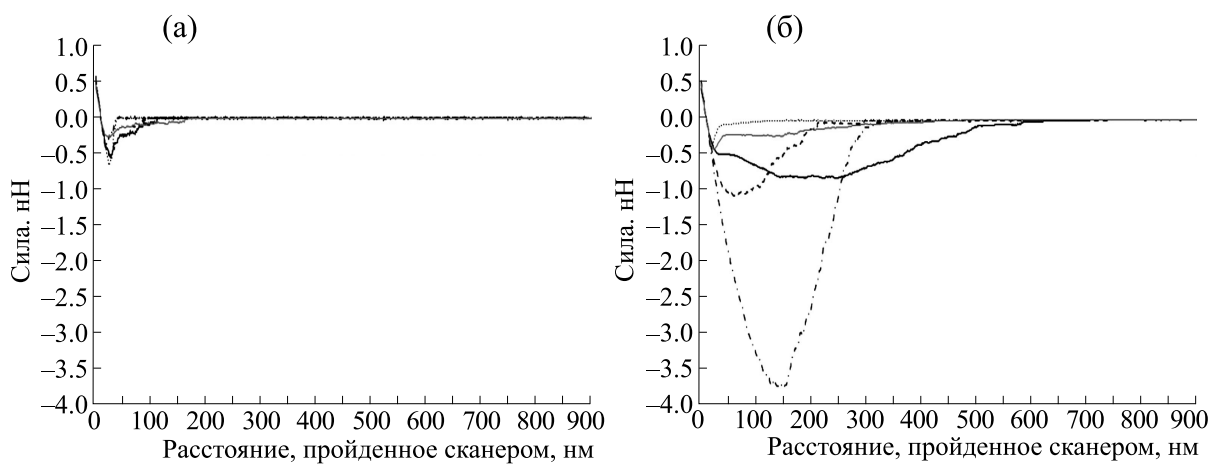
На рис. 3 и 4 представлены также усредненные хронограммы сигнала фотодетектора (в координатах «сила — дистанция, пройденная сканером») для всех пяти типов слюды при отведении интактного и функционализированного ЛПС кантилеверов. При усреднении хронограмм за нулевую точку принимали точку пересечения кривой отведения с базисной линией.

Анализ индивидуальных и усредненных кривых подведения для всех десяти пар сравниваемых объектов показал отсутствие значимых свидетельств их притяжения или отталкивания до момента касания при использованных условиях эксперимента (данные не представлены). Взаимодействия регистрировали только после соприкосновения и односекундного контакта зонда и субстрата.

Как видно из рис. 3а, все неспецифические взаимодействия материала интактного (чистого) зонда с разнокачественными вариантами слюды, включая обработанные антителями двух специфичностей, являются маловыраженными относительно функционализированного зонда. Из числа пяти типов слюды, по-видимому, несколько большее взаимодействие с интактным кантилевером отмечено для слюды «АРТЕS» (рис. 3а и 4). Эти данные качественно подтверждают результаты авторов работы [11], зарегистрировавших притяжение аминированного с помощью APDES зонда (нитрид кремния) к поверхности стекла; не обработанный APDES зонд указанного свойства не проявлял. Авторы объясняют данный эффект адгезии действием электростатических (положительно заряженные аминогруппы и от-

Таблица 2. Влияние метода обработки слюды на силовые характеристики ее взаимодействия с кантилеверами «чистым» и функционализированным ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Кантилевер	Слюда	Показатели, $X_{\text{mean}} \pm I_{99}$							
		Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Максимальная адгезия, нН	Длина ассоциата, нм	Дистанция последнего отрыва, нм	Количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %
Чистый	Чистая	1.078 \pm 0.132	0.12 \pm 0.02	1.078 \pm 0.132	1.148 \pm 0.106	0.7 \pm 0.4	18.6 \pm 2.2	1.00 \pm 0.00	65.5
	АРТЕS	1.051 \pm 0.260	0.20 \pm 0.08	1.042 \pm 0.208	1.097 \pm 0.248	13.2 \pm 9.8	30.7 \pm 10.7	1.30 \pm 0.21	100.0
	ГА	0.926 \pm 0.506	0.16 \pm 0.19	1.063 \pm 0.447	0.963 \pm 0.501	7.5 \pm 6.2	22.9 \pm 12.3	1.42 \pm 0.67	80.0
	МКАт2	0.686 \pm 0.184	0.16 \pm 0.09	0.778 \pm 0.168	0.852 \pm 0.207	20.3 \pm 6.8	31.7 \pm 7.9	1.46 \pm 0.30	51.3
	МКАт7	0.585 \pm 0.187	0.11 \pm 0.05	0.602 \pm 0.150	0.655 \pm 0.174	18.6 \pm 5.2	28.3 \pm 6.7	1.28 \pm 0.21	43.3
Функционализированный ЛПС	Чистая	0.538 \pm 0.035	0.10 \pm 0.02	0.547 \pm 0.034	0.627 \pm 0.033	12.2 \pm 3.9	21.1 \pm 4.0	1.10 \pm 0.03	73.5
	АРТЕS	1.876 \pm 0.302	1.28 \pm 0.32	2.117 \pm 0.232	2.365 \pm 0.322	103.7 \pm 34.5	134.9 \pm 33.5	1.82 \pm 0.20	93.6
	ГА	5.461 \pm 0.375	6.05 \pm 0.61	5.199 \pm 0.220	6.032 \pm 0.379	77.0 \pm 5.2	167.8 \pm 8.9	2.76 \pm 0.19	99.3
	МКАт2	2.267 \pm 0.211	2.66 \pm 0.45	2.650 \pm 0.161	2.383 \pm 0.215	85.3 \pm 6.6	123.0 \pm 9.6	1.96 \pm 0.12	78.0
	МКАт7	1.169 \pm 0.134	0.59 \pm 0.16	1.447 \pm 0.124	1.251 \pm 0.129	33.4 \pm 4.0	52.8 \pm 5.6	1.53 \pm 0.08	72.5

**Рис. 3.** Усредненные хронограммы сигнала отведения слюды от чистого кантилевера (а) и кантилевера, покрытого ЛПС (б). Хронограммы взаимодействия кантилеверов выполнены в виде точек (чистая слюда), пунктирной линии (слюда «АРТЕS»), штрих-пунктирной линии (слюда «ГА»), сплошной черной линии (слюда «МКАт2») и сплошной серой линии (слюда «МКАт7»).

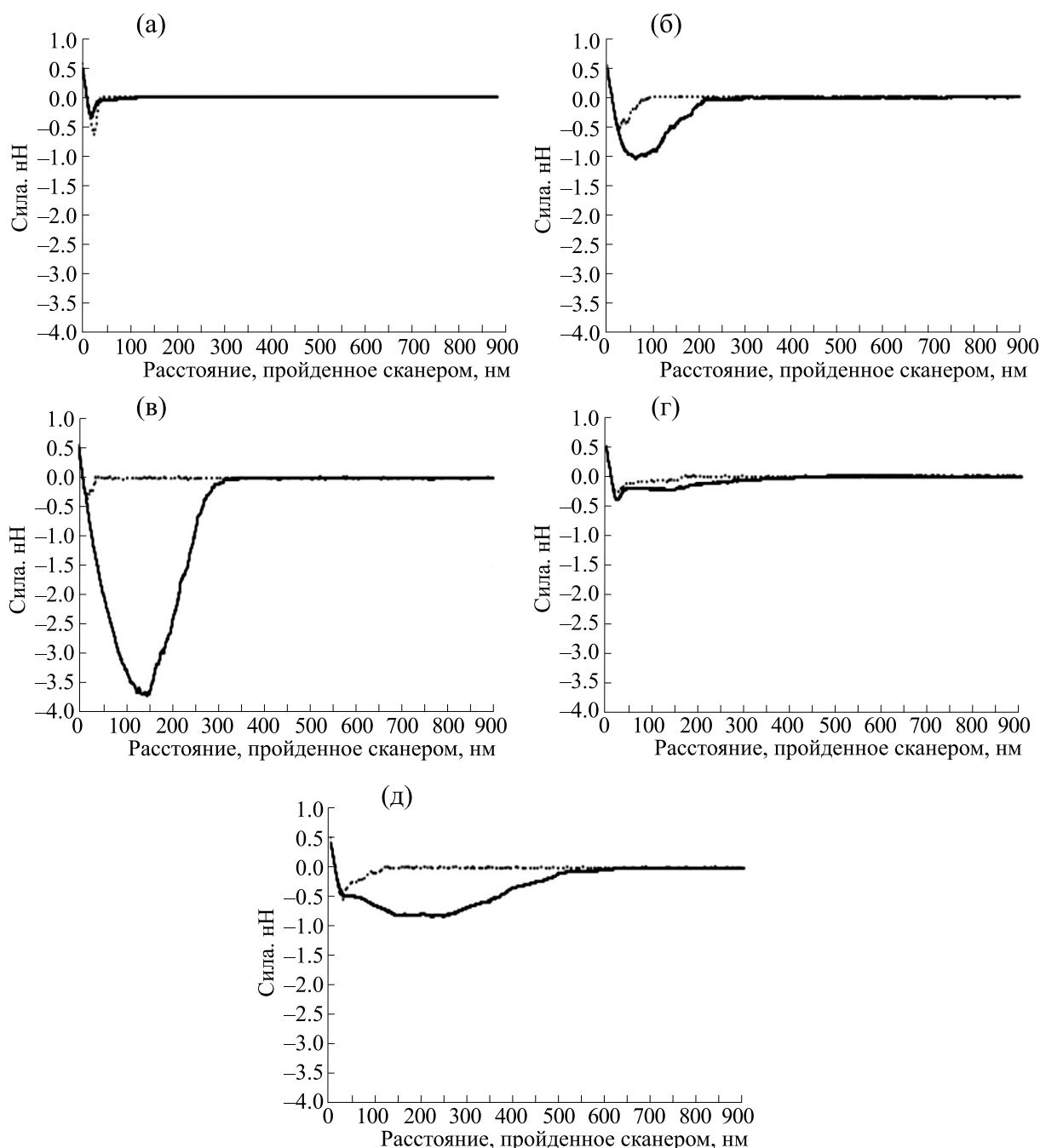


Рис. 4. Усредненные хронограммы сигнала отведения чистой слюды (а) и слюды, обработанной препаратами АРТЕС (б), глутарового альдегида (в), МКАт7 (г) и МКАт2 (д) от чистого кантилевера (точки) и кантилевера, функционализированного ЛПС (сплошная линия).

рицательно заряженная поверхность стекла) и гидрофобных взаимодействий. Последние определяются заменой силанольных групп на поверхности зонда на аминогруппы [11]. Можно отметить, что усредненная кривая для интактной слюды и слюды «ГА» выходит на базисную линию через ~40 нм после начала отведения пьезостолика; для слюды, модифицированной АРТЕС, а так-

же обработанной МКАт2 и МКАт7, выход кривых на базисную линию происходит значительно позднее, через 100 и более нм (рис. 3а).

Иная картина наблюдается при использовании кантилевера, функционализированного ЛПС (рис. 3б и 4). Если наличие/отсутствие молекул ЛПС на поверхности зонда мало отражается на его адгезивности к интактной слюде

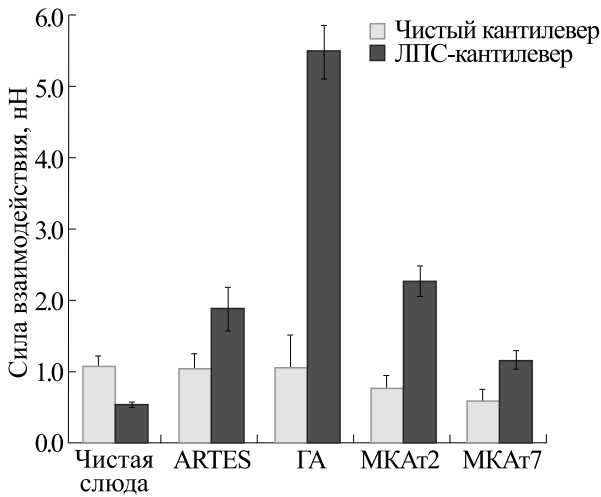


Рис. 5. Средняя сила разрыва последней связи. Доверительные интервалы указаны для $p = 0.01$.

(рис. 4а), то в остальных четырех случаях функционализированный ЛПС кантилевер вызывает существенно более выраженное взаимодействие с субстратами по сравнению с интактным кантилевером. Последнее объясняется в том числе тем, что выделенные из бактериальной массы препараты ЛПС склонны к агрегации во времени и, в зависимости от его концентрации и состава раствора, могут находиться в виде высокомолекулярных структур (ассоциатов, агломератов) различных формы и размера [34]. При взаимодействии функционализированного ЛПС кантилевера и аминированной слюды регистрируются выраженные неспецифические силовые взаимодействия. Эти данные согласуются с результатами работы [35], в которой при помощи установки для изучения поверхностных сил авторы показали, что сила взаимодействия в системе «ЛПС – аминированная ARTES слюда» значительно превышает взаимодействие в системе «ЛПС – немодифицированная слюда». Вероятно, между аминогруппами модифицированной слюды и молекулами ЛПС происходит образование большого числа связей, имеющих кислотно-основную природу, обусловленную присутствием на молекулах ЛПС свободных фосфатных, карбоксильных и гидроксильных групп.

Силы взаимодействий между функционализированным ЛПС зондом и аминированной слюдой резко возрастают после последующей ее обработки глутаровым альдегидом. Природа взаимодействий в системе «ЛПС – слюда «ГА»» не совсем ясна. Так, считается, что карбогидраты слабо взаимодействуют с альдегидами. Вместе с тем, альдегиды могут в порядке убывания силы взаимодействия реагировать с ϵ -, α -, вторичными аминогруппами и гидроксильными функциональными

группами [36]. Полисахаридная часть ЛПС содержит большое число гидроксильных групп, при этом даже в случае образования слабых водородных связей в системе «альдегидная группа – гидроксильная группа» интегральная сила взаимодействия множества отдельных частных связей может достигать больших величин. Общеизвестно также, что альдегидные группы легко вступают в реакцию с аминогруппами с образованием ковалентной связи. Можно предположить, что значительная сила связи обусловлена в том числе взаимодействием между свободными аминогруппами молекулы ЛПС и альдегидными группами подложки, поскольку известно, что содержание общего белка в препаратах ЛПС, выделенных даже жесткими методами, может достигать 1.5–2.5%. Использованный нами в работе препарат ЛПС включал в качестве прочно связанной примеси 1.3% белка.

Заключительная стадия функционализации моноклональными антителами слюды, предварительно обработанной последовательно ARTES и затем ГА, при использовании ЛПС-кантилевера приводила к резкому падению силы взаимодействия, выраженному в на много большей степени для слюды «МКАт7» по сравнению с «МКАт2» (табл. 2, рис. 3б). Последнее обстоятельство указывает на то, что «пришитые» антитела, как МКАт2, так и МКАт7, экранируют на поверхности слюды реакционно-активные группы ГА, способные взаимодействовать с молекулами ЛПС. Вместе с тем существенная разница в адгезивности функционализированного ЛПС кантилевера к слюде, покрытой комплементарными этому антигену и гетерологичными антителами, свидетельствует о весомом вкладе в регистрируемое взаимодействие «МКАт2-ЛПС» специфической составляющей.

Наиболее часто используемыми и показательными силовыми характеристиками изучаемых взаимодействий в разнообразных системах «лиганд – рецептор» являются сила последнего разрыва связей и площадь между кривой отведения и базисной линией (работа сил адгезии). Последний отрыв в такого рода исследованиях, как предполагается [14], отражает разрыв специфической связи непосредственно между молекулами, иммобилизованными на поверхность зонда и субстрата. Площадь между кривыми подведения и отведения соответствует работе, которую необходимо приложить для разрыва всех связей, как специфических, так и неспецифических [37].

Рис. 5 и 6 иллюстрируют наличие специфической и неспецифической составляющих взаимодействий при использовании кантилеверов двух типов, функционализированного ЛПС и интактного, для двух наиболее демонстративных критериев силы разрываемых связей – силе последнего

отрыва (рис. 5) и работе сил адгезии (рис. 6). Применительно к intactному кантилеверу по указанным показателям значимость процедуры той или иной обработки слюды существенно ниже по сравнению с ЛПС-кантилевером. Обращает на себя внимание аналогичный характер результатов сравнительной оценки амплитуды последнего отрыва и работы, затрачиваемой на разрыв всех связей. В частности, более высокие значения обоих показателей для слюды, покрытой МКАт2, по сравнению с МКАт7, при использовании функционализированного ЛПС кантилевера подтверждают наличие специфического компонента связи (рис. 5 и 6). Об этом можно судить при сравнении названных систем не только по двум вышеуказанным показателям, но и таким, как дистанция последнего отрыва, длина ассоциата, среднее количество отрывов, доля отведений, имеющих хотя бы один отрыв (табл. 2). По-видимому, относительно более высокие значения использованных показателей для пары «МКАт2 – ЛПС» объясняются наличием в препарате ЛПС, иммобилизованном на зонде, достаточно крупных ассоциатов (агломератов) субъединиц антигена, отрыв которых от субстрата требует преодоления не только сил специфического связывания, но и опосредуемых ими неспецифических сил дезагрегации ассоциата, очевидно, превышающих таковые для пары «МКАт7 – ЛПС», в которой нет специфического взаимодействия «антиген – антитело». Вместе с тем достаточно высокие абсолютные значения показателей взаимодействия в паре «МКАт7 – ЛПС» могут свидетельствовать о том, что степень выраженности суммарной неспецифической составляющей во взаимодействии «МКАт2 – ЛПС» по крайней мере сопоставима с таковой у его специфического компонента, если не выше. Так, по литературным данным сила единичной связи между молекулами антигена и антитела в подобных системах зависит, в частности, от скорости отведения и, как правило, не превышает 250–280 пН [38]. В наших экспериментах средняя сила последнего отрыва в паре «МКАт2 – ЛПС» превысила 2.2 нН (табл. 2), что свидетельствует о разрыве сильного неспецифического взаимодействия, которое может превышать специфическое взаимодействие, и, кроме того, одновременном разрыве множественной специфической связи «антиген – антитело», поскольку область контакта острия кантилевера и субстрата значительно превышает размеры одной белковой молекулы [39, 40].

Следует подчеркнуть, что последний (и часто единственный) отрыв в оцениваемой связи «МКАт2 – ЛПС» содержит неспецифическую составляющую. На это указывают относительно большие значения показателя «сила последнего отрыва» и, косвенно, показателей «дистанция последнего отрыва», «длина ассоциата», «среднее

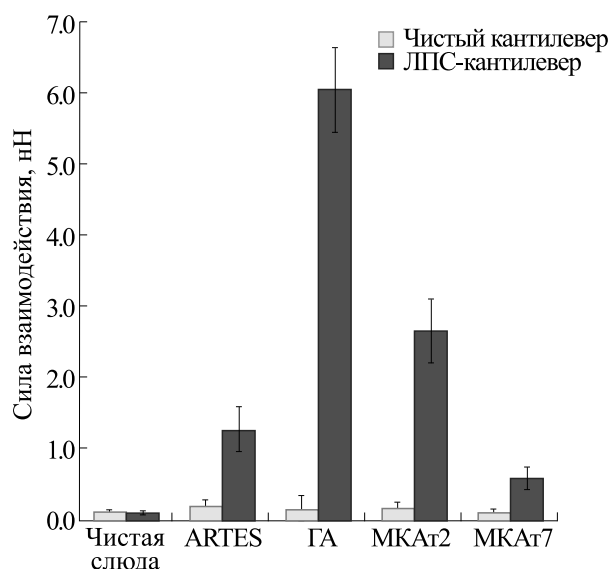


Рис. 6. Площадь между кривыми подведения и отведения (работа сил адгезии). Доверительные интервалы указаны для $p = 0.01$.

количество отрывов» для субстратов без МКАт2, в первую очередь, для пары «МКАт7 – ЛПС» (рис. 3, табл. 2). В этой связи можно ли утверждать, что каждый последний отрыв в системе «МКАт2 – ЛПС» содержит специфическую компоненту, то есть отражает ли он в том числе и разрыв связи между Fab-фрагментом МКАт2 и О-антигеном липополисахарида? По-видимому, нельзя, поскольку, как можно судить по представленным в табл. 2 результатам, силы неспецифического связывания достаточно велики и могут целиком опосредовать последний отрыв. Даже если отрыв (в том числе и последний) включает специфическую в указанном выше смысле составляющую, прикладываемая сила разрывает не только такую связь, но и сопутствующую неспецифическую, определяемую в том числе и дезагрегацией биомолекул. Поэтому при количественной оценке взаимодействия «антиген – антитело» ориентироваться на абсолютные значения силы последнего отрыва не следует, во всяком случае, как и в наших экспериментах, для биомолекул, имеющих склонность к агрегации. Точность таких измерений относительна и в силу других причин – шероховатости соприкасающихся поверхностей, адсорбции на них примесных компонентов, способа ковалентного связывания биомолекул к твердой фазе, определяющего доступность реакционноспособных сайтов для иммуноспецифического взаимодействия, и др. [11, 41]. Кроме того, существуют разные подходы к идентификации отрыва как отрыва, выбраковке отдельных хронограмм, иные различия в проце-

дуре измерений, статистической обработке и трактовке полученных результатов.

Литературные данные, а также вышеприведенные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что применительно к изучению методом АСМ силы связи между двумя биообъектами неспецифические связи можно квалифицировать следующим образом.

1. Взаимодействие минеральных материалов зонда и подложки (субстрата) между собой.

2. Взаимодействие каждого из них с биообъектом (биомолекулами), иммобилизованным на другом.

3. К числу неспецифических взаимодействий следует отнести, очевидно, также и события, которые вызывают изменения сигнала, отражающие дезагрегацию биомолекул; исследуемые биомолекулы могут иметь различные химический состав, физико-химические свойства, пространственную организацию или представлять собой агломераты, как, например, препараты бактериальных липополисахаридов [32, 42]. Дезагрегация такого агломерата может иметь место и в отсутствие специфической связи, но наличие последней требует повышения суммарной работы, затрачиваемой на разрыв всех связей.

4. Вполне вероятно также, что существенный вклад в силу формируемой связи вносит и компонента, определяемая неспецифическим, единичным или множественным, взаимодействием соприкасающихся участков биомолекул, не имеющих прямого отношения к определяемой связи «антигенная детерминанта – Fab-фрагмент антител». Указанная компонента, очевидно, также может влиять на количество работы, требуемой для дезагрегации агломератов макромолекул.

ВЫВОДЫ

Совокупность представленных экспериментальных данных свидетельствует о том, что неспецифические связи, регистрируемые в проведенных экспериментах, включают взаимодействия не только между минеральными носителями, но и, в гораздо большей степени, взаимодействия, определяемые иммобилизованными на них биомолекулами. По-видимому, последние регистрируются в результате дезагрегации агломератов ЛПС (и в меньшей степени – агломератов антител) при отведении сенсibilизированного ЛПС кантилевера от субстрата, покрытого антителами; указанная неспецифическая составляющая взаимодействия ЛПС кантилевера с субстратом, обработанным комплексными антителами МКАт2, оказалась существенно выше по сравнению с гетерологичными антителами МКАт7. При этом следует подчеркнуть резкое снижение неспецифического связывания ЛПС-кантилевера

со слюдой, предварительно обработанной АРТЕС и далее ГА, за счет последующего блокирования препаратами антител ее реакционно-активных групп, способных к взаимодействию с ЛПС. Учитывая вышеизложенное, количественное выявление из интегрального сигнала фотодетектора компонента, который бы соответствовал чисто специфической связи «молекула антигена – молекула антител», представляется сложной проблемой вследствие неотъемлемого и не всегда строго идентифицируемого влияния на разрывающую связь неспецифических факторов. Их природа, количество и степень выраженности определяются выбранными условиями проведения эксперимента. В подобного рода исследованиях целесообразным и продуктивным представляется использование нескольких, желательно радикально различающихся и взаимодополняющих методических подходов, совокупные результаты применения которых должны давать более объективную, взвешенную оценку подобных взаимодействий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90013, а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (№ МК-3383.2021.1.4).

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. T. Nandi and S.R.K. Ainaravaru, *Emerg. Top. Life Sci.* **5** (1), 103 (2021).
2. M.Y. Amarouch, J. El Hilaly, and D. Mazouzi, *Scanning* **2018**, 7801274 (2018).
3. S. Liu and Y. Wang, *Scanning* **32**(2), **61** (2010).
4. Z. Bednarikova, Z. Gazova, F. Valle, and E. Bystrenova, *J Microsc.* **280** (3), 241 (2020).
5. C. Lo Giudice, A.C. Dumitru, and D. Alsteens, *Anal Bioanal Chem* **411** (25), 6549 (2019).
6. L.S. Dorobantu and M.R. Gray, *Scanning* **32** (2), 74 (2010).
7. C. Formosa-Dague, M. Castelain, H. Martin-Yken, et al., *Microorganisms* **6** (2), 39 (2018).

8. E.V. Sidorin and T.F. Solov'eva. *Biochemistry (Mosc)*. **76** (3), 295 (2011).
9. J. Israelachvili, *Q Rev Biophys*. **38** (4), 331 (2005).
10. A. Elbourne, J. Chapman, A. Gelmi, et al., *J Colloid Interface Sci*. **546**, 192 (2019).
11. T.S. Tsapikouni and Y.F. Missirlis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **75** (1), 252 (2010).
12. O.H. Willemsen, M.M. Snel, K.O. van der Werfs, et al., *Biophys. J.* **75**, 2220 (1998).
13. L. Chih-Kung, W. Yu-Ming, H. Long-Sun, and L. Shiming, *Micron* **38** (5), 446 (2007).
14. M. Utjesanovic, T.R. Matin, K.P. Sigdel, et al., *Sci Rep*. **9** (1), 451 (2019).
15. C.T. Lim, E.H. Zhou, A. Li, et al., *Mater. Sci. Eng.* **26** (8), 1278 (2006).
16. M. Targosz, P. Czuba, R. Biedron, et al., *ACTA PHYSICA POLONICA A* **109** (3), 421 (2005).
17. E. Brzozowska, A. Leśniewski, S. Sęk, et al., *Sci. Rep.* **8** (1), 10935 (2018).
18. И.В. Сафенкова, А.В. Жердев и Б.Б. Дзантиев, *Успехи биологической химии* **52**, 281 (2012).
19. A. Beaussart and S. El-Kirat-Chatel, *Cell Surf.* **5**, 100031 (2019).
20. Y. Wang, J. Wang, J. Sun, et al., *J Nanosci Nanotechnol* **19** (12), 7584 (2019).
21. S. Ramezani, H.X. Ta, B. Muhunthan, and N. Abu-Lail, *Biointerphases* **13** (4), 041005 (2018).
22. M.M. Elmahdy, A. Drechsler, C. Gutsche, et al., *Langmuir* **25** (22), 12894 (2009).
23. E. Celik and V.T. Moy, *J Mol Recognit.* **25** (1), 53 (2012).
24. J.R. King, C.M. Bowers, and E.J. Toone, *Langmuir* **31** (11), 3431 (2015).
25. J. Wakayama, H. Sekiguchi, S. Akanuma, et al., *Anal Biochem.* **380** (1), 51 (2008).
26. O. Westphal and K. Jann, *Methods in Carbohydrate Chemistry* **5**, 83 (1965).
27. A.A. Byvalov, L.G. Dudina, S.G. Litvinets, et al., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **50** (2), 203 (2014).
28. A.A. Byvalov, L.G. Dudina, A.V. Chernyad'ev, et al., *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **33** (2), 32 (2015).
29. H. He, J. Zhang, J. Yang, and F. Yang, *Microsyst. Technol.* **23**, 1799 (2017).
30. S. Kim, H.K. Christenson, and J.E. Curry, *Langmuir* **18**, 2125 (2002).
31. A. Ebner, L. Wildling, and H.J. Gruber, *Methods Mol. Biol.* **1886**, 117 (2019).
32. B. Ananchenko, V. Belozero, A. Byvalov, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **156**, 841 (2020).
33. ISO 4287:2000, Geometrical product specification (GPS). Surface texture. Profile method. Terms, definitions and surface texture parameters, International Organization of Standardization.
34. N.C. Santos, A.C. Silva, M.A. Castanho, et al., *Chem-biochem.* **4** (1), 96 (2003).
35. Q. Lu, J. Wang, A. Faghihnejad, et al., *Soft Matter* **7** (19), 9366 (2011).
36. I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, and K.C. Waldron, *Biotechniques* **37** (5), 790 (2004).
37. R. Popeski-Dimovski, *Carbohydr Polym.* **123**, 146 (2015).
38. H. Gao, X.X. Zhang, and W.B. Chang, *Front Biosci.* **10**, 1539 (2005).
39. Y. Wang, J. Wang, S. Huang, et al., *Int J Biol Macromol.* **134**, 28 (2019).
40. C. Wang, J. Wang, and L. Deng, *Nanoscale Res Lett.* **6** (1), 579 (2011).
41. H.J. Butta, B. Cappella, and M. Kappl, *Surface Science Reports* **59**, 1 (2005).
42. W. Kaca, J. Gleńska-Olender, I. Konieczna, et al., *Methods Mol Biol.* **2021**, 273 (2019).

Specific and Non-Specific Interactions of *Yersinia pseudotuberculosis* Lipopolysaccharide with Monoclonal Antibodies Assessed by Atomic Force Microscopy

A.A. Byvalov*, **, V.S. Belozero*, **, B.A. Ananchenko*, and I.V. Konyshov*, **

*Vyatka State University, Moskovskaya ul. 36, Kirov, 610000 Russia

**Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya ul. 50, Syktyvkar, 167982 Russia

Atomic force microscopy (AFM) was employed to quantify the interaction force between a probe coated with *Yersinia pseudotuberculosis* lipopolysaccharide (LPS) (a LPS-functionalized probe) and monoclonal antibodies immobilized on mica; contribution of nonspecific factors to this interaction was evaluated. No evidence was observed for the presence of discernable interactions between the "pure" probe and "pure" mica or mica subjected to any treatments. Surface modification of "pure" mica with (3-aminopropyl)triethoxysilane led to an increase in the forces of interaction between an LPS-covered AFM cantilever tip and mica. Treatment of surface-aminated mica with glutaric aldehyde caused further increase in nonspecific binding force. Subsequent immobilization of monoclonal antibodies on mica pretreated with (3-aminopropyl)triethoxysilane and then with glutaric aldehyde induced a sharp decrease in the interaction, decrease was significantly less pronounced in the presence of specific anti-lipopolysaccharide antibodies than decrease in the presence of heterologous antibodies. The force of specific binding to antibodies of antigens that have a tendency to aggregate, such as lipopolysaccharides, can be lower than the force of nonspecific interaction, including "disaggregation", "unfolding" of agglomerates of biomolecules immobilized on the probe and mica surface.

Keywords: atomic force microscopy, binding force, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies

УДК 577.3

ОБЗОР МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ, ОПИСЫВАЮЩИХ МЕХАНИЧЕСКИЕ ДВИЖЕНИЯ В МОЛЕКУЛЕ ДНК

© 2022 г. М.В. Беженар^{*, **, #}, А.А. Елкина^{*, **, #}, Х.Л. Эрнандес Касерес^{***}, М.Г. Барышев^{*, **, #},
А.О. Сулима^{**}, С.С. Джимаков^{*, **, #}, В.А. Исаев^{**}

^{*}ФИЦ «Южный научный центр РАН», 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

^{**}Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

^{***}Кубинский Центр Нейронаук ул. 25-ая, угол к 198-ой, Плайя, Гавана, Куба

[#]E-mail: mia1610@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 19.08.2022 г.

Рассмотрены различные механические модели ДНК, воспроизводящие ее структуру. Более подробно описана эволюция механической модели молекулы ДНК, предложенной С.В. Ингландером, который предположил, что нелинейные эффекты могут играть важную роль в динамике ДНК. Обсуждается механическая модель молекулы ДНК, учитывающая вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатной цепи, а также влияние внешнего периодического воздействия на динамику молекулы. Показано, что при численном решении модели без упрощений при периодическом внешнем воздействии молекула ДНК начинает колебаться, причем специфика колебаний молекулы зависит от последовательности нуклеотидов в цепи. Важно, что с помощью данной математической модели можно рассчитать частоту и амплитуду колебаний отдельного участка ДНК. Расчеты показывают, что зоны открытых состояний чаще появляются на границах гена и в областях с преобладанием А–Т-пар оснований.

Ключевые слова: механическая модель молекулы ДНК, энергия связи, водородные связи, стэкинг, торсионный момент, открытые состояния.

DOI: 10.31857/S0006302922060035, EDN: LJAVZJ

Экспериментальное исследование динамики ДНК и возникновения открытых состояний ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов [1]. По этой причине основным методом исследования открытых состояний ДНК является математическое моделирование [2]. Несмотря на большое количество упрощений, методы математического моделирования позволяют с большой точностью учесть различные аспекты поведения и функционирования молекулы ДНК.

В работе [1] описана попытка экспериментального наблюдения за динамикой открытых состояний в реальном времени. Эксперимент проводили на коротких кольцевых молекулах ДНК, при этом делали большое количество микрофотографий на электронном микроскопе, а затем с помощью суперкомпьютера из этих фотографий создавали короткие видео. В результате удалось наглядно зафиксировать возможные места возникновения открытых состояний в точках перегиба молекулы ДНК. С одной стороны, это говорит о большом интересе ведущих мировых уни-

верситетов к исследованию динамики ДНК и открытых состояний, с другой стороны — о необходимости проведения подобных исследований именно с помощью математического моделирования, позволяющего получить гораздо больше информации, отражающей особенности динамики ДНК. Отмечается, что механические деформации ДНК широко распространены и вовлечены в различные жизненно важные клеточные процессы. Кроме того, авторы работы [3] отметили, что отсутствие высокопроизводительных инструментов для измерения механических свойств ДНК ограничивает изучение ее механики. По этой причине особо важным методом исследования молекулярной динамики ДНК является математическое моделирование на основе механических моделей ДНК.

Механические модели играют важную роль для теоретического исследования внутренней подвижности молекулы ДНК. В этом случае основания ДНК представляют в виде маятников, а взаимодействия между основаниями описывают с помощью замены водородных связей на упругие

связи. Такой подход был предложен в работе [4], последующие работы позволили развить механическую модель описания динамики ДНК, учесть разнообразные формы внешнего воздействия, различные эффекты диссипации и неоднородности молекулы [5].

Остановимся подробнее на рассмотрении различных механических моделей ДНК.

Составными частями каждого нуклеотида являются сахар, фосфат и основание, которые в механических моделях представляются в виде упругих нитей и маятников (дисков). Рассмотрим взаимодействие между двумя соседними нуклеотидами из одной цепи, эти связи являются сильными ковалентными связями, и они моделируются гармоническими потенциалами. Так, например, в работе [6] исследованы механические взаимодействия между соседними нуклеотидами. В этой же работе было показано, что последовательность азотистых оснований коренным образом влияет на процесс структурообразования нуклеиновых кислот, кроме того, отмечено влияние взаимодействия с растворителем на стабильность последовательности.

Между нуклеотидами, которые принадлежат к разным цепям, существуют слабые водородные связи. В некоторых работах сделано предположение, что силы притяжения и отталкивания в данной системе почти равны, и соответствующую потенциальную энергию можно описать потенциалом Морзе. Минус такого подхода состоит в том, что парные потенциалы не зависят от окружения, то есть нуклеотиды в такой последовательности не отличаются друг от друга, в действительности же от типа пары, как было показано выше, зависит энергия связи между ними.

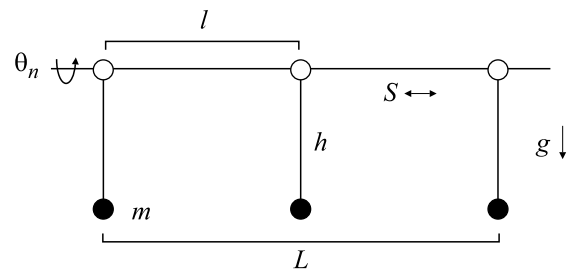


Рис. 1. Механический аналог двойной спирали, представляющий собой линейные цепочки маятников (оснований), соединенных пружинами (сахаро-фосфатными стержнями).

тельности же от типа пары, как было показано выше, зависит энергия связи между ними.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯКУШЕВИЧ

Важное предположение впервые в 1980 г. сделали авторы работы [4]: нелинейные эффекты могут играть важную роль в динамике ДНК. Принципиальная возможность образования открытых состояний в ДНК была показана методом водородно-третиевого обмена. Согласно модели, ДНК может быть представлена в виде двух линейных цепочек маятников (сахаро-фосфатные основания), соединенных пружинами (взаимодействия между основаниями), как показано на рис. 1.

Полная энергия описанной системы в зависимости от углов поворота θ_n задается следующим гамильтонианом:

$$H = \sum \left[\frac{mh^2}{2} \left(\frac{d\theta_n}{dt} \right)^2 + \frac{S}{2} (\theta_n - \theta_{n-1})^2 + mgh(1 - \cos \theta_n) \right], \quad (1)$$

где $d\theta_n$ – угол поворота n -го маятника, S – коэффициент крутильной жесткости маятника, m и h – масса и длина маятников, g – гравитационная постоянная.

Поэтому дифференциальное уравнение движения n -го маятника имеет следующий вид:

$$mh^2 \frac{d^2\theta_n}{dt^2} = S(\theta_n - 2\theta + \theta_{n-1}) + mgh \sin \theta_n. \quad (2)$$

Решением уравнения (2) является выражение:

$$\theta_n = 4 \arctan \left[\exp \left(\frac{2nl}{L} \right) \right], \quad L = 2l \sqrt{\frac{S}{mgh}}, \quad (3)$$

где l – расстояние между двумя соседними маятниками. Функция $\theta_n = \theta(n)$ является солитоном излома.

Данное решение интерпретируем как движение открытого состояния вдоль цепочки ДНК.

Если жесткость $S \gg mgh$, то ширина солитона равна множеству постоянных решетки. Проворачивание только одного из маятников через угол 2π в пределах одной постоянной решетки потребовало бы значительной энергии пружины; таким образом, солитон распространяется на толщину L . Для большей толщины затраты потенциальной энергии слишком велики, что приводит к сохранению солитона неповрежденным.

Модель, разработанная авторами работы [4], была улучшена сначала в работах [7, 8], а затем уже усовершенствована авторами работы [9], которые, рассмотрев дискретную модель плоских ротаторов, показали, что помимо солитонов, которые описывают повороты оснований, существуют достаточно большие отклонения углов поворота между соседними парами оснований. Из этого наблюдения был сделан вывод об обяза-

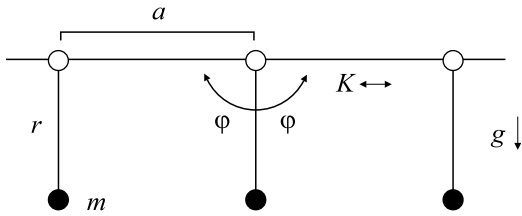


Рис. 2. Схематическое представление модели Л.В. Якушевича.

тельном учете дискретных эффектов при изучении динамики ДНК.

Биомеханический подход также в своих работах использовала Л.В. Якушевич. Ею в 1989 г. была предложена одна из лучших теоретических моделей ДНК, рассматривающая открытое состояние как результат вращения пар оснований [10].

$$L_{\text{single pair}} = \frac{1}{2} \left[I_1 \left(\frac{d\varphi_1}{dt} \right)^2 + I_2 \left(\frac{d\varphi_2}{dt} \right)^2 \right] - K_{1-2} [r_1 (r_1 + r_2 + a) (1 - \cos \varphi_1) + r_2 (r_1 + r_2 + a) (1 - \cos \varphi_2) - r_1 r_2 \left(1 - \cos (\varphi_1 + \varphi_2) \right) + \frac{a^2}{2}], \quad (4)$$

где $\varphi_1(t)$ и $\varphi_2(t)$ — углы отклонения 1-го и 2-го маятников, I_1 и I_2 — моменты инерции этих маятников, K_{1-2} — жесткость горизонтальной пружины, соединяющей маятники, r_1 и r_2 — длины маятни-

Согласно данной модели, ДНК представляет собой две цепочки дисков, которые связаны между собой продольными и поперечными пружинками. При этом основания ДНК — диски, взаимодействие между основаниями — пружинки. Модель учитывает водородные связи между парами оснований, а также стэкинг между соседними парами оснований; недостаток данной модели состоит в том, что не учитываются колебания оснований в крайних парах (рис. 2).

В своей работе Л.В. Якушевич рассматривала фрагмент молекулы ДНК, состоящий из трех пар оснований, и полагала, что происходит только колебание центральной n -й пары оснований, а пары оснований по краям ($(n-1)$ и $(n+1)$) зафиксированы, причем колебание происходит только в горизонтальной плоскости. Функция Лагранжа для такой системы имеет вид:

ков, a — расстояние между массами маятников в положении равновесия ($\varphi_1 = \varphi_2$).

Уравнения, соответствующие данной функции, имеют следующий вид:

$$\begin{cases} I_1 \left(\frac{d\varphi_1}{dt} \right)^2 = -U_1 \sin \varphi_1 + U_{1-2} \sin (\varphi_1 + \varphi_2) - (S_1^{(-)} + S_1^{(+)}) \varphi_1 - \beta_1 \frac{d\varphi_1}{dt}, \\ I_2 \left(\frac{d\varphi_2}{dt} \right)^2 = -U_2 \sin \varphi_2 + U_{1-2} \sin (\varphi_1 + \varphi_2) - (S_2^{(-)} + S_2^{(+)}) \varphi_2 - \beta_2 \frac{d\varphi_2}{dt}, \end{cases} \quad (5)$$

где β_1 и β_2 — коэффициенты диссипации.

При развитии данной модели Л.В. Якушевич ввела дополнительные члены в уравнения и получила [5]:

$$\begin{aligned} I_{1,n} \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - K'_{1,n} [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] - k_{1-2,n} R_{1,n} (R_{1,n} + R_{2,n}) \sin \varphi_{n,1} - \\ - k_{1-2,n} R_{1,n} R_{2,n} \sin (\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = -\beta_{1,n} \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + F_0 \cos (\Omega t), \\ I_{2,n} \frac{d^2 \varphi_{2,n}(t)}{dt^2} - K'_{2,n} [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] - k_{1-2,n} R_{2,n} (R_{1,n} + R_{2,n}) \sin \varphi_{n,2} - \\ - k_{1-2,n} R_{1,n} R_{2,n} \sin (\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = -\beta_{2,n} \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + F_0 \cos (\Omega t), \end{aligned} \quad (6)$$

где $\varphi_{i,n}(t)$ — угловое отклонение n -го азотистого основания i -й цепочки; $I_{i,n}$ — момент инерции n -го азотистого основания i -й цепочки; $R_{i,n}$ — расстояние от центра масс n -го азотистого основания i -й цепочки до сахаро-фосфатной цепочки;

$K'_{i,n}$ — константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки; $k_{1-2,n}$ — константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар; F_0 и Ω — соответственно амплитуда и частота внешнего перио-

дического поля; n – номер основания в последовательностях S и S_k .

При решении этих уравнений был введен ряд упрощений и усреднений. В частности, были

усреднены коэффициенты $I_{1,n}$, $I_{2,n}$, $K'_{1,n}$, $K'_{2,n}$, $R_{1,n}$, $R_{2,n}$ и $k_{1-2,n}$ методом концентраций. Были получены следующие уравнения:

$$\begin{aligned} \bar{I}_1 \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_1 [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,1} - \\ - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = -\bar{\beta}_1 \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t), \\ \bar{I}_2 \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_2 [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,2} - \\ - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = -\bar{\beta}_2 \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t). \end{aligned} \tag{7}$$

Как показано в нашей работе [11], усреднение коэффициентов уравнений приводит к уменьшению в 100 раз величины амплитуды угловых колебаний азотистых оснований.

Л.В. Якушевич получила аналитическое решение данной модели при усреднении коэффициентов уравнений. Было получено аналитическое решение в виде кинка:

$$\varphi_{1,\Omega}(t) = A_{1,\Omega} \cos(\Omega t + \varphi_{01}), \tag{8}$$

где $A_{1,\Omega} = \frac{f_{01}}{\sqrt{[(\omega_{01} - \Omega)^2 + (\delta_1 \Omega)^2]}}$ – амплитуда, $\varphi_{01} = \arctan\left(-\frac{2\delta_1 \Omega}{(\omega_{01} - \Omega)^2}\right)$ – фаза.

Однако данное решение не учитывает спиральный характер структуры ДНК и взаимодействие угловых смещений азотистых оснований. Кроме того, решение типа кинка может быть получено только в случае однородной синтетической ДНК.

На основе модели Л.В. Якушевич было предложено учесть спиральную структуру ДНК, добавляя в уравнение член, учитывающий торсион-

ную связь между n -м диском на одной цепи и $(n + h)$ -м диском на другой, где $2h$ – длина витка спирали в единицах основания [12, 13].

Введение в гамильтониан члена, который отвечает за «геликоидальное» взаимодействие, с одной стороны учитывает спиральную структуру, а с другой – способно качественно описать динамику молекулы ДНК. В дальнейшем модель Якушевич претерпевала несколько изменений, в частности, стало учитываться влияние внешней среды за счет появления коэффициентов диссипации. В работе [14] Л.В. Якушевич с соавторами показали, что в рассматриваемой асимметричной модели двойной цепи ДНК могут существовать три типа топологических солитонов, имитирующих локализованные состояния с открытыми парами оснований. Солитоны могут перемещаться вдоль макромолекулы с постоянной скоростью, меньшей скорости звука, а также они устойчивы по отношению к тепловым колебаниям.

Результаты численных расчетов показали, что данная модель солитонов может объяснять структуру молекулы ДНК. В работе [11] было показано, что необходимо учитывать колебания двух нитей ДНК, это позволяет описать динамику открытых состояний молекулы ДНК:

$$\begin{aligned} I_1^i \frac{d^2 \varphi_1^i(t)}{dt^2} = K_1^i [\varphi_1^{i-1}(t) - 2\varphi_1^i(t) + \varphi_1^{i+1}(t)] - \\ - k_{12}^i R_1^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_1^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i) + F_1^i(t), \quad i = \overline{2, n-1}, \end{aligned} \tag{9}$$

$$I_1^1 \frac{d^2 \varphi_1^1(t)}{dt^2} = K_1^1 [\varphi_1^2(t) + \varphi_1^1(t)] - k_{12}^1 R_1^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_1^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_1^1 - \varphi_2^1) + F_1^1(t), \tag{10}$$

$$\begin{aligned} I_1^n \frac{d^2 \varphi_1^n(t)}{dt^2} = K_1^n [\varphi_1^{n-1}(t) - \varphi_1^n(t)] - \\ - k_{12}^n R_1^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_1^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_1^n - \varphi_2^n) + F_1^n(t), \end{aligned} \tag{11}$$

$$I_2^i \frac{d^2 \varphi_2^i(t)}{dt^2} = K_2^i [\varphi_2^{i-1}(t) - 2\varphi_2^i(t) + \varphi_2^{i+1}(t)] - k_{12}^i R_1^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_2^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i) + F_2^i(t), \quad i = \overline{2, n-1}, \quad (12)$$

$$I_2^1 \frac{d^2 \varphi_2^1(t)}{dt^2} = K_2^1 [\varphi_2^2(t) + \varphi_2^1(t)] - k_{12}^1 R_2^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_2^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_2^1 - \varphi_1^1) + F_2^1(t), \quad (13)$$

$$I_2^n \frac{d^2 \varphi_2^n(t)}{dt^2} = K_2^n [\varphi_2^{n-1}(t) + \varphi_2^n(t)] - k_{12}^n R_2^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_2^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_2^n - \varphi_1^n) + F_2^n(t), \quad (14)$$

$$\text{где } F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t).$$

Как оговаривалось выше, данный член отвечает за эффекты диссипации и периодическое воздействие, причем $F_0 = 0.526 \cdot 10^{-22}$ Дж, $\omega = 0.4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹.

В работе [11] было показано, что ряд упрощений (усреднение характеристик цепочки ДНК) приводит к снижению достоверности решения. Вышеописанный метод намного ближе к истинной биомеханике молекулы ДНК.

На основе модели Л.В. Якушевич появилось множество других моделей, особенностью которых является использование торсионного момента для описания открытых состояний. Такие модели в последствии получили название Y-модели.

В работах [15, 16] было показано влияние изотопного состояния среды: при изменении изотопного обмена $^2\text{H}/^1\text{H}$ наблюдалось увеличение энергии, которое необходимо для разрыва водородной связи, в связи с чем возрастало количество открытых состояний. Представленное в работе [17] исследование показало, что наличие дейтерия в цепочке нуклеотидов может вызывать в зависимости от величины энергии разрыва водородной связи как увеличение, так и уменьшение вероятности возникновения открытых состояний. Участие атомов дейтерия в образовании водородных связей в молекуле ДНК может вызвать изменение во времени передачи генетической информации, что говорит о том, что даже незначительное изменение изотопного состояния среды способно повлиять на изменение процессов метаболизма в живых системах.

В работе [17] было показано влияние частот в диапазоне от 10^{11} с⁻¹ до 10^8 с⁻¹ внешнего периодического воздействия на динамику молекулы ДНК. Под воздействием внешней периодической силы молекула ДНК может совершать колебательные движения с частотой отличной от частоты внешнего воздействия.

Численное решение механической математической модели молекулы ДНК для гена интерферона альфа 17 и фрагмента гена дрозофилы показало, что при увеличении вязкости среды скорость изменения угловых колебаний азотистых

оснований уменьшается, что приводит к их стабилизации; в свою очередь, уменьшение вязкости среды приводит к обратному эффекту – увеличению скорости угловых отклонений азотистых оснований и увеличению угловых деформаций нитей ДНК. Таким образом, уменьшение вязкости среды вызывает нестабильность молекулы ДНК, которая со временем только увеличится [18].

При воздействии торсионного момента на молекулу ДНК возникают вращательные движения азотистых оснований, что приводит к возникновению открытых состояний, которые чаще всего образуются на краях молекулы ДНК и в областях с преобладанием азотистых пар оснований А–Т [19]. Вероятность появления открытых состояний при ситуации, когда торсионный момент прикладывается к определенной части гена, зависит от содержания в этой области пар А–Т, от размера этой области и времени воздействия торсионного момента на этот участок гена.

Необходимо отметить, что данная модель позволяет учесть стэкинг оснований за счет коэффициента, характеризующего крутильную жесткость сахара-фосфатной цепочки. При этом, если знать значения стэкинга для всех комбинаций пар оснований в цепи, он может быть учтен в абсолютных значениях. Как отмечено в работе [20], при расчете величины стэкинга необходимо учитывать ряд параметров, в том числе, влияние водного окружения.

МОДЕЛЬ ПЕЙЯРДА–БИШОПА И ПЕЙЯРДА–БИШОПА–ДОКСУА

Модели, представленные выше, являются угловыми, такие модели предсказывают движение солитонов по цепочке ДНК. Хорошо известным примером трансляционных моделей является модель Пейярда–Бишопа (РВ) [21, 22], а также две ее расширенные версии. Они представляют собой геликоидальные модели Пейярда–Бишопа и модель Пейярда–Бишопа–Доксуа. Основным требованием к трансляционному подходу является описание комплементарных Н-связей с помощью нелинейного потенциала. Нелинейность данного потенциала доказывается работами по инфракрасной спектроскопии ДНК, такие низкочастотные колебательные моды водородных

связей оснований были названы «дыханием» ДНК. Модель Пейярда–Бишопа предполагает, что молекула ДНК состоит из двух цепочек полинуклеотидов и представляет собой две цепочки дисков, которые связаны между собой продольными и поперечными пружинами. продольные взаимодействия представляют собой сильные ковалентные связи, моделируемые гармоническими потенциалами. Поперечные взаимодействия между нуклеотидами, принадлежащими к разным цепям, являются слабыми водородными взаимодействиями, требующими ангармонического потенциала. Примером, используемым для модели Пейярда–Бишопа, является потенциал Морзе:

$$V_M(u_n - v_n) = D \left[e^{-a(u_n - v_n)} - 1 \right]^2, \quad (15)$$

где параметры D и a – соответственно глубина и обратная ширина потенциальной ямы Морзе. Координаты u_n и v_n представляют собой поперечные смещения нуклеотидов в положении n от их положений равновесия вдоль направления водо-

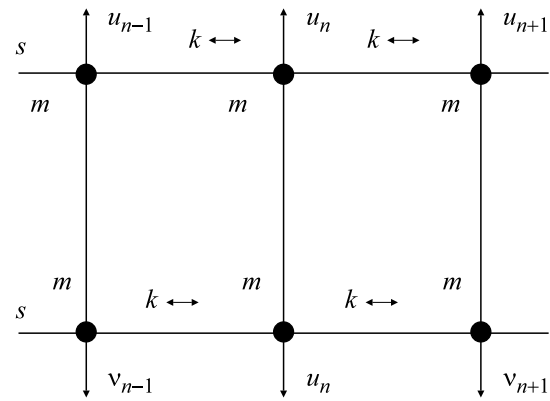


Рис. 3. Сегмент молекулы ДНК, показывающий как ковалентные взаимодействия, определяемые параметром k , так и водородные связи, моделируемые потенциалом Морзе.

родной связи. Гамильтониан такой системы равен

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{u}_n^2 + \dot{v}_n^2) + \frac{k}{2} [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] \right\} + V_M(u_n - v_n), \quad (16)$$

где $m = 300$ а.е.м. $= 5/1 \cdot 10^{-25}$ кг – масса нуклеотида, k – константа гармонического взаимодействия, в то время как \dot{u}_n и \dot{v}_n представляют соответствующие скорости. Первые два члена представляют собой соответственно кинетическую и потенциальные энергии продольной пружины. Потенциал Морзе отвечает за нелинейность дан-

ной системы и описывает слабые водородные связи. Для удобства были введены новые координаты, представляющие синфазные и нефазовые поперечные движения:

$$x_n = \frac{(u_n + v_n)}{\sqrt{2}}, \quad y_n = \frac{(u_n - v_n)}{\sqrt{2}}, \quad (17)$$

которые преобразует гамильтониан (16) в (18):

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{x}_n^2 + \dot{y}_n^2) + \frac{k}{2} [(x_n - x_{n-1})^2 + (y_n - y_{n-1})^2] \right\} + V_M(y_n). \quad (18)$$

Согласно уравнениям (17) и рис. 3 можем заключить, что $x_n(t)$ и $y_n(t)$ описывают синфазные и нефазовые колебания пары нуклеотидов в положении n соответственно. Другими словами, $x_n(t)$ представляет колебание центра масс нуклеотидов, в то время как $y_n(t)$ – их растяжение.

Фактически модель Пейярда–Бишопа является частным случаем геликоидальной модели Пейярда–Бишопа, которая будет объяснена ниже. Теперь достаточно указать, что функция $x_n(t)$ представляет собой линейную волну, в то время как $y_n(t)$ является нелинейной. Важно знать, что $y_n(t)$ зависит не от температуры, а от ее среднего значения $\langle y \rangle$? [23–25]. Данная модель может объ-

яснить денатурацию ДНК, а это означает, что величина, которая может отражать степень денатурации молекул ДНК в растворе, представляет собой среднее растяжение водородных связей [19]. Температура плавления, заданная численной обработкой, значительно выше, чем температура, соответствующая непрерывному приближению. Это, безусловно, указывает на большую роль дискретности в динамике ДНК [25].

Рассмотрим усовершенствованные модели Пейярда–Бишопа – геликоидальные модели Пейярда–Бишопа и модель Пейярда–Бишопа–Доксуа. В модели Пейярда–Бишопа–Доксуа гармоническая потенциальная энергия была заменена ангармонической следующим образом:

$$\frac{k}{2} (y_n - y_{n-1})^2 \Rightarrow \frac{k}{2} \left[1 + \rho e^{-\alpha(y_n + y_{n-1})} \right] (y_n - y_{n-1})^2, \quad (19)$$

где ρ и α – константы [26].

Это выражение можно рассматривать как гармоническое взаимодействие с переменной константой связи [27].

В рамках данной модели показано, что среднее растяжение водородных связей $\langle y \rangle$ зависит от температуры. Это демонстрирует преимущество модели Пейярда–Бишопа–Доксуа по сравнению с теми моделями, которые предполагают гармоническую аппроксимацию. Функция $\langle y \rangle$ сначала медленно увеличивается, а потом резко возрастает, данный участок графика представляет собой денатурацию. В случае модели Пейярда–Бишопа–Доксуа денатурация протекает довольно резко и происходит при более низких температурах. Чтобы быть более точным, авторы сравнили два случая в пределах потенциала, заданного уравнением (19), – площадь $\alpha = 0$ (модель Пейярда–Би-

шопа) и $\alpha \neq 0$ (модель Пейярда–Бишопа–Доксуа) – и продемонстрировали преимущество последнего. Отметим, что функция $\langle y \rangle$ также зависит от остальных параметров, существующих в модели, таких как D и a , описывающих потенциал Морзе. Некоторые комбинации дают очень резкое увеличение даже для гармонического случая, а также слишком низкую температуру плавления [28, 29].

Хронологически первое и наиболее важное усовершенствование модели Пейярда–Бишопа было сделано в работе [30], его мы и называем геликоидальной моделью Пейярда–Бишопа. В уравнение (12) был введен новый термин, описывающий геликоидальные взаимодействия, и гамильтониан перепишем следующим образом:

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{u}_n^2 + \dot{v}_n^2) + \frac{k}{2} [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] + \frac{K}{2} [(u_n - v_{n+h})^2 + (u_n - v_{n-h})^2] + D [e^{-a(u_n - v_n)} - 1]^2 \right\}, \quad (20)$$

где K – гармоническая постоянная геликоидальной пружины. Как оговаривалось выше, геликоидальность означает, что после поворота на угол π нуклеотид, принадлежащий одной цепи в позиции n , будет близок как к $(n+h)$ -му, так и $(n-h)$ -му нуклеотидам другой цепи [31].

Полный математический анализ, включающий множество математических деталей, можно найти в работе [32], очень кратко рассмотрим основные выводы. Уравнения (17) и (20) приводят к двум несвязанным динамическим уравнениям движения – линейному и нелинейному. Ограничимся нелинейным, который представляет собой выражение:

$$m\ddot{y}_n = k(y_{n+1} + y_{n-1} - 2y_n) - K(y_{n+h} + y_{n-h} - 2y_n) + 2\sqrt{2}aD(e^{-a\sqrt{2}y_n} - 1)e^{-a\sqrt{2}y_n}. \quad (21)$$

Конечно, это дискретное дифференциальное уравнение в частных производных, и наша цель – получить его решение, т.е. функцию $y_n(t)$. Предполагаем, что колебания нуклеотидов достаточно велики, чтобы быть ангармоническими, но все же достаточно малы для преобразования, чтобы быть действительными:

$$y_n = \varepsilon \Phi_n \quad (\varepsilon \ll 1). \quad (22)$$

Для решения уравнения (22) используем полудискретное приближение, что означает волновые решения вида:

$$\Phi_n(t) = F_1(\xi) e^{i\theta_n} + \varepsilon [F_0(\xi) + F_2(\xi) e^{i2\theta_n}] + c.c. + O(\varepsilon^2) \quad (23)$$

и

$$\xi = (\varepsilon n l, \varepsilon t), \quad \theta_n = n q l - \omega t, \quad (24)$$

где $l = 0.34$ нм – расстояние между двумя соседними нуклеотидами в одной цепи, ω – оптическая частота линейного приближения; $q = 2\pi/\lambda$ – волновое число, $c.c.$ представляет собой комплексно сопряженные члены, а функция F_0 является

действительной. Это модулированная волна, где F_1 является непрерывной функцией, представляющей огибающую, в то время как компонент несущей $e^{i\theta_n}$ является дискретным. Математической основой для уравнения (23) является метод множественного масштаба или метод разложения по производным [33, 34].

Приходим к дисперсионному соотношению:

$$\omega^2 = \frac{4}{m} \left[a^2 D + k \sin^2 \left(\frac{ql}{2} \right) + K \cos^2 \left(\frac{qhl}{2} \right) \right], \quad (25)$$

выражение для групповой скорости $V_S = d\omega/dq$ и так далее. Особое значение имеет тот факт, что функции F_0 и F_2 могут быть выражены через F_1 , в то время как последняя является решением хорошо известного разрешимого нелинейного уравнения Шредингера:

$$iF_{1\tau} + PF_{1SS} + Q|F_1|^2 F_1 = 0, \quad (26)$$

где τ и S – новые временные и пространственные координаты. Здесь P и Q – коэффициент дисперсии и коэффициент нелинейности соответственно. Для $PQ > 0$ решение уравнения (26) равно:

$$F_1(S, \tau) = A_0 \operatorname{sech} \left(\frac{S - u_e \tau}{L_e} \right) \exp \frac{iu_e(S - u_e \tau)}{2P}, \quad (27)$$

что приводит к окончательному решению [34]:

$$y_n(t) = 2A \operatorname{sech} \left(\frac{nl - V_e t}{L} \right) \left\{ \cos(\Theta nl - \Omega t) + A \operatorname{sech} \left(\frac{nl - V_e t}{L} \right) \left[\frac{\mu}{2} + \delta \cos(2(\Theta nl - \Omega t)) \right] \right\}. \quad (28)$$

Выражение для $A = \varepsilon A_0$, $L = L_e/\varepsilon$, волновое число Θ огибающей скорости V_e и частота Ω приведены в [30].

Чтобы построить график функции $y_n(t)$, значения всех параметров должны быть известны или, по крайней мере, оценены. Их две группы: математические (ε , u_e , u_c) и внутренние параметры (k , K , a , D , q). Было высказано предположение [34], что длина волны охватывает целое число периодов l :

$$q = \frac{2\pi}{\lambda}, \quad \lambda = Nl, \quad N \text{ integer}. \quad (29)$$

Следовательно, можно принять N в качестве внутреннего параметра вместо q . Обращаем внимание на то, что зависимость от ε может быть устранена [30]. Это можно было ожидать, поскольку это только рабочий параметр, который мы используем для различения больших и малых терминов в расширении ряда (23).

Проблема с математическими параметрами практически решена с использованием идеи когерентного режима [31, 34], предполагая, что скорости огибающей и несущей волны равны:

$$V_e = \frac{\Omega}{\Theta}. \quad (30)$$

Это означает, что функция $y_n(t)$ одинакова в любой позиции n . Другими словами, волна сохраняет свою форму во времени, что указывает на возможную стабильность [34]. Обращаем внимание на то, что уравнение (28) является однофазной функцией, если выполняется уравнение (30).

ПРИМЕНЕНИЕ КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКИХ И МЕТОДОВ САМОНАПРЯЖЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРЫ ДНК

Квантово-механические методы часто применяются для описания сложных биологических объектов. Эта необходимость может возникнуть при объяснении поведения клеток и тканей, возникающих в результате коллективных взаимодействий внутри сложных молекулярных сетей, а также в вопросе переноса энергии и заряда в макромолекулах. В отличие от моделей, представленных выше, данные процессы протекают на молекулярном уровне, поэтому на динамику молекулы ДНК могут влиять квантово-механические эффекты. Данный подход был предложен в работе [35], автор которой описал солитонный механизм переноса биоэнергии в макромолекуле. В работе [36] показано, что возникающее нелинейное взаимодействие, сопровождающее распространение вибрационных квантов вдоль макромолекулы, вызывается вибрационными возбуждениями (экситонами) и акустическим фононами. Это приводит к формированию солитона, под которым подразумевают перемещающуюся вдоль молекулярной цепи локальную область продольных сжатий водородных связей в молекуле белка. В работе [37] описан солитон кручения, который представляет собой динамически устойчивую локальную область деформации торсионных углов макромолекулы. Рассматривалась цепь молекул, находящихся на определенном расстоянии, а в качестве потенциала – торможение звена цепи, которое возникает при перекрывании орбиталей при вращении вокруг валентной связи. Одним из недостатков подобных моделей является то, что солитон обладает коротким временем жизни ($\sim 10^{-12} - 10^{-13}$ с) при

температурах, близких к биологическим, что говорит о сложности переноса им энергии в биологических системах [38]. Помимо солитонов Давыдова в макромолекулярных структурах могут возникнуть различные типы стабильных состояний, которые зависят от геометрии структуры, а также от ее физических свойств [39].

Другим, не менее интересным методом, является концепция самонапряженных конструкций или тенсегрити, суть данного метода заключается в описании поведения биоконструктивных систем. Данная модель клетки объясняет, как ее механическое поведение возникает в результате физических взаимодействий между различными системами молекулярных нитей, формирующих цитоскелет [40].

В работе [41] рассматривается математическая модель, воспроизводящая регуляцию экспрессии генов на основе связывания лигандов с молекулой ДНК. Макромолекула представлялась идеальной струной для изучения механических возмущений, динамика этих процессов описывается следующим уравнением:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial t^2} = \frac{F}{\rho(x)} \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} + g(x, t), \quad (31)$$

где $U(x, t)$ представляет собой поперечное отклонение струны на расстоянии x от конца струны в момент времени t , F – натяжение струны, $\rho(x)$ – линейная плотность, $g(x, t)$ – удельная внешняя сила, действующая на струну. Величина $F/\rho(x) = c^2$, где c – скорость распространения возмущения в ДНК. Начальное возмущение имеет вид:

$$g(x, t) = Ae^{-\frac{(at^2 + (x-x_0)^2)^{1/2}}{b}}, \quad (32)$$

где A и b – численные параметры. Для определения положения струны использовали разностную схему, а для оценки – электромеханическую модель отталкивания дипольных моментов.

Данные методы на сегодняшний день вызывают большой интерес к исследованию свойств нелинейных возбуждений, в частности таких как различные типы солитонов, поляронов или биполяронов, которые могут образовываться в биологических макромолекулярных структурах. Концепция самонапряженных конструкций, описанная в работах [40, 41], совмещает различные подходы к описанию динамики молекулы ДНК, а также показывает, что помимо статистических методов может быть использована модель электромеханических возмущений.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На сегодняшний день разработано множество различных нелинейных моделей ДНК, различаются они в основном своей подробностью: моде-

ли упругого стержня и квантовые модели ДНК [42–48]. Образование открытых состояний [49] можно объяснить на основании вращения азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатного остова (модель Л.В. Якушевича), либо на основании сдвига азотистых оснований в направлении, перпендикулярном оси вращения молекулы ДНК (модель Пейярда–Бишопа и другие). Динамика моделей ДНК описывается нелинейными уравнениями, которые допускают аналитическое решение в виде солитонов и кинков. Необходимо отметить, что изучению физических свойств молекулы ДНК посвящено огромное количество публикаций. Так, хорошо изучена температурная зависимость гибкости ДНК в присутствии сил растяжения и расстегивания [50]. Считается, что двухцепочечная ДНК обладает внутренней жесткостью на изгиб [51–53]. Одним из важных факторов, влияющих на прочность молекулы являются термически генерируемые пузырьки денатурации [54]. При этом подобные пузырьки возникают при считывании информации с молекулы ДНК, поэтому изучение их свойств является крайне важной и актуальной задачей [55–59]. Одним из факторов, влияющих на образование пузырьков денатурации является величина торсионного момента, действующего на двойную спираль молекулы [60]. Измерению его величины также посвящен ряд работ [61–63].

Известно, что экспериментальное исследование динамики ДНК и возникновения открытых состояний ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов [64, 65]. Более полное описание механики ДНК можно получить, если объединить данные о ее механических показателях и исследовать ее движения. Такой подход возможен только в рамках математического моделирования [2]. Поэтому на сегодняшний день одним из основных методов исследования механических свойств ДНК является математическое моделирование.

На наш взгляд, наиболее универсальной моделью для исследования динамики азотистых оснований, позволяющей учитывать различные внешние факторы является модель Л.В. Якушевича без упрощений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № Н-21.1/11, гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-2366.2022.1.4), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-44-230026) и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

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. L. B. Pyne, A. Noy, K. H. S. Main, et al., *Nature Commun.*, **12**, 1053 (2021).
2. M. Manghi and N. Destainville, *Phys. Reports*, **631**, 1 (2015).
3. A. Basu, D. G. Bobrovnikov, Z. Qureshi, et al., *Nature*, **589**, 462 (2021).
4. S. W. Englander, N. R. Kallenbach, A. J. Heeger, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7222 (1980).
5. Л. В. Якушевич, *Нелинейная физика ДНК* (НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск, 2007).
6. F. Hase and M. Zacharias, *Nucl. Acids Res.*, **44**, 7100 (2016).
7. S. Yomosa, *Phys. Rev. A*, **27**, 2120 (1983).
8. S. Yomosa, *Phys. Rev. A*, **30**, 474 (1984).
9. S. Homma and S. Takeno, *Progr. Theor. Phys.* **72**, 679 (1984).
10. L. V. Yakushevich, *Phys. Lett. A*, **136**, 413 (1989).
11. M. I. Drobotenko, S. S. Dzhimak, A. A. Svidlov, et al., *Biophysics*, **63** (2), 177 (2018).
12. G. Gaeta, *Phys. Lett. A*, **143** (4–5), 227 (1990).
13. G. Gaeta, *Phys. Lett. A*, **168** (5–6), 383 (1992).
14. L. V. Yakushevich, A. V. Savin, and L. I. Manevitch, *Phys. Rev. E*, **66** (1), 16614 (2002).
15. A. A. Basov, M. I. Drobotenko, A. A. Svidlov, et al., *Molecules*, **25** (16), 3753 (2020).
16. A. A. Svidlov, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Physics of Wave Phenomena*, **29** (2), 180 (2021).
17. A. A. Svidlov, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (15), 7873 (2021).
18. A. A. Svidlov, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Entropy*, **23** (11), 1446 (2021).
19. S. Dzhimak, A. Svidlov, A. Elkina, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (8), 4428 (2022).
20. F. Hase and M. Zacharias, *Nucl. Acids Res.*, **44** (15), 7100 (2016).
21. M. Peyrard and A. R. Bishop, *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2755 (1989).
22. T. Dauxois, M. Peyrard, and A. R. Bishop, *Phys. Rev. E*, **47**, 684 (1993).
23. A. Wildes, N. Theodorakopoulos, J. Valle-Orero, et al., *Phys. Rev. Lett.*, **106** (4), 48101 (2011).
24. A. Wildes, L. Khadeeva, W. Trewby, et al., *J. Phys. Chem. B*, **119** (12), 4441 (2015).
25. G. Gaeta, C. Reiss, and M. Peyrard, *La Rivista del Nuovo Cimento*, **17**, 1 (1994).
26. G. Weber, *Europhys. Lett.*, **73** (5), 806 (2006).
27. M. Peyrard, S. Cuesta-López, and D. Angelov, *J. Phys. Condensed Matter*, **21** (3), 34103 (2009).
28. M. Barbi, S. Lepri, M. Peyrard, et al., *Phys. Rev. E*, **68**, 61909 (2003).
29. T. Dauxois and M. Peyrard, *Phys. Rev. E*, **51**, 4027 (1995).
30. T. Dauxois, *Phys. Rev. A*, **159**, 390 (1991).
31. S. Zdravković, *J. Nonlinear Math. Phys.*, **18** (2), 463 (2011).
32. T. Kawahara, *J. Phys. Soc. Japan*, **35**, 1537 (1973).
33. R. K. Dodd, J. C. Eilbeck, J. D. Gibbon, and H. C. Morris, *Solitons and Nonlinear Wave Equations* (Acad. Press, Lond., 1982).
34. S. Zdravković and M. V. Satrić, *Phys. Rev. E*, **73**, 021905 (2006).
35. A. S. Davydov, *Phys. Scripta*, **20** (3–4), 387 (1979).
36. A. S. Davydov, *Solitons in molecular systems* (Riedel Publ. Comp., D., 1985).
37. А. В. Савин и О. В. Гендельман, *Высокомолекуляр. соединения*, **41** (2), 263 (1999).
38. L. Cruzeiro-Hansson, *Phys. Rev. A*, **45**, 4111 (1992).
39. A. A. Gogolin, V. I. Mel'nikov, and É. I. Rashba, *J. Exp. Theor. Phys.*, **42**, 254 (1975).
40. D. E. Ingber, *J. Cell Sci.*, **116**, 1397 (2003).
41. Ю. Д. Нечипуренко, Р. В. Полозов и Д. Ю. Нечипуренко, в кн. *Математика. Компьютер. Образование*, под ред. Г. Ю. Ризниченко (М.-Ижевск, НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Ижевский институт компьютерных исследований, 2006), сс. 392–402.
42. S. K. Nomidis, M. Caraglio, M. Laleman, et al., *Phys. Rev. E*, **100** (2), 22402 (2019).
43. S. K. Nomidis, E. Skoruppa, E. Carlon, et al., *Phys. Rev. E*, **99** (3), 032414 (2019).
44. S. K. Nomidis, J. Hooyberghs, G. Maglia et al., *J. Phys. Condensed Matter*, **30** (30), 304001 (2018).
45. G. Torrellas and E. MacLá, *Phys. Lett., Section A: General, Atomic and Solid State Physics* **376** (45), 3407 (2012).
46. A. Zeida, M. R. MacHado, P. D. Dans, et al., *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **86** (2), 21903 (2012).
47. A. K. Mazur and M. Maaloum, *Phys. Rev. Lett.*, **112** (6), 68104 (2014).
48. M. Zoli, *J. Phys. Condensed Matter*, **29** (22), 225101 (2017).
49. A. K. Mazur, *Phys. Rev. E*, **95** (6), 62417 (2017).
50. T. Pal and S. M. Bhattacharjee, *Phys. Rev. E*, **93** (5), 52102 (2016).

51. A. Noy and R. Golestanian, *Phys. Rev. Lett.*, **109** (22), 228101 (2012).
52. A. K. Mazur, *Phys. Rev. Lett.*, **116** (15), 158101 (2016).
53. A. K. Mazur, *Phys. Rev. Lett.*, **111** (17), 179801 (2013).
54. G. Altan-Bonnet, A. Libchaber, and O. Krichevsky, *Phys. Rev. Lett.*, **90** (13), 138101 (2003).
55. O.-C. Lee, J.-H. Jeon, and W. Sung, *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **81** (2), 21906 (2010).
56. D.S. Sanchez, H. Qu, D. Bulla, et al., *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **87** (2), 22710 (2013).
57. O.-C. Lee and W. Sung, *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **85** (2), 021902 (2012).
58. B. S. Alexandrov, L. T. Wille, K. O. Rasmussen, et al., *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **74**, 050901 (2006).
59. S. Park, O.-C. Lee, X. Durang, et al., *J. Korean Phys. Soc.*, **78** (5), 408 (2021).
60. D. Salerno and A. Tempestini, I. Mai, *Phys. Rev. Lett.*, **109** (11), 118303 (2012).
61. H. Qu, Y. Wang, C.-Y. Tseng, et al., *Phys. Rev. X*, **1** (2), 1 (2011).
62. D. S. Sanchez, H. Qu, D. Bulla, et al., *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **87** (2), 22710 (2013).
63. J. Wang, H. Qu, and G. Zocchi, *Phys. Rev. E – Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **88** (3), 32712 (2013).
64. A. L. B. Pyne, A. Noy, K. H. S. Main, et al., *Nat. Commun.* **12**, 1053 (2021).
65. S. S. Dzhimak, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Dokl. Biochem. Bioph.* **483**, 359 (2018).

Review of Mathematical Models Describing the Mechanical Motion in a DNA Molecule

M.V. Bezhenar^{*, **}, A.A. Elkina^{*, **}, J.L. Hernandez Caceres^{*}, M.G. Baryshev^{*, **},
A.O. Sulima^{**}, S.S. Dzhimak^{*, **}, and V.A. Isaev^{**}**

**Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

***Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia*

****Cuban Center for Neurosciences Avenida 25 esquina a 198, Playa, La Habana, Cuba*

Various mechanical models of DNA reproducing its structure are considered. The evolution of the mechanical model of the DNA molecule proposed by S.V. Englander, who suggested that nonlinear effects can play an important role in DNA dynamics, is described in more detail. This paper discusses a mechanical model of a DNA molecule that takes into account the rotational motion of nitrogenous bases around the sugar-phosphate chain, as well as the influence of external periodic action on the dynamics of the molecule. It is shown that when the model is numerically solved without simplifications, the DNA molecule begins to oscillate under periodic external influence, and the specificity of the molecule's oscillations depends on the sequence of nucleotides in the chain. It is important to note that with the help of this mathematical model, it is possible to calculate the frequency and amplitude of vibrations of a single DNA site. Calculations show that zones of open states appear more often at gene boundaries and in regions with a predominance of A–T base pairs.

Keywords: mechanical model of a DNA molecule, binding energy, hydrogen bonds, stacking, torsion moment, open states

УДК 577.3

ВОЗМОЖНЫЕ ФАЗОВЫЕ ЭФФЕКТЫ В ДИСПЕРСИИ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА В ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР НАТИВНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2022 г. С.П. Рожков*, А.С. Горюнов*

*Институт биологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия

E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

Предложен качественный подход к механизму возникновения фазовых переходов и равновесий разного типа в дисперсиях глобулярного белка в диапазоне температур, где структурное состояние белка считается нативным. Предполагается, что возможны два типа нативных конформеров N и N*, имеющих максимумы стабильности в разных температурных диапазонах, но между которыми существует обратимый структурный переход. Также предполагается наличие двух типов интермедиатов белка I и I*, сосуществующих с конформерами N и N* в соответствующих диапазонах температур. Обсуждается вопрос о поиске возможных путей перехода от термодинамики (пред)денатурационных переходов белка к термодинамике конденсационных фазовых переходов всей дисперсии в целом, с формированием фазовых границ. Предполагается, что интермедиаты I и I* могут участвовать в фазовых переходах типа «жидкость—жидкость» (L-L), с образованием из них микрофаз (кластеров) в метастабильном равновесии с фазой раствора, состоящей из нативных конформеров. Наступление фазовых переходов зависит как от микроокружения макромолекул белка в дисперсии, так и от свойств интермедиатов белка. На фазовых диаграммах, построенных в координатах «температура—энтропия» $\{T, S\}$, «химический потенциал конформеров – температура» $\{\mu^i, T\}$, определены зоны метастабильных состояний N+I и N*+I*, верхняя и нижняя критические температуры растворения, зона сверхкритических фазовых переходов. Обсуждаются условия, при которых метастабильные равновесия N+I и N*+I* являются результатом фазовых переходов типа (L-L). Установлено, что максимальная стабильность белка достигается именно в области критических фазовых переходов. Эта область является гомогенной, но характеризуется как зона пониженной термодинамической устойчивости дисперсии белка в целом.

Ключевые слова: химический потенциал, конформация, интермедиаты, кластеры, фазовые переходы, фазовая диаграмма.

DOI: 10.31857/S0006302922060047, EDN: LJFWJL

Проблемы конформации и саморегуляции в белковых системах, равно как и связанных с ними фазовых переходов (ФП) I рода между нативными (N) и денатурированными (D) состояниями, являются предметом интенсивных исследований [1]. В то же время пока еще недостаточно рассматривается роль конформации белка в таких, например, ФП в дисперсиях глобулярных белков, как ФП типа «жидкость—жидкость» (ФП L-L) [2], что обычно наблюдаются в температурном интервале стабилизации нативной формы белка и подробно изучаются в связи с проблемами кристал-

лизации [3]. Вместе с тем известно, что основными участниками физиологически значимых ФП L-L в цитоплазме являются конформационно лабильные внутренне неупорядоченные белки [4–7]. В связи с этим возникает вопрос, в какой мере конформационная лабильность белка способствует наступлению и определяет параметры ФП в белковом растворе. Один из способов ответить на него состоит, на наш взгляд, в том, чтобы проследить взаимосвязь между термодинамикой (пред)денатурационных переходов белка и термодинамикой конденсационных фазовых переходов всей дисперсии (раствора) в целом. Это позволило бы тем самым установить взаимосвязь различных уровней организации – от внутримолекулярного до уровня водно-белковой системы (раствора, дисперсии), поскольку все эти процес-

Сокращения: ФП – фазовые переходы, N – нативный, D – денатурированный, ФП L-L – фазовые переходы типа «жидкость—жидкость», НКТР – нижняя критическая температура растворения, ВКТР – верхняя критическая температура растворения.

сы регулируются однотипными физическими и химическими молекулярными взаимодействиями [8].

ФП типа L-L обычно связаны с образованием плотных белковых микрофаз – кластеров, находящихся в метастабильном равновесии с разбавленным белковым раствором. Плотные микрофазы содержат около тысячи белков и возникают в области температур L-L-переходов. Их образование объясняется механизмами коллоидных взаимодействий, обусловленных короткодействующим потенциалом притяжения и дальним потенциалом отталкивания между молекулами белка [3]. Существуют экспериментальные данные о зависимости критических температур ФП L-L от концентрации белков, различных солей [9] и других осмолитов в дисперсии [10]. Теоретический опыт изучения ФП L-L с критической точкой (при критическом составе и температуре) был сконцентрирован на относительно простых белковых модельных системах типа «вода–глобулярный белок» [3] и «вода–белок–соль» [11]. В последнем случае для такой тройной системы было получено теоретическое выражение критического состава, соответствующего критической температуре. Критический состав определялся отношением молярных концентраций белка и соли m_2/m_3 и зависел от заряда белка, числа адсорбированных белком ионов электролита, коэффициента активности соли [11]. При определенном значении m_2/m_3 на фазовой диаграмме предсказывалось возникновение критического ФП между плотной и разбавленной фазами. В результате этого перехода должна появляться устойчивая макроскопически однородная дисперсия. Критическое значение m_2/m_3 может означать, что определенное количество ионов соли должно взаимодействовать с молекулой белка и занимать соответствующие места в структуре белка. Регулировка может осуществляться как путем подгонки температуры к составу, так и состава к температуре. При отсутствии необходимого соотношения могут возникать белковые фракции с разным количеством адсорбированных ионов, отличающиеся по конформации, гидратации, удельному объему и значениям химического потенциала. Существование различных белковых фракций способствует дестабилизации гомогенного состояния дисперсии [12] и тем самым допускает возможность разделения фаз за счет выделения молекул с более высоким химическим потенциалом в отдельные микрофазы. В этом случае последние могут служить причиной возникновения кристаллического полиморфизма [13].

Если растворимость глобулярного белка снижается с повышением температуры, то их растворы имеют нижнюю критическую температуру

растворения (НКТР). Существует и другая группа белков, которые лучше растворяются при повышении температуры и имеют верхнюю критическую температуру растворения (ВКТР). Считается, что последовательность аминокислот определяет характер растворимости и конденсации. Однако большое число полимеров, частным случаем которых являются белки, могут иметь и ту и другую температуры [14]. В последнее время наблюдается прогресс в дизайне внутренне неупорядоченных белков, растворы которых обладают как НКТР, так и ВКТР, т.е. способных к конденсации как при нагревании, так и при охлаждении [15]. С другой стороны, в зависимости от микроокружения, которое определяется составом и значениями pH дисперсии (зарядом белка), концентрациями и типами электролита, осмолитов и т. д., дисперсия как с ВКТР, так и с НКТР может быть образована одним и тем же белком. Примером такого белка может служить сывороточный альбумин, имеющий ВКТР в присутствии полиэтиленгликолей или ряда неорганических солей в диапазоне пониженных, но положительных температур [16], и имеющий НКТР в области более высоких температур в присутствии поливалентных солей [17].

В данной работе мы рассматриваем низкотемпературный (D) \leftrightarrow (N) и высокотемпературный (D) \leftrightarrow (N)* конформационные переходы белка как ФП первого рода, хотя первый из них обычно имеет место в диапазоне отрицательных температур. При этом исходим из представления, что низкотемпературное D и высокотемпературное D* состояния белка хотя и похожи, но не идентичны, поскольку вторичные структуры отличаются динамикой и гидратацией [18].

С другой стороны, есть факты о существовании двух стабильных конформеров белка в области физиологических температур, которые мы назовем N- и N*-конформерами. Первый из них имеет максимум стабильности в области более низких, а второй – в области более высоких температур. Так, бычья карбоангидраза имеет два свернутых конформера с температурой перехода между ними около 30°C. При этом второй конформер переходит в состояние расплавленной глобулы при нагревании [19]. Предполагается [20], что две свернутые N- и N*-формы белка характерны для многих ферментов. При этом существуют данные о конкретных структурных различиях стабильных конформеров [21].

В работе [22] было показано, что бычий сывороточный альбумин находится в одном конформационном состоянии А в интервале температур 12–20°C, а в интервале температур 22–50°C – в двух различных конформационных состояниях А и В. Процент содержания конформации А уменьшался, в то время как процент содержания кон-

формации В увеличивался примерно до 25% при приближении температуры к 50°C. Бычий сывороточный альбумин спонтанно переходил из конформационного состояния А в конформационное состояние В при температуре около 58°C.

Ранее нами по результатам исследования методом ЭПР спиновой метки структурно-динамических свойств сывороточного альбумина человека в водно-солевых дисперсиях также были выявлены два температурных диапазона максимальной стабильности нативного состояния белка [23, 24].

Таким образом, в некоторой области температур существуют два типа взаимопревращающихся стабильных конформеров, которые, наиболее вероятно, отличаются по растворимости в зависимости от температуры. Их температурный переход А↔В, видимо, можно отнести к явлению, которое классифицируется в термодинамике как непрерывный фазовый переход, связанный с изменением симметрии системы без скачков термодинамических функций, а лишь с их плавным изменением [25].

Кроме того, для многих белков наряду с нативным состоянием обнаруживаются различные долгоживущие интермедиаты [26], причем их концентрация иногда может быть значительной. Естественно предположить, что они являются более лабильными, чем нативная форма, но менее лабильными, чем развернутая форма. Мы допускаем, что некоторые из интермедиатов (I*) имеют более высокую растворимость и концентрацию в высокотемпературном диапазоне, образуя соответствующую фракцию белка, а некоторые интермедиаты (I) имеют более высокую растворимость и концентрацию в низкотемпературном диапазоне и образуют там свою фракцию. Не исключено, что они способны менять структурное состояние при смене температурных диапазонов.

Помимо растворимости, различие N- и I-конформеров белка, равно как N*- и I*-конформеров, может быть сопряжено с различием их объема и химических потенциалов. Так, известно, что объем нативного состояния больше, чем денатурированного из-за образования некоторого количества заполненных растворителем пустот в структуре нативного белка [27]. При некоторой величине этого различия термодинамическая устойчивость дисперсии нарушается и запускается процесс фазового разделения. При этом метастабильное равновесие может устанавливаться за счет высвобождения молекул с повышенным химическим потенциалом в отдельные микрофазы в результате ФП типа «жидкость—жидкость». Если же структурно-динамические различия между N- и I-молекулами или N*- и I*-молекулами уменьшатся при изменении температуры или состава системы, то возможен критический ФП, ведущий

к образованию относительно стабильной макрогомогенной системы из смеси N-, N*-, I- и I*-молекул без фазовых границ.

В данной работе ставится задача качественного описания термодинамической системы в представлении фазовых диаграмм, в которой фазовые переходы первого рода молекул (D)*↔(N)* и (D)↔(N) приняты за реперные точки, в температурном интервале между которыми существуют белковые фракции из (N + I)- и (N* + I*)-молекул. В диапазоне некоторых температур может оказаться энергетически выгодно их фазовое разделение с установлением метастабильного равновесия. Вместе с тем в других, также определенных условиях, происходят критические ФП между этими фазами с формированием макроскопически однородной системы, в которой на микрокопическом уровне возможны последовательные изменения конформации всех компонентов системы. Это состояние характеризуется сильным развитием флуктуаций концентрации конформеров при макроскопической гомогенности дисперсии.

Для характеристики этих переходов и метастабильных равновесий предлагается рассмотреть фазовые диаграммы в координатах температурных изменений энтропии S, концентрации и химических потенциалов μ^i различных состояний белка, где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ – соответствующие конформеры.

ТЕОРИЯ

Кривая стабильности белка. Как следует из колоколообразной формы кривой стабильности белка, стабилизация нативного состояния N происходит при положительных значениях разности свободной энергии $\Delta G_N^D = G^D - G^N$ между денатурированным состоянием белка D и нативным состоянием N [28]. Температуры, при которых $\Delta G_N^D = 0$, соответствуют ФП первого рода. Ниже и выше этих температур наблюдаются холодное и термическое денатурированные состояния. Форма кривой стабилизации и температуры переходов изменяются в присутствии осмолитов или адсорбентов [29].

Обращает на себя внимание, что по краям купола стабильность белка меньше, чем в середине. Это может быть связано с тем, что наряду со стабильным N-конформером в этом диапазоне температур присутствуют интермедиаты белка, которые по конформационной «гибкости» занимают промежуточное между N и D положение и тем самым метастабильны. Если концентрация интермедиатов достаточна и их объем отличен от объема N-конформера, это уменьшает термодинамическую устойчивость однофазной системы в

целом, поскольку может оказаться энергетически выгодным их выделение в отдельную фазу. Подобный случай нами теоретически рассматривался ранее [30]. Гомогенная однофазная система является термодинамически более устойчивой, чем система при наличии метастабильных состояний.

В случае существования одного стабильного конформера ΔG_N^D имеет форму одиночного купола, а ΔS_N^D монотонно растет в этом интервале температур и меняет знак при температуре максимальной стабилизации конформера. При наличии двух стабильных N- и N*-конформеров можно ожидать наличия двух выраженных экстремумов ΔG_N^D , обозначенных на рис. 1 как A и B соответственно, и двух кривых ΔS_N^D , пересекающихся $\Delta S_N^D = 0$ в точках экстремума при соответствующих температурах. Они сходятся вблизи температур ФП 1 рода $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$, как это представлено на рис. 1. Здесь мы предполагаем, что состояния D и D*, N и N* различаются.

Энтропийные изменения белка. Из анализа рис. 1 можно выделить ряд энтропийных изменений, сопровождающих ФП белковых молекул в растворе в интервале температур от холодной до тепловой денатурации. Во-первых, это скачки энтропии для фазового перехода первого рода $D \leftrightarrow N$ и $N^* \leftrightarrow D^*$. Во-вторых, это изменения энтропии при переходах $D^* \leftrightarrow N$ и $D \leftrightarrow N^*$ через точки $\Delta S_N^D = 0$, а также при переходах NN^* . Эти изменения можно наглядно рассмотреть на примере гипотетической фазовой диаграммы в координатах «температура–энтропия», как показано на рис. 2. Здесь энтропийные изменения будут иметь соответствующие знаки:

$$\begin{aligned} \Delta S_N^D &= S^D - S^N < 0, \\ \Delta S_N^{D^*} &= S^{D^*} - S^{N^*} > 0, \\ \Delta S_N^{D^*} &= S^{D^*} - S^N > 0, \\ \Delta S_N^D &= S^D - S^{N^*} < 0. \end{aligned} \quad (1)$$

При построении фазовой диаграммы на рис. 2 исходили из того, что ФП первого рода обычно не заканчивается при одной температуре, но возможны метастабильные состояния. В нашем представлении подобные состояния могут возникнуть из-за интермедиатов белка I* и I. Относящиеся к ним изобары в форме кривых Ван-дер-Ваальса изображены на рис. 2. Метастабильные равновесия конформеров белка в интервале между T_1-T_3 и T_6-T_4 возможны, если эти конформеры будут находиться под разными давлениями. В критических точках [25] T_3 и T_4 различие между интермедиатами и нативными конформерами,

которое может быть обусловлено их разными объемами и давлениями, исчезает.

На рис. 2 также показаны фазовые переходы первого порядка при T_1 и T_6 и область постепенного превращения конформера N в конформер N* (и наоборот) в интервале температур T_3-T_4 как возможный фазовый переход более высокого порядка, чем первый.

Химические потенциалы конформеров белка. Поскольку на рис. 2 каждое метастабильное равновесие представлено своей изобарой, а давление и химический потенциал компонента взаимосвязаны ($\Delta\mu = P\Delta V$), возможные изменения различных конформеров белка от температуры в интервале температур от термической до холодной денатурации могут быть представлены в терминах химических потенциалов (рис. 3), а не давлений. Химический потенциал μ вещества уменьшается с ростом температуры при постоянном давлении, так как $(\partial\mu/\partial T)_p = -S$, а энтропия S положительна [31]. Качественно зависимости μ^i от T , где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ – соответствующие состояния белка, показаны на рис. 3. Их форма определена из общих теоретических представлений о температурном поведении химического потенциала компонент в конденсированной системе [31]. Помимо этого, подобные зависимости следуют из

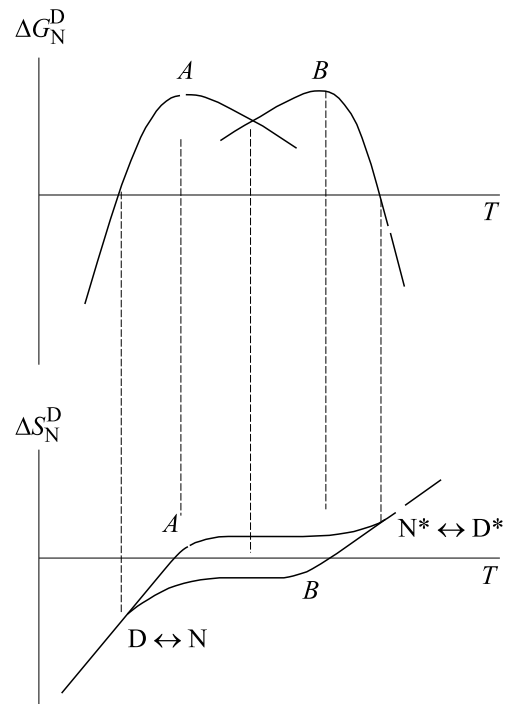


Рис. 1. Зависимость энергии Гиббса ΔG_N^D (а) и энтропии ΔS_N^D (б) разности D- и N-состояний белка, представленного двумя стабильными конформерами A и B в интервале температур от холодной до тепловой денатурации.

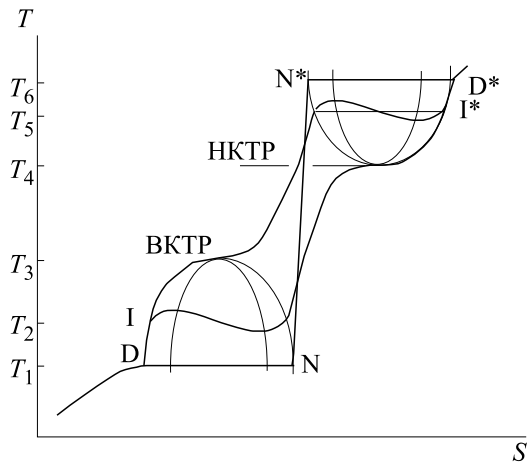


Рис. 2. Схематическое изображение фазовой диаграммы модельного белка со свойствами, представленными на рис. 1, в координатной плоскости «температура (T) – энтропия (S)». Горизонтальные линии между N и D , а также N^* и D^* , соответствуют фазовым переходам первого рода. Кривые (изобары), образованные петлями Ван-дер-Ваальса при низких и высоких температурах, указывают на метастабильное равновесие между интермедиатом I и молекулами N , а также I^* - и N^* -молекулами.

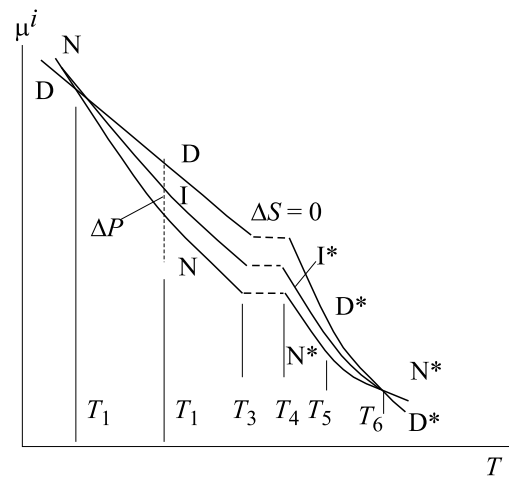


Рис. 3. Температурные зависимости химических потенциалов μ^i различных конформеров модельного белка ($i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$), построенные на основе общих термодинамических представлений о температурном поведении компонент в конденсированной системе [31]. T_1 и T_6 – фазовые переходы $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$; T_2 и T_5 – средние температуры зоны метастабильных равновесий; T_3 и T_4 являются критическими точками с VKTP и HKTP соответственно. Между T_3 и T_4 находится сверхкритическая макроскопически однофазная область с пониженной стабильностью.

известной фазовой диаграммы эллиптического типа, связывающей давление, при котором происходят ФП $N \leftrightarrow D$, с температурой (диаграмма Хаулея (С. А. Hawley)), где вместо давления используется химический потенциал. Углы наклона касательных к кривым, характеризующим $S^D, S^N, S^{D^*}, S^{N^*}$, выбраны так, чтобы выполнялись условия (1). Поэтому углы наклона касательной к S^D меньше, чем к S^N , а углы наклона касательной к S^{D^*} больше, чем S^{N^*} . В данном диапазоне температур от T_1 до T_6 наиболее стабильны состояния белка N и N^* , поэтому значения μ^N и μ^{N^*} минимальны. При этом состояния D и D^* наименее стабильны, поэтому значения μ_D и μ_{D^*} максимальны. Соответственно концентрация белков изменяется в сторону N и N^* как более стабильных состояний, а содержание D^* - и D -форм становится незначительным. Можно предположить, что эти закономерности сохраняются, если вместо S^D и S^{D^*} рассматривать S^I и S^{I^*} , как показано на рис. 3.

Наличие метастабильного равновесия между макромолекулами N, I (или N, D), имеющих разный объем (или обладающими разными химическими потенциалами), будет обеспечиваться разными давлениями на них. Это возможно, если на уровне макромолекул действует закон Лапласа о капиллярном давлении. Сосуществование N, I (или N, D) макромолекул термодинамически эквивалентно появлению метастабильного зароды-

ша новой фазы в старой фазе. Есть формула (см. работу [25]), связывающая радиус метастабильного зародыша R с разницей давлений в нем P_2 с давлением в основной фазе P_1 или с разницей в химических потенциалах:

$$R = 2\sigma/(P_2 - P_1) \text{ или } R = 2\sigma v_2/(\mu_1 - \mu_2), \quad (2)$$

где σ – поверхностное натяжение, μ – химический потенциал частиц в фазах, v_2 – объем ядра.

Согласно этим выражениям разность $(P_2 - P_1)$ может быть такой, что зародыш новой фазы соизмерим с размером молекулы белка, однако чем разность меньше, тем радиус новой фазы будет больше. Различие между давлениями на N - и D -конформеры может быть значительным. Об этом говорят экспериментальные факты использования гидростатического давления для проверки адекватности эллиптической формы фазового равновесия $N \leftrightarrow D$ на фазовой диаграмме Хаулея [32] в координатах $\{P, T\}$. Поскольку объем нативного состояния больше, чем развернутого, то, согласно этой диаграмме, равновесие $N \leftrightarrow D$ при любой температуре из диапазона $T_1 - T_6$ можно достичь либо ростом гидростатического давления, которое ведет к уменьшению объема N -конформера до объема D -конформера, либо ростом отрицательного давления, которое увеличивает объем D -конформера до объема N -конформера. И в том и другом случае это большие значения давлений – в сотни МПа [33] (или десятки кбар).

Чем больше разница давлений, тем меньше значение R , которое будет приближаться к молекулярному. Можно предположить, что такого же порядка давления необходимы, чтобы интермедиаты находились в метастабильном равновесии $N \leftrightarrow I$. Может ли капиллярное давление обеспечить такую разность, неизвестно.

С другой стороны, можно достичь метастабильного равновесия при гораздо меньших значениях давления, если интермедиаты группируются в кластеры или микрофазы. В этом случае на них будет действовать давление Лапласа $\Delta P = \pm 2\sigma/R$, где ΔP – разность давлений в соседних фазах, разделенных искривленной поверхностью R . Недавно были получены интересные результаты в диапазоне гидростатических давлений до 1 кбар, когда на примере γ -кристаллина было показано, что фазовый переход L–L очень чувствителен к относительно низкому давлению [34]. Так, при низких температурах капли γ -кристаллина переходят в гомогенный раствор при давлении около 0.1 кбар, что находится в пределах капиллярного давления микронных капель. Поэтому гораздо более вероятно существование метастабильного равновесия в форме ФП L–L, чем в форме отдельных молекул. Такой подход позволяет перейти от термодинамики отдельных конформеров белка к термодинамике жидких фаз, состоящих из этих конформеров, и рассматривать их метастабильное равновесие как ФП типа «жидкость–жидкость».

При температурах T_1 и T_6 (ФП первого рода) на рис. 3 наблюдается излом потенциальных кривых, но в точке их пересечения обеспечивается равновесие всех состояний белка как по объему, так и по давлению. Между температурами T_3 и T_4 , где $\Delta S^D_N = 0$, предполагается существование зоны, в которой возможен непрерывный переход как переход более высокого порядка, чем ФП-1, от N-конформера к N*- и I*-конформерам, и от N*-конформера к N- и I-конформерам. Этот переход должен сопровождаться ростом флуктуаций концентраций конформеров. Зона между T_3 и T_4 интересна тем, что дисперсия белка здесь является термодинамически устойчивой, поскольку в ней нет фазовых границ и метастабильных состояний, как по краям всего температурного диапазона, но из-за развития флуктуаций такое состояние характеризуется пониженной термодинамической устойчивостью [25]. Вместе с тем эта зона оказывается зоной максимальной стабильности нативного состояния и она, согласно теории Семенченко [35], может обладать определенными термодинамическими преимуществами при функционировании белковых систем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Если $\Delta G^D_N = 0$ определяет границу перехода $N \leftrightarrow D$, то граница термодинамической устойчивости дисперсии белка по отношению к диффузионным процессам (концентрационные флуктуации перестают «растворяться», и это способствует фазообразованию) определяется детерминантом устойчивости $\delta^2 G = 0$, где $\delta^2 G = \det(\partial^2 G / \partial m_i / \partial m_j)$ [11]. Здесь m_i и m_j – молярные концентрации компонентов раствора: белка и осмолита соответственно. Равенство нулю этого детерминанта позволяет рассчитать границу устойчивости системы к разделению фаз (спинодаль) [11]. К спинодали примыкает бинадаль как линия метастабильного равновесия фаз. LLPTs есть общая критическая точка спинодали и бинадали и обычно наблюдается в непосредственной близости от кривой растворимости нативной формы белка [2, 3]. Такой подход позволяет перейти от рассмотрения проблемы конформации и ее стабильности для индивидуальной формы белка к проблеме устойчивости всей дисперсии по отношению к разделению на фазы и образованию метастабильных состояний из разных по стабильности и растворимости форм белка. Это можно сделать посредством фазовых диаграмм «температура–состав» (рис. 4), где состав определяется отношением m_2/m_3 [11]. Эта диаграмма представляет систему, в которой существуют два стабильных конформера N и N* и два интермедиата I и I* (рис. 4). В основе диаграммы лежит типичная диаграмма смешения системы полимер–растворитель [14], но концентрация соли выступает как параметр, играющий роль давления, поскольку кривые 1–6 – изобары.

На рис. 4 показаны две бинадали – одна с НКТР и одна с ВКТР (соответствующие им спинодали (внутренние параболы) и связанные с этим неравновесные процессы здесь рассматриваться не будут). Бинадали соответствуют метастабильным равновесиям типа $N \leftrightarrow I$ или $N^* \leftrightarrow I^*$, представленными на рис. 2, но в данном контексте не на молекулярном, а на фазовом уровне. Кривые растворимости белка представлены тонкими линиями. Цифры слева от 1 до 6 соответствуют возрастающим концентрациям электролита m_3 в дисперсии белка, в то время как по оси абсцисс меняется концентрация белка m_2 . Кривые растворимости, соединяющие противоположные стороны бинадали, отражают метастабильное равновесие конформеров $N \leftrightarrow I$ (кривые 1 и 2) и $N^* \leftrightarrow I^*$ (кривые 3 и 4). В этих случаях макрофазы дисперсии содержат молекулы N и N*, а микрофазы-кластеры содержат интермедиаты I и I*, соответственно. Кривые 5 и 6 соответствуют равновесию фазы из I*-конформеров и их аморфных агрегатов.

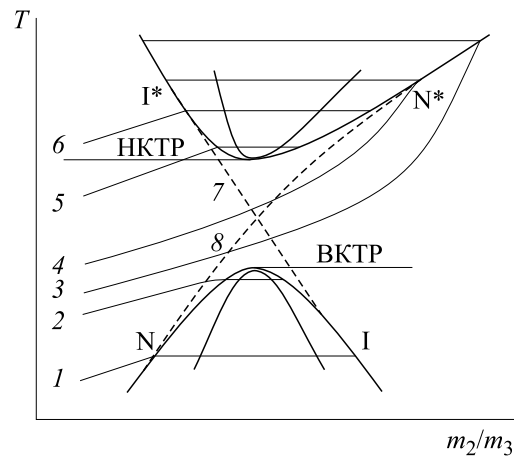


Рис. 4. Гипотетическая фазовая диаграмма дисперсии модельного белка в плоскости «температура (T) — состав (m_2/m_3)», где m_2 — концентрация белка, m_3 — концентрация соли. Бинодали и спинодали представлены низкотемпературными и высокотемпературными параболой с НКТР и ВКТР. $N \leftrightarrow I$ и $N^* \leftrightarrow I^*$ — метастабильные равновесия соответствующих конформеров белка и состоящих из них фаз. 1–6 — Кривые растворимости белка при возрастании концентрации соли, отражающие общий эффект «всаливания» и «высаливания»; 7 — растворимость олигомеров белка; 8 — растворимость микрофибрилл.

Согласно рис. 4 I -кластеры должны быть более плотные, чем N -фаза (эквивалент «капель» в газовой фазе), а I^* -кластеры — менее плотные, чем N^* -фаза (эквивалент «пузырей» в жидкой фазе). Это теоретически возможно, если I^* -конформеры формируют вытянутые криволинейные или линейные фибриллы. Статистическая трактовка подобного явления, предложенная Онзагером для вытянутых макромолекул полимеров, допускает в таком случае фазовое разделение (цитируется по [36]). Вследствие деплеционного механизма микрофибриллы из I^* -конформеров будут создавать отдельные микрофазы, внутри которых будет действовать потенциал отталкивания из-за перекрытия вытянутых «сфер влияния» с формированием «пустого» пространства, куда другие фибриллы стерически попадать не могут.

Поскольку как в низкотемпературных, так и в высокотемпературных кластерах могут идти процессы полимеризации, то могут возникать олигомеры белка в первом случае (пунктирная линия 7), либо фибриллы белка во втором (пунктирная линия 8). Их растворимости также будут зависеть от температуры и концентрации соли, и эти предполагаемые изменения показаны пунктирными линиями 7 и 8 на рис. 4.

В критических точках (НКТР и ВКТР) различие между конформерами N и I или N^* и I^* исчезает. Точка пересечения штриховых линий приходится на область закритических фазовых переходов, в которой существует флуктуационная смесь всех конформеров и их возможных ассоци-

атов. Эта область макроскопически однофазна, хотя имеет пониженную термодинамическую устойчивость из-за флуктуаций. Здесь сильно развиты флуктуации концентрации различных конформеров, вероятно, в виде динамических мезоскопических кластеров [3]. Вместе с тем в этой области нативное состояние белка является наиболее стабильным, потому что в этом состоянии ему соответствует максимальное число макромолекул.

Нами было показано ранее [30, 37], что образование зародышей — кластеров латентной фазы в белковой дисперсии может быть энергетически выгодным, если полярные и заряженные группы одной белковой молекулы располагаются вблизи неполярных групп другой молекулы белка при формировании ядер. Это связано с компенсацией вклада неполярных групп в уменьшение энтропии при упорядочении воды. Таким образом, неполярная область одной молекулы белка как бы экранируется другой молекулой белка от взаимодействия с объемной водой, при этом удаление молекул воды из зоны контакта не происходит. Поэтому образование таких белковых кластеров не меняет отношения поверхности к объему. Так в кластерах регулируется гидрофобность интерфейса за счет модификации структуры воды между поверхностями макромолекул. Чем меньше экранируемая за счет взаимодействия поверхность (т.е. разность $(\mu_1 - \mu_2)$ в уравнении (2)), тем больше молекул должно объединиться в кластер-микрофазу и тем больше должен быть ее размер, чтобы получить энергетический выигрыш. Очевидно, более выгодно группироваться в кластер

таким молекулам, у которых экспонировано больше гидрофобных групп (в соответствии с уравнением (2) значение R должно быть меньше). Расчеты с учетом этих предположений показывают, что в недонасыщенных белковых растворах в объеме макрофазы могут возникать белковые кластеры переменного размера. Увеличение насыщенности приводит к уменьшению радиуса одних из них и увеличению радиуса других. Они становятся одинаковыми только при насыщении, когда достигается размер зародыша кристаллической фазы.

Поскольку в метастабильном равновесии микрофаз и основной фазы должны участвовать поверхностные силы, возникает необходимость учета капиллярного давления в белковых микрофазах, которое может быть как положительным, так и отрицательным. Практически отсутствует теоретическое описание этих явлений для белковых дисперсий [38]. Однако приближенные оценки по уравнению Лапласа для микрофаз размером до сотен нанометров показывают, что дополнительное давление в таких каплях может достигать десятков бар с учетом того, что удельная поверхностная энергия гидратной оболочки белка находится в пределах 15–30 МДж/м² [39].

Химические потенциалы молекул в дисперсии, находящейся в метастабильном равновесии, равны

$$\mu^{N,N^*}(P) = \mu^{I,I^*}(P \pm \Delta P),$$

где μ^{I,I^*} – химический потенциал молекул внутри кластера, а μ^{N,N^*} – в основной фазе. Экспериментальные данные показывают, что в низкотемпературном диапазоне I-фаза является более плотной, чем N-фаза. Это эквивалентно жидким «каплям», находящимся в равновесии с «газовой» фазой. Они стабилизированы избыточным давлением Лапласа на выпуклой поверхности «капель». В таких плотных «каплях» могут идти процессы, ведущие к олигомеризации белков (двухстадийное зародышеобразование здесь не рассматривается). Затем при повышении температуры выше зоны бинодали «растворение» плотной I-фазы может привести к появлению в дисперсии сферических олигомеров, растворимость и конформация которых в дальнейшем изменяются в направлении $I \rightarrow I^*$, как показано на рис. 4, и накоплению агрегатов фибриллярного типа.

Экспериментально установлено [40], что в высокотемпературном диапазоне в солевых дисперсиях белка в определенных условиях образуются агрегаты фибриллярного типа. Может оказаться, что I^* -конформеры участвуют в этом процессе. Появление таких асимметричных вытянутых ассоциатов значительно увеличивает их эффективный объем по сравнению с реальным объемом молекул, из которых они составлены. Часто ока-

зывается энтропийно выгодно выделение таких ассоциатов в отдельные фазы вследствие существования сегрегационного механизма неустойчивости. Если это так, то линейные ассоциаты I^* -конформеров могут создавать микрофазы, но менее плотные, чем фазы, составленные из доминирующих при этих температурах N^* -конформеров. Это подобно тому, как пузырьки возникают в жидкой фазе и существуют за счет избыточного давления Лапласа в системе с вогнутой поверхностью с отрицательной кривизной. Такие микросферы из I^* -ассоциатов могут появляться в более плотной N^* -фазе за счет сил отталкивания. При этом силы отталкивания между надмолекулярными структурами в «сферах» вызывают дополнительное давление на основную фазу N^* -белка и обеспечивают стабильность фазового разделения типа L-L. Это может быть сопряжено с ростом положительных значений второго вириального коэффициента осмотического давления.

Предлагаемый подход не означает, что для любого белка реализуются все теоретически возможные состояния на фазовой диаграмме, так как каждый из белков имеет свою структуру, предысторию и особую среду функционирования. Тем не менее некоторые из них экспериментально зарегистрированы для ряда глобулярных белков.

Поскольку свернутые, развернутые и интермедиатные конформации белков различаются по своей гидратации и объему, поверхностное натяжение может играть важную роль в белок-белковых взаимодействиях, осмотическом давлении, образовании надмолекулярных структур и плотности их упаковки. Мы полагаем, что предложенные фазовые диаграммы белковой дисперсии, которые включают НКТР, ВКТР и сверхкритическую область между ними в отношении конкретных фазовых состояний дисперсии, также могут прояснить роль поверхностных эффектов в отношении плотности и полиморфизма кристаллических зародышей. Однако эффект поверхностного натяжения в малых микрофазах или белковых кластерах при достаточно высоких концентрациях требует гораздо более глубокого понимания, как и вероятные структуры жидкокристаллического типа внутри кластеров. Наиболее интересным аспектом является сверхкритическая зона фазовой диаграммы между ВКТР и НКТР, в которой существуют и трансформируются белковые мономеры, олигомеры и мезоскопические белковые кластеры. Несмотря на то, что эта макроскопически однородная фаза обладает пониженной термодинамической устойчивостью, нативная конформация белка в этой фазе оказывается наи-

более стабильна. Процессы в этой зоне могут представлять собой модель физико-химического состояния белков в клеточной протоплазме, которую следует рассматривать в связи с аналогичным состоянием межклеточной жидкости, так как вместе они могут контролировать осмотический гомеостаз как немедленный адаптивный ответ на колебания температуры или состава системы в условиях физиологического стресса [41].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено по Государственному заказу (проект № FMEN-2022-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Финкельштейн и А. Б. Птицын, *Физика белка: курс лекций* (Книжный дом «Университет», М., 2002).
2. V. N. Uversky and A. V. Finkelstein, *Biomolecules*, **9**, 842 (2019).
3. P. G. Vekilov, *J. Physics: Condensed Matter*, **24**, 193101 (2012).
4. A. V. Fonin, A. L. Darling, I. M. Kuznetsova, et al., *Cell Molec. Life Sci.*, **75**, 3907 (2018).
5. E. L. Baba, T. J. Kim, D. B. Rogers, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 12040 (2016).
6. A. A. M. André and E. Spruijt, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5908 (2020).
7. A. A. Nyman, C. A. Weber, and F. Julicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 39 (2014).
8. П. Хиппель и Т. Шлейх, в кн. *Структура и стабильность биологических макромолекул* (М.: Мир, 1973), Гл. 4.
9. J. J. Grigsby, H. W. Blanch, and J. M. Prausnitz, *Biophys. Chem.*, **91**, 231 (2001).
10. O. Galkin and P. G. Vekilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6277 (2000).
11. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *Biophys. Chem.*, **151**, 22 (2010).
12. D. Bulone, V. Martorana, and P. L. San Biagio, *Biophys. Chem.*, **91**, 61 (2001).
13. С. П. Рожков, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **6** (2), 330 (2021).
14. А. А. Тагер, *Физико-химия полимеров* (Научный мир, М., 2007).
15. G. L. Dignon, W. Zheng, Y. C. Kim, and J. Mittal, *ACS Cent. Sci.*, **5**, 821 (2019).
16. Y. Wang and O. Annunziata, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 1222 (2006).
17. O. Matsarskaia, M. K. Braun, F. Roosen-Runge, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 7731 (2016).
18. M. Adrover, G. Martorell, S. R. Martin, et al., *J. Mol. Biol.*, **417**, 413 (2012).
19. H. N. Hollowell, S. S. Younvanich, S. L. McNevin, et al., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 205 (2007).
20. B. M. Britt, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 394 (2004).
21. R. L. Tuinstra, F. C. Peterson, S. Kutlesa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5057 (2008).
22. L. Bian, D. Wu, and W. Hu, *Biomed. Chromatogr.*, **28**, 295 (2014).
23. С. П. Рожков и А. И. Кяйвяряйнен, *Биофизика*, **30**, 772 (1986).
24. С. П. Рожков, А. С. Горюнов и М. Ю. Крупнова, *Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология*, № 11, 38 (2020).
25. И. П. Базаров, *Термодинамика* (Высшая школа, М., 1983).
26. M. Tsytlonok and L. S. Itzhaki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **531**, 14 (2013).
27. C. Royer and R. Winter, *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.*, **16**, 568 (2011).
28. П. Л. Привалов, *Биофизика*, **32**, 742 (1987)
29. C. Alfano, D. Sanfelice, S. R. Martin, et al., *Nature Commun.* **8**, 15428 (2017).
30. С. П. Рожков, *Биофизика*, **46**, 53 (2001).
31. П. Эткинс, *Физическая химия* (Мир, М., 1980).
32. S. A. Hawley, *Biochemistry*, **10**, 2436 (1971).
33. L. Smeller, F. Meersman, and K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 497 (2006).
34. S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, and R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 7347 (2019).
35. В. К. Семенченко, *Журн. физ. химии*, **36** (1), 15 (1962).
36. Д. А. Фридрихсберг, *Курс коллоидной химии* (Химия, Л., 1984).
37. S. P. Rozhkov, *J. Cryst. Growth*, **273**, 266 (2004).
38. A. Cacciuto and D. Frenkel, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 6587 (2005).
39. С. П. Рожков и А. С. Горюнов, *Биофизика*, **51**, 236 (2006).
40. J. Juarez, S. G. Lope, and A. Cambon, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 10521 (2009).
41. С. П. Рожков, *Биофизика*, **50**, 115 (2005).

Possible Phase Effects in Dispersion of a Globular Protein in the Temperature Range of the Protein's Native State

S.P. Rozhkov* and A.S. Goryunov*

**Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

This work proposes a qualitative approach to study the mechanism of occurrence of phase transitions (PT) and equilibria of various types in globular protein dispersions in the temperature range within which the structure of a protein can be considered as the native state of a protein. Presumably, the presence of two types of N and N* native conformers with a maximum stability in different temperature ranges is possible, but for these protein conformations, structural phase transition is reversible. It is also expected that there are two types of protein intermediates, I and I*, coexisting with N and N* conformers in the corresponding temperature ranges. Possible ways of transfer from the thermodynamics of (pre)denaturation protein transitions to the thermodynamics of condensation phase transitions of the overall dispersion, with the formation of phase boundaries, are discussed. I and I* intermediates are assumed to be involved in liquid–liquid (L–L) phase transitions, forming microphases (clusters) out of them in metastable equilibrium with the solution phase composed of native conformers. The onset of phase transitions depends both on the microenvironment of protein macromolecules in the dispersion and on the properties of protein intermediates. Phase diagrams plotted in temperature and entropy (T - S) coordinates, in the $\mu^I - T$ plane, illustrate zones of metastable states $N \leftrightarrow I$ and $N^* \leftrightarrow I^*$, the upper and lower critical solution temperatures have been determined and the zone of supercritical phase transitions are shown. The conditions under which $N \leftrightarrow I$ and $N^* \leftrightarrow I^*$ metastable equilibria are phase transitions of the (L-L) type are discussed. It is concluded that maximal protein stability is achieved just in the region of critical phase transitions. This region is homogeneous, but on the whole, it is characterized as a zone of reduced thermodynamic stability of protein dispersion.

Keywords: chemical potential, conformation, intermediates, clusters, phase transitions, phase diagram

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЯМР ^1H ВЛИЯНИЯ *трет*-БУТИЛОВОГО СПИРТА НА КОЛЛАГЕН I

© 2022 г. М.Н. Машкин*, #, В.А. Машкина**, ##, С.Г. Козлова***, ****, ###

*Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет), Волоколамское шоссе, 4, Москва, 125993, Россия

#E-mail: mnmashkin@yandex.ru

**Московский государственный университет пищевых производств, Волоколамское шоссе, 11, Москва, Российская Федерация 125080

##E-mail: vmashkina@yandex.ru

***Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, просп. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090, Россия

****Белгородский государственный технологический университет имени В. Г. Шухова, ул. Костюкова, 46, Белгород, 308012, Россия

###E-mail: sgk@niic.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

На образцах ахиллова сухожилия крупного рогатого скота методом ЯМР ^1H впервые исследовано влияние трет-бутилового спирта ((CH_3) $_3\text{COH}$) на динамическое состояние макромолекул коллагена I. Это влияние проявляется в изменениях подвижности CH_2 -групп, находящихся в составе макромолекул, и обусловлено взаимодействиями между водной подсистемой и макромолекулами коллагена. Наиболее сильно взаимодействия проявляются при фазовом переходе в системе «трет-бутиловый спирт – вода».

Ключевые слова: ахиллово сухожилие, ядерный магнитный резонанс, подвижность CH_2 -групп, фазовый переход.

DOI: 10.31857/S0006302922060059, EDN: LJSBMV

Структура коллагена соединительно-тканых структур, таких как кожи, сухожилий, аортальной стенки и др. относится к типу коллаген I [1]. Волокнистая структура коллагена I относится к пространственной группе P1 (триклинная, с параметрами решетки $a = 39.97 \text{ \AA}$, $b = 26.95 \text{ \AA}$, $c = 667.9 \text{ \AA}$; $\alpha = 89.24^\circ$, $\beta = 94.59^\circ$, $\gamma = 105.58^\circ$), образована параллельной укладкой стержнеобразных макромолекул тропоколлагена, представляющих собой тройную спираль из трех неидентичных цепочек по ~ 1040 аминокислотных остатков каждая [2, 3]. Пространство между макромолекулами (поры), заполнено молекулами воды и (в малых концентрациях) другими веществами, необходимыми для роста ткани и поддержания устойчивого ее состояния в условиях непрерывного молекулярного обмена [4, 5]. Изменение температуры и состава водной подсистемы может

привести не только к изменению подвижности молекул воды и макромолекул, но и к фазовым переходам [6, 7].

В настоящей работе методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H) исследованы изменения, происходящие в подвижности макромолекул коллагена, в поры которого были внедрены молекулы *трет*-бутилового спирта. Трет-бутиловый спирт ((CH_3) $_3\text{COH}$ или 2-метил-2-пропанол) широко используется в фармацевтической промышленности при синтезе лекарственных субстанций. Он плохо впитывается в кожу человека, но тем не менее вызывает ее раздражение [8]. Водный раствор *трет*-бутилового спирта характеризуется сложной фазовой диаграммой [9]. Мы использовали 65%-й водный раствор, который при комнатной температуре является жидкостью, ниже 4°C происходит образование дигидратов (CH_3) $_3\text{COH}$ в воде, а ниже -5°C возникает фаза льда с дигидратами (CH_3) $_3\text{COH}$.

Сокращение: BAT – ахиллово сухожилие крупного рогатого скота (Bovine Achilles Tendon).

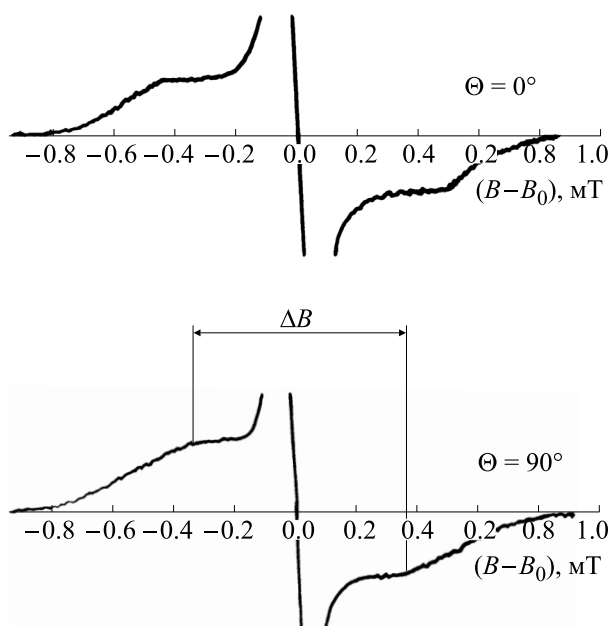


Рис. 1. Производные спектров поглощения ЯМР ^1H образца VAT2: Θ – угол между ориентацией внешнего магнитного поля и направлением волокон образца VAT2, ΔB – полуширина широкой составляющей спектра.

ОБРАЗЦЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы. В исследованиях использовали образцы (массой 0.3 г) ахиллова сухожилия крупного рогатого скота (ВАТ – Bovine Achilles Tendon) трехлетнего возраста. Образец VAT1 являлся исходным (нативным) образцом и до проведения экспериментов находился в воде. Образец VAT2 находился в 65%-м водном растворе *трет*-бутилового спирта. Время пребывания образцов в жидкостях составило 26 ч при температуре 25°C. Объем жидкости в десять раз превышал объем каждого образца.

ЯМР ^1H исследование. ЯМР-эксперименты были проведены на модифицированном приборе JNM-4H100 (Jeol, Япония), предназначенном для регистрации спектров широких линий ЯМР ^1H . Регистрировали производные спектров поглощения на частоте резонанса 23МГц при изменении внешнего магнитного поля. Образцы VAT1 и VAT2 помещали в ампулы так, чтобы в экспериментах можно было бы реализовать две ориентации волокон ахиллова сухожилия по отношению к внешнему магнитному полю: под углом $\Theta = 0^\circ$ и 90° , где Θ – угол между направлением магнитного поля и направлениями волокон ахиллова сухожилия. Температуру образцов изменяли в интервале от 20 до -10°C продувкой паров газообразного азота через криостат спектрометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формы спектров ЯМР ^1H в образцах VAT1 и VAT2 являются подобными, состоят из широкого компонента, обусловленного протонами CH_2 -, CH - и NH -групп макромолекул, а также узкого компонента, обусловленного протонами H_2O и $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ в жидком состоянии (рис. 1). В широком компоненте полученных спектров невозможно четко выделить спектр от CH_2 -, CH -, NH -групп и других водородсодержащих групп макромолекул коллагена, тем не менее видно, что наибольшим удельным весом среди протонсодержащих структурных единиц обладают CH_2 -группы, так как форма их ЯМР ^1H спектров совпадает с характерным дублетом Пейка для CH_2 -групп с полушириной $\Delta B \sim 1$ мТл [10].

Поскольку макромолекулы в структуре коллагена имеют некоторую кристаллическую упорядоченность, преобладающий вклад CH_2 групп приводит к ориентационной зависимости пейковского дублета, которая описывается соотношением для дублетного расщепления за счет диполь-дипольного взаимодействия между ядерными магнитными моментами атомов водорода в CH_2 -группе [10–12]:

$$\Delta B = 3 \cdot (\mu / r^3) \cdot (3 \times \cos^2 \vartheta - 1), \quad (1)$$

где μ – магнитный момент ядра атома водорода, r – расстояние (H–H) в CH_2 -группе и ϑ – угол между внешним магнитным полем и осью r .

Температурные зависимости полуширины спектра широкого компонента (ΔB) VAT1 и VAT2 при различных ориентациях представлены соответственно на рис. 2 и 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные температурные зависимости ΔB указывают на подвижность CH_2 -групп и отличаются при разных ориентациях волокон ВАТ по отношению к внешнему магнитному полю. Видно, что значения ΔB в образцах VAT1 и VAT2 при $\Theta = 0^\circ$ с понижением температуры меняются незначительно (рис. 2 и 3). Этот результат можно объяснить тем, что (H–H)-вектора при тепловых движениях для большинства CH_2 -групп остаются перпендикулярными к направлению внешнего поля и их колебания при такой ориентации не приводят к изменениям ΔB (см. уравнение (1)).

Значения ΔB в образце VAT1 при ориентации $\Theta = 90^\circ$ резко меняются в области от -1 до -6°C . Резкое уширение спектров ЯМР при понижении температуры как правило объясняется «вымерзанием» или торможением подвижности. Активационный барьер этой подвижности можно оце-

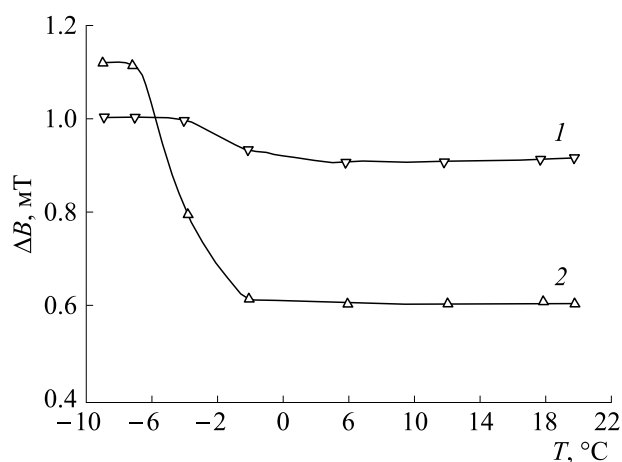


Рис. 2. Зависимость полуширины ΔB широкого компонента спектра ЯМР ^1H в образце VAT1 при различных углах ориентации $\Theta = 0^\circ$ (1) и 90° (2).

нить исходя из следующей формулы (уравнение Уо–Федина [13]):

$$U_a = 37T_x = 9.9 \text{ ккал/мол,}$$

где $T_x = 267 \text{ K}$ (-6°C) температура начала сужения широкого компонента спектра. Значения ΔB в образце VAT2 при $\Theta = 90^\circ$ также начинают сужаться при $T_x = 267 \text{ K}$. Следовательно, активационный барьер для подвижности макромолекул в образце остался прежним. Следует отметить, что полученное значение U_a по величине согласуется со значениями активационного барьера вымерзания подвижности водной подсистемы в сухожилии крысиного хвоста разного возраста [14].

Сравнительный анализ спектральных полос при комнатной температуре и $\Theta = 90^\circ$ показывает, что значения ΔB в образце VAT2 превосходят значения ΔB в образце VAT1 на 0.1 мТл. Поскольку активационные барьеры для обоих образцов одинаковы, то обнаруживаемое различие может быть связано с изменениями в предэкспоненциальном факторе (ν_a) активационного движения, описываемого законом

$$\nu = \nu_a \cdot \exp(-U_a/kT),$$

где k – константа Больцмана, T – температура и ν – частота движения. Поскольку ν_a характеризуется частотами $10^{10} - 10^{12} \text{ Гц}$, то изменения в подвижности CH_2 -групп можно ожидать и в колебательной спектроскопии. Отметим, что некоторое превышение значений ΔB в образце VAT2 над значениями ΔB в образце VAT1 сохраняется по всему температурному интервалу от $+20$ до -5°C (рис. 2 и 3).

На рис. 3 видно, что температурная зависимость ΔB в образце VAT2 при $\Theta = 90^\circ$ имеет ано-

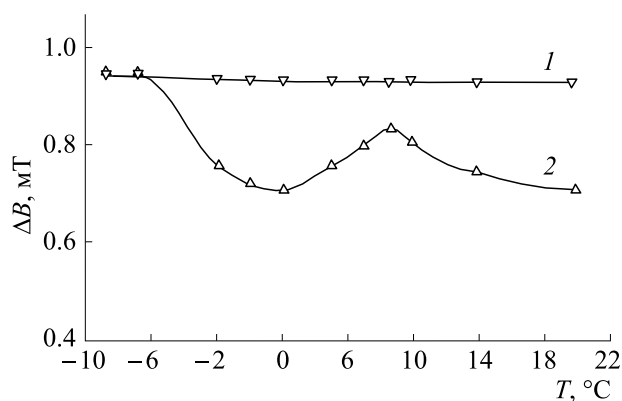


Рис. 3. Зависимость полуширины ΔB широкого компонента спектра ЯМР ^1H в образце VAT2 при различных углах ориентации $\Theta = 0^\circ$ (1) и 90° (2).

малию, которая локализуется в области температур от 4°C до 16°C и имеет максимум при 9°C . Можно полагать, что эта аномалия связана с фазовым переходом. Основанием для этого предположения является то, что в 65%-м водном растворе *трет*-бутилового спирта фазовый переход происходит при 4°C с образованием комплексов дигидрата *трет*-бутилового спирта [9]. Образование комплексов дигидрата возможно и в порах коллагена I, но структура и размер этих пор являются неоднородными [6, 7]. Молекулы в водной подсистеме взаимодействуют с макромолекулами, но это взаимодействие из-за неоднородных пор и сложной структуры макромолекул не может быть регулярным, что, по-видимому, и приводит к наблюдаемому температурному размытию образования комплексов дигидрата $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые на образцах ахиллова сухожилия крупного рогатого скота методом ЯМР ^1H выявлено влияние молекул $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ на подвижность коллагена I. Это влияние обнаруживается в изменениях предэкспоненциального фактора активационного движения CH_2 -групп макромолекул. Выявленное влияние еще раз доказывает существование взаимодействия между водной подсистемой и макромолекулами коллагена I. Это взаимодействие проявляется наиболее заметно при фазовом переходе в системе « $(\text{CH}_3)_3\text{COH} - \text{H}_2\text{O}$ ». Полученные данные могут быть полезны при исследовании воздействия *трет*-бутилового спирта на кожу человека, а также при проектировании оборудования и разработки технологий для механохимических процессов обработки коллагенсодержащих сырья и материалов [15, 16].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят профессора С. П. Габуду за постановку задачи при изучении взаимодействий в биологических соединительных тканях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание № 121031700313-8).

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. *Collagen I-IV*, Ed. by M. E. Nimni (CRS Press, Boca Raton, FL, 1988).
2. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, et al., *Structure*, **9**, 1061 (2001).
3. J. P. Orgel, A. Miller, T. C. Irving, and T. J. Wess, *Fibre Diffraction Rev.*, **10**, 40 (2002).
4. S. Lees, *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 66 (1986).
5. S. Lees, *Biophys J.*, **85** (1), 204 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74466-X
6. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, V. A. Drebushchak, and S. G. Kozlova, *JETP Lett.* **82**, 613 (2005). DOI: 10.1134/1.2161292
7. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, V. A. Drebushchak, and S. G. Kozlova, *J. Struct. Chem.*, **46**, 1131 (2005). DOI: 10.1007/s10947-006-0257-0
8. D. McGregor, *Crit. Rev. Toxicol.*, **40** (8), 697 (2010). DOI: 10.3109/10408444.2010.494249
9. K. Kasraian and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.*, **12** (4), 484 (1995).
10. А. Леше, *Ядерная индукция* (ИЛ, М., 1963).
11. G. E. Pake, *J. Chem. Phys.*, **16**, 327 (1948).
12. С. П. Габуда и А. Г. Лундин, *Внутренняя подвижность в твердом теле* (Наука, Новосибирск, 1986).
13. Дж. Уо и Э. И. Федин, *Физика твердого тела*, **4** (6), 2233 (1962).
14. S. P. Gabuda, A. A. Gaidash, and E. A. Vyazovaya, *Biophysics*, **50** (2), 226 (2005).
15. С. А. Комиссаров, В. А. Машкина, М. Н. Машкин и др., *Кожевенно-обувная промышленность*, № 3, 30 (2000).
16. *Аппарат для непрерывной поштучной жидкостной обработки кожевенного сырья и полуфабриката*, Патент МПК C14C15/00 (1989).

A ¹H NMR Study of the Effect of *tert*-Butyl Alcohol on Collagen I

M.N. Mashkin*, V.A. Mashkina**, and S.G. Kozlova***, ****

*Moscow Aviation Institute (National Research University), Volokolamskoe shosse 4, Moscow, 125993 Russia

**Moscow State University of Food Production, Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

***Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentyeva 3, Novosibirsk, 630090 Russia

****Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov, ul. Kostukova 46, Belgorod, 308012 Russia

The effect of *tert*-butyl alcohol ((CH₃)₃COH) on dynamic states of collagen I macromolecules in bovine Achilles tendon was studied for the first time using ¹H NMR spectroscopy. It appears that being exposed to (CH₃)₃COH can cause changes in the mobility of CH₂-groups that are part of macromolecules and this effect is due to interactions between the aqueous subsystem and collagen macromolecules. The interactions are most strongly manifested during phase transition in the (CH₃)₃COH/H₂O system.

Keywords: Achilles tendon, nuclear magnetic resonance, mobility of CH₂-groups, phase transition

УДК 577.3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ГРАФЕНОВ НАНОЧАСТИЦ ШУНГИТОВОГО УГЛЕРОДА В ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ВОДЫ В ДИАПАЗОНЕ БОЛЬШИХ ВОЛНОВЫХ ЧИСЕЛ

© 2022 г. С.П. Рожков*, А.С. Горюнов*, В.А. Колодей**, Л.А. Пронькина**, Н.Н. Рожкова**

*Институт биологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия

**Институт геологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия

E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 05.05.2022 г.

После доработки 09.06.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Методом комбинационного светорассеяния проведено исследование положения экстремумов, амплитуд и ширин основных спектральных линий диапазона волновых чисел $3200\text{--}3600\text{ см}^{-1}$, обусловленных валентными ОН-колебаниями в сетке водородных связей воды при изменении концентрации бычьего сывороточного альбумина в диапазоне $0.01\text{--}10\text{ мг/мл}$. Сравнивали вариации этих параметров для белка при наличии и в отсутствие жирных кислот, а также влияние наночастиц шунгитового углерода на эти вариации. Обнаружено, что стабильность системы водородных связей воды существенно нелинейно зависит от концентрации белка, причем в диапазоне концентраций $0.1\text{--}0.3\text{ мг/мл}$ белка стабилизация максимальна и убывает как с ростом, так и уменьшением концентрации. Дестабилизация системы водородных связей с ростом концентрации белка может быть связана с его конформацией и/или агрегацией. Изменения зависят как от лигандного состояния бычьего сывороточного альбумина (наличие жирных кислот), так и влияния наночастиц шунгитового углерода. В присутствии наночастиц шунгитового углерода сетка водородных связей поддерживается в более однородном, но разрыхленном состоянии во всем диапазоне концентраций белка как с жирными кислотами, так и без них. Полученные данные указывают на важную роль воды в механизмах взаимодействия между молекулами белка, а также между графенами наночастиц шунгитового углерода и поверхностью белка в области их центров связывания с жирными кислотами.

Ключевые слова: альбумин, жирная кислота, графены шунгитового углерода, комбинационное рассеяние света, водородные связи.

DOI: 10.31857/S000630292205060060, EDN: LJWEII

Графены и оксиды графена являются перспективным наноматериалом для биомедицинских целей благодаря их уникальным свойствам — двумерной структуре, большой поверхности, химической и механической стабильности, специфическим электронным свойствам и биосовместимости [1]. Это обеспечивает им потенциальную возможность осуществлять транспортную функцию по доставке биопрепаратов, а также выступать в качестве биосенсоров, искусственных ферментов-пероксидаз [2, 3], центров гетерогенной нуклеации при кристаллизации белков [4]. Вме-

сте с тем общие закономерности взаимодействия между водой, наночастицами и биомакромолекулами еще не вполне поняты. Так до конца не выяснена роль конформации и лигандного состояния биополимера при формировании различных биоконъюгатов. Но главное, пока не установлена возможная роль воды, физико-химическое состояние которой может определять и регулировать баланс сил в таких системах. Поэтому основной целью работы является установление возможной роли сетки водородных связей воды в механизме взаимодействия в системе «вода–наночастица–биополимер» на примере дисперсии сывороточного альбумина быка в различном лигандном состоянии, а также в присутствии наночастиц шунгитового углерода.

Сокращения: ShC — графены шунгитового углерода, GO — оксид графена, БСА — бычий сывороточный альбумин, ЖК — жирные кислоты, КРС — комбинационное рассеяние света.

Базовые элементы шунгитового углерода (ShC) относятся к числу графенов [5, 6]. Они представляют собой молекулы, близкие по свойствам к восстановленному оксиду графена. Предполагается, что такие элементы в докембрийский период истории Земли агрегировали в наночастицы и в составе гидротермальных флюидов образовывали залежи шунгитовых пород [7, 8]. В настоящее время разработаны технологии разделения этих пород на составляющие и получены устойчивые водные дисперсии углеродных наночастиц [9]. Исследование эффектов и понимание механизмов взаимодействий таких природных графеновых наночастиц с биологическими молекулами представляют собой приоритетную цель в биомедицинском направлении при решении задач регуляции связывания и транспорта лигандов белками, окислительно-восстановительного баланса в системах с участием белков, структурно-динамического состояния как самих макромолекул белка, так и фазовых свойств их дисперсий [10, 11]. При этом наночастицы ShC в гораздо большей степени удовлетворяют требованию стандартизации физико-химических свойств углеродных наноматериалов при создании водно-дисперсных систем, чем получаемые разными способами искусственные углеродные наноматериалы, даже после специальной очистки и функционализации последних [12].

Сывороточный альбумин является одним из наиболее распространенных модельных объектов при изучении молекулярных биологических эффектов углеродных наночастиц, что определяется его коммерческой доступностью и важнейшей физиологической ролью в функционировании различных тканей и сред организма животных и человека. Ранее уже исследовалось [13] влияние химического состава раствора на адсорбцию сывороточного альбумина человека на оксиде графена (GO). Была установлена ключевая роль электростатики в контроле взаимодействий «сывороточный альбумин человека – оксид графена». При этом физическое состояние адсорбционных белковых слоев было сопряжено с конформационным состоянием белка. В работе [14] получена информация о влиянии концентрации бычьего сывороточного альбумина (БСА) на коллоидную стабильность дисперсии GO в экологически значимых условиях. Стабильность была максимальной в диапазоне промежуточных концентраций белка и обуславливалась разной степенью его адсорбции. Низкая концентрация БСА снижала стабильность GO в основном за счет электростатического связывания положительно заряженных лизиновых групп БСА и отрицательно заряженных групп GO, а также эффекта сжатия двойного слоя. С увеличением концентрации БСА рост адсорбции БСА на GO приводил к сильному стерическому отталкиванию, которое в

конечном итоге преобладало и стабилизировало дисперсию GO.

Исследование биоконъюгатов наночастиц ShC с альбумином и его агрегатами проводилось нами ранее методами гель-фильтрационной хроматографии, дифференциальной сканирующей калориметрии, электронного парамагнитного резонанса спиновых меток и спиновых зондов, динамического рассеяния света [15]. Основным эффектом взаимодействия сывороточного альбумина и наночастиц ShC в дисперсии является увеличение разницы температур индивидуальных переходов термодинамических структурных доменов белка. При этом наблюдаются различия в характере взаимодействий структурных доменов сывороточного альбумина с поверхностью наночастиц ShC. Получены убедительные экспериментальные доказательства, что взаимодействие наночастиц ShC с макромолекулами альбумина наблюдается в основном в области их центров связывания жирных кислот (ЖК) [16]. Данные, полученные методом электронного парамагнитного резонанса спинового зонда для модифицированных спин-мечеными ЖК макромолекул сывороточного альбумина и методом дифференциальной сканирующей калориметрии по теплотам плавления макромолекул в дисперсиях при разном содержании наночастиц ShC, указывают на различия в конформационном состоянии белка, зависящие как от концентрации белка, так и наночастиц. При этом анализ распределения молекул белка и их агрегатов по размерам методом динамического рассеяния света показал существенное повышение однородности распределения под влиянием наночастиц ShC, которое мы объясняли ролью ShC в перераспределении ЖК между фракциями белка. Было высказано предположение, что формирование био-нано-границы между БСА и наночастицами ShC способствует большей однородности границы связывания ЖК, уменьшению фракций белка и активных центров на поверхности белка, ответственных за супрамолекулярную гетерогенность белка в растворе. В случае наночастиц ShC это объясняется переходом лигандов (ЖК) с молекул сывороточного альбумина на наночастицы графеноподобного углерода с соответствующим изменением соотношения фракций сывороточного альбумина с различным содержанием лигандов.

При интерпретации всех полученных результатов явно или неявно подразумевалась важная роль воды в реализации обнаруживаемых эффектов. В то же время данные об изменении состояния системы водородных связей в дисперсии, сопровождающих изменения взаимодействия между компонентами дисперсии, отсутствовали. Поэтому конкретной задачей настоящей работы было исследование изменений конфигурации сетки водородных связей в дисперсии БСА в

сравнении с гибридной дисперсией БСА-ShC в условиях различия лигандного состояния белка при взаимодействии с жирными кислотами. Для этого предполагалось использовать метод комбинационного рассеяния света (КРС) в частотной области спектра $3000\text{--}3650\text{ см}^{-1}$, который характеризует состояние системы водородных связей воды [17]. Изменения концентрации белка в широком диапазоне от 0.01 до 10 мг/мл позволяют охватить относительно большой диапазон молярного соотношения графен/белок (около $2000\text{--}0.1$).

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Стабильные водные дисперсии наночастиц ShC были получены по оригинальной методике [9]. Об их графеновой природе существуют экспериментальные и теоретические свидетельства [18]. Раствор БСА в дистиллированной воде с концентрацией от 0.02 до 20 мг/мл добавляли в дисперсию наночастиц ShC в дистиллированной воде (исходная концентрация наночастиц 0.07 и 0.14 мг/мл) в соотношении 1:1, тщательно перемешивали и выдерживали не менее трех часов до съемки. Полученные смеси были однородны по цвету и сохраняли устойчивость во времени. Использовали коммерческие препараты альбумина фирмы Sigma (США) – как обезжиренный (БСА-обезжир), так и нативный, фракция V (БСА_{5фр}), содержащая ЖК. Эта фракция содержит не более 1.5 моль ЖК на моль белка [19]. В ряде случаев применяли пальмитиновую кислоту для насыщения образцов сывороточного альбумина жирными кислотами.

Взаимодействие наночастиц ShC с белковыми молекулами регистрировали по спектрам КРС с использованием рамановского спектрометра Nicolet Omega XR (Thermo Scientific, США), оснащенного лазером с длиной волны излучения 532 нм, со спектральным разрешением выше 1 см^{-1} ; мощность возбуждающего лазера на данной длине волны составляла 15 мВт. Спектры регистрировали с 30-минутным накоплением. Дисперсии помещали в кварцевую кювету, которую устанавливали в отделении для макрообразцов перпендикулярно оси лазерного пучка. Температура образца равнялась 22°C и под действием лазера не менялась. Спектр КРС получали путем возбуждения образца (дисперсии наночастиц) при 532 нм с последующими измерениями частоты и интенсивности рассеянного света. Наряду с регистрацией изменения интенсивности полос ID, IG и сдвига частот G-полосы оценивали изменение положения, интенсивности и ширины пиков КРС в области спектра $3000\text{--}3650\text{ см}^{-1}$, которые характеризуют состояние системы водородных связей воды [17, 20]. Спектральные дан-

ные комбинационного рассеяния, такие как положение пика, площадь полосы и ширина полосы (т.е. полная ширина на полувысоте), были определены с использованием программного обеспечения OMNIC. Полосы в спектрах аппроксимированы гауссовыми функциями. Асимметрию линий учитывали в результате аппроксимации спектров тремя гауссовыми функциями. Анализировали пики, полученные по вертикальным линиям положения максимумов гауссианов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования свойств дисперсий наночастиц ShC и их конденсатов показали, что они обладают многоуровневой структурной организацией в воде, возникающей в результате последовательных взаимодействий исходных структурных элементов [18]. Графеновые фрагменты размерами до 1 нм (около 0.4–0.7 нм), обладающие свойствами восстановленного оксида графена, являются минимальным базовым элементом ShC. В полярных растворителях они образуют стопки в пять-шесть слоев с суммарным дипольным моментом 6.5 Д и представляют собой первый уровень структурной организации. Последующие уровни организации представлены глобулярными кластерами этих стопок и агрегатами. Водные дисперсии наночастиц ShC обладают широким спектром свойств, которые, с одной стороны, указывают на их прямую связь со свойствами углерода шунгитовых пород, а с другой стороны, подобны свойствам, характерным для водных дисперсий таких квантовых точек, как наночастицы золота и серебра, CdS и CdSe, а также синтетических графеновых квантовых точек [21]. Дипольный момент и полярные группы по дефектным краям могут придавать поверхности наночастиц ShC гидрофильные свойства, способствовать устойчивости кластеров из наночастиц в водной дисперсии и их способности к интеркаляции воды внутри структур [22].

Спектроскопия КРС ранее использовалась как один из методов, позволяющих охарактеризовать структурную однородность и структурные уровни наночастиц ShC в водной дисперсии и при конденсации дисперсии наночастиц ShC в диапазоне $200\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ [12]. Взаимодействие наночастиц углерода с белковыми молекулами можно было бы регистрировать в спектрах КРС по изменению интенсивности обычных для углерода полос ID, IG в области $1300\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ и сдвигу частот G-полосы [23]. Но в спектре КРС белка в растворе наблюдается широкий пик при 1573 см^{-1} с плечом 1635 см^{-1} , характерный для α -спирали белка, который сам по себе располагается в области частот D- и G-пиков углерода (рис. 1, спектр I; рис. 2а, спектр I). При этом суммарный спектр БСА-ShC

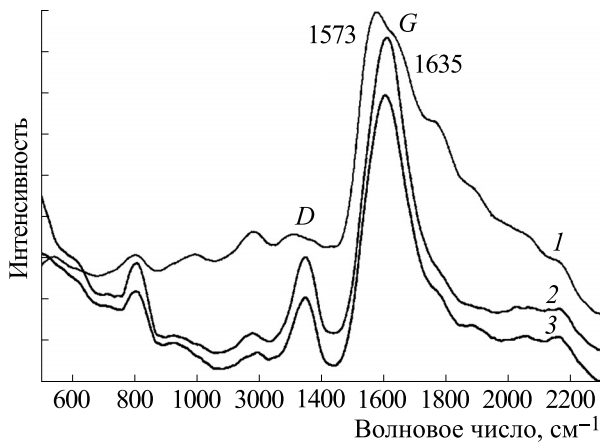


Рис. 1. Сравнение спектров КРС в дисперсиях БСА (1), БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (2) и БСА_{5фр} + дисперсия наночастиц ShC (3).

в области G полосы характеризуется одним максимумом, который смещается в сторону меньших частот (1612, 1605 см^{-1}) по сравнению с G-пиком в дисперсии наночастиц графеноподобного ShC (рис. 2а, спектр 1), но в сторону больших частот по сравнению с положением максимума пика в растворе белка. Положение максимума пика чувствительно к лигандному состоянию БСА, определяемому взаимодействием с жирными кислотами (рис. 2), однако закономерности этого взаимодействия остаются неясными. Значительный сдвиг полосы свидетельствует о различном взаимодействии наночастицы ShC с БСА_{5фр} и ShC с БСА_{обезжир}. Так, изменения частот 1622, 1605, 1612, 1635 см^{-1} в ряду ShC, БСА_{обезжир}-ShC, БСА_{5фр}-ShC могут быть сопряжены с интеркаляцией воды в графеновые слои наночастиц [8].

Более информативным относительно опосредованного растворителем взаимодействия между молекулами белка и ShC, которое зависит от лигандного состояния БСА-ЖК, оказывается анализ спектров КРС в высокочастотной области спектра 3000–3650 см^{-1} . Совокупность пиков в этой области характеризуют состояние водородных связей молекул воды (рис. 3).

Несмотря на то что деконволюция спектра воды в этой области позволяет выделить пять характеристических частот, наиболее интенсивными являются две частоты 3230 и 3440 см^{-1} которым соответствуют 90% состояния воды [17, 20] (рис. 3). Первая характеризует симметричную моду валентных ОН-колебаний в сетке связей молекул воды в состоянии «два донора—два акцептора» (DDAA-ОН), а вторая — ассиметричную моду воды в состоянии «донор—акцептор» (DA-ОН). Отношение интенсивностей (I) пиков $d = I(3440 \text{ см}^{-1})/I(3230 \text{ см}^{-1})$

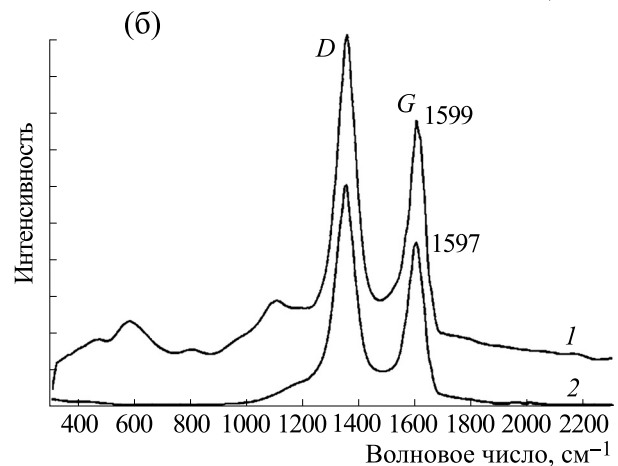
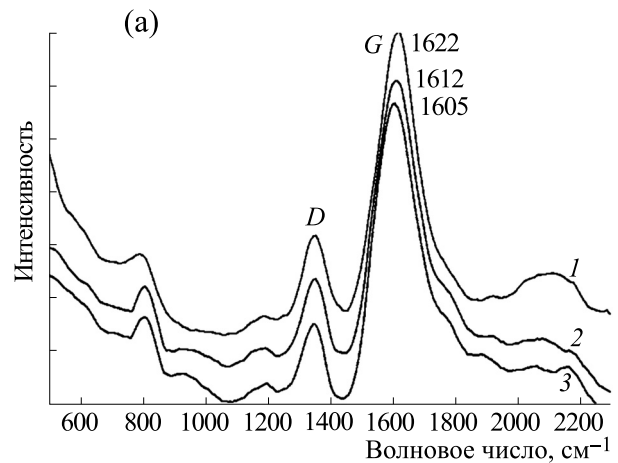


Рис. 2. (а) — Сравнение спектров КРС дисперсий наночастиц ShC (1), БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (2) и БСА_{5фр} + дисперсия наночастиц ShC (3). (б) — Сравнение спектров КРС конденсатов: БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (1), дисперсия наночастиц ShC (2).

позволяет оценить изменение ориентационной упорядоченности молекул воды, поскольку увеличение этого отношения коррелирует с уменьшением межмолекулярного сопряжения ОН-осцилляторов и уменьшением ограничения подвижности молекул воды.

Вместе с тем под влиянием растворенных веществ или изменения температуры значения частот могут изменяться [20]. Так, в присутствии гидратированных тканей биологического происхождения и биомолекул положения пиков смещаются в область 3450 и 3250 см^{-1} [24, 25]. В наших образцах также наблюдались сдвиги максимумов интенсивности (DA-ОН) и (DDAA-ОН) (табл. 1).

На диаграмме (рис. 4) приведены усредненные значения отношения d с учетом ширины пиков l на половине высоты: $d = I_1 l_1 / I_2 l_2$, полученные в разных сериях экспериментов: для воды, для дис-

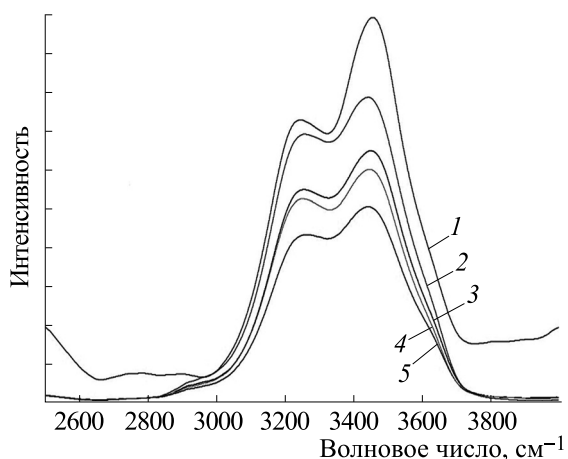


Рис. 3. Сравнение спектров КРС дисперсий БСА+ShC при разных отношениях концентраций компонентов и различном лигандном состоянии белка: 1 – БСА_{5фр}, 1 мг/мл; 2 – БСА_{обезжир}, 0.025 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; 3 – БСА_{5фр}, 0.025 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; 4 – БСА_{обезжир}, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; 5 – БСА_{5фр}, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC.

персий ShC в концентрации 0.07–0.14 мг/мл, для дисперсий ShC (0.14 мг/мл) в присутствии разных концентраций ЖК, для БСА_{5фр} (5 мг/мл) и БСА_{5фр} (5 мг/мл) в присутствии от 1 до 10 молекул пальмитиновой ЖК на молекулу белка, для гибридных наночастиц ShC с нативным БСА_{5фр} и обезжиренным БСА_{обезжир} при разных концентрациях белка, ЖК и ShC. Если в качестве отношения брать только амплитуды спектров или только полную площадь спектров, получаемую в процессе деконволюции сигналов, то абсолютная величина отношения при этом изменяется, но полученные тенденции к изменению сохраняются во всех случаях.

В терминах ограничения подвижности молекул воды на основе данных рис. 4 можно сделать вывод, что в дисперсиях ShC (значение *d* мало) подвижность молекул воды заметно уменьшается (водородные связи укрепляются). Взаимодействие ShC с ЖК стимулирует слабый рост по-

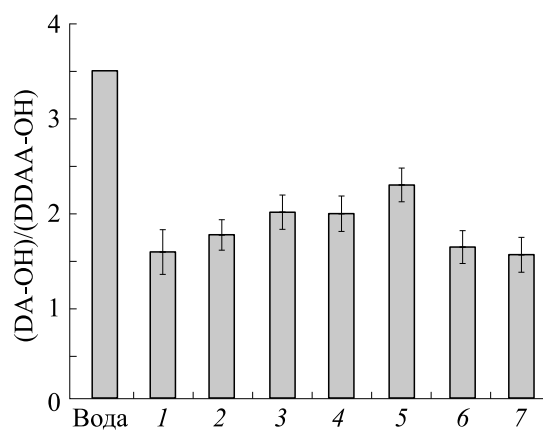


Рис. 4. Диаграмма, характеризующая диапазоны изменений усредненной по ряду измерений величины отношения интенсивности пиков $d = (DA-OH)/(DDAA-OH)$ спектров КРС в диапазоне 3200–3600 см⁻¹ по разным образцам дисперсий ShC в концентрациях 0.07–0.14 мг/мл (1); ShC (0.14 мг/мл) в присутствии ЖК пальмитиновой кислоты в отношении 1–10 моль ЖК на моль ShC (2); БСА_{5фр} (5 мг/мл) (3) и БСА в присутствии пальмитиновой кислоты в отношении (1–10) ЖК на молекулу БСА (4); дисперсий БСА в присутствии наночастиц ShC в концентрации 0.07 мг/мл (5–7): (БСА_{5фр} 0.1 мг/мл+ShC) (5); БСА_{5фр} 0.05 мг/мл + ShC (6); БСА_{обезжир} 0.025 мг/мл + ShC (7).

движности воды, возможно, вследствие ее высвобождения из областей связывания с ЖК. При этом нет заметной зависимости от концентрации пальмитиновой кислоты. При умеренных концентрациях молекул белка (5 мг/мл) их взаимодействие с ЖК не влияет на состояние молекул воды, поскольку взаимодействие в основном происходит в неполярных полостях белка и при этом высвобождается мало воды. При добавлении в эту систему 0.14 мг/мл ShC подвижность молекул воды увеличивается (величина *d* растет), возможно, вследствие взаимодействия ShC с поверхностью белка с высвобождением связанной воды. При большом молярном отношении ShC/белок ~ 1000 (два последних столбца на рис. 4) подвижность молекул воды уменьшается

Таблица 1. Положение пиков спектров КРС дисперсий БСА в диапазоне 3200–3600 см⁻¹

	БСА _{5фр}	БСА _{обезжир}	БСА _{5фр} -ShC	БСА _{обезжир} -ShC
DDAA-OH	3235 ± 3	3226 ± 2	3231 ± 1	3230 ± 3
DA-OH	3445 ± 4	3434 ± 3	3445 ± 2	3440 ± 4

Примечание. Лигандное состояние дисперсий БСА: с ЖК (БСА_{5фр}) и без ЖК (БСА_{обезжир}), а также в присутствии наночастиц шунгитового углерода (ShC). Положение пиков спектров усреднено для концентраций белка от 0.01 до 10 мг/мл; концентрация наночастиц шунгитового углерода (ShC) – 0.07 мг/мл.

(величина d мала) и в основном, видимо, определяется ее взаимодействием с ShC (табл. 1).

На рис. 5 показаны величины отношения интенсивностей пиков спектров КРС $d = (DA-OH)/(DDAA-OH)$ в зависимости от концентрации белка в диапазоне 0.01–10 мг/мл. Обращают на себя внимание их относительно резкие и систематические изменения в диапазоне концентраций 0.1–0.3 мг/мл белка и возвращение к исходному состоянию с дальнейшим увеличением концентрации белка. Изменения зависят как от лигандного состояния БСА (наличие ЖК), так и влияния ShC. Так, в присутствии ShC скачок меньше, а в системе БСА+ЖК+ShC отклонения во всем диапазоне концентраций белка практически отсутствуют. При этом уменьшение отношения $(DA-OH)/(DDAA-OH)$ указывает на упрочнение водородных связей, а увеличение — на их ослабление. Подобные скачки отношения интенсивности пиков в системе «вода–этанол» в зависимости от концентрации последнего связывались с упрочнением связей в системе в связи с образованием водных клатратов вокруг неполярных групп спирта [26]. В нашем случае первоначальное упрочнение связей с ростом концентрации белка может быть связано с влиянием неполярных групп белка на систему связей воды, которое затем уменьшается вследствие стабилизации нативной конформации, агрегации и/или олигомеризации молекул белка через взаимодействие и экранирование неполярных групп. Как известно, сывороточные альбумины склонны к олигомеризации, в которой может участвовать до 20% белка [27]. Если белки не содержат лиганды, взаимодействующие с ними по неполярным полостям, то стабилизация наблюдается при меньших концентрациях белка как на рис. 5 (образец 2). В присутствии ShC, графены которого также взаимодействуют с белком по неполярным полостям, стабилизация сетки водородных связей воды не наблюдается, что особенно заметно в системе БСА_{5фр} + ShC.

В табл. 1 приведены усредненные положения пиков спектров КРС в диапазоне 3200–3600 см⁻¹, соответствующих валентным OH-колебаниям в сетке водородных связей воды (DDAA-OH) и (DA-OH). Их изменения в зависимости от лигандного состояния белка и взаимодействия с ShC могут свидетельствовать об индуцированном изменении сетки водородных связей воды во всей системе. При этом сдвиг в низкочастотную область указывает на «замораживание» колебаний, как это наблюдается при понижении температуры [20]. Более низкие значения волновых чисел в образцах обезжиренного БСА могут указывать на более прочную сетку водородных связей в такой системе, возможно, из-за большей доступности

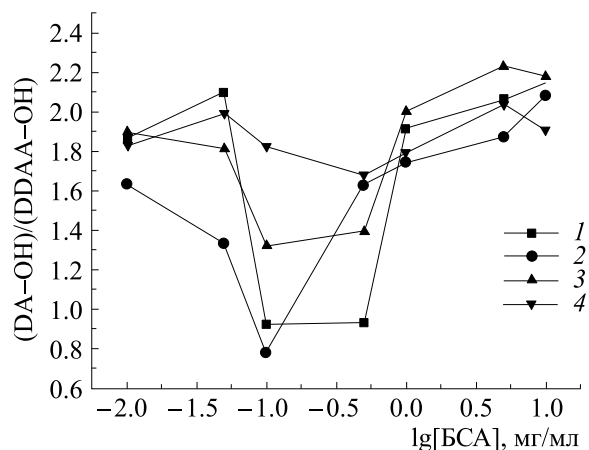


Рис. 5. Изменение отношения интенсивностей пиков спектров КРС в диапазоне 3200–3600 см⁻¹ (DA-OH)/(DDAA-OH) дисперсий БСА при концентрации белка от 0.01 до 10 мг/мл в различном лигандном состоянии: БСА_{5фр} (1) и БСА_{обезжир} (2), а также это изменение в присутствии наночастиц шунгитового углерода в концентрации 0.07 мг/мл: БСА_{обезжир}-ShC (3), БСА_{5фр}-ShC (4). Относительная ошибка определения отношения не превышала 10%.

неполярных областей белка для воды и формирования там гидратации полуклатратного типа.

Таким образом, резкое изменение отношения интенсивностей $(DA-OH)/(DDAA-OH)$ на рис. 5 в определенном диапазоне концентраций белка может быть интерпретировано как немонотонный характер изменения состояния всей системы водородных связей воды в дисперсии, сопряженного с состоянием конформации или ассоциации белковых макромолекул. Это явление напоминает микрорасплавление неэлектролита на пространственной сетке водородных связей воды, при котором упругость сетки выталкивает молекулы неэлектролита к ее дефектам [28]. В местах дефектов молекулы неэлектролита объединяются так, чтобы их гидрофобные части имели наименьший контакт с водой. С дальнейшим ростом концентрации неэлектролита существующая сетка H-связей разрушается и вместе с этим прекращается процесс расщепления.

Немонотонный характер температурных изменений конформации белков в предденатурационной области температур также наблюдали в их растворах методом ИК спектроскопии на полосе поглощения Амид I [29]. Было установлено, что по мере роста температуры в растворе БСА сначала система водородных связей воды разрушается, достигает некоторого предела, а затем начинает перестраиваться и связи восстанавливаются. Таких скачков наблюдается два, при 25 и 43°C. Это может быть сопряжено с изменением конформации белка и сопровождаться изменением

взаимодействия между молекулами белков и их разделением на фракции. Не исключено, что фракции белка могут возникать из-за неравномерного распределения ЖК по центрам сорбции. В этом случае в присутствии ShC происходит модификация центров, способствующая более однородному распределению ЖК по центрам связывания. Это ведет к уменьшению числа различных фракций белка, ответственных за гетерогенность белка в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование изменений конфигурации сетки водородных связей воды в гибридной дисперсии БСА-ShC в сравнении с дисперсией БСА в условиях изменения лигандного состояния белка при взаимодействии с жирными кислотами показало, что конформационное состояние альбумина определяет состояние водородных связей воды. Конформация альбумина зависит от его концентрации, способности к адсорбции жирных кислот и взаимодействию с наночастицами ShC, которое происходит в первую очередь по центрам связывания ЖК. Обезжиренный белок в большей степени стабилизирует сетку водородных связей воды вследствие большей доступности неполярных участков для воды, но, вероятно, из-за этого имеет большую склонность к агрегации из-за уменьшения растворимости. С ростом концентрации белка вследствие агрегации или стабилизации нативного состояния экспонирование гидрофобных областей уменьшается, и сетка связей воды разрушается. Под влиянием наночастиц ShC происходит перераспределение ЖК по центрам сорбции и ведет к повышению однородности распределения активных центров на поверхности белка. При этом сетка водородных связей изначально поддерживается в более рыхлом и однородном состоянии при вариациях концентрации компонент. Это сопряжено с минимизацией фракционности белка и гетерогенности его супрамолекулярной организации в дисперсии. Проведенные исследования подтверждают обнаруженную ранее многофункциональность наночастиц ShC в дисперсии, выполняющих функции гомогенизаторов и модификаторов белков, а также возможных регуляторов транспорта и взаимодействия жирных кислот с белками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные данные получены на оборудовании ЦКП ФИЦ КарНЦ РАН

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного заказа (проекты № FMEN-2022-0006 и № АААА-А18-118020690131-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Liu, L. Cui, and D. Losic, *Acta Biomater.*, **9**, 9243 (2013).
2. Y. Ni, F. Zhanga, and S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, **769**, 40 (2013).
3. H. Sun, A. Zhao, N. Gao, et al., *Angew Chem. Int. Ed.*, **54** (24), 7176 (2015).
4. B. S. Gully, J. Zou, G. Cadby, et al., *Nanoscale*, **4**, 5321 (2012).
5. N. N. Rozhkova, A. V. Gribanov, and M. A. Khodorovskii, *Diamond and related materials*. **16**, 2104 (2007).
6. E. F. Sheka and N. A. Popova, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 13304 (2013).
7. E. F. Sheka, N. N. Rozhkova, K. Holderna-Natkaniec, and I. Natkaniec, *Nanosystems: Physics, chemistry, mathematics*, **5** (5), 659 (2014).
8. E. F. Sheka and N. N. Rozhkova, *Int. J. Smart Nano Mat.*, № 5, 1 (2014).
9. Н. Н. Рожкова и С. С. Рожков, Патент РФ № 2448899 (2012).
10. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, *Russ. J. Gen. Chem.* **83** (13), 2585 (2013).
11. С. П. Рожков и А. С. Горюнов, Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология, №12, 38 (2018).
12. N. N. Rozhkova, *Russ. J. Gen. Chem.* **83** (13), 2676 (2013).
13. X. Liu, C. Yan, and K. L. Chen, *Environ. Sci. Technol.*, **53** (15), 8631 (2019).
14. B. Sun, Y. Zhang, W. Chen, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **52** (13), 7212 (2018).
15. С. П. Рожков, А. С. Горюнов, Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология, № 5, 33 (2017).
16. A. Goryunov, S. Rozhkov, and N. Rozhkova, *Eur. Biophys. J.*, **49**, 85 (2020).
17. L. E. Masson, C. M. O'Brien, I. J. Pence, et al., *Analyst*, **143**, 6049 (2018).
18. N. N. Rozhkova, S. P. Rozhkov, and A. S. Goryunov, In *Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene*, Ed. by K. D. Slatter (CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2016), Vol. 1, pp. 151–174.
19. A. Michnik, K. Michalik, and Z. Drzazga, *J. Thermal Anal. Calorim.*, **80**, 399 (2005).

20. S. M. Baschenko and L. S. Marchenko, *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*, **14** (1), 77 (2011).
21. Б. С. Разбирин, Н. Н. Рожкова, Е. Ф. Шека и др., *Журн. эксперим. и теорет. физики*, **145** (5), 838 (2014).
22. Y. Xu, T. Watermann, H.-H. Limbach, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 9327 (2014).
23. A. C. Ferrari and J. Robertson, *Phil. Trans. R. Soc.*, **362**, 2477 (2004).
24. Y. Maeda and H. Kitano, *Spectrochim. Acta. Part A*, **51**, 2433 (1995).
25. M. Unal and O. Akkus, *J. Biomed. Opt.*, **23** (1), 015008 (2018).
26. S. Burikov, S. Dolenko, T. Dolenko, et al., *Mol. Physics*, **108** (6), 739 (2010).
27. G. D. Fullerton, K. M. Kanal, and I. L. Cameron, *Cell Biol. Intern.*, **30**, 86 (2006).
28. И. А. Чабан, М. Н. Родникова и В. В. Жакова, *Биофизика*, **41** (2), 293 (1996).
29. А. П. Жуковский, Н. В. Ровнов и А. И. Халоимов, *Биофизика*, **29**, 586 (1984).

Interaction between Serum Albumin Molecules, Fatty Acids and Graphenes of Shungite Carbon Nanoparticles in Aqueous Dispersion Based on Raman Spectroscopic Analysis of Water in the High Wavenumber Region

S.P. Rozhkov *, A.S. Goryunov*, V.A. Kolodey, L.A. Pron'kina**, and N.N. Rozhkova****

**Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

***Institute of Geology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

The Raman spectroscopy method was used to analyze the positions of extrema, amplitudes, and widths of the main Raman spectral lines in the wavenumber range 3200–3600 cm⁻¹ attributed to the hydrogen bonded complex upon addition of bovine serum albumin with a concentration of 0.01–0.10 mg/ml. The values obtained for these parameters in the presence and absence of fatty acids within the said protein concentration range were compared and the effects of shungite carbon nanoparticles on these variations were studied. The stability of the hydrogen bonded complex in water is found to depend significantly nonlinearly on the protein concentration: the stability was maximum in the protein concentration range of 0.1–0.3 mg/mL and became less both with an increase and decrease of the protein concentration. The destabilization of water hydrogen bonds with increasing protein concentration may be associated with its conformation and/or aggregation. Changes depend both on a ligand state of bovine serum albumin (presence of fatty acids) and on the effects of shungite carbon. In the presence of nanoparticles of shungite carbon, the hydrogen bonded complex is maintained in a more uniform but loosened state over the entire range of protein concentrations, with and without fatty acids. The data obtained indicate that water plays an important role in the mechanisms of interaction between protein molecules, as well as between shungite carbon graphenes and the protein surface in the fatty acid binding sites.

Keywords: albumin, fatty acid, shungite carbon graphenes, Raman scattering, hydrogen bonds

УДК 577.32

НЕЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ МОНОМЕРОВ В ДИМЕРНОЙ СТРУКТУРЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОРЕГУЛИРУЕМОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

© 2022 г. А.М. Кулакова*, М.Г. Хренова*, **, А.В. Немухин *, ***,#

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

#E-mail: anet@lcc.chem.msu.ru

**Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Ленинский проспект, 33/2, Москва, 119071, Россия

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

Поступила в редакцию 17.08.2022 г.

После доработки 17.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Построены полноатомные 3D-модели димерных комплексов бактериальной фоторегулируемой аденилатциклазы с темными и светлыми состояниями фоторецепторного домена. По результатам молекулярно-динамического моделирования показана геометрическая неэквивалентность мономеров в димерном комплексе, которая не зависит от состояния каждого мономера. С использованием метода динамического сетевого анализа проанализированы пути передачи сигнала от фоторецепторного к каталитическому домену внутри и между мономерами и продемонстрирована функциональная неэквивалентность мономеров в димере.

Ключевые слова: многодоменные димеры белков, структурная асимметрия, фоторегулируемая аденилатциклаза, молекулярная динамика, динамический сетевой анализ.

DOI: 10.31857/S0006302922060072, EDN: LJYPRH

Оптогенетические белковые модульные системы, переключаемые светом, содержат фоторецепторные домены, связанные с эффекторными доменами, в частности, обладающими ферментативными функциями [1]. При освещении в фоторецепторном домене происходят конформационные изменения, затрагивающие всю макромолекулу, что приводит к изменению скорости ферментативной реакции. Подобная фоторегуляция в бактериях обеспечивает изменение скорости образования и деградации молекул вторичных посредников, инициируя различные сигнальные каскады.

Важнейшим примером таких систем являются бактериальные фоторегулируемые аденилатциклазы с рецепторами синего света (BLUF – blue light using flavin), использующими изоаллоксазиновое кольцо флавинов в качестве хромофора [1–3]. Химическая реакция в ферментативных доменах отвечает за гидролиз аденозинтрифосфата (АТФ) до вторичного посредника – циклической формы аденозинмонофосфата (сАМР).

Сокращения: BLUF – рецепторы синего света (blue light using flavin), ФМН – флавиномононуклеотид, bPAC – фоторегулируемая аденилатциклаза.

Особенностью белковых комплексов, содержащих BLUF-домены, является то, что после облучения белка синим светом происходит реорганизация сетки водородных связей около хромофора флавиномононуклеотида (ФМН) с изомеризацией аминокислотного остатка глутамин рядом с изоаллоксазиновым кольцом флавина (рис.1) [4, 5]. Таким образом темная форма BLUF-домена (до облучения светом) содержит глутамин в амидной форме, а светлая форма BLUF-домена (после облучения светом) содержит глутамин в имидной форме.

Наши предшествующие исследования [6, 7] фоторегулируемой аденилатциклазы (bPAC) были в основном направлены на выяснение механизма передачи сигнала из фоторецепторных в каталитические домены после фотовозбуждения. При этом было найдено, что структурная эквивалентность мономеров одинакового химического состава, наблюдаемая (точнее, предполагаемая при анализе результатов кристаллографических исследований) в структурах bPAC (PDB ID 5M2A [8]), нарушается после достаточно непродолжительной эволюции системы вдоль молекулярно-динамических траекторий. Подобная динамическая неэквивалентность мономеров в димерных

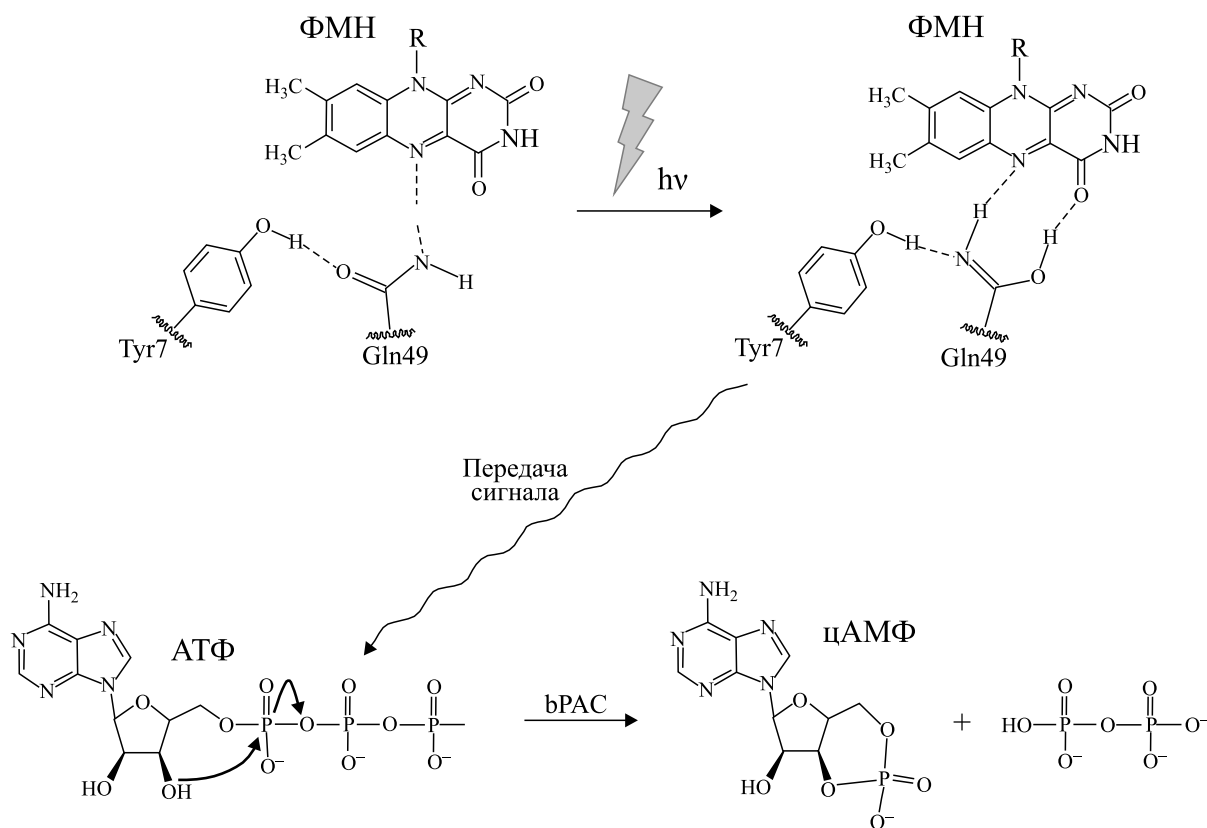


Рис. 1. Схема фотоактивации BLUF домена (верхняя часть) и каталитической реакции гидролиза аденозинтрифосфата в активном центре аденилатциклазы (нижняя часть).

белках по результатам молекулярно-динамического анализа была отмечена и для фермента аспартоацилазы [9, 10]. Было найдено, что в случае димера аспартоацилазы динамическая неэквивалентность мономеров приводит к значительному влиянию на пути доставки субстрата к активному центру фермента.

Асимметрия в олигомерных структурах белков, включая асимметрию между химически эквивалентными белковыми субъединицами, известна и по результатам экспериментальных работ [11–15].

Исследование нарушения симметрии в олигомерных белках является перспективным направлением биофизики, требующим всестороннего анализа. Целью настоящей работы является подробное изучение динамической неэквивалентности мономеров в димерном белке bPAC и роли этого явления в механизме передачи сигнала от фоторецепторных к каталитическим доменам.

МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Полноатомные модели апо-форм bPAC, т.е. без субстрата АТФ в каталитических доменах, и комплексов bPAC с АТФ строились на основе

кристаллографической структуры димера bPAC (PDB ID 5M2A [8]), соответствующей апо-форме. Методами молекулярного моделирования структура была дополнена плохо разрешенными в ходе рентгеноструктурного анализа аминокислотными остатками, а также атомами водорода, предполагая состояния протонирования полярных аминокислотных остатков соответствующими рН 7.0. Вначале была построена апо-форма bPAC, в которой оба мономера находятся в темном состоянии (DD). Мы будем использовать обозначения D или L для темной или светлой формы фоторецепторного домена, соответственно, последовательно указывая символы для одного мономера (A) и для второго мономера (B). Для построения апо-форм bPAC, в которых мономер A (LD), мономер B (DL) или оба мономера (LL) содержат BLUF-домен в светлой форме, в соответствующих мономерах амидная структура остатка Gln49 около хромофора менялась на имидную форму. Все четыре структуры, помимо белковой макромолекулы, содержат молекулы ФМН в соответствующих сайтах связывания в доменах BLUF.

Комплексы bPAC с субстратом АТФ в активных центрах в ферментативных доменах создавались путем встраивания в соответствующие сай-

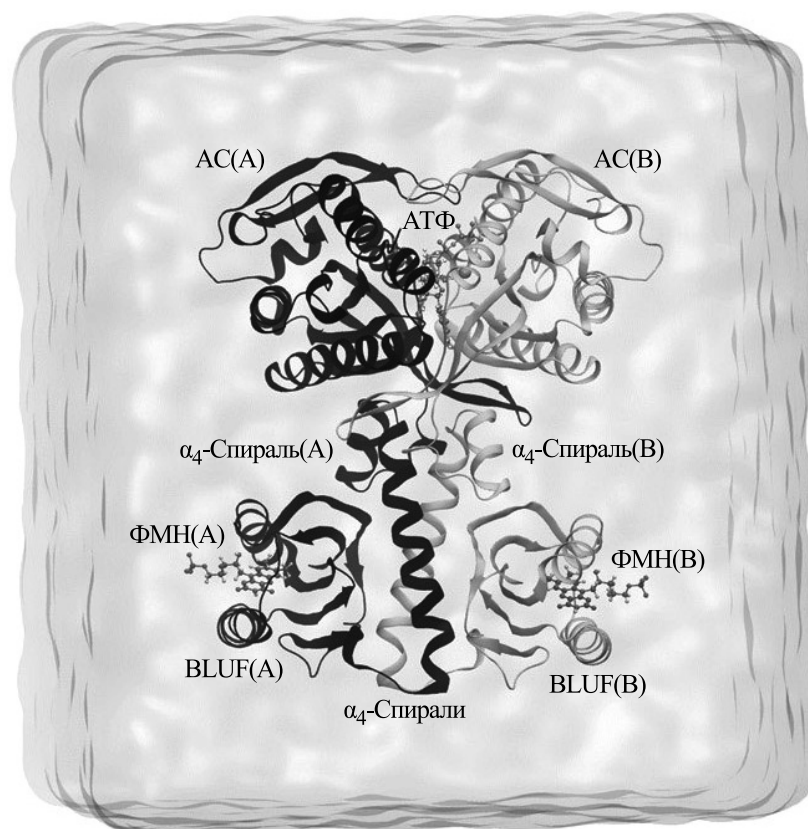


Рис. 2. Модельная система сольватированного комплекса bRAC с молекулами субстрата АТФ. Черным цветом выделен мономер А, серым цветом – мономер В. Шаростержневое представление использовано для молекул ФМН и АТФ.

ты связывания аденилатциклаз апо-форм bRAC молекул аденозинтрифосфата и катионов Mg^{2+} . Молекулы встраивались по аналогии со структурами комплекса аденилатциклазы человека с АТФ (PDB ID: 4USW [16]) и комплекса с аналогом гуанозинтрифосфата $GTP\gamma S$ (PDB ID: 1CJK [17]).

Полученные апо-формы и комплексы bRAC сольватировали молекулами воды до образования ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда таким образом, чтобы расстояние от любого атома текущей системы до границ ячейки составляло не менее 10 \AA . Затем в систему добавляли противоионы Na^+ для нейтрализации общего заряда. Общий размер систем составил $85 \times 90 \times 100 \text{ \AA}^3$ или 68500 атомов. Общий вид модельной системы показан на рис. 2.

Для каждой из восьми рассматриваемых систем проведено классическое молекулярно-динамическое моделирование с использованием программного пакета NAMD [18]. Все расчеты проводили в каноническом ансамбле NPT для давления $p = 1 \text{ атм}$ и температуры $T = 298 \text{ К}$, которые поддерживали с помощью баростата Нозе-Гувера и термостата Ланжевена. Для описания

электростатических взаимодействий использовали метод Эвальда. Для белковой макромолекулы использовали силовое поле CHARMM36 [19], для молекул АТФ, ФМН и имидной формы глутамина – силовое поле CGenFF [20], молекул воды – силовое поле TIP3P [21]. Параметры для ФМН были взяты из работы [22], а параметры для имидной формы глутамина – из работы [23], где они дополнительно оптимизировались по сравнению с параметрами, получаемыми с сервера CGenFF. Шаг интегрирования для всех молекулярно-динамических траекторий – 1 фс , продолжительность траекторий для каждой из восьми систем составляла 20 нс .

Для анализа результатов молекулярно-динамических расчетов был применен динамический сетевой анализ [24]. В этом подходе все тяжелые атомы системы (за исключением молекул воды и противоионов) были разбиты на определенные фрагменты (аминокислотные остатки, изоаллоксаниновое кольцо флавина, фосфатсодержащие части ФМН и АТФ, пуриновое основание АТФ, катион магния), каждый из которых отвечал собственной вершине графа. Эти вершины соединяли ребрами, если атомы соответствующих фрагментов системы находились на расстоянии менее

4 Å на протяжении 75% молекулярно-динамической траектории. Вес ребра между i -й и j -й вершинами рассчитывали по формуле:

$$\omega_{ij} = -\ln|\text{cov}(x_i, x_j)| = \\ = -\ln|M[(x_i - M[x_i]) \cdot (x_j - M[x_j])]|,$$

где $\text{cov}(x_i, x_j)$ – ковариация координат атомов, относящихся к вершинам графа i и j соответственно, $M[x]$ – математическое ожидание (среднее значение) координат атомов. Данный анализ проводили с помощью соответствующего сервиса NetworkView в программе VMD [25], матрицу ковариации считали в программе Sigma [26]. В полученных графах с помощью алгоритма Гирван–Ньюмена обнаруживали отдельные сообщества – наиболее связанные между собой фрагменты общего графа.

В каждом из получившихся в ходе динамического сетевого анализа графов были определены кратчайшие пути между вершинами, относящимися к флавиномононуклеотиду и связанным с ним аминокислотным остаткам, и вершинами, относящимися к аденозинтрифосфату и окружающим его аминокислотным остаткам. Длину пути между вершинами i и j определяли как сумму весов ребер между вершинами, встречающимися на пути: $D_{ij} = \sum_{k,l} \omega_{kl}$.

Кратчайшее расстояние между вершинами находили с помощью алгоритма Флойда–Уоршелла.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Геометрические аспекты неэквивалентности мономеров. Бактериальная фоторегулируемая аденилатциклаза из бактерии *Beggiatoa sp.* представляет собой гантелеподобный димер с параллельной укладкой мономеров (рис. 2). Каждый мономер состоит из ядра BLUF-домена (Met1-Ser102), α_3 -спирали (Glu103-Pro128), которую часто относят к BLUF-домену, перемычки (Ala129-Glu145), в которой отдельно выделяют α_4 -спираль (Ala129-Gly138), и домена аденилатциклазы AC (Pro146-Asp349).

По расчетам молекулярно-динамического моделирования апо-форм bPAC, а также комплексов bPAC с АТФ для анализа доступны восемь молекулярно-динамических траекторий. Подвижность каждой структуры вдоль траектории оценивали с помощью среднеквадратичного отклонения. Значения среднеквадратичного отклонения, рассчитанные для различных фрагментов системы с усреднением по последней наносекунде траектории, приведены в табл. 1.

Значения среднеквадратичного отклонения могут различаться до 0.4 Å как в рамках одной мо-

Таблица 1. Среднеквадратичные отклонения атомов модельных систем в молекулярно-динамических траекториях

Структура	Апо-форма bPAC				Комплекс bPAC с АТФ			
	DD	DL	LD	LL	DD	DL	LD	LL
Мономер (А)	2.30	2.34	2.39	2.38	2.79	2.57	2.45	2.50
Мономер (В)	2.77	2.53	2.41	2.38	2.60	2.79	2.30	2.30
BLUF-домен (А)	2.46	2.49	2.59	2.26	2.49	2.24	2.20	2.27
BLUF-домен (В)	3.15	2.24	2.43	2.57	2.12	2.63	2.46	2.13
α_3 -Спираль (А)	1.87	1.84	2.33	2.09	1.52	1.83	1.74	1.71
α_3 -Спираль (В)	1.70	1.73	1.93	1.58	1.71	1.90	1.61	1.82
α_4 -Спираль (А)	1.88	2.55	2.31	2.36	1.53	1.84	1.33	2.13
α_4 -Спираль (В)	1.70	2.02	2.13	1.69	1.37	1.58	1.50	1.58
АС-домен (А)	2.30	2.33	2.26	2.47	3.14	2.85	2.72	2.74
АС-домен (В)	2.74	2.80	2.48	2.42	2.99	3.03	2.36	2.48

Примечание. Наложение кадров траектории проводили по кристаллической структуре PDB ID 5M2A [8], величина отклонения выражена в Å.

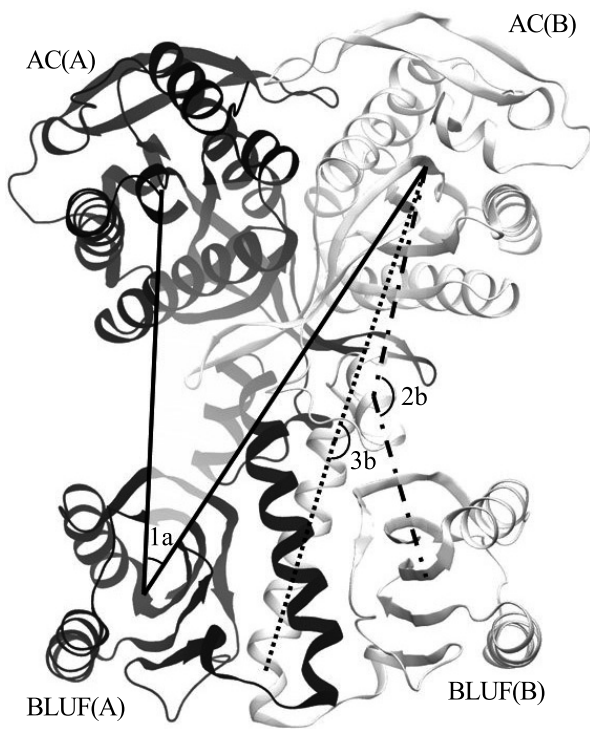


Рис. 3. Исследуемые углы в модельной системе bPAC. Черным цветом выделен мономер А, серым цветом – мономер В.

дельной системы при рассмотрении различных мономеров, так и при рассмотрении одного и того же состояния мономера (светлого или темного) в различных модельных системах. Подвижность мономеров происходит как за счет каталитического AC-домена, так и за счет фоторецепторного BLUF-домена. Наименее подвижными фрагментами bPAC являются α_3 -спираль, относящаяся к BLUF-домену и ответственная за взаимодействие мономеров в димере, и α_4 -спираль, находящаяся между BLUF- и AC-доменами в мономере.

Для количественной оценки неэквивалентности мономеров были выбраны углы, содержащие наименее подвижные фрагменты системы (рис. 3). Угол (1) между центром масс BLUF домена и центрами масс AC доменов (AC–BLUF–AC) является межмономерным и показывает положение одного мономера относительно другого. Углы (2) между центрами масс α_4 -спирали и центрами масс BLUF и AC доменов (BLUF– α_4 –AC) и углы (3) между α_3 -спиралью и центром масс домена AC (α_3 –AC) являются внутримonomерными и отражают форму соответствующего мономера.

Межмономерный угол (1) и внутримonomерные углы (2) и (3) показывают незначительную разницу между различными формами мономеров (DD, DL, LD, LL), а также небольшую разницу

между апо-формой и комплексом bPAC с АТФ. Однако во всех системах видна значительная разница между мономерами А и В. Таким образом, по результатам молекулярной динамики видна геометрическая неэквивалентность мономеров, которая не зависит от того, содержит ли комплекс bPAC молекулы АТФ и в каком именно состоянии – темном или светлом – находится BLUF-домен в конкретном мономере.

Динамический сетевой анализ. Функциональную неэквивалентность мономеров можно также анализировать с помощью динамического сетевого анализа. Для этого молекулярно-динамические траектории для всех восьми систем были представлены с помощью соответствующих графов (см. раздел «Методы»). Проведенный с помощью алгоритма Гирван–Ньюмена анализ выявил схожую структуру отдельных сообществ во всех системах. В каждом мономере BLUF-домен является отдельным сообществом, домен аденилатциклазы содержит два отдельных сообщества, единым сообществом являются переключки, а также фрагменты α_3 -спиралей обоих мономеров.

На основе полученных графов были оценены кратчайшие пути передачи сигнала от фоторецепторного домена к каталитическому. На рис. 4б представлена вероятность участия аминокислотного остатка в кратчайшем пути передачи сигнала в комплексах bPAC с АТФ. Передача сигнала в BLUF-домене (Met1–Ser102) весьма консервативна вне зависимости от типа системы и рассматриваемого мономера, также она практически не зависит от того, происходит ли передача сигнала внутри мономера или между мономерами. Небольшая разница состоит лишь в том, что при передаче сигнала между мономерами участвует остаток Leu75, поскольку с него передается сигнал на конец α_3 -спирали (Glu124, Tyr126), откуда через α_4 -спираль (Ala129–Gly138) соседнего мономера сигнал доходит до каталитического домена AC (Pro146–Asp349). При передаче сигнала внутри мономера преимущественно в А-мономере вместо Leu75 может затрагиваться остаток Cys76, с которого происходит передача сигнала на α_4 -спираль этого же мономера и дальше сигнал переходит в AC-домен.

Пути передачи сигнала внутри AC-домена значительно менее консервативны. Отметим, что вне зависимости от состояния мономеров (темное или светлое) пути передачи сигнала в мономере А и В различны. В DD-форме bPAC в передаче сигнала задействуются β -листы каталитического домена (Ala190–Glu210), в то время как в структурах LL, DL, LD задействованы остатки, находящиеся на α_9 -спирали, расположенной рядом с каталитическим центром.

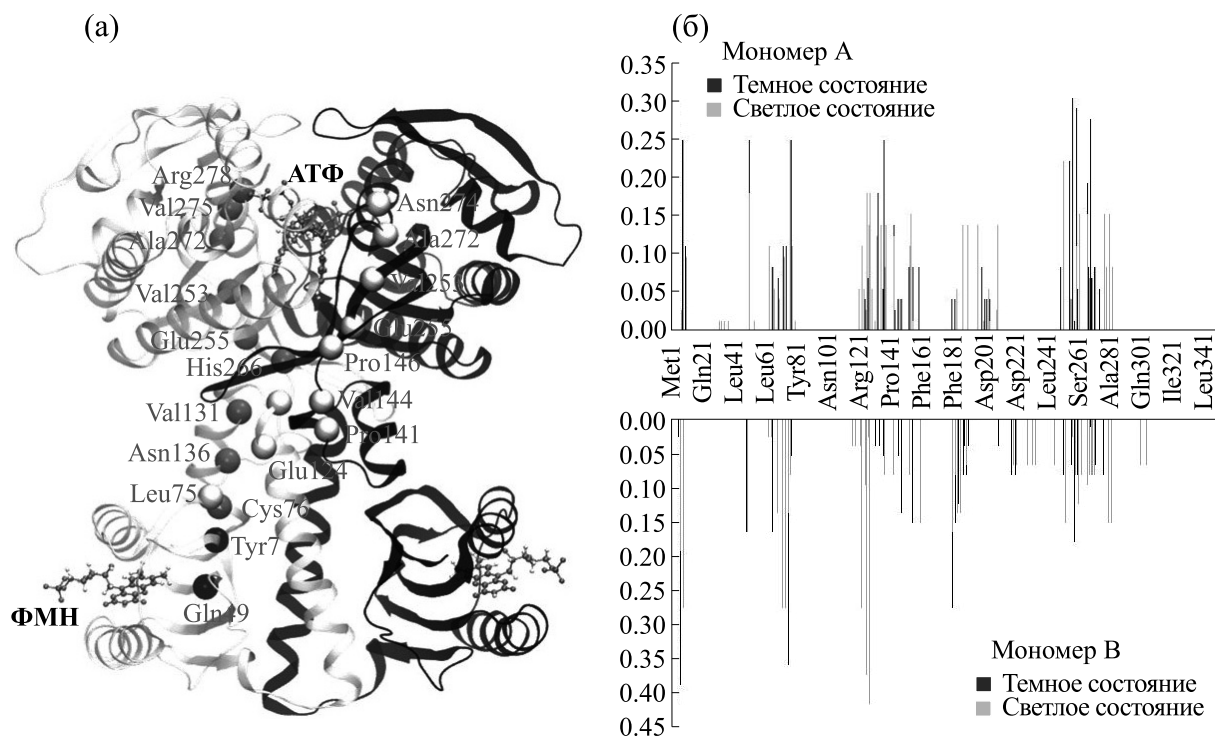


Рис. 4. (а) – Пример кратчайших путей передачи сигнала внутри мономеров (черные линии, серые сферы) и между мономерами (серые линии, белые сферы). (б) – Вероятность прохождения кратчайшего пути от флавинсвязывающей области BLUF-домена до активного центра AC-домена через заданный аминокислотный остаток в комплексах bPAC с АТФ.

Длины кратчайших путей передачи сигнала от флавин-связывающей области BLUF-домена (ФМН, Tyr7, Asn30, Leu40, Phe47, Arg70, Met93) до каталитического центра (Ile199, Met204, Val273, Asn274, Arg284, Lys317) в исследуемых системах апо-форм bPAC имеют схожие значения для передачи сигнала в DD- и LL-формах (сред-

ние значения 374 и 362), которые значительно отличаются от средних значений в DL- и LD-формах (444 и 422 соответственно), что показывает различие в поведении систем имеющих одинаковые или разные типы мономеров. При переходе к комплексам bPAC с АТФ данная закономерность нарушается – LL-комплекс значительно быстрее

Таблица 2. Средние значения выбранных углов для модельных систем на протяжении всей траектории

Угол	Апо-форма bPAC				Комплекс bPAC с АТФ			
	DD	DL	LD	LL	DD	DL	LD	LD
(1a) AC(A) – BLUF(A) – AC(B)	60.4	57.6	59.4	59.6	56.3	56.7	58.8	58.8
(1b) AC(A) – BLUF(B) – AC(B)	64.6	61.4	63.4	63.0	59.7	59.7	62.5	62.5
(2a) BLUF(A) – α 4(A) – AC(A)	128.9	126.6	125.8	121.5	129.6	128.6	126.9	126.9
(2b) BLUF(B) – α 4(B) – AC(B)	140.3	137.9	135.9	140.0	134.7	136.9	139.3	139.3
(3a) α 3(A) – AC(A)	168.8	165.7	168.0	163.9	166.3	164.9	163.3	163.3
(3b) α 3(B) – AC(B)	172.1	174.5	169.7	173.9	171.7	171.3	174.6	174.6

Примечание. Значения углов выражены в градусах.

передает сигнал (339), чем комплексы с разным типом мономеров (DL и LD) и DD-комплекс (406).

Наибольшие функциональные различия между мономерами А и В в процессе передачи сигнала заключаются в участии остатков Leu75 (преимущественно в В-мономере) или Cys76 (преимущественно в А-мономере), остатков Glu124, Tyr126 (преимущественно в В-мономере) или Lys125 (преимущественно в А-мономере). Также в светлом состоянии мономера В часто задействованы остатки Ser9, Asn73, Arg121, Phe181, Ile183, Ile187, которые редко встречаются в путях передачи сигнала в светлом состоянии мономера А, и наоборот, остатки Arg130, Tyr133, Glu194, Ser206 значительно чаще встречаются в путях передачи сигнала в светлом состоянии мономера А, чем мономера В.

ВЫВОДЫ

По результатам молекулярно-динамического моделирования комплексов бактериальной фоторегулируемой аденилатциклазы bPAC показана геометрическая неэквивалентность мономеров в димерном комплексе. Данная неэквивалентность не зависит от типа мономера в системе. Результаты динамического сетевого анализа демонстрируют различия в путях передачи сигнала от фоторецепторного домена к каталитическому в каждом мономере, показывая функциональную неэквивалентность мономеров в димерном комплексе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Расчеты проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М. В. Ломоносова [27].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-20032).

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. Г. Я. Фрайкин, М. Г. Страховская, Н. С. Беленикина и А. Б. Рубин, *Микробиология*, **84**, 391 (2015).
2. M. Gomelsky and G. Klug, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 497 (2002).
3. C. Bonetti, M. Stierl, T. Mathes, et al., *Biochemistry*, **48**, 11458 (2009).
4. T. Domratcheva, B. L. Grigorenko, I. Schlichting, and A. V. Nemukhin, *Biophys. J.*, **94**, 3872 (2008).
5. B. L. Grigorenko, M. G. Khrenova, and A. V. Nemukhin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 23827 (2018).
6. M. G. Khrenova, A. M. Kulakova, and A. V. Nemukhin, *J. Chem. Inf. Model.*, **61**, 1215 (2021).
7. А. М. Кулакова, М. Г. Хренова и А. В. Немухин, *Изв. РАН. Сер. хим.*, **68**, 1991 (2019).
8. R. Lindner, E. Hartmann, M. Tarnawski, et al., *J. Mol. Biol.*, **429**, 1336 (2017).
9. E. D. Kots, M. G. Khrenova, S. V. Lushchekina, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120**, 4221 (2016).
10. E. D. Kots, S. V. Lushchekina, S. D. Varfolomeev, and A. V. Nemukhin, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 1999 (2017).
11. J. H. Brown, *Prot. Sci.*, **15**, 1 (2006).
12. R. Godoy-Ruiz, A. Krejcirikova, D. T. Gallagher, and V. Tugarinov, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19578 (2011).
13. L. Dong, N. P. Sharma, B. J. Jurban, and W. L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **288**, 28641 (2013).
14. G. Maksay and O. Töke, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **114**, 153 (2014).
15. G. Maksay and J. A. Marsh, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 599 (2017).
16. S. Kleinboelting, J. van den Heuvel, and C. Steegborn, *FEBS J.*, **281**, 4151 (2014).
17. J. J. G. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, and S. R. Sprang, *Science*, **278**, 1907 (1997).
18. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, et al., *J. Comput. Chem.*, **26**, 1781 (2005).
19. R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 3257 (2012).
20. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, et al., *J. Comput. Chem.*, **31**, 671 (2009).
21. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, et al., *J. Chem. Phys.*, **79**, 926 (1983).
22. M. G. Khrenova, Y. I. Meteleshko, and A. V. Nemukhin, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 10018 (2017).
23. M. G. Khrenova, T. Domratcheva, I. Schlichting, et al., *Photochem. Photobiol.*, **87**, 564 (2011).
24. A. Sethi, J. Eargle, A. A. Black, and Z. Luthey-Schulten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6620 (2009).
25. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33 (1996).
26. N. M. Glykos, *J. Comput. Chem.*, **27**, 1765 (2006).
27. V. V. Voevodin, A. S. Antonov, D. A. Nikitenko, et al., *Supercomput. Front. Innov.*, **6**, (2019).

Non-Equivalence of Monomers in the Dimeric Structure of a Bacterial Light-Regulated Adenylyl Cyclase

A.M. Kulakova*, M.G. Khrenova*, **, and A.V. Nemukhin*, ***

*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia

**A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect, 33/2, Moscow, 119071 Russia

***N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Full-atom 3D models of dimer complexes of a bacterial light-regulated adenylyl cyclase with the photoreceptor domain in dark and light states were constructed. The molecular dynamics simulation results demonstrated that the geometry of monomers in the dimeric complexes was not the same. It was not affected by the state of each monomer. With the dynamical network analysis, the signal transduction pathways from the receptor's domain to catalytic domain within and between monomers were analyzed and the functional non-equivalence of monomers was shown.

Keywords: multidomain protein dimers, structural asymmetry, light-regulated adenylyl cyclase, molecular dynamics, dynamical network analysis

УДК 578.23

ПАПАИНОПОДОБНАЯ ПРОТЕАЗА PLpro КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 КАК ПРОТИВОВИРУСНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ИНГИБИТОРОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА И БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© 2022 г. П.В. Ершов^{*,#}, Е.О. Яблоков^{*}, Ю.В. Мезенцев^{*}, Г.Н. Чуев^{**}, М.В. Федотова^{***}, С.Е. Кручинин^{***}, А.С. Иванов^{*}

^{*}Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Погодинская ул., 10/8, Москва, 119121, Россия

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

^{***}Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, Иваново, Академическая ул., 1, 153045, Россия

[#]E-mail: pavel79@inbox.ru

Поступила в редакцию 05.06.2022 г.

После доработки 09.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Папаиноподобная протеаза PLpro коронавируса SARS-CoV-2 является мультифункциональным ферментом, который катализирует протеолитический процессинг двух вирусных полипротеинов pp1a и pp1ab. PLpro также расщепляет пептидные связи между белками клеток хозяина и убиквитином (или убиквитиноподобными белками), что связывают с нарушением иммунных процессов. Были приоритизированы девять структур наиболее действенных ингибиторов активного центра PLpro по параметрам биохимических (IC_{50}) и клеточных тестов для оценки подавления вирусной репликации (EC_{50}) и цитотоксичности (CC_{50}). Литературный поиск показал, что PLpro может взаимодействовать с не менее чем 60 потенциальными белковыми партнерами в клетках, 23 из которых являются мишенями для других вирусных белков (вирус папилломы человека, вирус Эпштейна–Барр). Анализ белок-белковых взаимодействий показал, что белки USP3, UBE2J1, RCHY1 и FAF2, вовлеченные в процессы де- и убиквитинирования, содержат наибольшее число связей с другими белками, а взаимодействие с ними вирусных белков может отражаться на архитектуре всей сети белок-белковых взаимодействий. На примере пространственной модели комплекса PLpro/убиквитин и набора из 154 соединений природного происхождения с известной противовирусной активностью были предсказаны 13 соединений (молекулярные массы в диапазоне 454–954 Да) в качестве потенциальных ингибиторов PLpro. Эти соединения связываются с «горячими» аминокислотными остатками протеазы в положениях Gly163, Asp164, Arg166, Glu167 и Tyr264, участвующими во взаимодействии с убиквитином. Таким образом, фармакологическое воздействие на периферические сайты PLpro, играющие важные роли в связывании белковых субстратов, может быть дополнительной мишень-ориентированной противовирусной стратегией.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, папаиноподобная протеаза, PLpro, белок-белковые взаимодействия, вирус-хозяин, поверхностный плазмонный резонанс, ингибиторы.

DOI: 10.31857/S0006302922060084, EDN: LJZOBK

Всемирная организация здравоохранения 11 марта 2020 г. объявила о начале пандемии заболевания COVID-19, которое было вызвано коронавирусом SARS-CoV-2. Заболевание оказало серьезную нагрузку на национальные системы

здравоохранения и привело к смерти нескольких миллионов человек во всем мире [1]. Еще до начала волны штамма омикрон (B.1.1.529) к середине ноября 2021 года более 40% населения мира заразилось COVID-19 хотя бы один раз [2]. Появление и быстрое распространение новых штаммов SARS-CoV-2 стимулирует разработку лекарственных средств, блокирующих разные стадии жизненного цикла вируса. Это достигается также че-

Сокращения: PLpro – папаиноподобная протеаза SARS-CoV-2, Mpro – главная протеаза SARS-CoV-2, ББВ – белок-белковые взаимодействия, SPR – поверхностный плазмонный резонанс (Surface Plasmon Resonance), а.к.о. – аминокислотные остатки.

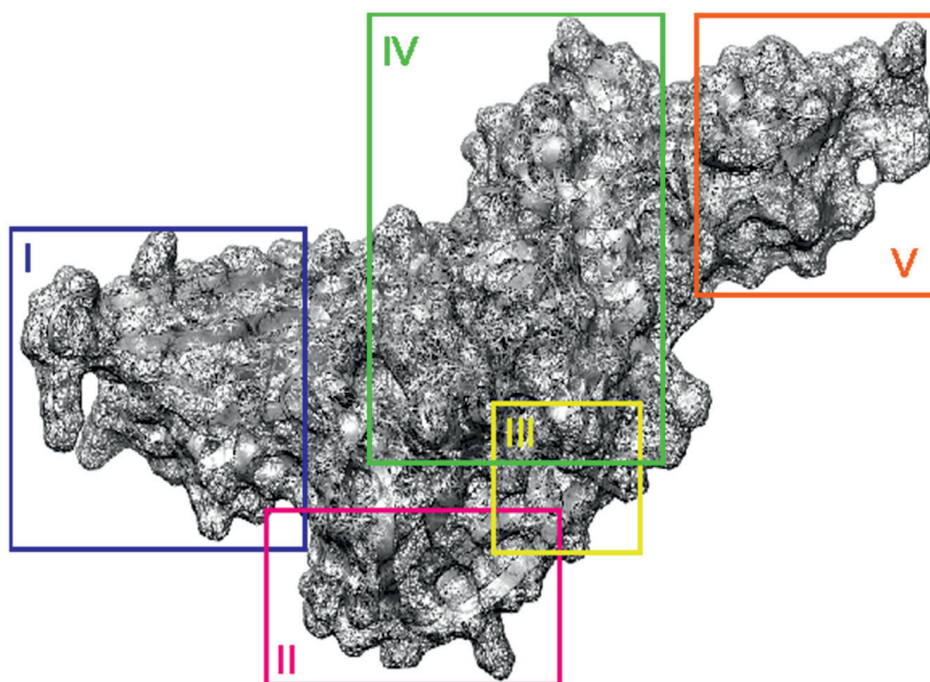


Рис. 1. Кристаллографическая структурная модель PLpro SARS-CoV-2 (PDB ID 7cmd [6]). Римскими цифрами на рисунке обозначены: I – Zn-связывающий домен (один ион цинка координируют четыре остатка цистеина (Cys189, Cys192, Cys224, Cys226)), II – домен Palm, III – каталитическая триада (Cys111–His272–Asp286), IV – домен «большой палец», V – убиквитиноподобный домен.

рез ингибирование ключевых ферментов вирусного аппарата репликации [3].

Папаиноподобная протеаза (PLpro) и главная протеаза (Mpro) SARS-CoV-2 осуществляют протеолитическое расщепление двух вирусных полипротеинов pp1a и pp1ab, что важно для созревания 16 белков, вовлеченных в репликацию и сборку вирусных частиц [4]. PLpro является мономерным белком с мультидоменной структурой (рис. 1) и «каталитической триадой» (аминокислоты Cys112, His273, Asp287) в активном центре, которая распознает и расщепляет мотив Leu-X-Gly-Gly полипротеина (где X – любой аминокислотный остаток) с образованием вирусных белков nsp1, nsp2 и nsp3 [5].

На сегодняшний день пока отсутствуют разрешенные для клинического применения ингибиторы PLpro. По данным портала Clinical Trials проводятся клинические исследования двух кандидатных ингибиторов PLpro – изотретиноина (NCT04361422) и эбселена (NCT04484025). Подавляющее большинство научных разработок посвящено идентификации обратимых и необратимых ингибиторов, нацеленных именно на активный центр вирусного фермента. Параллельно с генерацией большого объема информации о новых ингибиторах PLpro нельзя не заметить, что число предсказанных *in silico* биоинформационных гипотез [7–11] примерно на порядок может

превышать число экспериментально верифицированных ингибиторов. Данный факт порождает очевидную проблему, состоящую в том, что далеко не все гипотезы бывают продуктивны [12, 13]. В этом контексте использование мультиметодического инструментария (биохимические тесты, оценка связывающей способности, клеточные тесты) является эталонным вариантом приоритизации новых ингибиторов PLpro SARS-CoV-2 [14–16]. Однако уместно заметить, что фармакологическое воздействие на активный центр PLpro имеет некоторые биологические ограничения. Во-первых, возникновение аминокислотных замен в активном центре вследствие высокой мутационной изменчивости разных штаммов вируса может быстро формировать резистентность к конкурентным ингибиторам. Во-вторых, широкая представленность остатков Cys в составе активных центров клеточных ферментов увеличивает вероятность неселективного действия ингибиторов, образующих ковалентные связи с Cys.

Особенность PLpro взаимодействовать с клеточными белками подчеркивает мультифункциональный аспект фермента. Было установлено, что это явление сопровождается расщеплением пептидных связей между белками-метками (убиквитин, ISG15 – интерферон-стимулируемый ген 15 и убиквитиноподобный белок Nedd8) и целевыми белками [16–18]. Так, PLpro, снижая уровень

убиквитинилирования белков TRAF3, TBK1, IKK ϵ , STING и IRF3, косвенно влияет на экспрессию гена интерферона (*IFN*) [19], тем самым нарушая протекание иммунных процессов, а возможность PL_{pro} участвовать в белок-белковых взаимодействиях (ББВ) [20] позволяет в целом рассматривать ее как экзогенный модулятор клеточных сигнальных путей через изменение спектра ББВ. Как будет показано далее, в ББВ PL_{pro} и клеточных белков, по-видимому, вовлечена консервативная область, смежная с активным центром вирусного фермента, поэтому альтернативная стратегия снижения токсического действия PL_{pro} на организм человека, могла бы реализовываться в фармакологической блокаде ББВ в координатах вирус-хозяин.

Одной из целей данной работы является обзор наиболее перспективных и экспериментально верифицированных кандидатных ингибиторов PL_{pro} SARS-CoV-2, обнаруженных к настоящему времени. Второй целью являются систематизация данных по интерактоме PL_{pro} и обсуждение возможностей блокирования ББВ с участием PL_{pro} низкомолекулярными соединениями с известной противовирусной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПРЕДСКАЗАННЫХ *IN SILICO* ИНГИБИТОРОВ

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR, от англ. Surface Plasmon Resonance,) является одним из способов экспериментальной верификации предсказанных *in silico* потенциальных ингибиторов PL_{pro}. SPR-анализ позволяет определить кинетические, равновесные и термодинамические константы межмолекулярного взаимодействия. В работах, где использовали SPR-биосенсор, рекомбинантный полноразмерный препарат PL_{pro} был ковалентно иммобилизован на оптическом чипе CM5 за свободные аминокислотные группы белка [14] или за аффинный полигистидиновый таг [15]. Целевой уровень иммобилизации PL_{pro} составил 12–13 тысяч RU (resonance unit). В качестве позитивного контроля связывания с PL_{pro} был использован контрольный ингибитор GRL0617.

В биохимических тестах изучают кинетику ферментативной реакции PL_{pro} в отсутствие (контроль) и присутствии разных концентраций потенциальных ингибиторов для определения значений IC_{50} . Композиция параметров биохимического теста (рН и ионная сила буферного раствора, соотношение концентраций фермента и ингибитора, время инкубации, температурный режим, присутствие добавок) существенно отличалась, что следует из анализа литературных источников [15, 21–24]. Для регистрации протеаз-

ной активности был использован спектральный метод, основанный на флуоресцентном резонансном переносе энергии (FRET, от англ. fluorescence resonance energy transfer) с флуоресцентно меченными пептидами, мотивы которых соответствуют сайтам узнавания PL_{pro}, например, Z-RLRGG-AMC (где AMC – это 7-амидо-4-метилкумарин) или Ac-LRGG-ACC (где ACC – это 7-амино-4-карбамоилметилкумарин). Так, при протеолитическом расщеплении субстрата наблюдалось значительное возрастание интенсивности флуоресценции AMC ($\lambda_{ex} = 360$ nm; $\lambda_{em} = 460$ nm) или ACC ($\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm), а начальная скорость реакции (V_0) была пропорциональна активности PL_{pro}. Для регистрации деубиквитиназной активности PL_{pro} использовали флуоресцентно меченные белковые субстраты на основе убиквитина и ISG-15. Буферные растворы содержали 20–50 mM трис-HCl (рН 6.8–8.0) с добавлением NaCl до финальной концентрации 150 mM. Время преинкубации ингибитора с PL_{pro} перед добавлением субстрата составляло от 10 до 30 мин при комнатной температуре или при 37°C. Финальные концентрации PL_{pro} и субстрата в реакционной смеси составляли 10–100 нМ и 10–50 мкМ соответственно, в среднем молярное соотношение фермент : субстрат было равно 1:500. Содержание добавок для улучшения растворимости низкомолекулярных соединений в буферных растворах, таких как Тритон X-100 и диметилсульфоксид, составляло 0.01–0.05% (v/v) и 0–2% соответственно. Добавление в реакционную смесь дитиотреитола до финальной концентрации 3–5 mM необходимо для ограничения неспецифического влияния низкомолекулярных соединений на остаток цистеина в активном центре PL_{pro} [25]. Так, шесть серосодержащих соединений, не показавших ранее торможения вирусной репликации, но ингибировавших ряд цистеиновых протеаз в биохимическом тесте в отсутствии дитиотреитола, не снижали ферментативную активность протеаз в его присутствии. Так же, как и в SPR-анализе, в качестве позитивного контроля использовали контрольный ингибитор GRL0617 ($IC_{50} = 0.6$ и $K_i = 0.5$ мкМ). Для изучения механизма ингибирования разные концентрации целевого соединения инкубировали в течение 30 мин в присутствии разных концентраций PL_{pro} (25–150 нМ) в объеме 90 мкл. Затем реакцию запускали добавлением 10 мкл субстрата PL_{pro} до конечной концентрации 30 мкМ. Данные в координатах начальных скоростей и концентраций PL_{pro} обрабатывали при помощи регрессионного анализа [21].

Мы выполнили поиск соединений, которые были описаны в литературе одновременно как ингибиторы ферментативной активности PL_{pro} по известным параметрам IC_{50} , так и ингибиторы

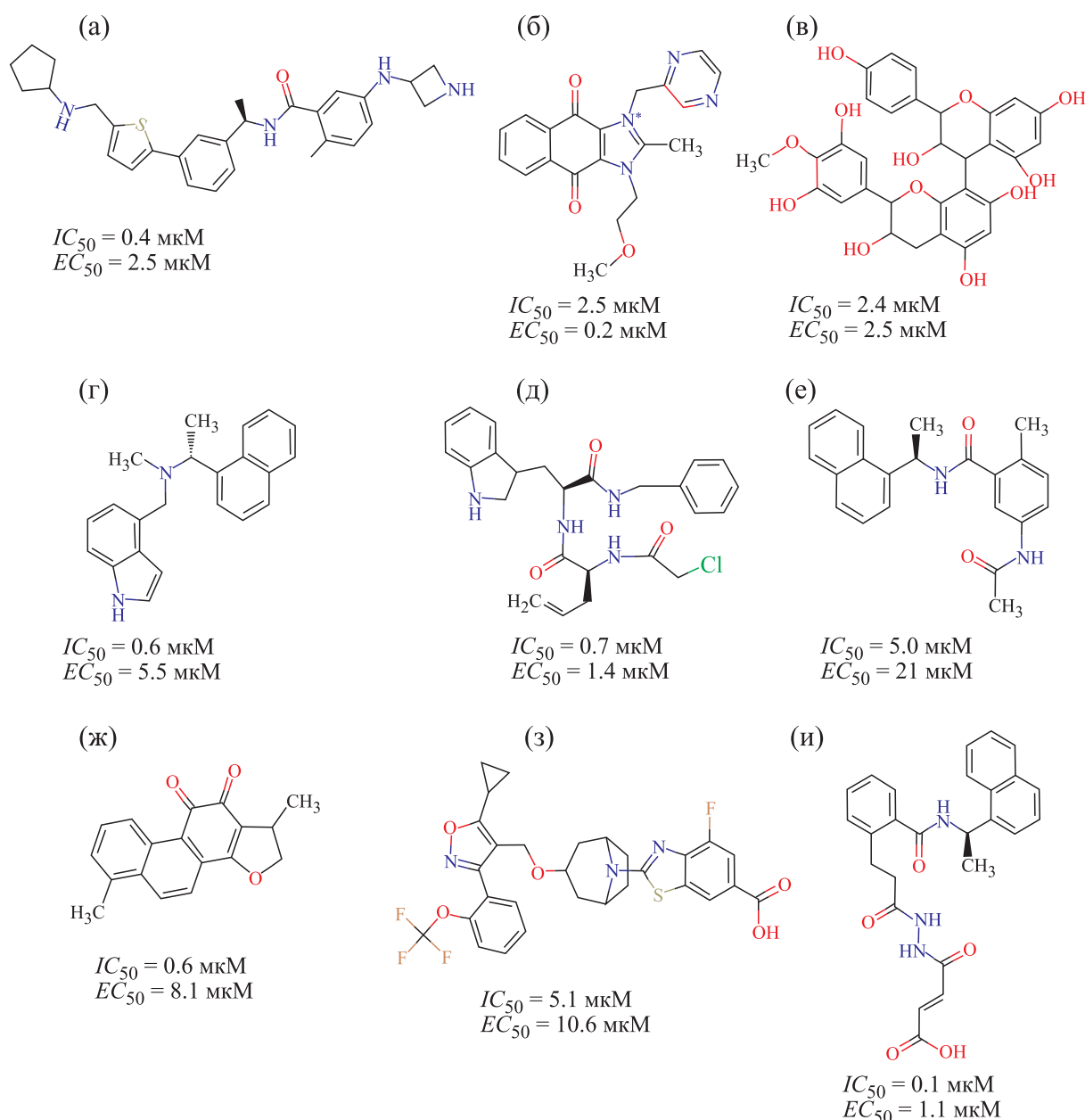


Рис. 2. Цифрами обозначены следующие соединения: (а) – XR8-23, (б) – YM155, (в) – проантоцианидин, (г) – Jun9-75-4, (д) – соединение 29, (е) – соединение 6, (ж) – дигидротаншинон I, (з) – тропифексор, (и) – соединение 7. Лекарствоподобные (от англ. drug-likeness) свойства были предсказаны для соединений (б), (г), (д), (е), (ж) и (и), согласно данным ресурса SwissADME [36].

репликации SARS-CoV-2 по параметрам цитотоксичности (CC_{50}) и полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}). Определение параметров CC_{50} и EC_{50} можно считать более «стандартизованными» ввиду использования одинаковых методик и клеточных моделей (Vero E6, A549, Caco2, Calu3). Что касается значений IC_{50} , то их достаточно сложно сравнивать между собой из разных работ вследствие применения

разных субстратов и композиции биохимических тестов. На рис. 2 представлена выборка низкомолекулярных соединений неперитидной природы, показавших наиболее благоприятный профиль ингибирования по параметрам IC_{50} , CC_{50} , EC_{50} : XR8-23 (рис. 1а) [15], YM155 (рис. 1б) [26], проантоцианидин (рис. 1в) [27], Jun9-75-4 (рис. 1г) [28], соединение 29 (рис. 1д) [23], соединение 6 (рис. 1е) [29], дигидротаншинон I (рис. 1ж) [30], тропифексор (рис. 1з) [31], соединение 7 (рис. 1и)

[32]. Важной характеристикой ингибиторов вирусных ферментов является их побочное действие в отношении клеточных мишеней. Предсказание спектра «нецелевых» клеточных мишеней было выполнено для шести лекарственно-подобных соединений (рис. 2б,г,д,е,ж,и) на веб-серверах SwissTargetPrediction [33], BindingDB [34] и TargetNet (ECFP2, ECFP4, ECFP6, MACCS с AUC=0.95) [35] с отбором гипотез при значении параметра probability score 1. Так, гликогенфосфорилаза была предсказана как потенциальная мишень для соединений, представленных на рис. 2в,е,и; арахидонат-15-липоксигеназа — для соединений, представленных на рис. 2г,е; кальпаин-1 и неприлизин — для соединений, представленных на рис. 2д,и; печеночная карбоксиэстераза 1 — для соединений, представленных на рис. 2е,ж; форболин-1 — для соединений, представленных на рис. 2е,и. Другие белковые мишени были предсказаны в качестве уникальных для каждого из шести соединений, а среднее число мишеней в расчете на одно соединение составило 12 (интервал от 3 до 21). Только три «нецелевых» белковых мишени были предсказаны для соединения, представленного на рис. 2б.

РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ PLpro

Авторы работы [37] изучали ингибиторный потенциал в отношении PLpro SARS-CoV-2 библиотеки из 70 известных ингибиторов деубиквитиных и цистеиновых протеаз. Было установлено, что соединения SJB2-043 (ингибитор убиквитин-специфичной протеазы 1), TCID (ингибитор убиквитин-С-терминальной гидролазы L3) и PR-619 (неселективный ингибитор деубиквитиных) характеризовались значениями IC_{50} , равными 0,6, 6,4 и 6,1 мкМ соответственно. При использовании меченого АМС убиквитина в качестве субстрата PLpro значение IC_{50} составляло 0,09 мкМ в случае SJB2-043, который связывается в периферическом сайте PLpro [37]. Противоопухольевый препарат тарлокситиниб, необратимый ингибитор рецепторных тирозинкиназ EGFR и HER2, продемонстрировал активность в отношении PLpro SARS-CoV-2 ($IC_{50} = 0,3$ мкМ и $K_i = 0,2$ мкМ) по типу конкурентного ингибирования. На клеточной модели гепатокарциномы HUH7 тарлокситиниб снижал на 25% репликацию SARS-CoV-2 в концентрации 10 мкМ, не проявляя значимого цитотоксического эффекта [38]. Лозартан, антагонист рецептора ангиотензина второго типа, подавлял на 50% репликацию SARS-CoV-2 ($EC_{50} \sim 14$ мкМ), однако, ингибирование ферментативной активности PLpro дости-

галось в концентрациях порядка 10^{-4} – 10^{-3} М [39]. В работе [30] было установлено, что соединения с антипролиферативной активностью CAS No. 331253-86-2, CAS No. 265312-55-8 и CAS No. 37854-59-4 ингибировали PLpro со значениями IC_{50} , равными 0,26, 0,39 и 0,53 мкМ соответственно. Тем не менее, только соединение CAS No. 37854-59-4 показало приемлемый уровень подавления вирусной репликации ($EC_{50} = 20$ мкМ) [30].

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ ЦИСТЕИНА PLpro В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ

Цинк-связывающий домен PLpro SARS-CoV-2 (рис. 1) представлен “цистеиновой тетрадой” (Cys189–X–X–Cys192–Xn–Cys224–X–Cys226), координирующей ион цинка. Принято считать, что серосодержащие лекарства активные в отношении PLpro, такие как каптоприл или 6-тиогуанин, могут неселективно “выталкивать” ионы цинка не только из PLpro, но и из клеточных белков [40]. Одно из удачных решений было реализовано в пептидомиметиках, нацеленных на остатки цистеина активного центра PLpro. Примерами были необратимые ингибиторы VIR250 и VIR251, которые образуют ковалентную тиоэфирную связь с остатком цистеина PLpro в положении 111 [41].

ИНГИБИТОРЫ ДВОЙНОГО ДЕЙСТВИЯ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА PLpro И Mpro

Анализ работ в поисках соединений, способных ингибировать сразу обе протеазы SARS-CoV-2, выявил целый ряд кандидатных соединений с определенным фармакологическим потенциалом. Одно из производных халкона (соединение 6, рис. 2е) ингибировало Mpro и PLpro со значениями IC_{50} , равными 11 и 1 мкМ соответственно [22]. Гинкголовая и анакардиновая кислоты, подавляющие репликацию SARS-CoV-2, были идентифицированы в качестве необратимых ингибиторов Mpro и PLpro с IC_{50} 2 и 16 мкМ соответственно, причем при добавлении дитиотреитола значения IC_{50} не изменялись [21]. Соединение 29, подавляющее репликацию вируса (EC_{50} около 1 мкМ), ингибировало обе протеазы SARS-CoV-2 с IC_{50} 0,67–1,72 мкМ и K_D выше 25 мкМ. Молекулярный докинг показал два возможных варианта связывания соединения 29 в активном центре: нековалентное и ковалентное, которое в последнем случае указывает на механизм необратимого ингибирования [23]. Двадцать три производных эбселена, который обладает противовоспалительной, антиоксидантной и цитопротекторной активностью, показали дифференциальный спектр ингибирования PLpro и

Mrpо SARS-CoV-2 в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-6} М [24].

ИНГИБИТОРЫ PLpro ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ

Фармакологически активные агенты пептидной природы, нацеленные на белки репликационного аппарата SARS-CoV-2, представляют немалый интерес для разработки противовирусных лекарств, прежде всего, с точки зрения удобства органического синтеза [42]. В литературе описаны результаты доклинических исследований профилактического вакцинного препарата для интраназального введения с непродолжительным сроком действия на основе липопептида, механизм действия которого заключается в блокаде взаимодействия SARS-CoV-2 с восприимчивыми клетками [43]. Стоит сказать, что сообщения по пептидным ингибиторам PLpro SARS-CoV-2 встречаются значительно реже по сравнению с низкомолекулярными соединениями непептидной природы. Помимо чисто биоинформационного предсказания подобных пептидов [44, 45], есть работы с экспериментальной верификацией компьютерных предсказаний. Так, авторы работы [46] создали конструкции на основе LRGG мотива узнавания PLpro, сшитого посредством химического линкера с ингибитором GRL0617 (IC_{50} порядка 10^{-6} М). В работе [47] было показано, что димерные модифицированные производные пептидов на основе мотива ботропс-токсина I (KKYRYNHLKPFCKK) подавляли репликацию SARS-CoV-2 ($EC_{50} = 28-65$ мкМ) и более специфично ингибировали PLpro ($IC_{50} = 1.0-3.5$ мкМ) в сравнении с Mrpо. Результаты компьютерного моделирования позволили создать модели связывания пептидных ингибиторов с PLpro в области BL2 петли (265-TGNYQCG-271), которая критична для узнавания субстрата и связывания известных низкомолекулярных ингибиторов [47].

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С УЧАСТИЕМ PLpro В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Взаимодействие вирусных белков с клеточными белками играет значимую роль в патогенезе заболевания, поскольку может перепрограммировать естественные процессы для поддержания жизненного цикла вируса. На данный момент имеется достаточно много результатов интерактивного профилирования потенциальных белковых партнеров вирусных белков SARS-CoV-2. Анализ восьми статей [20, 48-54] позволил нам извлечь 472 клеточных белковых партнера PLpro. Однако в целевую группу мы включили 61 белок,

который встречался в двух и более статьях. Функциональный анализ всего спектра потенциальных белковых партнеров PLpro приведен в табл. 1. Большинство белков расположено в цитоплазме и в мембранах эндоплазматического ретикулула. Они выполняют как структурные (например, связывание с микротрубочками, макромолекулами и фосфолипидами), так и ферментативные функции (например, проявление лигазной активности). Далее была проверена биоинформационная гипотеза о том, являются ли клеточные белки, связывающиеся с PLpro коронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV, мишенями для экзогенных белков, появляющихся в клетках при инфицировании/репликации другими вирусами. Поиск таких интерактивных данных и визуализация сети ББВ были выполнены с использованием ресурса Virhostome (http://interactome.dfci.harvard.edu/V_hostome/) [55] на примере вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр и аденовируса (рис. 3). Из рис. 3 следует, что по крайней мере около трети клеточных белков (23 из 61 белка), взаимодействующих с PLpro, являются мишенями для белков других вирусов, что может указывать на «универсальность» выбора клеточных мишеней среди этих трех вирусов и коронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV. Это следует из того, что несколько разных вирусных белков, в том числе и PLpro, взаимодействуют с одной клеточной мишенью (например, MBOAT7, рис. 3). С другой стороны, вирусный белок NPV6B-E5A взаимодействует с шестью разными клеточными белками (FAF2, VMP1, AUP1, SNX19, TMEM43, ARL6IP5) (рис. 3) Таким образом, можно предположить, что если область контакта вирусного белка с клеточными белками представлена одним и тем же структурным элементом, то ее можно рассматривать как мишень для нацеливания фармакологически активных ингибиторов ББВ.

Одиннадцать потенциальных белковых партнеров (MKRN2, MKRN3, RCHY1, FAF2, AUP1, TRIM13, UBE2J1, UFSP2, UFL1, USP3, ZER1), взаимодействующих с PLpro SARS-CoV-2 и SARS-CoV, вовлечены в процессы убиквитинирования и деубиквитинирования. Это хорошо согласуется с кристаллографическими данными о связывании PLpro с убиквитином и белком ISG15 [56-58] и наличием деубиквитиновой активности PLpro. Сеть ББВ с участием 61 вершин (клеточных белковых мишеней PLpro) была смоделирована в программе NetworkAnalyst v. 3.0 [59] (<https://www.networkanalyst.ca/>) с использованием в качестве источников данных IMEx (International Molecular Exchange Consortium) и STRINGdb (Search Tool for the Retrieval of Interacting proteins database). Для каждой из 11 вершин (целевых белков) в сети ББВ (табл. 2) приведены данные по числу связей конкретной вершины с

Таблица 1. Анализ групп клеточных потенциальных белковых мишеней PLpro SARS-CoV-2, представленных терминами генной онтологии (от англ. *gene ontology*)

Группа генной онтологии, $p < 0.05$	%*	Белки представленные в группе
GO:0005783 ~ субклеточная локализация в эндоплазматическом ретикулуме	57	ANKLE2, ATL1, FAF2, STX18, UFSP2, AUP1, UBE2J1, UFL1, SMPD4, TMEM43, DDRGK1, ARL6IP5, CLCC1, SEC63, WLS, OSBPL8, CAMLG, MBOAT7, SURF4, CDKAL1, ACSL3, VRK2, TEX2, VMP1, RINT1, LSG1, STIM1, TMEM214, SOAT1, STIM2, REEP4, TRIM13, ESYT2, DHCR7, SLC27A4
GO:0005737 ~ субклеточная локализация в цитоплазме	85	VEZT, ANKLE2, FMR1, FAF2, UFSP2, AUP1, UFL1, SMPD4, TMEM43, GPBP1, ARL6IP5, CLCC1, SEC63, WLS, CAMLG, AKTIP, USP3, CDKAL1, ACSL3, VRK2, FNDC3A, TEX2, RINT1, LSG1, STIM1, TMEM214, ESPL1, SOAT1, STIM2, TRIM13, SLC27A4, SNAP47, ATL1, STX18, RCHY1, UBE2J1, FXR1, CCNB2, FXR2, DDRGK1, SNX25, OSBPL8, MBOAT7, SURF4, HOOK3, VMP1, TMEM199, SNX19, REEP4, SNX14, ESYT2, DHCR7
GO:0010256 ~ субклеточная локализация в мембранах органелл	20	VMP1, OSBPL8, CCNB2, ANKLE2, TMEM43, REEP4, AKTIP, ATL1, SURF4, STX18, ACSL3, HOOK3
GO:0016874 ~ лигазная активность	11	UFL1, MKRN2, TRIM13, MKRN3, ACSL3, RCHY1, SLC27A4
GO:0035091 ~ участие в связывании с фосфатидилинозитолом	8	OSBPL8, SNX19, SNX25, SNX14, ESYT2
GO:0019787 ~ убиквитино-подобная трансферазная активность	10	UFL1, ZER1, AKTIP, TRIM13, RCHY1, UBE2J1
GO:0005515 ~ участие в связывании с белками	75	VEZT, SNAP47, ANKLE2, GRAMD1A, TEX264, FMR1, ATL1, FAF2, STX18, UFSP2, AUP1, RCHY1, UBE2J1, FXR1, UFL1, CCNB2, FXR2, TMEM43, DDRGK1, SNX25, GPBP1, ARL6IP5, SEC63, WLS, CAMLG, AKTIP, MBOAT7, USP3, SURF4, CDKAL1, ACSL3, VRK2, HOOK3, VMP1, TMEM199, RINT1, SNX19, STIM1, ESPL1, SOAT1, STIM2, REEP4, TRIM13, MKRN2, MKRN3, ESYT2
GO:0008289 ~ участие в связывании липидов	11	OSBPL8, SNX19, SOAT1, SNX25, SNX14, ESYT2, TEX2
GO:0005543 ~ участие в связывании фосфолипидов	8	OSBPL8, SNX19, SNX25, SNX14, ESYT2
GO:0008017 ~ участие в связывании с микротрубочками	6	STIM1, REEP4, FMR1, HOOK3

Примечание. * – Процент белков в группе от общего числа потенциальных белковых мишеней PLpro (61 белок).

другими вершинами в сети и «степени посредничества» (от англ. *betweenness centrality*), который указывает на число кратчайших путей, проходящих через вершину [60]. Из табл. 2 можно видеть, что убиквитин-протеинлигазы RCHY1 и FAF2, а также деубиквитиназы USP3 и UBE2J1, являются белками с наибольшим числом связей в сети ББВ, следовательно, взаимодействие с ними вирусных белков может приводить к изменениям архитектуры значительной части сети ББВ.

Пока отсутствуют кристаллографические модели взаимодействия PLpro с клеточными белками, за исключением убиквитина и белка ISG-15, поэтому концепцию модуляции ББВ с участием PLpro низкомолекулярными соединениями мы рассмотрим далее именно на этих двух белках. Хотя аминокислотные последовательности PLpro SARS-CoV и SARS-CoV-2 обладают высокой гомологичностью, анализ областей контакта PLpro с убиквитином или ISG-15 выполняли для обеих

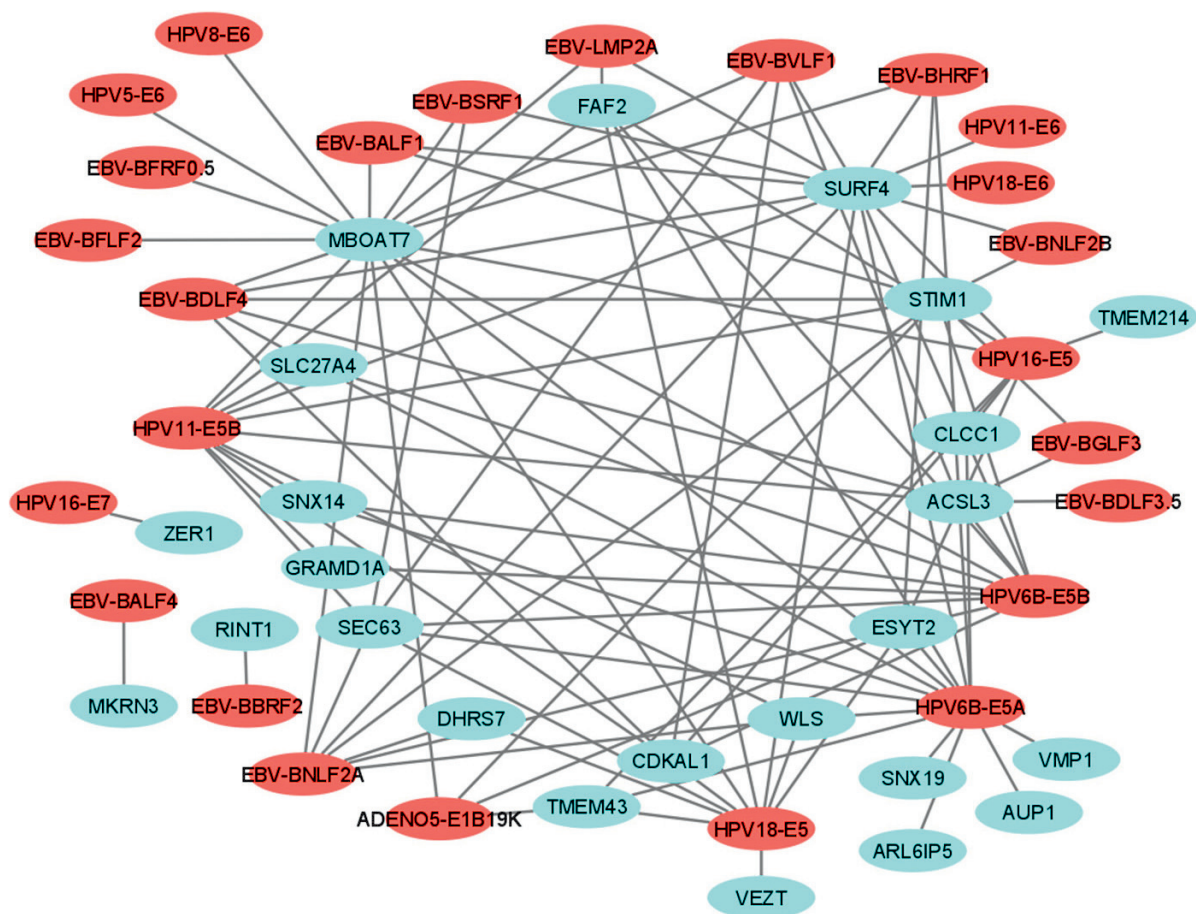


Рис. 3. Репертуар перекрестных белок-белковых взаимодействий с участием клеточных белков, которые могут взаимодействовать с PLpro SARS-CoV (голубой цвет), с белками вируса папилломы человека (HPV), вируса Эпштейна-Барр (EBV) и аденовируса (ADENO) по данным ресурса Virhostome. В качестве поискового запроса был использован список из 61 потенциальной белковой мишени PLpro.

вирусных протеаз. Из табл. 3 следует, что большая часть водородных связей и солевых мостиков в области контакта образуется консервативными аминокислотными остатками (а.к.о.) 163–170 и 265–273 PLpro. Виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов ББВ, способных связываться в области контакта между PLpro и убиквитином (или ISG-15), был выполнен на платформе для компьютерного дизайна лекарств ezCADD среди 154 низкомолекулярных соединений природного происхождения с установленной противовирусной активностью (Catalog No. BCL0032, BioCrick Co., Ltd, КНР) [61]. Наилучшие модели связывания PLpro с 13 соединениями (455–954 Да) были предсказаны в боксе $20 \times 25 \times 20$ с координатами центра ($X = 0$, $Y = 72$, $Z = 40$) и отобраны по значениям «score» меньше -8.0 . Водородные связи между соединениями и а.к.о. PLpro SARS-CoV-2 приведены в табл. 4. Частота встречаемости а.к.о. PLpro, значимых для ее взаимодействия с низкомолекулярными соединениями,

составила 92% (TYR273), 69% (ASP164 и ARG166), 54% (LEU162 и LYS157) и 31% (GLY163, GLU167, TYR264, GLY266 и TYR268). При этом GLY163, ASP164, ARG166, GLU167 и TYR264 PLpro SARS-CoV-2 были вовлечены во взаимодействие с убиквитином и ISG-15 (табл. 3). Результаты компьютерного моделирования в одной из работ указали на то, что соединение (-)-эпигаллокатехингалат образует водородные связи с остатками ASP164 и TYR273 PLpro, что сопоставимо с данными докинга (табл. 3 и 4), а при концентрации 100 мкМ это соединение незначительно (на 13%) снижает активность PLpro [62]. Однако было установлено, что (-)-эпигаллокатехингалат связывается также и с Mpro ($K_D = 6$ мкМ), при этом с более выраженным ингибиторным эффектом ($IC_{50} = 0.8$ мкМ) [63].

Связывание низкомолекулярных соединений с а.к.о. PLpro в области контакта с убиквитином должно затруднять доступ субстрата в активный

Таблица 2. Положение потенциальных белковых партнеров PLpro SARS-CoV и SARS-CoV-2 в сети белок-белковых взаимодействий

Источник данных	IMEX*		STRINGdb**	
	Число связей	«Степень посредничества»	Число связей	«Степень посредничества»
МКRN2	3	436	1	0
UFSP2	3	1249	5	2
ZER1	5	1579	8	6055
TRIM13	13	4819	0	0
UFL1	13	3207	7	871
USP3	26	14776	25	20083
UBE2J1	28	10830	16	6028
AUP1	36	14442	13	2280
МКRN3	50	24427	0	0
RCHY1	60	31175	23	20688
FAF2	69	33358	49	38202

Примечание. * – International Molecular Exchange Consortium (www.imexconsortium.org); ** – Search Tool for the Retrieval of Interacting proteins database (<https://string-db.org/>).

центр и подавлять деубиквитинирование клеточных белков. Пример модели связывания с таким соединением (корилагин) представлен на рис. 4. Как видно из рисунка, корилагин связывается с активным центром PLpro непосредственно в зоне контакта протеазы с убиквитином, при этом значение «score» равно -10.0 (по данным ezCADD) и энергия взаимодействия равна -7.58 ккал/моль (по данным SwissDock) [64]. Также из табл. 3 и 4 можно видеть, что корилагин (согласно модели связывания) в этом положении может образовывать водородные связи с консер-

вативными а.к.о. Gly163, Asp164 и Glu167 PLpro, которые вовлечены в связывание убиквитина. Таким образом, данное низкомолекулярное соединение может ингибировать деубиквитиназную активность PLpro путем создания стерических затруднений для связывания убиквитина и доступа полипептидной цепи к активному центру PLpro. Интересно отметить, что ранее корилагин был идентифицирован как блокатор взаимодействия белка «шипа» SARS-CoV-2 с ACE2 рецептором на поверхности клеток [65]. Воздействие фармакологически активными соединениями на область

Таблица 3. Параметры области контакта PLpro коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 с клеточными белками

Параметр/PD В ID*	Площадь, Å ²	H+-связи	Солевые мостики	S-S-связи	А.к.о. PLpro, вовлеченные в связывание с клеточными белками
4m0w	999	17	4	0	<u>Leu163**</u> , Gly164, Asp165, Glu168, Tyr265, Gly272, Glu162, Arg167, Gln175, Tyr268
5t17	817	12	5	0	Gly163, Asp164, Arg166, Glu167, Tyr264, Gly271, Glu161, Leu162, Ser170, Glu203, Met208, Thr225, Tyr268, Tyr269
6хаа	945	17	7	0	
6ха9	804	11	4	0	

Примечание. * – Параметры области контакта кристаллографических моделей определяли на сервере PDBePISA (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>). 3D-модели: 4m0w и 5t17 – SARS-CoV PLpro/убиквитин и PLpro/ISG-15 соответственно; 6хаа и 6ха9 – SARS-CoV-2 PLpro/убиквитин и PLpro/ISG-15 соответственно; ** – Консервативные а.к.о. выделены подчеркиванием.

Таблица 4. Предсказание аминокислотных остатков PLpro коронавируса SARS-CoV-2, вовлеченных в связывание соединений природного происхождения

№	Название соединения	M_r	CAS No	Аминокислотные остатки
1	(-)-Epigallocatechin gallate	458	989515	ASP164, GLY266, TYR268, TYR273
2	Calceolarioside B	478	105471985	LYS157, LEU162, ASP164, ALA246, GLY266, TYR273
3	Chebulagic acid	954	23094715	GLY163, ASP164, ARG166, GLU167, GLY266, TYR268, TYR273
4	Corilagin	634	23094691	LYS157, GLY163, ASP164, GLU167, TYR273
5	Forsythoside A	624	79916771	LYS157, ASP164, ARG166, GLU167, TYR264, GLY266, TYR273
6	Ganoderiol F	454	114567474	LYS157, ASP164, ARG166, TYR264, ASN267, ASP302
7	Glycyrrhizic acid	819	—	LEU162, ASP164, ARG166, GLU167, TYR264, TYR268, TYR273
8	Hinokiflavone	538	19202369	LEU162, ARG166, TYR273
9	Mulberrofuran G	562	87085005	LEU162, ARG166, TYR273
10	Mulberroside C	458	102841430	LYS157, LEU162, GLY163, ARG166, TYR273
11	Myriceric acid B	634	55497795	LYS157, ARG166, TYR273
12	Procyanidin B1	578	29106512	GLY163, ASP164, ARG166, GLY266, TYR264, TYR273
13	Sennoside A	862	81276	LYS157, LEU162, ASP164, TYR268, TYR273

контакта PLpro с убиквитином и ISG-15 может быть дополнительной антивирусной стратегией, блокируя возможность вируса нарушать есте-

ственную реакцию клетки на его присутствие. Ингибиторы белкового комплексообразования, связывающиеся вне области активного центра

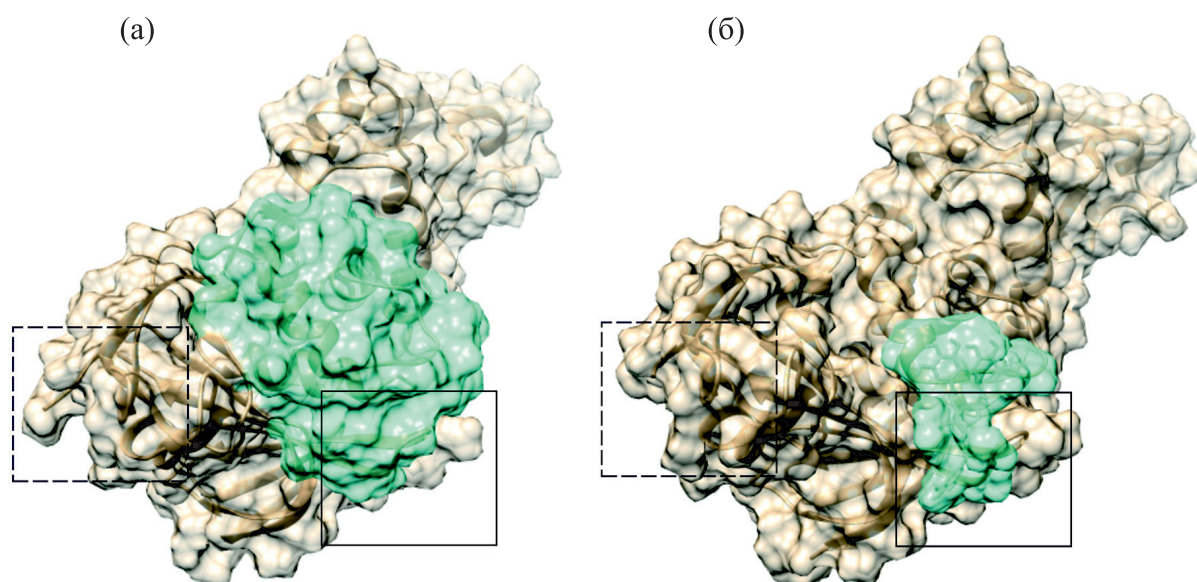


Рис. 4. (а) – Визуализация 3D-модели комплекса PLpro SARS-CoV-2 и убиквитина (PDB ID 6xaa [56], разрешение 2.70 Å, 8.5 кДа). (б) – Модель докинга низкомолекулярного соединения корилагина (630 Да) в область контакта PLpro SARS-CoV-2 и убиквитина (PDB ID: 6wrh [5], разрешение 1.60 Å). Сплошной и пунктирной рамками выделены области активного центра и Zn-связывающего домена соответственно.

PL_{pro}, опосредованно влияют на протеолитическую активность [66]. Последнее актуально также в свете работы [31], в которой на *in silico* моделях связывания PL_{pro} SARS-CoV-2 с тремя соединениями EACC, KY-226 и тропифексором (IC_{50} порядка 10^{-5} – 10^{-6} М) в U-образном кармане протеазы (также сайт связывания контрольного ингибитора GRL0617) была показана вовлеченность а.к.о. Gln269, Asp164, Tyr268, Lys157 в комплексобразовании. Итак, PL_{pro} SARS-CoV-2, может участвовать во взаимодействиях как минимум с 61 клеточными белками, что следует из систематизации интерактомной информации по данным нескольких публикаций, однако, на сегодняшний день кристаллографические модели существуют только для двух комплексов — PL_{pro}/убиквитин и PL_{pro}/ISG-15. Следовательно, пока остается неизученным вопрос, является ли сайт связывания этих двух белков на PL_{pro} уникальным или характерным для позиционирования других потенциальных белковых партнеров. Далее, какое преимущество даст блокирование сайта связывания убиквитина низкомолекулярными соединениями с противовирусной активностью широкого спектра, например, корилагином, и подавление деубиквитиназной активности PL_{pro}? Известно, что вирусные деубиквитиназы нацелены на несколько клеточных процессов, в основном на различные молекулы, вовлеченные в сигнальный путь врожденного иммунитета, тем самым опосредовано подавляя его и стимулируя репликацию вирусов [67, 68]. В основе этих событий лежат несколько причин: деубиквитинирование белков TRAF3 и TRAF6 (факторы, ассоциированные с рецептором TNF) с последующими нарушениями интерферонового сигнального пути и выработкой провоспалительных цитокинов; инактивация пути с участием Toll-подобных рецепторов и универсального транскрипционного фактора NF- κ B, который регулирует экспрессию генов иммунного ответа, в том числе гена интерферона-бета; PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток)-ассоциированная блокада рекрутирования ДНК-полимеразы Nu к сайтам повреждения ДНК и некоторые другие причины [67, 68].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие новых специфичных ингибиторов вирусных протеаз M_{pro} и PL_{pro} SARS-CoV-2 является крайне динамичным и высококонкурентным направлением разработок среди многих научных групп в мире. Большинство экспериментально верифицированных ингибиторов нацелены на активный центр протеаз SARS-CoV-2. В данной работе мы проанализировали ряд перспективных ингибиторов PL_{pro} и выделили, по крайней мере, шесть соединений с благоприят-

ным фармакокинетическим профилем и высоким потенциалом ингибирования согласно значениям IC_{50} и EC_{50} , которые могут быть использованы в качестве базовых структур для создания более специфичных и действенных кандидатных противовирусных лекарственных средств. Но как справедливо отмечают авторы работы [69], несмотря на обнадеживающий прогресс в идентификации по меньшей мере 70 структур ингибиторов PL_{pro} за последние два года, предстоит еще долгий путь для внедрения ингибиторов в клиническую практику. До сих пор не было показано, что рационально разработанные ингибиторы PL_{pro} обладают противовирусной эффективностью *in vivo* против инфекции SARS-CoV-2 на животных моделях.

Систематизация данных по интерактомному профилированию белок-белковых взаимодействий с участием PL_{pro} и клеточных белков позволила выявить 11 клеточных белков, принимающих участие в процессах убиквитинирования и деубиквитинирования. Мы полагаем, что селекция фармакологически активных агентов, нацеленных на периферические сайты PL_{pro}, таких как область контакта PL_{pro} и клеточных белков, может быть альтернативным вариантом противовирусного воздействия на SARS-CoV-2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы), тема № 122030100168-2.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Ganesh, K. Mahalingam, N. Kandaswamy, et al., *Ind. J. Public Health*, **65** (4), 375 (2021).
2. R. M. Barber, R. J. D. Sorensen, D. M. Pigott, et al., *Lancet*, S0140 (2022).
3. M. Mei and X. Tan, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 671263 (2021).
4. Y. M. Báez-Santos, S. E. St John, and A. D. Mesecar, *Antiviral Res.*, **115**, 21 (2015).

5. J. Osipiuk, S.-A. Azizi, S. Dvorkin, et al., *Nat. Commun.*, **12** (1), 743 (2021).
6. X. Gao, B. Qin, P. Chen, et al., *Acta Pharm. Sin. B*, **11** (1), 237 (2021).
7. A. Stasiulewicz, A. W. Maksymiuk, M. L. Nguyen, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (8), 3957 (2021).
8. D. Li, J. Luan, and L. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **538**, 72 (2021).
9. S. Rajpoot, M. Alagumuthu, and M. S. Baig, *Curr. Res. Struct. Biol.*, **3**, 9 (2021).
10. C. Wu, Y. Liu, Y. Yang, et al., *Acta Pharm. Sin. B*, **10** (5), 766 (2020).
11. P. Delre, F. Caporuscio, M. Saviano, et al., *Front. Chem.*, **8**, 594009 (2020).
12. M. Loffredo, H. Lucero, D.-Y. Chen, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 5433 (2021).
13. C. Ma and J. Wang, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **5** (2), 102 (2022).
14. H. Shan, J. Liu, J. Shen, et al., *Cell Chem. Biol.*, **28** (6), 855 (2021).
15. Z. Shen, K. Ratia, L. Cooper, et al., *J. Med. Chem.*, **65** (4), 2940 (2022).
16. D. Shin, R. Mukherjee, D. Grewe, et al., *Nature*, **587** (7835), 657 (2020).
17. N. Barretto, D. Jukneliene, K. Ratia, et al., *J. Virol.*, **79** (24), 15189 (2005).
18. S. G. Devaraj, N. Wang, Z. Chen, et al., *J. Biol. Chem.*, **282** (44), 32208 (2007).
19. X. Chen, X. Yang, Y. Zheng, et al., *Prot. Cell*, **5** (5), 369 (2014).
20. A. Stukalov, V. Girault, V. Grass, et al., *Nature*, **594** (7862), 246 (2021).
21. Z. Chen, Q. Cui, L. Cooper, et al., *Cell Biosci.*, **11** (1), 45 (2021).
22. J.-Y. Park, J.-A. Ko, D. W. Kim, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **31** (1), 23 (2016).
23. V. Di Sarno, G. Lauro, S. Musella, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **226**, 113863 (2021).
24. M. Zmudzinski, W. Rut, K. Olech, et al., *bioRxiv* (2020). DOI:10.1101/2020.08.30.273979
25. C. Ma, Y. Hu, J. A. Townsend, et al., *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **3** (6), 1265 (2020).
26. Y. Zhao, X. Du, Y. Duan, et al., *Prot. Cell*, **12** (11), 877 (2021).
27. C.-J. Kuo, T.-L. Chao, H.-C. Kao, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65** (4), e02577 (2021).
28. Z. Xia, M. D. Sacco, C. Ma, et al., *BioRxiv* (2021). DOI:10.1101/2021.03.15.435551
29. B. T. Freitas, I. A. Durie, J. Murray, et al., *ACS Infect. Dis.*, **6** (8), 2099 (2020).
30. C. T. Lim, K. W. Tan, M. Wu, et al., *Biochem. J.*, **478** (13), 2517 (2021).
31. C. Ma, Y. Hu, Y. Wang, et al., *ACS Infect. Dis.*, **8** (5), 1022 (2022).
32. B. Sanders, S. Pohkrel, A. Labbe, et al., *Res. Square* (2021). DOI: 10.21203/rs.3.rs-906621/v1
33. D. Gfeller, A. Grosdidier, M. Wirth, et al., *Nucl. Acids Res.*, **42** (Web Server issue), W32 (2014).
34. M. K. Gilson, T. Liu, M. Baitaluk, et al., *Nucl. Acids Res.*, **44** (D1), D1045 (2016).
35. Z.-J. Yao, J. Dong, Y.-J. Che, et al., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **30** (5), 413 (2016).
36. A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, *Sci. Rep.*, **7**, 42717 (2017).
37. C.-C. Cho, S. G. Li, T. J. Lalonde, et al., *ChemMedChem*, **17** (1), e202100455 (2022).
38. M. A. Redhead, C. D. Owen, L. Brewitz, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 13208 (2021).
39. R. Nejat, A. S. Sadr, B. Freitas, et al., *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **24**, 390 (2021).
40. B. K. Maiti, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **3** (5), 1017 (2020).
41. W. Rut, Z. Lv, M. Zmudzinski, et al., *Sci. Adv.*, **6** (42), eabd4596 (2020).
42. A. S. Skwarecki, M. G. Nowak, and M. J. Milewska, *ChemMedChem*, **16** (20), 3106 (2021).
43. R. D. de Vries, K. S. Schmitz, F. T. Bovier, et al., *Science*, **371** (6536), 1379 (2021).
44. M. Moradi, R. Golmohammadi, A. Najafi, et al., *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **28** (1), 24 (2022).
45. S. Sasidharan, C. Selvaraj, S. K. Singh, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39** (15), 5706 (2021).
46. N. Liu, Y. Zhang, Y. Lei, et al., *J. Med. Chem.*, **65** (1), 876 (2022).
47. M. C. L. C. Freire, G. D. Noske, N. V. Bitencourt, et al., *Molecules*, **26** (16), 4896 (2021).
48. J. Li, M. Guo, X. Tian, et al., *Med. (NY)*, **2** (1), 99 (2021).
49. E. M. N. Laurent, Y. Sofianatos, A. Komarova, et al., *bioRxiv* (2020). DOI:10.1101/2020.08.28.272955
50. P. Samavarchi-Tehrani, H. Abdouni, J. D. R. Knight, et al., *bioRxiv* (2020). DOI:10.1101/2020.09.03.282103
51. J. R. St-Germain, A. Astori, P. Samavarchi-Tehrani, et al., *bioRxiv* (2020). DOI:10.1101/2020.08.28.269175
52. D.-K. Kim, B. Weller, C.-W. Lin, et al., *bioRxiv* (2021). DOI:10.1101/2021.03.15.433877
53. S. Pfefferle, J. Schöpf, M. Kögl, et al., *PLoS Pathog.*, **7** (10), e1002331 (2011).
54. Z. Chen, C. Wang, X. Feng, et al., *EMBO J.*, **40** (17), e107776 (2021).
55. O. Rozenblatt-Rosen, R. C. Deo, M. Padi, et al., *Nature*, **487** (7408), 491 (2012).
56. T. Klemm, G. Ebert, D. J. Calleja, et al., *EMBO J.*, **39** (18), e106275 (2020).
57. C.-Y. Chou, H.-Y. Lai, H.-Y. Chen, et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **70** (Pt 2), 572 (2014).
58. C. M. Daczkowski, J. V. Dzimianski, J. R. Clasman, et al., *J. Mol. Biol.*, **429** (11), 1661 (2017).

59. G. Zhou, O. Soufan, J. Ewald, et al., *Nucl. Acids Res.*, **47** (W1), W234 (2019).
60. J. K. Das, S. Roy, and P. H. Guzzi, *Infect. Genet. Evol.*, **93**, 104921 (2021).
61. A. Tao, Y. Huang, Y. Shinohara, et al., *J. Chem. Inf. Model.*, **59** (1), 18 (2019).
62. E. Pitsillou, J. Liang, K. Ververis, et al., *J. Mol. Graph. Model.*, **104**, 107851 (2021).
63. A. Du, R. Zheng, C. Disoma, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **176**, 1 (2021).
64. A. Grosdidier, V. Zoete, and O. Michielin, *Nucl. Acids Res.*, **39** (Web Server issue), W270 (2011).
65. L. J. Yang, R. H. Chen, S. Hamdoun, et al., *Phytomedicine*, **87**, 153591 (2021).
66. H. Lee, H. Lei, B. D. Santarsiero, et al., *ACS Chem. Biol.*, **10** (6), 1456 (2015).
67. Q. Zhang, Q. Jia, W. Gao, et al., *Front. Microbiol.*, **13**, 839624 (2022).
68. S. M. Soh, Y.J. Kim, H.H. Kim, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (1), 492 (2022).
69. H. Tan, Y. Hu, P. Jadhav, et al., *J. Med. Chem.*, **65** (11), 7561 (2022).

SARS-COV-2 Coronavirus Papain-like Protease PLpro as an Antiviral Drug Target for Inhibitors of Active Site and Protein-Protein Interactions

P.V. Ershov*, E.O. Yablokov*, Yu.V. Mezentsev*, G.N. Chuev**, M.V. Fedotova***, S.E. Kruchinin***, and A.S. Ivanov*

*V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul. 10/8, Moscow, 119121 Russia

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

***G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Ivanovo, 153045 Russia

The SARS-CoV-2 papain-like protease PLpro is a multifunctional enzyme that catalyzes the proteolytic processing of two viral polyproteins such as pp1a and pp1ab. PLpro also cleaves peptide bonds between host cell proteins and ubiquitin (or ubiquitin-like proteins), probably because of an impaired immune system. Nine structures of the most effective inhibitors for PLpro active site were prioritized based on biochemical (IC_{50}) and cellular data to estimate viral replication suppression (EC_{50}) and cytotoxicity (CC_{50}). The literature review demonstrated that PLpro can interact with no less than 60 potential cellular protein partners, 23 of which are targets for other viral proteins (human papillomaviruses and Epstein-Barr virus). Analysis of protein-protein interactions revealed that USP3, UBE2J1, RCHY1, and FAF2, involved in deubiquitination/ubiquitination process, have the greatest number of bonds with other proteins, and the interaction of viral proteins with these enzymes can impact the architecture of the entire network. Thirteen compounds (molecular weights of 454–954 Da) were predicted using a spatial model of the PLpro/ubiquitin complex and a panel of 154 naturally occurring compounds with known antiviral activity. These compounds bind to the “hot spot” amino acid residues of protease at the positions (Gly163, Asp164, Arg166, Glu167, Tyr264) which are involved in the interaction with ubiquitin. Thus, the pharmacological effect on the peripheral sites of PLpro which play important roles in the binding of protein substrates can be an additional target-based antiviral strategy.

Keywords: SARS-CoV-2, papain-like protease, PLpro, protein-protein interactions, host virus, surface plasmon resonance, inhibitors

ДИМЕРИЗАЦИЯ СВОБОДНОГО И АССОЦИИРОВАННОГО С МЕМБРАНАМИ ФОТОСИСТЕМЫ II БЕЛКА PsbO ПРИ ОБЛУЧЕНИИ УФ-СВЕТОМ

© 2022 г. М.С. Христин*, Т.Н. Смолова*, А.А. Хоробрых*, #

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: andrewkhor@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.08.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Основной функцией белка PsbO в ФСII является стабилизация Mn_4CaO_5 -кластера водоокисляющего комплекса. В работе впервые показано, что кратковременное воздействие УФ-света как на изолированный, так и на мембранносвязанный белок PsbO приводит к его димеризации. Нековалентный димер белка PsbO обнаруживался с помощью гель-фильтрации. Разделение с помощью электрофореза в полиакриламидном геле белков мембран ФСII, освещенных УФ-светом, свидетельствовало об образовании ковалентного димера PsbO, как и в случае изолированного белка PsbO. Образование ковалентного димера PsbO под действием УФ-излучения подтверждает предположение о существовании *in vivo* нековалентного димера PsbO, который может играть стабилизирующую роль в ФСII.

Ключевые слова: УФ-свет, мембраны ФСII, белок PsbO, димеризация, дисульфидная связь, дитиозино-вая связь, электростатическая связь.

DOI: 10.31857/S0006302922060096, EDN: LKETDZ

Фотосистема II (ФСII) представляет собой пигментно-белковый комплекс, локализованный в тилакоидной мембране. Основная функция ФСII — фотоокисление воды и передача электронов от воды в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь. ФСII можно условно разделить на реакционный центр (РЦ), состоящий из белков D1 и D2, на которых располагаются кофакторы переноса электронов; водоокисляющий комплекс (ВОК), имеющий каталитический центр — Mn_4CaO_5 -кластер, и внутренние (CP43 и CP47) и внешние светособирающие комплексы, окружающие РЦ. Реакционный центр преобразует энергию возбужденного хлорофилла в энергию разделенных зарядов ($[P680^{+} \cdot \text{Фео}^{-} \cdot]$) с образованием сильного окислителя $P680^{+} \cdot$ с окислительно-восстановительным потенциалом 1.10–1.27 В [1, 2]. $P680^{+} \cdot$ окисляет Mn_4CaO_5 кластер через редокс-активный тирозиновый остаток белка D1 (TyrZ), который действует как донор

электронов для $P680^{+} \cdot$. В результате последовательного разделения зарядов в РЦ ФСII формируются промежуточные S-состояния Mn_4CaO_5 -кластера (S_0, S_1, S_2, S_3 and S_4). Переход от S_4 к S_0 сопровождается окислением двух молекул воды и выделением O_2 .

Mn_4CaO_5 -кластер окружен внешними белками, которые защищают его от экзогенных восстановителей и служат для оптимизации выделения кислорода. Эти белки включают марганец-стабилизирующий белок (PsbO), который обнаруживается во всех окисленных организмах, белки PsbP и PsbQ, характерные для высших растений и зеленых водорослей, в то время как цианобактерии содержат PsbU и PsbV [3, 4]. В последнее время установлена роль Asp158 белка PsbO в его связывании с ФСII и ее активностью [5], а также необходимость в белке PsbJ для активности ФСII у мутантов *Thermosynechococcus vulcanus*, обедненных люменальными белками PsbO и PsbV [6].

Марганец-стабилизирующий белок PsbO прочно связывается с белками мембран ФСII с люменальной стороны [3] на расстоянии 17 Å от Mn_4CaO_5 -кластера ВОК [7]. Мутанты *Synechocys-*

Сокращения: ФСII – фотосистема II, РЦ – реакционный центр, ВОК – водоокисляющий комплекс, PsbO – марганец-стабилизирующий белок, ПААГ – полиакриламидный гель, ДТТ – дитиотреитол.

tis sp. PCC 6803, лишённые белка PsbO, показывают низкую скорость фотосинтетического выделения кислорода в сравнении с диким типом. При высокой интенсивности света эти мутанты быстро утрачивают способность выделять кислород [8], что свидетельствует о защитной роли белка PsbO при функционировании ФСII в условиях фотоокислительного стресса. Отмытые от внешних белков фрагменты мембран ФСII утрачивают фотосинтетическую активность, а при инкубации с белками, прежде всего с препаратами PsbO, восстанавливают ее [9]. Блокирование генов двух изоформ белка PsbO1 и PsbO2 в *Arabidopsis thaliana* приводит к снижению фотосинтетической активности и обнаружению мономера ФСII при электрофорезе в полиакриламидном геле [10]. Рассматривается также участие белка PsbO в поступлении воды к Mn_4CaO_5 -кластеру и отводе протонов, образующихся при разложении воды, из активного центра ВОК в люмен [3, 11–13]. Было установлено, что в отводе протонов принимают участие карбоксилатные группы глутамата и аспартата, расположенные на поверхности β -цилиндра белка PsbO [14]. Механизм передачи протонов включает релеподобную регуляцию, синхронно связанную с конформационными изменениями белка [15].

Установлено, что на одну ФСII приходится две молекулы белка PsbO [16]. Связывание двух молекул белка с одним реакционным центром ФСII увеличивает скорость выделения кислорода [11]. Доказательство участия нековалентного димера белка PsbO в стабилизации ФСII *in vivo* основано на анализе энергетических и электростатических взаимодействий между двумя молекулами белка [14], а также электронно-микроскопических изображений ФСII в мембранах тилакоидов [17].

Экспериментально обнаружить димер белка PsbO в мембранных фрагментах, обогащенных комплексами ФСII (мембраны ФСII) возможно с помощью химических сшивок, например, карбодимидом, который ранее был успешно использован для сшивки PsbO с CP47 [18]. Однако химический метод сшивок не подтверждает наличие димера белка PsbO в ФСII. Вероятно, условия для обратимой димеризации белка PsbO в растворе и в мембранах ФСII значительно отличаются. Таким образом, вопрос о наличии димера белка PsbO в мембранах ФСII нельзя считать окончательно решенным. Представляется, что использование УФ-света для сшивки димера белка PsbO позволит получить новые данные о его возможном участии в стабилизации ФСII.

УФ-свет, являясь составным компонентом спектра солнечного света, оказывает на растения как положительное, так и повреждающее действие. Известно, что свет диапазона УФ-В поглощается белком psb33, ассоциированным с ВОК

[19], а также белком-рецептором УФ-света UVR 8 [20]. УФ-свет вызывает образование синглетного кислорода, гидроксильных радикалов в мембранах тилакоидов [21]. Нами показано, что в препаратах РЦ ФСII УФ-свет индуцирует выцветание хлорофилла *a*, феофитина, каротиноида, а также изменяет структуру белков, ковалентно сшивает гетеродимер D1-D2 [22]. В результате этих и, возможно, других, еще неизученных механизмов, запускаемых УФ-светом, ингибируется ФСII. Нельзя исключить поглощение света диапазона УФ-В белком PsbO и, как следствие, образование фотомодифицированных форм белка. Это может влиять на структурно-функциональные свойства белка и регулировать фотосинтетическую активность растений.

Настоящая работа посвящена исследованию индуцированной УФ-светом димеризации как свободного, так и связанного с мембранами ФСII белка PsbO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кислород-выделяющие мембраны ФСII получали из хлоропластов гороха и шпината по методу, описанному в работе [23]. Белок PsbO был выделен по методу, описанному в работе [24].

Выделенный белок PsbO и мембраны ФСII освещали ртутно-кварцевой лампой ОКН-11, 950 Вт, (максимумы основных полос излучения паров ртути 253.65 и 435.8 нм), расположенной на расстоянии 150 мм от чашки Петри, в которую наливали раствор образца слоем толщиной в 2–3 мм. Чашку помещали на лед и дополнительно охлаждали поверхность растворов с помощью вентилятора. Такие условия исключали нагрев образца во время УФ-облучения. В отдельных опытах использовали интерференционные фильтры на 260 и 296 нм с полушириной полос в спектре пропускания 10 нм.

Флуоресценцию белка до и после облучения регистрировали с помощью спектрофлуориметра Hitachi-850 (Япония).

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в денатурирующих условиях в градиенте акриламида (12–18%) при комнатной температуре. Образцы белковых фракций после гель-хроматографии осаждали трихлоруксусной кислотой (10%), отмывали ацетоном, центрифугировали и высушивали. Осадок белка растворяли в трис-HCl-буфере (pH 6.8), содержащем 10% сахарозы, 8 М мочевины, 3% додецилсульфата натрия, 0.005% бромфенолового синего, 1% 2-меркаптоэтанола или 5 мМ дитиотреитола (ДТТ).

Гель-фильтрацию белка PsbO проводили на колонке Superdex-75 10/300 (GE Healthcare, Швеция) с использованием жидкостного хроматографа АКТА FPLC (Amersham Biociences, Швеция).

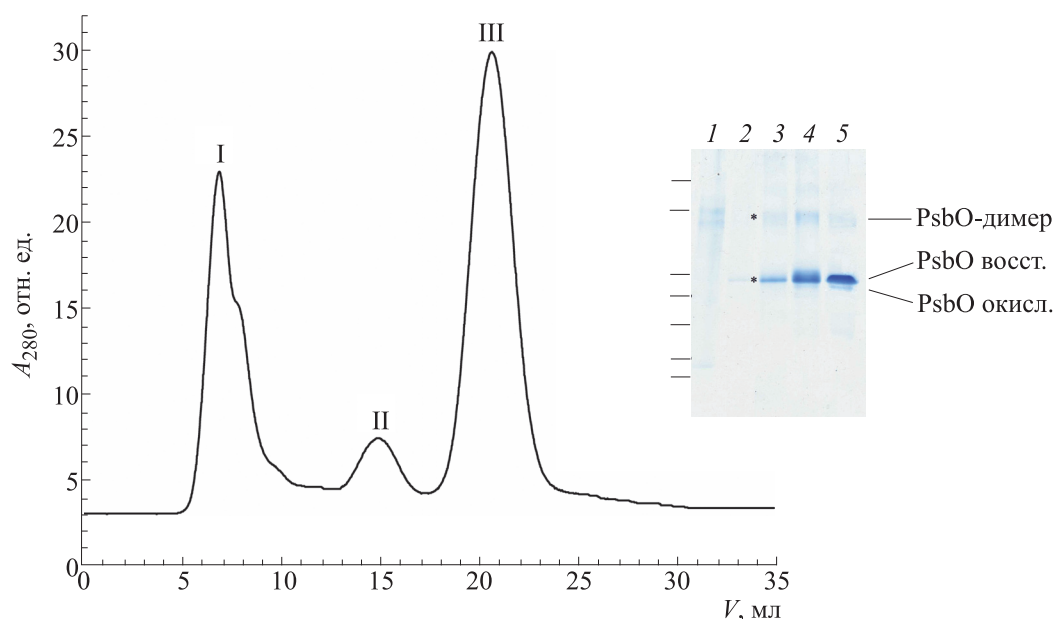


Рис. 1. Профиль гель-фильтрации белка PsbO из шпината на колонке Superdex-75. На врезке – электрофореграммы фракции I без (дорожка 1) и с 5 мМ ДТТ (дорожка 2), фракции II (дорожка 3), фракции III без (дорожка 4) и с 5 мМ ДТТ (дорожка 5). Штрихами слева обозначены белковые маркеры с молекулярными массами 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа; звездочками отмечены димер и мономер фракции I + 5 мМ ДТТ.

Белок PsbO, растворенный в среде А (50 мМ HEPES-NaOH, pH 7.0, 35 мМ NaCl) наносили на колонку Superdex-75 10/300, уравновешенную средой А и элюировали средой А при скорости потока 0.5 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты разделения белка PsbO из шпината на колонке Superdex 10/300 и электрофореза в ПААГ трех (I–III) его фракций. В первой фракции содержится белок с молекулярной массой около 70 кДа, согласно калибровке колонки по стандартам молекулярных масс, приложенным фирмой-производителем. Результаты разделения фракций I–III с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 1, врезка) показали, что фракция I содержит две близкие белковые зоны, незначительно отличающиеся по подвижности. Относительная молекулярная масса этих зон соответствует димеру белка PsbO (рис. 1, дорожки 1 и 2). Во фракциях II и III содержатся мономер и димер белка PsbO (рис. 1, дорожки 3–5). Также следует отметить, что мономер белка PsbO разделяется на две фракции, одна из которых содержит дисульфидную связь и представляет окисленный мономер PsbO, другая – мономер с восстановленной дисульфидной внутрибелковой связью, т.е. вместо дисульфида содержит две сульфгидрильные группы [25].

Инкубация белка фракции I с 5 мМ ДТТ перед электрофорезом приводила к увеличению интен-

сивности полосы (т.е. концентрации белка) в зоне 33 кДа, соответствующей относительной молекулярной массе белка PsbO, и уменьшению интенсивности в зоне, соответствующей его димеру (рис. 1, дорожка 2). Этот факт может свидетельствовать о том, что в геле часть димера белка PsbO содержит дисульфидную связь, а часть димера, не прореагировавшая с ДТТ, вероятно, имеет другой тип ковалентной связи, предположительно дитиозиноновый мостик между двумя молекулами мономера. Он может образоваться при окислительных реакциях, катализируемых ионами металлов и УФ-светом [26].

Как показано на рис. 2, освещение раствора белка PsbO УФ-светом в течении 5 мин приводит к снижению интенсивности флуоресценции при 310 нм при возбуждении светом 280 нм, а также смещению спектра флуоресценции в длинноволновую область, что характерно для денатурированного белка PsbO, когда единственный остаток триптофана (Трп) становится доступным для света. Для белка PsbO известна особенность флуоресценции единственного остатка Трп [27]. Максимальная эмиссия флуоресценции приходится примерно на 317 нм, что указывает на сильно гидрофобное окружение этого остатка в молекуле белка PsbO. Освещение светом 295 нм возбуждает только остаток Трп, а светом 280 нм – и этот остаток, и остатки восьми остатков тирозина (Тир).

Освещение УФ-светом и разделение электрофорезом в ПААГ показывают также образование

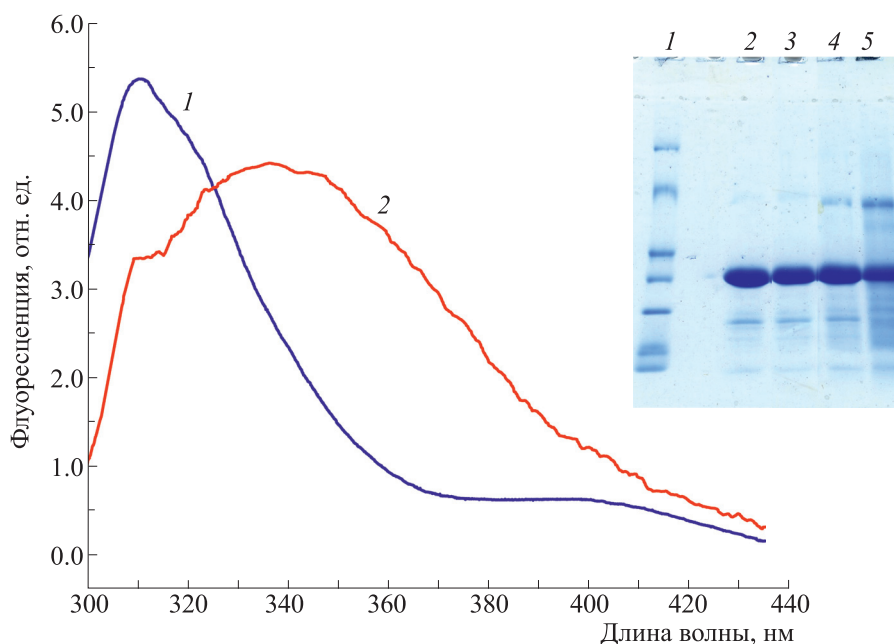


Рис. 2. Спектры флуоресценции ($E_x = 280$ нм) белка PsbO из гороха до (спектр 1) и после (спектр 2) пятиминутного облучения УФ-светом. На врезке – электрофореграммы исходного белка (дорожка 2), после облучения УФ-светом в течение 1 мин (дорожка 3), 2 мин (дорожка 4) и 5 мин (дорожка 5); дорожка 1 – белковые маркеры с молекулярными массами 116,0, 66,2, 45,0, 35,0, 25,0, 18,4, 14,4 кДа. Освещение образца проводили светом интенсивностью $54,3$ мкмоль фотонов·м⁻²с⁻¹ с помощью ртутно-кварцевой лампы (ОКН-11).

димера PsbO (рис. 2, дорожки 3–5). Связь между двумя молекулами белка формируется в результате фотохимического образования радикала Тир, локализованного на поверхности молекулы белка. Столкновение двух молекул, каждая из которых содержит на поверхности радикалы Тир, создает условия для формирования связи Тир–Тир. На рис. 3 представлен спектр флуоресценции белка PsbO, освещенного УФ-светом в течение 5 мин. Видно, что возбуждение белка светом с длиной волны 325 нм выявляет максимум флуоресценции при 410 нм, что соответствует дитиозину (согласно флуоресцентному методу определения дитиозина [28]).

Исследование влияния УФ-света на белки предусматривает, как правило, использование УФ фильтров, пропускающих свет определенного диапазона, что позволяет учитывать природу аминокислот в структуре белка. На рис. 4 представлены результаты электрофореза белка PsbO после освещения с использованием фильтров, пропускающих свет 276 нм (рис. 4, дорожки 3–6) и 290 нм (рис. 4, дорожки 7–10) по отношению к контрольному варианту (рис. 4, дорожка 2). Заметное увеличение содержания белка PsbO в полосе димера наблюдается после 5 и 10 мин освещения белка с использованием фильтра 276 нм (рис. 4, дорожки 5 и 6) и после 10 мин освещения с использованием фильтра 290 нм (рис. 4, дорожка 10). Так как диаметр и толщина обоих

фильтров, а также расстояние от УФ-лампы до поверхности освещаемых препаратов были одинаковыми, выявленное различие (заметное увеличение интенсивности полосы димера) обусловлено длиной волны и интенсивности УФ-света (для фильтра на 260 нм – $39,5$ мкмоль фотонов·м⁻²с⁻¹ и на

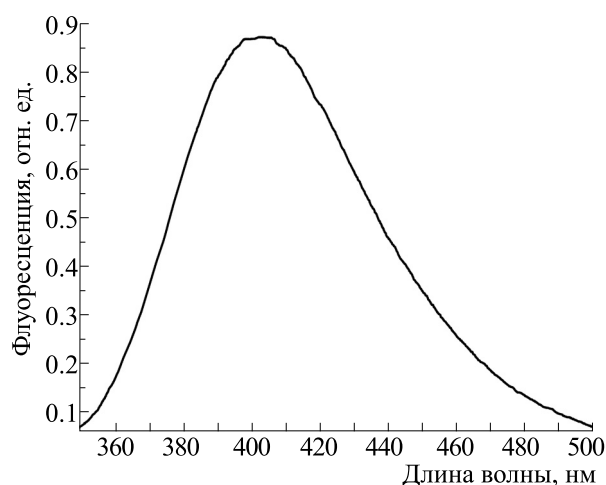


Рис. 3. Спектр флуоресценции ($E_x = 325$ нм) освещенного УФ-светом белка PsbO из гороха. Освещение образца проводили светом интенсивностью $54,3$ мкмоль фотонов·м⁻²с⁻¹ с помощью ртутно-кварцевой лампы (ОКН-11) в течение 3 мин.

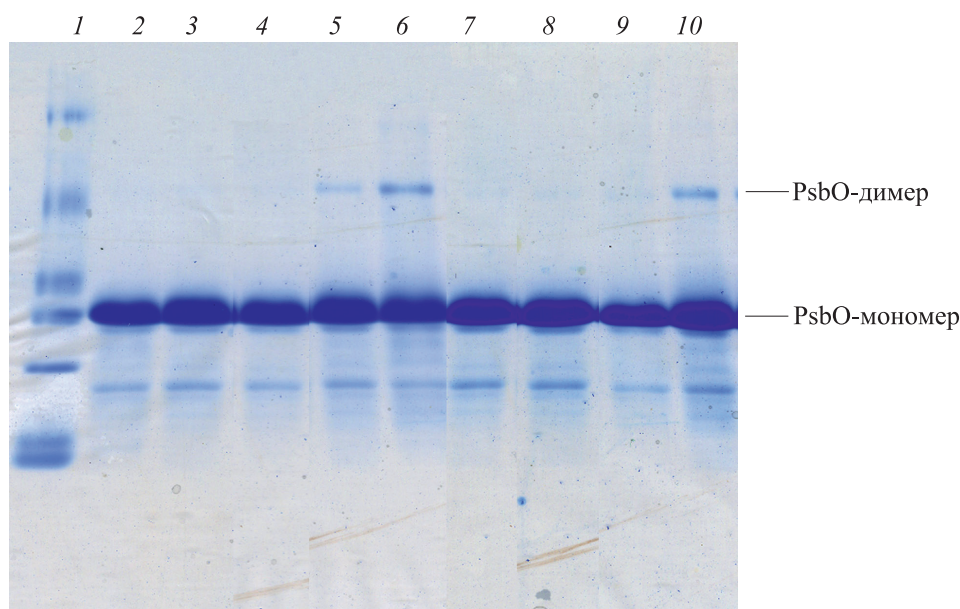


Рис. 4. Электрофореграммы белка PsbO из гороха до (дорожка 2) и после облучения УФ-светом через фильтры 260 нм в течение 1 мин (дорожки 3 и 7 соответственно), 5 мин (дорожки 5 и 9 соответственно) и 10 мин (дорожки 6 и 10 соответственно).

290 нм – $27.2 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Частично разница может быть за счет разного коэффициента поглощения при 260 и 290 нм.

Индукцированная УФ-светом димеризация белка PsbO была также исследована в мембранных препаратах ФСII, обработанных 1 М NaCl

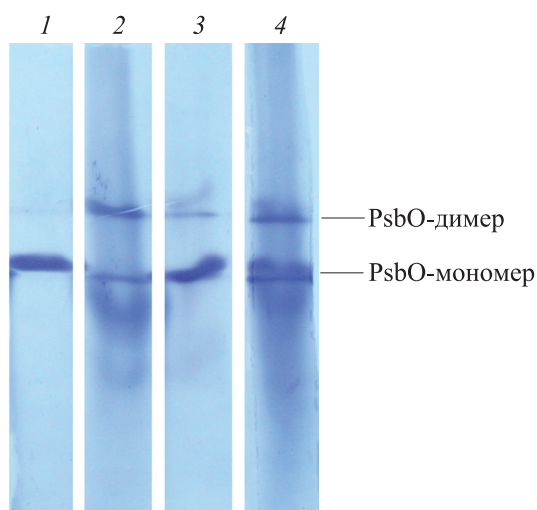


Рис. 5. Электрофореграммы белка PsbO (дорожка 1); белка PsbO, экстрагированного из мембранных препаратов ФСII, предварительно освещенных УФ-светом (дорожка 2); белка PsbO, освещенного УФ-светом в течение 5 мин (дорожка 3); белка PsbO, экстрагированного из освещенных УФ-светом мембранных препаратов ФСII + белок PsbO (дорожка 4).

для удаления белков PsbP и PsbQ ВОК. Предполагалось, что удаление внешних белков PsbP и PsbQ, находящихся на достаточно близком расстоянии от PsbO, может способствовать большей доступности УФ-света к белку PsbO. Кроме того, отмывка внешних белков PsbP и PsbQ от мембран с помощью 1 М NaCl частично удаляет белок PsbO, вероятно, ту его часть, которая находится в люмене в не связанном с мембранами состоянии. Такой белок можно добавить к отмывкам 1 М NaCl препаратам ФСII перед освещением УФ-светом с тем, чтобы наблюдать эффект димеризации белка в условиях, когда часть белка связана с мембранами ФСII, а другая часть находится в растворимой форме. Кроме того, нельзя исключить редокс-взаимодействие между связанными с мембранами и растворимыми мономерами PsbO.

На рис. 5 представлены результаты электрофореза растворимого (рис. 5, дорожки 1 и 3) и связанного с мембранами ФСII (рис. 5, дорожки 2 и 4) белка PsbO до (рис. 5, дорожка 1) и после (рис. 5, дорожки 2 и 4) облучения УФ-светом. К мембранам ФСII, содержащим связанный белок PsbO, после освещения добавляли растворимый белок PsbO. Как видно из рис. 5, полосы мономера и димера белка PsbO во всех вариантах опыта (свободный необлученный УФ-светом белок PsbO; облученные УФ-светом мембраны ФСII, содержащие связанный белок; облученный УФ-светом белок PsbO; свободный необлученный белок PsbO, добавленный к облученным мембранам ФСII, содержащим связанный белок PsbO) совпадают по подвижности, что исключает ошиб-

ку в идентификации образовавшегося димера белка после освещения препаратов ФСII (рис. 5, дорожка 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новые знания о влиянии УФ-света на структурно-функциональную организацию ФСII важны для более глубокого понимания механизмов повреждения и адаптации растений к возрастающей на Земле интенсивности УФ-света связанного с истощением озонового слоя [29] и потеплением климата. УФ-свет поглощается ароматическими кислотными остатками белков (прежде всего, Тир и Трп), липидами, нуклеиновыми кислотами, что усиливает окислительный стресс в ФСII и, таким образом, ингибирует фотосинтез [21, 30]. В настоящей работе получены данные, свидетельствующие о способности полихроматического (рис. 2) и монохроматического (рис. 4) УФ-света активировать димеризацию изолированного белка PsbO. Неожиданным явилось образование димеров без воздействия на белок УФ-света. Так, при хроматографии неосвещенного УФ-светом изолированного белка PsbO на гель-фильтрационной колонке (рис. 1) были обнаружены мономеры и димеры белка. Было предположено, что в процессе разделения происходит обратимая димеризация и мономеризация белка. Образование димеров также наблюдается при электрофорезе в ПААГ фракций белка, полученных при его хроматографии на колонке Superdex-75 (рис. 1). Димеризация при электрофорезе, вероятно, связана с тем, что на границе концентрирующего и разделяющего гелей мономерный белок концентрируется в узкую зону при pH 6.8 и димеризуется, а затем движется в разделяющем геле с pH 8.5. Электрофорез белков в гелях, приготовленных с использованием персульфата аммония, происходит в условиях, благоприятных для окисления цистеина [31], что способствует димеризации белка с участием цистеинов и в связи с этим приводит к возникновению артефактов. Учитывая это, мы проводили предэлектрофорез без белков для удаления персульфата, заменяли электродные буферы на свежие и затем наносили белковые растворы в ячейки гелевого блока. После окрашивания белков в гелях красителем Ку-масси и при наличии димерной полосы белка наблюдается шлейф, направленный от димера к мономеру (рис. 2, врезка, дорожка 5), что можно объяснить мономеризацией димера в процессе электрофореза. Такой эффект наблюдается при электрофорезе рекомбинантного хемокина, содержащего четыре цистеина [32].

Таким образом, сравнивая собственные результаты электрофореза PsbO с литературными данными, можно заключить, что димер с межмолекулярной дисульфидной связью формируется в

результате взаимодействия цистеинов белка с окислителями, например, персульфатом аммония, который используется в качестве окислителя при полимеризации гелей для электрофореза. В ФСII такими окислителями являются радикальные формы кислорода [33], образующиеся во время освещения препаратов ФСII видимым светом.

Межбелковые сшивки в изолированных тилакоидах хлоропластов при освещении видимым светом наблюдаются только при температуре 40°C [34]. В цитируемой работе иммуноблотинг белков в ПААГ специфическими антителами против белка PsbO показал образование нескольких дополнительных полос после освещения при температуре 40°C, одна из которых соответствует мономеру белка. Снижение компактности и формы зоны мономера белка в полосах после обработки мембран белым светом интерпретируются авторами работы [35] как повреждение структуры белка PsbO гидроксильными радикалами (OH^\bullet), образующимися в реакции перекиси водорода с ионами переходных металлов. Мы наблюдали расширение и раздвоение зоны мономера белка PsbO в присутствии окислителей (H_2O_2 , феррицианида), восстановителей (ДТТ, 2-меркаптоэтанол), а также при электрофорезе. Так как эти изменения обратимы, можно говорить о структурных изменениях белка, связанных с редокс-состоянием Цис, Трп и Тир. Возможно, димеры, способные к мономеризации, образуются в гелях при электрофорезе в результате окислительно-восстановительных изменений дисульфидной связи. Димер белка PsbO, в котором молекулы связаны между собой в результате индуцированного УФ-светом образования дитиозина, не подвергается мономеризации. Такие димеры, вероятно, подвергаются протеолитической деградации *in vivo*. Важным подтверждением образования дитиозинового мостика является обнаружение специфической флуоресценции (рис. 3). В литературе описаны результаты восстановления дисульфидной связи инсулина и вазопрессина с помощью УФ-света [36]. В их восстановлении, вероятно, принимает участие возбужденный Трп [37]. По аналогии с этими работами мы также не исключаем возможность восстановления дисульфидной связи при облучении УФ-светом и последующего их окисления с образованием межбелковой дисульфидной связи.

Индукцированное УФ-светом образование дитиозина эффективно используется для межмолекулярных сшивок белков в научных исследованиях и решении практических задач. По предположению исследователей [38] определение ковалентных сшивок белков в растениях методом электрофореза в ПААГ является информативным и ценным тестом для определения чувствительности растений к УФ-свету. Сшитые белки могут

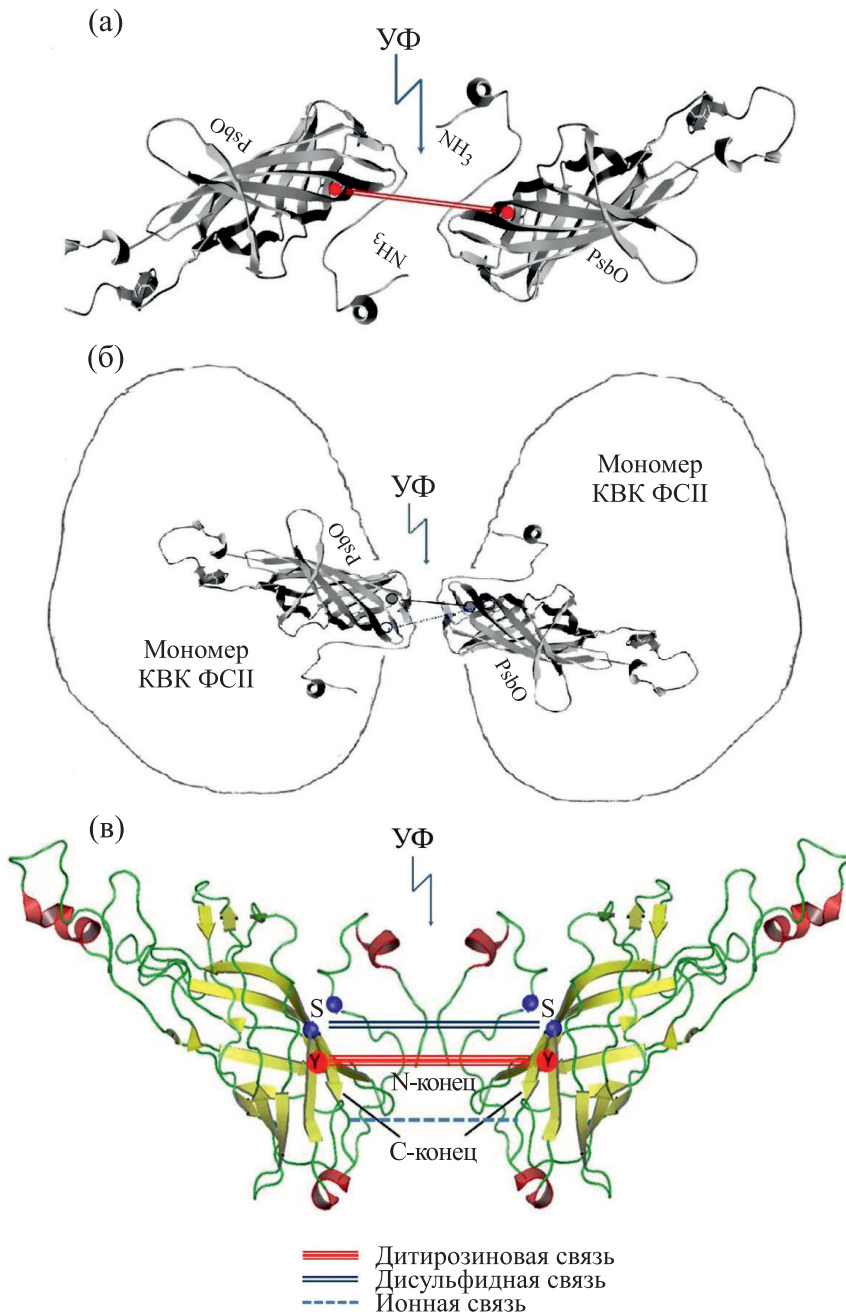


Рис. 6. Схема предполагаемого образования дитирозиновой и дисульфидной связи в димере белка PsbO при облучении УФ-светом в растворе (а), ассоциированного с ВОК (б) и с димерами ФСII в мегакомплексах тилакоидов (в). Модель белка PsbO взята из Data Bank entry 3ARC³⁰, модель димера PsbO в мегакомплексе – согласно работе [14].

функционировать в растениях и обладать повышенной устойчивостью к стрессам. Эта идея подтверждается многочисленными примерами сшивания белков с помощью химических и физических методов при моделировании и создании искусственного фотосинтеза, био-фототранзисторов на основе фотосинтетических белков.

На рис. 6 представлена гипотетическая схема индуцированной УФ-светом димеризации сво-

бодного белка PsbO (рис. 6а) и в составе димера ВОК ФСII (рис. 6б), а также его участия в образовании мегакомплексов ФСII (рис. 6в). Такая димеризация белка PsbO, вероятно, происходит не только в препаратах изолированного белка, но и в фотосинтезирующих организмах растений, бактерий, водорослей. Пока в литературе недостаточно экспериментальных данных, позволяющих глубже понять физиологическую роль этой, без-

условно важной, структурно-функциональной перестройки белков. Накопленные литературные данные и результаты, представленные нами в этой работе, позволяют предположить, что УФ-свет активирует перестройку белка PsbO, изменяя его структурную организацию. Предполагается, что нековалентные связи между мономерами белка PsbO участвуют в организации димеров ФСЦ. В этом случае образование дитиозиновых димеров белка PsbO, индуцированное УФ-светом, может быть вовлечено в этот процесс. Пока неясно, связано ли образование дитиозиновых связей со стабилизацией ВОК при действии УФ-света или их образование свидетельствует о повреждении, и таким образом является маркером стресса ФСЦ. В настоящее время отсутствуют сведения о возможности деполимеризации индуцированных УФ-светом димеров белка. Изучение механизмов деполимеризации белков, кроме научного, может также иметь практическое значение при конструировании искусственного фотосинтеза и в медицине. Например, проблема лечения болезни Паркинсона, молекулярным механизмом которой является активируемая окислительным стрессом ковалентная полимеризация си-нуклеина с образованием его дитиозиновых димеров, до последнего времени не решена, так как невозможно подобрать лекарственное средство, которое могло бы активировать деполимеризацию димеров и агрегатов (телец Леви) в клетках нейронов.

Таким образом, исследуя димеризацию УФ-светом, мы предполагаем возможность образования трех типов димера белка PsbO *in vitro*, различающихся по типу связи между двумя мономерами: электростатической, дитиозиновой и дисульфидной. Возможность образования ковалентного димера белка в виде двух популяций, в одной из которых связь мономеров дитиозиновая, а в другой дисульфидная подтверждается масс-хроматографическим анализом пептидов препарата α -лактальбумина, облученного УФ-светом [39].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100274-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Климов, С. И. Аллахвердиев, Ш. Деметер и др., Докл. АН СССР, **49**, 227 (1979).
2. H. Ishikita, B. Loll, J. Biesiadka, et al., *Biochemistry*, **44**, 4118 (2005).
3. T. M. Bricker, J. L. Roose, R. D. Fagerlund, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 121 (2012).
4. K. Ifuku and T. Noguchi, *Front. Plant Sci.*, **7**, 84 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.00084
5. Q. Zhu, Y. Yang, Y. Xiao, et al., *Photosynth. Res.*, **146** (1–3), 29 (2020).
6. P. Chao, J. A. Forsman, L. Hui, et al., *Photosynth. Res.*, **151** (1), 103 (2022).
7. A. R. Offenbacher, B. C. Polander, and B. A. Barry, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29056 (2013).
8. S. R. Mayes, K. M. Cook, S. J. Self, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1060** (1), 1 (1991).
9. Н. И. Шутилова, И. Г. Кадошникова, Т. Н. Смолова и др., *Биохимия*, **52** (12), 1958 (1987).
10. B. Lundin, M. Nurmi, M. Rojas-Stuetz, et al., *Photosynth. Res.*, **98**, 405 (2008).
11. H. Popelkova and C. F. Yocum, *J. Photochem. Photobiol.*, **104**, 179 (2011).
12. А. В. Пиголев и В. В. Климов, *Биохимия*, **80** (6), 785 (2015).
13. R. Hussein, M. Ibrahim, A. Bhowmick, et al., *Nature Commun.*, **12** (1), 6531 (2021).
14. L. M. Gerland, D. Friedrich, L. Hopf, et al., *ChemBioChem*, **21**, 1597 (2020).
15. C. del Val and A.-N. Bondar, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858** (6), 432 (2017).
16. J. L. Roose, C. F. Yocum, and H. Popelkova, *Biochemistry*, **50**, 5988 (2011).
17. M. Li, J. Ma, X. Li, et al., *eLife*, **10**, e69635 (2021). DOI: 10.7554/eLife.69635
18. A. Seidler, *Eur. J. Biochem.*, **242**, 485 (1996).
19. R. Fristedt, A. Herdean, C. E. Blaby-Haas, et al., *Plant Physiol.*, **167** (2), 481 (2010).
20. D. J. Kliebenstein, J. E. Lim, L. G. Landry, et al., *Plant Physiol.*, **130**, 234 (2002).
21. É. Hideg and I. Vass, *Plant Sci.*, **115** (2), 251 (1996).
22. О. В. Никитишена, М. С. Христин, Т. Н. Смолова и др., *Биохимия*, **62**, 1280 (1997).
23. D. A. Berthold, G. T. Babcock, and C. F. Yocum, *FEBS Lett.*, **134**, 231 (1981).
24. О. В. Pobeguts, Т. Н. Smolova, D. S. Timoshevsky, et al., *J. Photochem. Photobiol.*, **100** (1), 30 (2010).
25. M. Karamoko, S. Cline, K. Redding, et al., *Plant Cell*, **23**, 4462 (2011).
26. M. B. Maina, G. Burra, Y. K. Al-Hilaly, et al., *iScience*, **23** (10), 101537 (2020).
27. K. Ruan, J. Li, R. Liang, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 593 (2002).
28. D. A. Malencik and S. R. Anderson, *Amino Acids*, **25**, 233 (2003).
29. J. B. Kerr and C. T. McElroy, *Science*, **262** (5136), 1032 (1993).
30. G. Renger, M. Volker, H. J. Eckert, et al., *J. Photochem. Photobiol.* **49** (1), 97 (1989).

31. C. Achilli, A. Ciana, and G. Minetti, *J. Biol. Methods*, **5** (4), e104 (2018)
32. M. K. Crow, N. Karasavvas, and A. H. Sarris, *Biotechniques*, **30** (2), 311 (2001).
33. P. Pospíšil, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787** (10), 1151 (2009).
34. A. K. Singh, G.S. Singhal, *Photosynthetica*, **36**, 213 (1999).
35. T. Henmi, M. Miyao and Y. Yamamoto, *Plant Cell Physiol.*, **45**(2), 243 (2004).
36. S. K. Gammelgaard, S. B. Petersen, K. F. Haselmann, et al., *ACS Omega*, **5**, 7962 (2020).
37. E. A. Permyakov, S. E. Permyakov, G. Y. Deikus, et al., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **51**, 498 (2003).
38. N. Shanthi, K. Lingakumar, and G. Kulandaivelu, *J. Global Biosci.*, **4** (4), 1996 (2015).
39. Z. Zhao, K. Engholm-Keller, M. M. Poojary, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **68** (24), 6701 (2020).

Dimerization of the Free and Photosystem II-Associated PsbO Protein upon Irradiation of UV Light

M.S. Khristin*, T.N. Smolova*, and A.A. Khorobrykh*

*Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The main function of the PsbO protein in photosystem II is to stabilize the water-oxidizing Mn₄CaO₅ cluster. The present study shows for the first time that short-term exposure of both isolated and membrane-bound protein PsbO to UV light led to protein dimerization. A non-covalent dimer of the PsbO protein was detected by gel filtration. The electrophoretic separation of proteins of PSII membrane fragments illuminated with UV light using a polyacrylamide gel was indicative of the formation of the covalent dimer of the PsbO protein, as with the isolated PsbO protein. The formation of the covalent dimer of the PsbO protein exposed to UV light confirms the assumption about the existence in vivo of a non-covalent dimer of the PsbO protein that may play a regulatory role in PSII.

Keywords: UV light, PSII membranes, PsbO protein, dimerization, disulfide bond, tyrosine bond, electrostatic bond

УДК 615.45

ВКЛАД ФОСФОЛИПИДОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ В ФОРМИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

© 2016 г. Л.А. Минасбекян*., А.В. Неркарарян*

*Ереванский государственный университет, ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения

#E-mail: minlia@ysu.am

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 01.05.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Изучен электрокинетический потенциал изолированных клеточных ядер, полученных из проростков семян пшеницы, предварительно облученных неионизирующим электромагнитным излучением крайне высоких частот. Электрокинетический потенциал является важным фактором в протекании многих биологических процессов и, возможно, играет немаловажную роль в формировании ответа биологических организмов на электромагнитные волны. Показано увеличение абсолютных значений электрокинетического потенциала изолированных клеточных ядер проростков пшеницы с -7.7 мВ до -131.6 мВ в градиенте электрического поля под воздействием электромагнитного излучения крайне высоких частот, в диапазоне частот 46.0 – 50.3 ГГц. Выявлены однонаправленные изменения величин электрокинетического потенциала под воздействием подобного излучения, что объясняется нами увеличением разности потенциалов между ядерной мембраной и матриксом ядра. Показано также, что между величинами электрокинетического потенциала изолированных клеточных ядер, обработанных электромагнитным излучением крайне высоких частот в условиях *in vivo* и *in vitro*, имеются резкие различия. Выявлено, что величина изменений значений электрокинетического потенциала ядер, индуцированных воздействием электромагнитного излучения крайне высоких частот в *in vivo* условиях намного превосходит величину электрокинетического потенциала изолированных ядер, обработанных электромагнитным излучением той же частоты в *in vitro* условиях, что подтверждает пролонгированное действие электромагнитного излучения крайне высоких частот. Мы обсуждаем модуляции величины электрокинетического потенциала в зависимости от изменения разности между содержанием анионных фосфолипидов в ядерной оболочке и растворимой ядерной фракции, возникающей под действием электромагнитного излучения крайне высоких частот, что приводит к изменению поверхностного заряда ядерной мембраны, электрокинетического потенциала ядер и формированию более компактного двойного электрического слоя.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высоких частот, изолированные ядра проростков пшеницы, растворимая ядерная фракция, фосфолипиды, ядерная оболочка, электрокинетический ζ -потенциал.

DOI: 10.31857/S0006302922060102, EDN: LKFGZB

С развитием современных цифровых технологий наше жизненное пространство наполняется электромагнитными полями широкого спектра, источниками которых являются компьютеры, мобильные телефоны, антенны – усилители сотовой связи, а также различное медицинское оборудование. Проблема электромагнитной безопасности для человека и всех живых организмов становится чрезвычайно актуальной, поскольку большинство медицинских приборов и технических устройств излучают электромагнитные излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) в

диапазоне 30 – 300 ГГц, соответствующие миллиметровому диапазону волн [1, 2].

Предполагается, что многие структурные изменения, вызванные воздействием такого стрессорного фактора как ЭМИ миллиметрового диапазона, в основном носят эпигенетический характер. Однако Международное агентство по исследованию рака ВОЗ (WHO/IACR) классифицировала миллиметровые волны как потенциально канцерогенный фактор для здоровья людей [3–5]. Большинство исследований направлено на изучение влияния повышения интенсивности данного фактора на жизнедеятельность и поведение животных, поскольку с развитием различных технологий у людей возникли проблемы со здо-

Сокращения: ЭМИ КВЧ – электромагнитное излучение крайне высоких частот, ЭКП – электрокинетический потенциал, ФЛ – фосфолипиды.

ровьем [5], хотя данные на сегодняшний день все еще противоречивы [6], что объясняется во многих случаях исследованиями, проводимыми в *in vitro* условиях, а удельная мощность воздействия в экспериментах ниже действующих стандартов сотовой связи, равной 100 Вт/м^2 [4].

На растениях также проводились и проводятся многочисленные эксперименты, поскольку растения являются подходящей моделью по сравнению с животными для проведения таких исследований: они неподвижны и поэтому сохраняют постоянную ориентацию относительно источника ЭМИ, а их специфическая схема развития (высокое отношение площади поверхности к объему) делает их идеально подходящими для эффективного поглощения ЭМИ [7]. В исследованиях было обнаружено, что облучение ЭМИ миллиметрового диапазона улучшало рост корней/гипокотили и устойчивость сои к стрессу затопления [8]. Под воздействием ЭМИ КВЧ происходят эпигенетические изменения в геноме, что способствует фенотипической пластичности постэмбрионального развития растений и способности выживать, адаптироваться и размножаться в непредсказуемых изменяющихся условиях среды [9–12]. Как показывают исследования, под воздействием среды наибольшую нагрузку в первую очередь несут мембранные структуры клетки, такие как: плазматическая мембрана, ядерная оболочка, мембраны митохондрий и эндоплазматическая сеть [13, 14]. Именно поэтому объектом наших исследований является ядерная мембрана проростков пшеницы, являющаяся хорошей моделью для исследования воздействий ЭМИ КВЧ на структуру и электрокинетический потенциал (ЭКП) ядер в градиенте электрического поля.

Электрокинетический или ζ -потенциал определяется как средний электростатический потенциал, существующий в гидродинамической плоскости сдвига в коллоидных системах в межфазном двойном электрическом слое. ЭКП генерируется в месте расположения плоскости скольжения в объеме жидкости вдали от границы раздела твердой и жидкой фаз, где-то между плоскостью Штерна и внешней границы диффузного слоя, на расстоянии 0.2 нм от поверхности [15]. Этот параметр выражает разность потенциалов между дисперсионной средой и неподвижным слоем жидкости, примыкающим к дисперсной частице (в нашем исследовании это неповрежденные изолированные клеточные ядра проростков пшеницы). Хотя ζ -потенциал не равен потенциалу Штерна или электрическому поверхностному потенциалу в двойном слое, его измерение часто является единственным доступным путем для определения свойств двойного слоя [16]. Таким образом, существует прямая пропорциональная зависимость величины ζ -потенциала

от величины поверхностного заряда [17]. Измерение ζ -потенциала в настоящее время является самым простым и доступным способом для характеристики поверхности заряженных коллоидных частиц, а анализ полученных данных позволяет сделать выводы относительно концентрации, распределения, адсорбции, ионизации, воздействия или экранирования заряженных фрагментов [15, 18].

Ранее нами была показана решающая роль фосфолипидов (ФЛ) молекул при формировании радиорезистентности бесплазмидных штаммов *S. derby* [19], а на мицелиальной культуре гриба *P. ostreatus* выявлены разнонаправленные изменения роста культуры и активности ферментативных систем в зависимости от частоты ЭМИ в диапазоне 45–53 ГГц [20]. Нами также были обнаружены разнонаправленные изменения роста и пероксидазной активности проростков пшеницы [21, 22], содержания ФЛ в ядерных фракциях [14] и в биохимическом составе ядерной мембраны в зависимости от однократного воздействия ЭМИ КВЧ [23].

В настоящей работе исследованы ЭКП на модели изолированных ядер клеток четырехсуточных проростков пшеницы и его изменение в зависимости от обработки ЭМИ КВЧ в диапазоне 46.0–50.3 ГГц. За последнее десятилетие было установлено, что ζ -потенциал оказывает существенное влияние на различные свойства систем доставки нанолечей. В фармацевтической промышленности в настоящее время возрастает производство коллоидных наноносителей, что позволяет преодолеть такие проблемы, как плохая растворимость лекарств и их усвояемость. Кроме того, наноносители демонстрируют неограниченные возможности в области таргетной терапии, что вызывает интерес в исследовании ЭКП клеточных ядер и наноносителей [15].

Целью данного исследования является выявление изменений ЭКП интактных ядер клеток проростков пшеницы под влиянием ЭМИ КВЧ в зависимости от частоты миллиметровых волн, а также установление различий между воздействием ЭМИ КВЧ в *in vivo* и *in vitro* условиях. Обсуждается вклад содержания фосфолипидов ядерных субфракций (ядерная оболочка и растворимая ядерная фракция) в изменения значений ЭКП при воздействии стрессорного фактора, что может объяснить механизмы влияния ЭМИ миллиметрового диапазона на живые системы на клеточном и субклеточном уровне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проращивание семян и обработка миллиметровыми волнами. Семена гексаплоидной (AABBDD) пшеницы *T. aestivum* L. сорта Воскеаск замачива-

ли в чашках Петри на ночь в темноте при 26°C. Для получения экспериментальных проростков замоченные семена однократно облучали нетепловым низкоинтенсивным электромагнитным излучением крайне высоких частот и затем высаживали на лотки с фильтровальной бумагой, смоченной водопроводной водой. Источником облучения ЭМИ КВЧ служил генератор сигналов высокочастотных ЭМИ Г4-141 (производство СССР), излучающий когерентные миллиметровые волны в диапазоне частот 37.5–53.57 ГГц. В исследовании замоченные семена облучали ЭМИ КВЧ в диапазоне 46.0–50.3 ГГц в течение 20 мин при плотности мощности излучения 0.64 мВ/см² на расстоянии 18 см от рупора излучения. Далее семена проращивали в темноте при постоянной температуре 26°C в течение последующих 72 ч, при поливе водопроводной водой, в результате получали проростки семян, облученные *in vivo*. Для облучения в условиях *in vitro* мы получали суспензию изолированных ядер из контрольных четырехсуточных проростков пшеницы, после чего непосредственно перед измерением ЭКП облучали клеточные ядра во внеклеточной среде с частотой 50.3 ГГц в течение 20 мин.

Изолирование и фракционирование ядер. Ядра четырехсуточных проростков пшеницы выделяли по методу, описанному в работе [24], с некоторыми модификациями. Проростки, замороженные в жидком азоте, измельчали фарфоровой ступкой до мелкого порошка и далее выделяли ядра, как описано ранее [25]. Осажденные ядра неоднократно промывали в трис-буфере (рН 7.4), в состав которого входит 10 мМ трис-НСI, 25 мМ КСI и 15 мМ MgCl₂ (ТКМ-буфер). В результате получали очищенные интактные ядра для последующего изучения потенциала ЭКП. Чистоту полученных ядер определяли по биохимическому составу и под микроскопом [26].

Определение электрокинетического потенциала ядер. Оценку электрокинетического или ζ-потенциала ядер проводили с использованием метода определения величины электрофоретической подвижности ядер, приведенного в работах [25, 27, 28] и многих других.

Электрофоретическую подвижность ядер измеряли с помощью микроэлектрофореза под микроскопом. Изолированные неповрежденные ядра семян пшеницы суспендировали в ТКМ-буфере, и заливали суспензию ядер в горизонтальную камеру для микроэлектрофореза. Электрофорез проводили при напряжениях 70–80 В и силе тока 10–15 мА. За движением ядер наблюдали под микроскопом «Биолам» (ЛЮМО, Россия) в среднем слое суспензии на определенной глубине камеры, где исключаются электроосмотические явления со стенками камеры. Эксперименты проводили при комнатной температуре (25°C).

Скорость движения ядер в градиенте электрического поля измеряли с помощью секундомера и сетки окуляр-микрометра [27, 28]. Движение самого электролита в электрическом поле воздействует как на ядра контрольных, так и обработанных проростков семян пшеницы, поэтому о воздействии миллиметровых волн на клеточные ядра проростков обработанных семян можно судить по разности величин ЭКП экспериментальных и контрольных ядер. Следовательно, воздействие электродиффузии не может влиять на оценку воздействия миллиметровых волн на ЭКП ядер клеток проростков. Измерения проводили при разной полярности тока, в каждом случае отмечая направления движения «–»-заряженных ядер к аноду и, наоборот, «+»-заряженных ядер к катоду. В данном исследовании все ядра проростков пшеницы при всех использованных экспозициях несли отрицательный заряд и перемещались в сторону анода. Значение ЭКП рассчитывали по формуле Смолуховского:

$$\text{ЭКП} = 4\pi\eta\omega/DE, \quad (1)$$

где η – коэффициент вязкости дисперсионной среды, ω – скорость движения ядер, D – диэлектрическая постоянная воды, равная 81, E – градиент напряжения приложенного электрического поля в электрофоретической камере.

Статистический анализ. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения 20–40 измерений из четырех независимых экспериментов и их стандартные отклонения. Все вычисления средних значений и стандартные ошибки были рассчитаны в Microsoft Office Excel. Статистическую значимость всех наблюдаемых различий между средними значениями полученных данных и контрольными значениями оценивали с использованием критерия Стьюдента. Уровень достоверности был принят за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования на растительных объектах позволяют выявить механизмы воздействия электромагнитного поля на клеточном уровне и предоставляют возможность проследить индуцированные ими изменения на ранних стадиях развития организма. В настоящей работе было исследовано влияние низкоинтенсивных когерентных крайне высоких частот электромагнитного излучения на величину ЭКП изолированных неповрежденных ядер клеток проростков пшеницы.

Ранее нами было показано, что изменения физиологического состояния генома клеток проростающих семян пшеницы, и сопутствующие этому варьирование в ФЛ составе различных фракций ядер, индуцируют изменения значений ЭКП [25, 29, 30]. Исходя из ранее полученных данных, мы высказали предположение о значимости

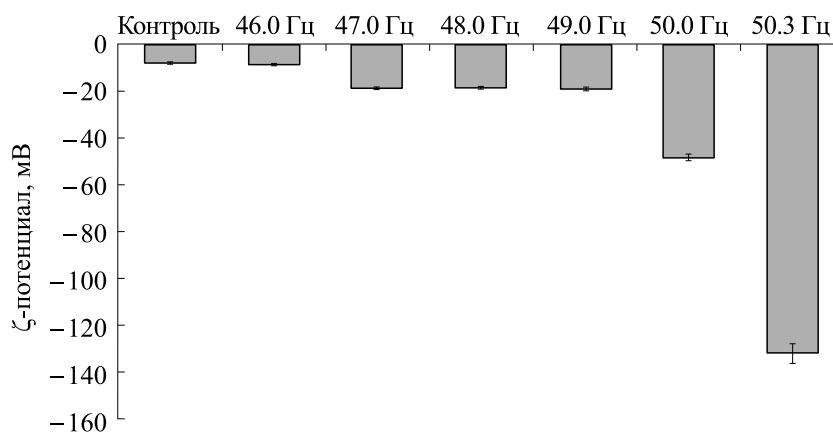


Рис. 1. Изменения ЭКП ядер проростков пшеницы в зависимости от частоты ЭМИ КВЧ.

вклада фосфолипидов в формирование заряда на поверхности изолированных ядер. Чтобы выявить этот вклад, мы исследовали ЭКП интактных ядер, обработанных различными частотами ЭМИ КВЧ в диапазоне 46.0–50.3 ГГц, в свете ранее полученных данных по изменению содержания ФЛ фракций ядра [14]. Полученные данные, отражающие электроотрицательность ядер проростков, представлены на рис. 1.

Можно видеть, что воздействие ЭМИ КВЧ на семена пшеницы приводило к увеличению скорости движения изолированных ядер проростков в градиенте электрического поля, возрастанию величины поверхностного заряда и, соответственно, повышению ζ -потенциала изолированных ядер проростков пшеницы при всех экспозициях обработки семян. Нами зафиксировано движение всех ядер только в одном направлении – к аноду, что свидетельствует о том, что ЭМИ КВЧ не меняет знак поверхностного заряда изолированных ядер проростков облученных семян.

Полученные данные (рис. 1) свидетельствуют об увеличении ЭКП ядер при всех вариантах обработки семян миллиметровыми волнами в диапазоне 46.0–50.3 ГГц, что может указывать на изменение физиологического состояния генома клеток, а также на изменение морфологических характеристик и биохимического состава клеток проростков. Как показано, облучение замоченных семян ЭМИ с частотой 46 ГГц приводило к незначительному увеличению абсолютного значения ЭКП интактных ядер. Однако обработка семян ЭМИ КВЧ в диапазоне частот 47–49 ГГц уже приводила к более чем двухкратному увеличению абсолютного значения ЭКП изолированных ядер проростков семян гексаплоидной пшеницы. Дальнейшее повышение частоты облучения семян ЭМИ КВЧ до 50.0 ГГц вызывала резкое возрастание значений ЭКП интактных ядер более чем в шесть раз (с -7.7 до -48 мВ). Об-

работка же семян ЭМИ КВЧ при частоте в 50.3 ГГц повышала электроотрицательность ядер проростков настолько, что абсолютное значение ЭКП достигало -130 мВ. Возможно, наблюдаемое увеличение поверхностного заряда ядер обусловлено изменениями состава ядерной мембраны прорастающих семян пшеницы на третьи сутки после облучения. Можно предположить, что под воздействием миллиметровых волн происходят некоторые структурные изменения во внешнем двойном электрическом слое на границе диффузной фазы. Кроме того, частоты в диапазоне 50.3–51.8 ГГц являются резонансными для колебательных частот молекул воды, поскольку ЭМИ миллиметрового диапазона вызывают структурные изменения в самой водной среде [31].

Ранее нами была показана взаимосвязь между электрокинетическими свойствами и физиологическим состоянием ядер клеток сухих эмбрионов и проростков различных злаковых в зависимости от пloidности генома, а также от концентрации ферментов ДНКазы и РНКазы в среде, добавленных *in vitro* [25, 29]. Прорастание сопровождалось повышением абсолютного значения ЭКП ядер проростков семян относительно ядер, изолированных из сухих зародышей семян пшеницы. Полученная корреляция свидетельствовала о связи между активностью генома и электроотрицательностью поверхностного заряда ядер проростков. Изменения ЭКП ядер сухих зародышей при прорастании пшеницы представлены на рис. 2. Этот же самый сорт пшеницы (гексаплоидная формула генома) был использован и в настоящем исследовании. Анализ данных настоящих и ранее полученных результатов позволит выявить природу воздействия миллиметровых волн на биологическую систему.

Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что во время прорастания семян

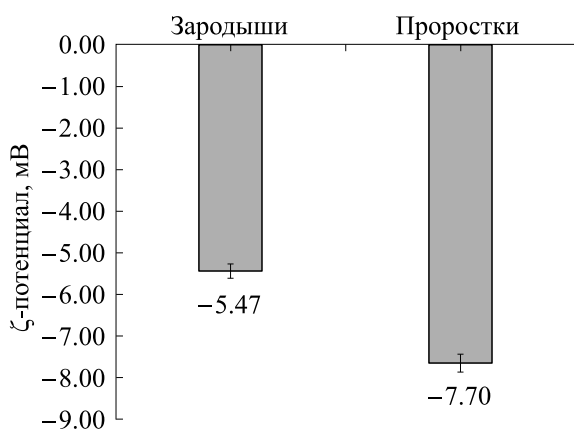


Рис. 2. Электрокинетический потенциал клеточных ядер, выделенных из сухих эмбрионов и проростков гексаплоидной пшеницы.

происходят изменения в электроподвижности отрицательно заряженных ядер: величины ζ -потенциала ядер при прорастании изменялись от -5.47 мВ до -7.70 мВ). Увеличение абсолютного значения ζ -потенциала ядер клеток при прорастании характерно для физиологического состояния прорастающих семян пшеницы. По-видимому, изменение величины поверхностного заряда на ядерной мембране способствует более активному обмену субстратами и маромолекулами между цитоплазмой и кариоплазмой и приводит к активации метаболизма клеток проростков. Это подтверждается также тем, что при прорастании семян в растворимой ядерной фракции и ядерной мембране, наблюдались изменения в соотношении РНК : белок : ДНК и перераспределение в содержании ФЛ [26, 30]. В частности, было отмечено увеличение содержания анионных фосфолипидов в составе ядерной мембраны при прорастании, что, возможно, и является причиной повышения электроотрицательности ядер.

Из литературных данных известно, что ядерная мембрана состоит из двойного липидного бислоя анионных и цвиттерионных (нейтральных) ФЛ, в которую интегрированы комплексы ядерных пор. Было естественно предположить, что ФЛ, составляющие большую часть поверхности ядерной мембраны, играют важную роль в формировании поверхностного заряда. Следовательно, увеличение количества отрицательно заряженных молекул в содержимом ядерной мембраны может привести к увеличению поверхностного заряда, двойного электрического слоя и соответственно к повышению значения ЭКП ядер. Однако, с другой стороны, увеличение ФЛ в составе мембраны ограничено. Дальнейшее возрастание количества анионных ФЛ в составе ядерной мембраны может настолько увеличить поверхностный заряд, что это приведет к увеличению объема двойного электрического слоя ядер и, соответственно, к относительному уменьшению значений ЭКП.

Исследование электроподвижности ядер в постоянном электрическом поле при микроэлектрофорезе может пролить свет на вопрос о том, как ЭМИ КВЧ влияют на электроотрицательность поверхности ядер, и о вкладе анионных ФЛ ядерных фракций в формирование ЭКП. Предполагается, что миллиметровые волны оказывают пролонгированное воздействие на клетки, приводя к изменению содержания фосфолипидов в ядерной мембране и экспорту РНК из ядра [14, 25]. Исследования фосфолипидного состава ядерной мембраны проростков пшеницы показали, что общее содержание фосфолипидов снижалось с 1.33 до 0.9 мкг/мг свежего веса проростков (приблизительно на 33%) после облучения в течение 20 мин ЭМИ частотой 50.0 ГГц. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о разнонаправленных изменениях в содержании ФЛ в составе ядерной мембраны после обработки ЭМИ. Облучение замоченных семян ЭМИ часто-

Таблица 1. Динамика изменений суммарного содержания фосфолипидов в ядерной мембране и растворимой ядерной фракции проростков при обработке миллиметровыми волнами

ФЛ	Суммарное содержание ФЛ, мкг/мг сырого веса		
	Контроль	Обработка миллиметровыми волнами с частотой:	
		50.0 ГГц	50.3 ГГц
Ядерная мембрана	1.33 ± 0.03	0.90 ± 0.02	$1.4 \pm 0.01^*$
Растворимая ядерная фракция	0.92 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.45 ± 0.02

Примечание. * – По критерию существенности на 5%-м уровне значимости разница несущественна.

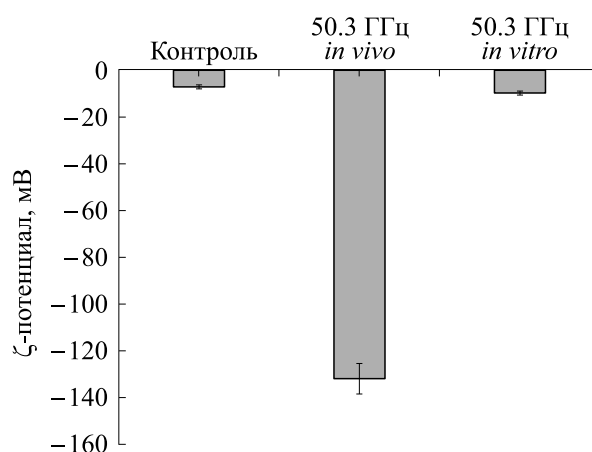


Рис. 3. Различия в электрокинетическом потенциале ядер проростков, обработанных ЭМИ КВЧ с частотой 50.3 ГГц в течение 20 мин, в зависимости от условий *in vivo* или *in vitro* обработки.

той в 50.3 ГГц увеличивает общее содержание ФЛ в ядерной оболочке приблизительно на 5.26%. Такие небольшие изменения содержания ФЛ в ядерной мембране могут вызвать существенные изменения в свойствах ядерной оболочки, влияя на ее проницаемость и изменение поверхностного заряда. В то же время увеличение ФЛ в содержании ядерной мембраны ведет к сглаживанию поверхности ядерной оболочки [26, 30]. Изменения содержания ФЛ наблюдались также и в составе растворимой ядерной фракции (табл. 1). Как представлено в табл. 1, общее содержание фосфолипидов в растворимой ядерной фракции после обработки миллиметровыми волнами с частотами в 50.0 и 50.3 ГГц по сравнению с контролем уменьшилось на 71.2 и 51.1% соответственно. Резкое снижение содержания ФЛ в растворимой ядерной фракции влечет за собой конформационные перестройки в активных и неактивных компартаментах хроматина, тем самым приводя к его «компактизации» [32].

Резкое увеличение абсолютных значений ЭКП до -130 мВ (рис. 1) происходит при обработке ЭМИ с частотой 50.3 ГГц, что не может быть объяснено только лишь изменением общего содержания ФЛ в ядре. Мы предполагаем наличие возможных структурных изменений в ядерной мембране, толщине двойного электрического слоя и ее поверхностного заряда. При этих же значениях ЭКП общее содержание ФЛ в составе ядерной мембраны проростков семян примерно такое же, как и в контрольных проростках, тогда как в растворимой ядерной фракции содержание ФЛ в два раза меньше, что, по-видимому, приводит к уменьшению объема кариоплазмы и сморщиванию ядра. Таким образом, в результате перераспределения ФЛ происходит изменение структуры ядра, а общий объем ядра уменьшается, что

представляет интерес для дальнейших исследований в этом направлении.

В то же время в литературе встречаются противоречивые данные по формированию ответа растительных клеток на воздействия ЭМИ КВЧ, проведенных в *in vivo* и *in vitro* условиях [33–35]. Нас также заинтересовал вопрос, есть ли разница в величине и характере отклика биологической системы между воздействием ЭМИ КВЧ в *in vivo* и *in vitro* условиях. С целью выявления различий мы провели сравнительное исследование, позволяющее выяснить уровень отклика биологической системы в ответ на воздействие ЭМИ КВЧ. В ответ на облучение в ядрах происходят изменения как в содержании фракций ядра, так и в поверхностном заряде ядра.

Результаты исследований приведены на рис. 3. Представленные данные позволяют сравнить влияние ЭМИ КВЧ на ЭКП ядер в зависимости от *in vivo* и *in vitro* условий облучения. На диаграмме показаны величины ЭКП для проростков ядер семян пшеницы, облученных *in vivo* и *in vitro*. Облучение ядер ЭМИ с частотой 50.3 ГГц в условиях *in vitro* приводило к увеличению ЭКП до -10.1 мВ, однако это значение ЭКП намного ниже, чем величина ЭКП изолированных ядер, выделенных из проростков предварительно облученных (обработка *in vivo*) семян (-131.6 мВ). Влияние миллиметровых волн на клеточные ядерные мембраны, обработанные в условиях *in vitro*, можно объяснить прямым воздействием ЭМИ КВЧ на структурные изменения водной среды и увеличением количества ионов в двойном электрическом слое на поверхности ядер. В условиях *in vivo* воздействие ЭМИ КВЧ на клеточные ядра объясняется их пролонгированным действием на метаболическую активность клеток [20], вызывающим активацию стресс-связанных генов, эпигенетические изменения в геноме [36], структурные из-

менения ядра [14, 23] и соответственно повышение проницаемости ядерной мембраны.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния ЭМИ КВЧ на ЭКП ядер семян в исследовании использована хорошо изученная нами модель этиолированных проростков пшеницы, что позволяет исключить влияние миллиметровых волн на фотосинтетический аппарат, поскольку облучение двенадцатисуточных семян кукурузы радиочастотными ЭМИ вызывало снижение фотосинтеза и содержания пигмента [37]. На основании полученных нами данных об изменениях ЭКП под воздействием ЭМИ КВЧ, представленных на рис. 1, мы предположили, что в первую очередь именно фосфолипиды могут играть важную роль в формировании поверхностного заряда ядра и, соответственно, быть ответственным за изменения ЭКП ядер. Результаты многочисленных исследований последнего десятилетия, подтверждающих важность роли ФЛ в регуляции процессов роста и развития растений, в передаче гормональных сигналов и обмена информацией между клетками организма, а также в восприятии и передаче информации от внешних раздражителей [35, 38].

В структуре ядерной бислоидной мембраны, состоящей из двойного слоя ФЛ, ориентация полярных головок молекул фосфолипидов играет важную роль в формировании толщины и плотности укладки молекул в липидном бислое, а поверхностная энергия будет варьировать в зависимости от общей площади поверхности ядер и поверхностного натяжения [39] согласно уравнению:

$$E_s = 2\sigma S, \quad (2)$$

где $2S$ — общая площадь поверхности раздела «бислоид—вода», а s — поверхностное натяжение.

В мембране интактных ядер в водной среде существует равновесие между силами электростатического отталкивания и заряженными молекулами ФЛ на поверхности и ван-дер-ваальсовым притяжением между остатками гидрофобных жирных кислот. Отклонение от такого равновесия при изменениях в водной среде под действием ЭМИ КВЧ может привести к структурным изменениям в фосфолипидной мембране. Под влиянием физического фактора это равновесие изменяется, что, возможно, ведет к уменьшению угла наклона липидной молекулы относительно поверхности мембраны и, таким образом, к значительному уменьшению объема ядра. Уменьшение же объема ядра ведет неминуемо к возрастанию поверхностной энергии (согласно уравнению (2)). Это в результате приводит к увеличению электроподвижности с -7.7 до -10.1 мВ, что подтверждается нашими данными при облучении

in vitro (рис. 3). Наши данные согласуются с *in vitro* исследованиями дозозависимых изменений ζ -потенциала в суспензиях анионных липосом при добавлении в среду лизина [40] и ранее полученных нами изменений ЭКП ядер проростков при добавлении ДНКазы и РНКазы [25].

Принимая во внимание, что значение ЭКП ядер проростков предварительно обработанных семян в вариантах *in vivo* возрастает более чем в 17 раз (от 7.7 до 131.6 мВ) (рис. 1 и 3), это увеличение может быть объяснено изменениями в содержании ФЛ в результате индуцированных облучением семян нарушений метаболизма клеток зародыша и, соответствующих изменений в структуре и составе ядер в последующие после трехсуточной обработки. При уменьшении общего количества ФЛ в растворимой ядерной фракции объем ядер, вероятно, уменьшается, что, в свою очередь, приводит к увеличению плотности поверхностного заряда, в результате чего значение ЭКП также может возрасти. С увеличением поверхностного заряда толщина двойного электрического слоя уменьшается, образуется более компактная по объему структура, в результате чего радиус ядра уменьшается. Поскольку даже незначительное уменьшение радиуса ядра (r) приводит к значительному уменьшению общей поверхности ядра ($S \sim r^2$), это может приводить к увеличению ζ -потенциала заряженной сферы, равного $\zeta = Q/Dr$. Следовательно, наблюдаемое нами изменение величины ЭКП обусловлено изменением содержания ФЛ в составе ядерной мембраны, индуцированным облучением, которое, в свою очередь, оказывает значительное влияние на физические свойства мембран. Плотность поверхностного заряда определяет электрокинетические свойства клеток и выражается уравнением:

$$\sigma = \frac{\bar{\omega}\eta}{\frac{1}{K} + r} 300, \quad (3)$$

где s — плотность заряда, $\bar{\omega}$ — электрофоретическая подвижность, η — вязкость среды, r — радиус противоиона, $1/K$ — обратная величина толщины двойного электрического слоя, а 300 — коэффициент для перехода от значений в вольтах к электростатическим единицам [41]. Таким образом, плотность заряда на внешней поверхности ядер определяется как свойствами самой среды и ее изменениями под действием физического фактора, так и общим содержанием анионных фосфолипидов и плотностью укладки молекул в составе двойного ФЛ бислоя ядерной мембраны.

В то же время резкое снижение содержания ФЛ в составе растворимой ядерной фракции может вызвать конформационные перестройки в активных и неактивных компартментах хроматина, его «компактизацию», появление гранул хро-

мата, что ранее наблюдалось в работах [32, 42, 43]. Поэтому мы предположили, что уменьшение содержания ФЛ в растворимой ядерной фракции при облучении ЭМИ с частотой в 50.3 ГГц вызывает уменьшение объема ядра и величины поверхностного заряда, что приводит к увеличению значений ЭКП. Поскольку ФЛ участвуют в регуляции таких важных биологических процессов, как фосфорилирование белка, окислительные процессы и модуляция мембранного транспорта, а также способствуют искривлению или сглаживанию мембраны, увеличению проницаемости мембраны [30], то из этого естественно следует, что данные изменения могут регулировать трансмембранный перенос веществ через ядерную мембрану, и способствовать повышению ее проницаемости.

Согласно литературным данным электрическое поле в импульсном режиме приводит к пробоям и увеличению проницаемости клеточных мембран, вызывая физико-химические и физиологические изменения в протопластах растений, стимулируя синтез белка и ДНК, деление и дифференцировку клеток [17]. На клеточном уровне наблюдались изменения общей метаболической активности клеток, вследствие активирования Ca^{+2} -ионов под действием миллиметровых волн, активирующих Ca -зависимые сенсоры протеинкиназ, регулирующих большинство сигнальных путей [44, 45].

Анализируя данные предыдущих исследований по изменениям содержания ФЛ и ЭКП при прорастании [25, 30], мы обнаружили очень интересную закономерность в изменении содержания анионных ФЛ в ядерных фракциях клеток проростков под действием миллиметровых волн [14], противоположную ранее полученным данным по изменению содержания анионных ФЛ в составе фракций ядра при прорастании семян в нормаль-

ных физиологических условиях [26]. Если суммировать по отдельности содержание всех нейтральных и анионных фосфолипидов ядерной оболочки, выявляется определенная закономерность изменений под действием миллиметровых волн: в составе ядерной оболочки наблюдалось увеличение содержания нейтральных и уменьшение содержания анионных ФЛ, а в составе растворимой ядерной фракции облучение миллиметровыми волнами вызывало уменьшение содержания как нейтральных, так и анионных фосфолипидов (табл. 2.). Степень индуцированных облучением изменений содержания по сравнению с контролем и величины разности содержания анионных ФЛ в ядерной мембране и растворимой ядерной фракциях может повлечь за собой увеличение разности потенциалов между ядерной оболочкой и содержимым ядра и привести к конформационным изменениям в хроматине, что подтверждается ранее полученными нами данными [32].

Анализ результатов, представленных на рис. 1 и в табл. 2, выявил четкую корреляцию между величиной изменений в содержании анионных фосфолипидов в ядерных фракциях и величиной изменений ЭКП. В соответствии с данными табл. 2 в ядрах контрольных проростков разность между анионными ФЛ растворимой ядерной фракции и ядерной оболочки составляет 0.29 мкг/мг (контрольным ядрам соответствует значение ЭКП, равное -7.7 мВ). Для изолированных ядер проростков из семян, обработанных ЭМП с частотой 50.0 ГГц, разница в содержании анионных фосфолипидов между ядерными фракциями возрастает и составляет 0.38 мкг/мг, им соответствует значение ЭКП, равное -48 мВ, т.е. разность в суммарном содержании анионных ФЛ между ядерными компартментами всего на 0.1 мкг/мг приводит к изменению ЭКП в 6.2 раза. При облучении же семян миллиметровыми вол-

Таблица 2. Динамика изменений суммарного содержания анионных и нейтральных фосфолипидов в ядерных субфракциях проростков после обработки семян миллиметровыми волнами

Ядерные фракции		Суммарное содержание ФЛ, мкг/мг сырого веса		
		Контроль	50.0 ГГц	50.3 ГГц
Мембрана	Нейтральные	0.47 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.61 ± 0.03
	Анионные	0.86 ± 0.04	0.54 ± 0.03	$0.79 \pm 0.03^*$
Матрикс	Нейтральные	0.35 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.03
	Анионные	0.57 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.31 ± 0.03

Примечание. * – По критерию существенности на 5%-м уровне значимости разница не существенна.

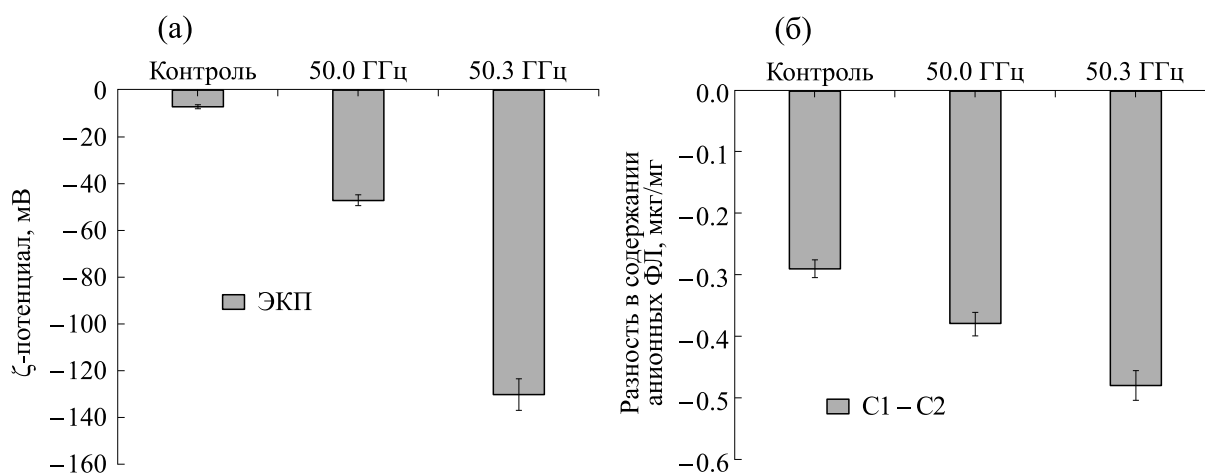


Рис. 4. Возрастание отрицательных значений ЭКП проростков семян пшеницы, облученных миллиметровыми волнами частотой в 50.0 ГГц и 50.3 ГГц *in vivo* (а), и их корреляция с разностью в содержании анионных фосфолипидов между ядерной мембраной и матриком ядра (б).

нами с частотой 50.3 ГГц наблюдалось увеличение отрицательных значений ЭКП до -130 мВ для изолированных ядер проростков, а разность в содержании анионных фосфолипидов между фракциями ядра достигала уже 0.48 мкг/мг, что в 1.65 раза превышает разность в содержании анионных фосфолипидов в контрольных ядрах (см. табл. 2). Коррелятивное соотношение между ЭКП и разностью в содержании анионных фосфолипидов ядерных фракций проростков семян пшеницы, облученных миллиметровыми волнами с частотами 50.0 и 50.3 ГГц, представлено на рис. 4.

Следует также отметить, что при прорастании в нормальных физиологических условиях было зарегистрировано значительное увеличение содержания анионных фосфолипидов в ядерной мембране и некоторое увеличение последних в растворимой ядерной фракции [30]. Незначительное возрастание содержания анионных фосфолипидов в составе растворимой ядерной фракции необходимо при прорастании для активации генома, поскольку известно, что добавление отрицательно заряженных липидов *in vitro* способствует деконденсации хроматина [46]. При прорастании семян, разность в содержании анионных ФЛ в ядерной мембране и растворимой ядерной фракции возрастала с 0.51 мкг/мг для сухих зародышей до 0.61 мкг/мг для проростков, то есть разность увеличилась всего на 0.1 единицу, и при этом ЭКП изменялся с -5.47 мВ до -7.7 мВ (см. рис. 2). К тому же ядерная мембрана представляет собой двойной ФЛ бислоем и транспорт субстратов через нее происходит исключительно посредством больших белковых комплексов ядер-

ных пор. Согласно разработанной нами физической модели [47], такая разность в содержании анионных фосфолипидов между фракциями ядра способствует облегченному транспорту субстрата сквозь комплексы ядерных пор, направленному из ядра. Высокое содержание анионных ФЛ в ядерной мембране в то же время повышает биодоступность мембраны для положительно заряженных субстратов и наночастиц, что регистрируется методом определения ЭКП, широко используемым для тестирования наночастиц в таргетной медицине [48, 49].

Под влиянием ЭМИ с частотой 50.3 ГГц, наоборот, наблюдается (см. табл. 2) ошутимое понижение содержания анионных фосфолипидов в растворимой ядерной фракции относительно контрольного варианта (с 0.57 мкг/мг до 0.31 мкг/мг) наряду с уменьшением и содержания нейтральных ФЛ (с 0.35 мкг/мг до 0.14 мкг/мг). Поскольку добавление отрицательно заряженных липидов *in vitro* способствует деконденсации хроматина [46], то естественно предположить, что уменьшение содержания анионных ФЛ в составе растворимой ядерной фракции, индуцированное облучением ЭМИ миллиметрового диапазона, приводит к конденсации хроматина. Представленные данные, а также полученные нами ранее результаты по перераспределению гетерохроматина под действием ЭМИ КВЧ [32], согласуются с данными авторов о воздействии миллиметровых волн ЭМИ на ядра букальных клеток человека: обработка миллиметровыми волнами индуцировала конденсацию хроматина и повышение проницаемости ядерной мембраны [43].

В составе ядерной мембраны под воздействием миллиметровых волн при этой же частоте в 50.3 ГГц ЭМИ наблюдалось понижение содержания анионных ФЛ с 0.86 мкг/мг до 0.79 мкг/мг (табл. 2), но, с другой стороны, суммарное содержание ФЛ в ядерной мембране повышается (табл. 1) за счет увеличения нейтральных ФЛ (с 0.47 мкг/мг до 0.61 мкг/мг). Такое перераспределение в ФЛ составе ядерной мембраны свидетельствует о том, что поверхность ядер сглаживается [30].

Таким образом, при воздействии миллиметровых волн в результате значительного уменьшения содержания ФЛ в растворимой ядерной фракции на уровне ядра в целом может привести к уменьшению объема ядра (следовательно и радиуса ядра), вследствие чего повысится плотность поверхностного заряда, увеличивается ЭКП ($\zeta = Q/Dr$). Вышеуказанные изменения в физико-химических свойствах изолированных ядер проростков семян, предварительно обработанных миллиметровыми волнами, приводят к значительному возрастанию абсолютных значений ЭКП. Наряду с уменьшением объема ядер сокращается также площадь поверхности ядер, а это приводит согласно формуле (2) к увеличению поверхностной энергии изолированных ядер.

Величина ЭКП ядер проростков возрастает под действием миллиметровых волн при всех обработках (рис. 1). Следовательно, обработка миллиметровыми волнами приводит к глубоким изменениям метаболизма клеток проростков и фосфолипидного состава ядра, что ведет в результате к повышению проницаемости ядерной мембраны. Полученные данные согласуются с предположенной нами гипотетической моделью механизма проницаемости ядерной мембраны. Согласно этой модели [47] увеличение разницы между содержанием анионных фосфолипидов в растворимой ядерной фракции и ядерной мембране под действием миллиметровых волн, будет приводить к возрастанию проницаемости ядерной мембраны, что подтверждается литературными данными [43, 48, 49]. Как было обнаружено мета-исследованием литературных данных за последнее десятилетие, большинство исследований, в которых регистрировался высокий уровень воздействия ЭМИ КВЧ, проводились в диапазоне частот 40–55 ГГц, но не с целью определения степени негативного воздействия на здоровья человека, а, наоборот, с целью исследования механизмов воздействия и возможностей использования миллиметровых волн в терапевтических целях [50].

Из полученных данных можно сделать вывод, что уменьшение содержания анионных ФЛ в составе ядерной мембраны является защитной реакцией клеток в ответ на миллиметровые волны, которые активируют транспортную активность

ядерной мембраны, поэтому снижение анионного ФЛ в содержании ядерной оболочки является как бы сдерживающим фактором повышения проницаемости ядерной мембраны и ее повреждения. Дальнейшие исследования по изучению воздействия миллиметровых волн на физико-химические свойства ядерной мембраны, а также на изменения заряда и размера ядер позволят выявить более глубокие связи между ЭКП, поверхностным зарядом, размером ядра и роли его модуляции под действием различных стрессовых факторов.

ВЫВОДЫ

Возрастание ЭКП при всех вариантах обработки миллиметровыми волнами можно объяснить изменением в следующих параметрах ядер: 1) изменением в содержании анионных фосфолипидов в ядрах; как в ядерной мембране, так и в растворимой ядерной фракции (в условиях *in vivo*), 2) уплотнением двухслойной ядерной оболочки вследствие изменения угла наклона гидрофильных головок молекул ФЛ (при воздействиях *in vitro*), 3) увеличением плотности структуры двойного электрического слоя, обусловленного повышением плотности поверхностного заряда ядерной мембраны.

Полученные результаты по воздействию миллиметровых волн на биологические структуры, особенно на ядра и его субфракции в проростках пшеницы, могут быть использованы в фармакологии с целью разработки препаратов целевой доставки и повышения усвояемости лекарственных препаратов, поскольку физико-химические свойства, размер частиц, форма и поверхностный заряд, играют ключевую роль в поглощении клетками наночастиц и доставку их до генетического аппарата, преодолевая барьер ядерной мембраны сквозь комплексы ядерных пор.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. R. Jauchem, Int. J. Hyg. Environ. Health, **211** (1–2), 1 (2009).
2. C. N. Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, et al., Bioelectromagnetics, **30**, 365 (2009).

3. *Non-ionizing radiation. Part.2: Radiofrequency electromagnetic fields in: IARC clasifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans. Press release N208*, v. **102**, pp. 1–6 (WHO/IARC, 2011).
4. A. B. Miller, M. E. Sears, L. Morgan, et al., *Front. Public Health*, **13**, 10 (2019).
5. P. Pogam, Y. Page, D. Habauzit, et al., *Sci. Reports*, **9**, 9343, (2019).
6. American Cancer Res. 1.800.227.2345 Radiofrequency (RF) Radiation Last Med. Rev.: June 1 (2020).
7. Y. Chen, F. Muller, I. Rieu, and P. Winter, *Plant Reprod.*, **29**, 21 (2016).
8. Zh. Zhong, T. Furuya, K. Ueno, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 486, (2020)
9. G-Ch. Yuan, *Wiley Interdisc. Rev.: Systems Biology and Medicine* **4** (3), 297 (2012).
10. M. Iwasaki and J. Paszkowski, *EMBO J.*, **33** (18), 1987 (2014.).
11. C. S. Pikaard and Sh. O. Mittelsten, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6** (12), a019315 (2014).
12. T. Stuart, S. R. Eichten, J. Cahn, et al., *eLife*, **5**, e20777 (2016).
13. N. S. M. Manik, S. Shi, J. Mao, et al., *Int. J. Genomics*, **2015**, 10 (2015).
14. Л. А. Минасбекян, *Биол. журн. Армении*, № 3 (70), 52 (2018).
15. S. Honary and F. Zahir, *Tropic. J. Pharmaceut. Res.*, **12** (2), 255 (2013).
16. H. L. Kutschera, P. Chaoa, M. Deshmukha, et al., *Int. J. Pharm.*, **402**, 64 (2010).
17. N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit, *Int. J. Pharm.*, **379**, 201 (2009).
18. L. Rabinovich-Guilatt, P. Couvreur, G. Lambert, et al., *Chem. Phys. Lipid.*, **131**, 1 (2004).
19. М. А. Балаян, П. О. Вардеванян, А. З. Пепоян и др., *Биол. мембраны*, **14** (5), 506 (1997).
20. И. А. Авагян, А. В. Неркарарян, Л. А. Минасбекян и С. Г. Нанагулян, *Микология и фитопатология*, **45** (6), 77 (2011).
21. П. О. Вардеванян, А. В. Неркарарян, Л. А. Минасбекян и Ц. К. Калтахчян, в сб. *Материалы междунар. конф.* (Мичуринск, 2008), т. 2, с. 107.
22. P. O. Vardevanyan, A. V. Nerkararyan, and M. A. Shahinyan, *J. Exp. Biol. Agricult. Sci.*, **1** (1), 39 (2013).
23. L.A. Minasbekyan, V. Pohrebennik, K. Przystupa, and O. Kohan, in *Wirtualne Sympozjum PTZE* (Warszawa 2020), pp. 240–242.
24. G. Blobel and V.R. Potter, *Science*, **154**, 1662 (1966)
25. Л. А. Минасбекян, М. А. Парсаданян, С. А. Гонян, and П. О. Вардеванян, *Физиология растений*, **49** (2), 280 (2002).
26. L. A. Minasbekyan and J. A. Teixeira da Silva, in *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Ed. by J. A. Teixeira da Silva (Global Science Book Edition, Japan, 2006), vol. I, pp. 454–459.
27. Р.Р. Вардапетян, С. А. Гонян и Н. А. Давтян, *Биол. науки*, **10**, 30 (1988).
28. С. А. Гонян, дисс. ... канд. биофизич. наук (ЕГУ, Ереван, 1993).
29. С. А. Гонян, Л. А. Минасбекян, А. В. Неркарарян и др., *Биол. журн. Армении*, **54** (3–4), 227 (2002).
30. Л. А. Минасбекян, Ж. В. Явроян, М. Р. Дарбинян и П. О. Вардеванян, *Физиология растений*, **51** (5), 784 (2004).
31. М. В. Курик и Л. С. Марценюк, *Физика сознания и жизни, космология и астрофизика*, **2**, 13 (2011).
32. L. Minasbekyan, V. Kalantaryan, and P. Vardevanyan, In *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Ed. by V. Tsakanov and H. Wiedemann (NATO Security through Science Series. Springer, Dordrecht, 2007), pp. 199–203.
33. A. Vian, E. Davids, M. Gendraud, and P. Bonnet, *BioMed. Res. Int.*, **2016**, 1830262, 13 (2016).
34. S. T. Qureshi, S. A. Memon, A. R. Abassi, et al., *Saudi J. Biol. Sci.*, **24** (4), 883 (2017).
35. M. Simko and M. O. Mattsson, *J. Environ. Res. Public Health*, **16**, 3406 (2019).
36. L. A. Minasbekyan and P. O. Vardevanyan, in *Int. Conf. Plant Gen.* (Novosibirsk, 2021), p. 150.
37. M. Racuciu, C. Iftode, and S. Miclaus, *Romanian J. Physics*, **60** (3–4), 603 (2015).
38. J. H. Vossen, A. Abd-El-Halim, E. F. Fradin, et al., *Plant J.*, **62** (2), 224 (2010).
39. Г. Г. Бадалян и А. А. Шагинян, *Биофизика*, **33** (1), 92 (1988).
40. Н. И. Марукович, А. М. Нестеренко и Ю. А. Ермаков, *Биол. мембраны*, **31** (6), 401 (2014).
41. E. Donath and V. Pastushenko, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **7** (1), 31 (1980).
42. D. W. Van de Vosse, Y. Wan, R. Wozniak and J. D. Aitchinson, *Wiley Interdisc. Rev.: System Biology and Medicine*, **3** (2), 147 (2011).
43. G. B. Skamrova, A. O. Lantushenko, Yu. G. Shkorbatov, and M. P. Evstigneev, *Biochemistry and Biophysics*, **1** (2), 22 (2013).
44. M. L. Pall, *Curr. Chem. Biol.*, **10**, 74 (2016).
45. B. Ranty, D. Aldon, V. Cotellet, et al., *Front. Plant Sci.*, **7**, 327 (2016).
46. V. V. Kuvichkin, *Bioelectrochemistry*, **58**, 3 (2002).
47. L. Minasbekyan, H. Badalyan, and P. Vardevanyan, In *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Ed. by V. Tsakanov and H. Wiedemann (NATO Security through Science Series. Springer, Dordrecht, 2007), pp. 205–211.
48. X-J. Du, Ji-L. Wang, Sh. Iqbal, et al., *Biomater. Sci.*, **6**, 642 (2018).
49. M. Kumari, N. Sharma, R. Manchanda, et al., *Sci. Reports*, **11**, 3824. (2021).
50. A. Wood, R. Mate, and K. Karipidis, *J. Exposure Science & Environ. Epidemiol.*, **31**, 606 (2021).

Contribution of Nuclear Membrane Phospholipids to the Formation of Elektrokinetic Potential**L.A. Minasbekyan* and A.V. Nerkararyan*****Yerevan State University, ul. A. Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

The electrokinetic potential of nuclei isolated from the seedlings of wheat seeds, that have already been exposed to extremely high frequency nonionizing electromagnetic fields, was studied. The electrokinetic potential is an important factor influencing the course of many biological processes and probably plays an important role in the formation of the response of biological organisms to electromagnetic waves. An increase in the absolute values of the electrokinetic potential of nuclei isolated from the seedlings of wheat seeds from -7.7 mV to -131.6 mV in the gradient of the electric field under the influence of extremely high frequency nonionizing electromagnetic radiation in the 46.0 GHz to 50.3 GHz frequency range is shown. It is also demonstrated that there are great differences between the values obtained for the electrokinetic potential of nuclei exposed to extremely high frequency nonionizing electromagnetic fields under in vivo and in vitro conditions. It is found out that the magnitude of changes in the values of the electrokinetic potential of nuclei resulting from exposure to extremely high frequency electromagnetic radiation under vivo conditions is much higher than that obtained after exposure of nuclei to the same frequency electromagnetic radiation under in vitro conditions. Modulations of the value of the electrokinetic potential are discussed depending on changes in the difference between the content of anionic phospholipids in the nuclear membrane and the soluble nuclear fraction, that leads to a change in the surface charge of the nuclear membrane, the electrokinetic potential and the formation of a more compact electric double layer.

Keywords: extremely high frequency electromagnetic radiation, isolated nuclei of wheat seedlings, soluble nuclear fraction, phospholipids, nuclear membrane, electrokinetic ζ -potential

ПРИМЕНЕНИЕ БАЗОВЫХ ИЗОТОПНЫХ УРАВНЕНИЙ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ДИНАМИКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ: ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙТЕРИЯ

© 2022 г. В.А. Вавилин^{*,#}, Л.Я. Локшина^{*}

^{*}Институт водных проблем РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119333, Россия

[#]E-mail: vavilin@iwp.ru

Поступила в редакцию 15.02.2022 г.

После доработки 10.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

С использованием базовых изотопных уравнений, основанных на сохранении баланса дейтерия, анализируется динамика внутриклеточного окисления метана нитрит-ионом (NDAMO) в двух лабораторных экспериментах с различными начальными концентрациями субстратов и с привлечением изотопных переменных с дейтерием, причем во втором эксперименте начальное количество воды в закрытом сосуде было уменьшено приблизительно в 2.8 раза. Согласно модели в конце первого эксперимента метан полностью расходуется при остающемся избытке нитрит-иона, тогда как в конце второго эксперимента метан остается при полном исчерпании нитрит-иона. В качестве изотопных переменных в модели рассматриваются концентрации содержащих единственный атом дейтерия субстратов (CH_4 и NH_4^+), продукта (H_2O) и биомассы метанотрофных микроорганизмов ANME ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$). Выведены стехиометрические уравнения реакций, описывающие перераспределение дейтерия между субстратами, продуктом реакции (водой) и биомассой. Показано, что фракционирование изотопов идет в процессе микробиологической реакции в воде, при этом субстраты обогащаются дейтерием, а вода и биомасса им обедняются. Если в первом эксперименте, сопровождающемся небольшим падением содержания дейтерия в воде и биомассе, процесс фракционирования заканчивается при $t \geq 17$ ч, то во втором эксперименте он заканчивается при $t \geq 140$ ч и сопровождается значительным падением содержания дейтерия в воде, зависящем от начальной концентрации воды, содержащей дейтерий. Это происходит из-за разбавления воды в сосуде обедненной дейтерием водой, образующейся в процессе NDAMO. В работе также дана сводка полученных нами в течение ряда лет результатов моделирования динамики одиннадцати биологических процессов, в которых измеряли в основном стабильные изотопы углерода. Приводятся используемые при моделировании факторы фракционирования изотопов.

Ключевые слова: динамика экологических процессов, кинетический изотопный эффект, базовые изотопные уравнения, последовательные и параллельные реакции.

DOI: 10.31857/S0006302922060114, EDN: LKFKYL

Кинетический изотопный эффект заключается в изменении скорости химических, биологических и физических процессов при замене в молекуле реагирующего вещества какого-либо атома его изотопом [1]. Величина отношения тяжелых (^hE) и легких (^lE) стабильных изотопов $R = ^h\text{E}/^l\text{E}$ в веществе обычно мала, она традиционно определяется при помощи разницы отношений $^h\text{E}/^l\text{E}$ в исследуемом образце $(^h\text{E}/^l\text{E})_{\text{обр}}$ и определенном

стандарте $(^h\text{E}/^l\text{E})_{\text{ст}}$, который отличается высоким содержанием более тяжелого изотопа ^hE [2]:

$$\delta^h\text{E} (\text{‰}) = \left[\frac{(^h\text{E}/^l\text{E})_{\text{обр}}}{(^h\text{E}/^l\text{E})_{\text{ст}}} - 1 \right] \times 1000, \quad (1)$$

где величина $\delta^h\text{E}$ называется изотопной сигнатурой (signature). Концентрация субстрата (реагента) с более тяжелым (редким) изотопом, как правило, много меньше концентрации субстрата с более легким изотопом.

Сокращения: NDAMO – реакция окисления метана нитритом, ANME – анаэробные метан-окисляющие микроорганизмы.

Уравнение Релея [3], изначально предложенное для описания диффузии газов, традиционно применяется и для вычисления фактора фракционирования (разделения) стабильных изотопов:

$$R_t/R_0 = (S_t/S_0)^{1/(\alpha-1)}, \quad (2)$$

где R_0 и R_t — отношение тяжелого и легкого стабильных изотопов в субстрате в моменты времени 0 и t соответственно; S_0 и S_t — начальная и текущая концентрации субстрата; α — фактор фракционирования стабильных изотопов при превращении субстрата в продукт. Величина α определяется [4] по наклону прямой линии, полученной в двойных логарифмических координатах, следующих из уравнения Релея (2).

При описании изотопного эффекта в уравнении (2) уже давно отмечается справедливость не-

линейной химической кинетики n -го порядка по концентрации субстрата S [5], однако, в современной научной литературе по-прежнему часто считается, что справедлива линейная кинетика по концентрации субстрата S [6]. При этом кинетический коэффициент слегка меньше у субстрата с более тяжелым изотопом. Фактор фракционирования α обычно считается величиной постоянной, что не всегда справедливо [7]. Фактически уравнение Релея (2) является статическим, поскольку оно фиксирует концентрацию субстрата только в моменты времени 0 и t и не зависит от динамики концентрации субстрата в промежутке от 0 до t .

Базовое изотопное динамическое уравнение для единственного субстрата записывается в следующем виде [8]:

$$\frac{d^h S}{dt} = \frac{1}{\alpha} \frac{^h S}{S} \frac{dS}{dt}, \quad (3)$$

где $^h S$ и $S = {}^1 S + ^h S \approx {}^1 S$ — концентрации субстрата, содержащего более тяжелый изотоп, и полного субстрата, содержащего более легкий и тяжелый изотоп соответственно; dS/dt — скорость изменения концентрации полного субстрата. Уравнение

(3) для субстрата нужно дополнить соответствующими уравнениями для продукта реакции (4) и биомассы (5), осуществляющей саму микробиологическую реакцию:

$$\frac{d^h P}{dt} = \frac{1}{\alpha} \frac{^h S}{S} \frac{dP}{dt}, \quad (4)$$

$$\frac{d^h B}{dt} = \frac{1}{\alpha} \frac{^h S}{S} \frac{dB}{dt}, \quad (5)$$

где продукт ($^h P$) и биомасса ($^h B$) содержат более тяжелый изотоп. При этом учитывается, что в продукт и биомассу более тяжелый изотоп поступает из субстрата. Из уравнений (3)–(5) следует сохранение суммарного баланса более тяжелого изотопа в субстрате, продукте и биомассе ($d^h S/dt + d^h P/dt + d^h B/dt = 0$), если материальный баланс в системе без изотопов сохраняется ($dS/dt + dP/dt + dB/dt = 0$). В работе [8] изотопные уравнения для субстрата, продукта и биомассы типа уравнений (3)–(5) используются как составные части двух последовательных реакций (превращения нитрата в нитрит и последующее превращение нитрита в молекулярный азот).

В работах [9, 10] показано, что статическое уравнение Релея (2) выводится из основного изотопного уравнения (3), где нелинейная скорость процесса dS/dt для скорости микробиологической реакции задается в общем виде. Часто для описания скорости биологического процесса используется нелинейная функция типа Моно. Тра-

диционно функция Моно используется при описании динамики анаэробных микробиологических процессов [11, 12]. В монографии [13] обсуждается переход от функции Михаэлиса–Ментен, известной в ферментативной кинетике, к функции Моно, известной в микробиологической динамике.

В предложенных нами динамических уравнениях (3) – (5) вводится концентрация более тяжелого (редкого) элемента в субстрате, продукте и биомассе. Из уравнения (3) следует, что скорость изменения концентрации субстрата, содержащего более тяжелый изотоп, пропорциональна скорости изменения концентрации полного субстрата, умноженной на текущую пропорцию более тяжелого изотопа в субстрате к полному субстрату и деленной на фактор фракционирования изотопов α , который отражает тот факт, что константа скорости для субстрата с более тяжелым изотопом несколько меньше, чем та же константа скорости для субстрата с легким изотопом. При этом концентрация субстрата, содержащего более тяжелый (редкий) изотоп, во мно-

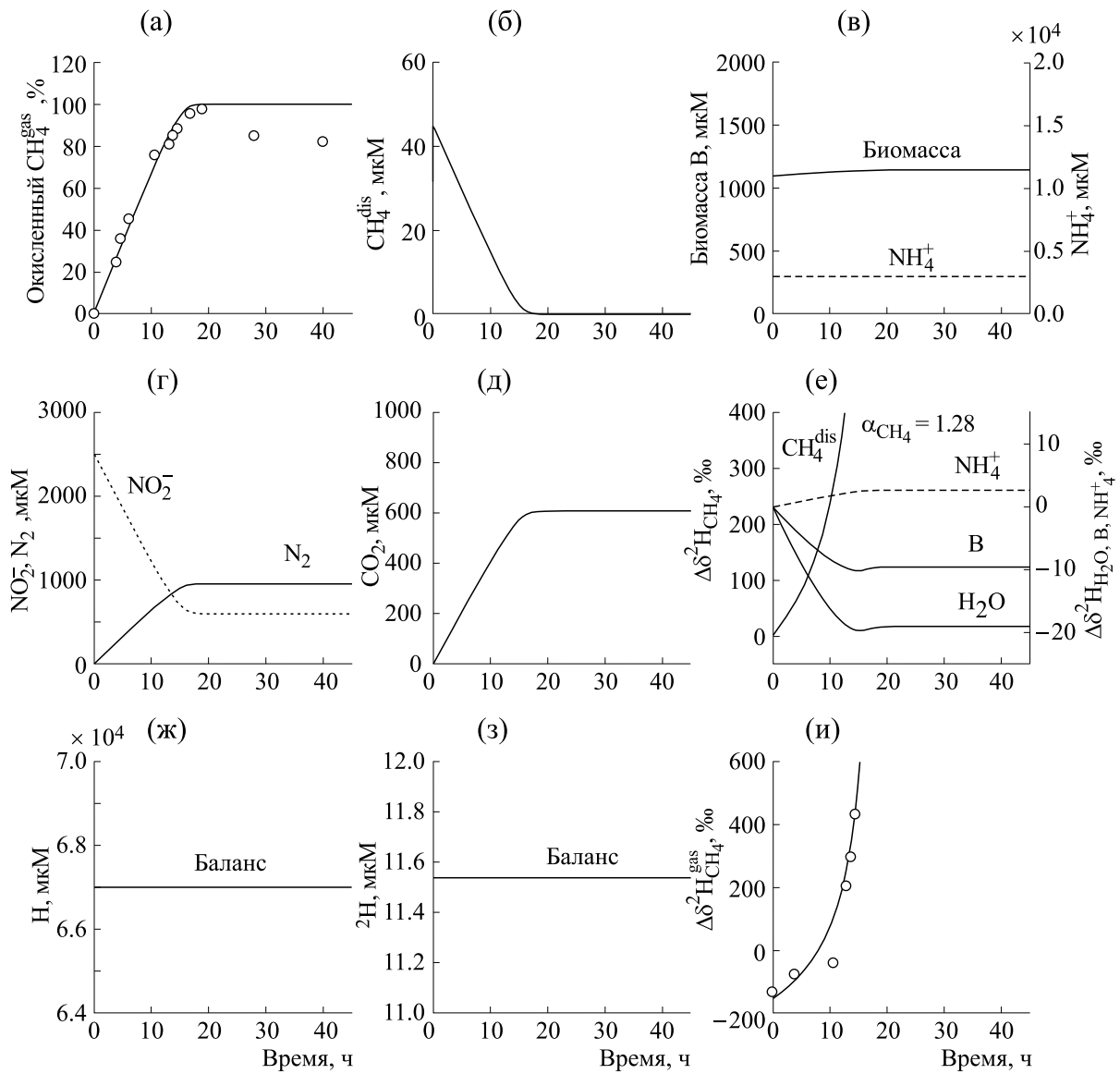


Рис. 1. Результаты расчета по динамической модели, описывающей анаэробное окисление метана нитритом NDAMO, при начальных концентрациях газообразного метана $CH_4^{gas} = 788$ мкМ, биомассы $B = 1100$ мкМ, объемах газовой и жидкой фаз реактора 15.6 и 44.4 мл соответственно (эксперимент R0.35). Символы (кружки) – эксперимент [14], кривые – модель (10)–(11).

го раз меньше концентрации субстрата, содержащего более легкий изотоп, которая почти равна концентрации полного субстрата (с легким и тяжелым изотопом).

Ранее анализ экспериментальных данных при моделировании микробиологических процессов выполнялся нами в основном для углерода ^{13}C .

Калибровку динамической модели проводили в два этапа. Сначала калибровали модель с общими переменными без участия изотопов, далее – часть модели с изотопными переменными. Так, при моделировании процесса окисления метана нитритом (NDAMO) [10] вычисляли изотопную сигнатуру по углероду для газообразного метана:

$$\delta^{13}C_{CH_4^{gas}} [‰] = 10^3 \left[\frac{^{13}C_{CH_4^{gas}} / ^{12}C_{CH_4^{gas}}}{0.0112372} - 1 \right], \quad (6)$$

где $^{13}C_{CH_4^{gas}}$ и $^{12}C_{CH_4^{gas}}$ – содержание тяжелого и легкого изотопа углерода в газообразном метане, соответственно; $^{13}C/^{12}C = 0.0112372$ – стандарт для окаменелости моллюска *Belemnitella americana* из формации Пи-Ди, Южная Каролина, США (PDB).

$$\delta^2H_{CH_4^{gas}} [‰] = 10^3 \left[\frac{{}^2H_{CH_4^{gas}} / {}^1H_{CH_4^{gas}}}{0.000150022503} - 1 \right], \quad (7)$$

где ${}^2H_{CH_4^{gas}}$ и ${}^1H_{CH_4^{gas}}$ – содержание тяжелого и легкого изотопа водорода в газообразном метане соответственно; ${}^2H/{}^1H = 0.000150022503$ – венский стандарт для морской океанической воды (V-SMOW). Далее теоретическую кривую сравнивали с экспериментальными данными.

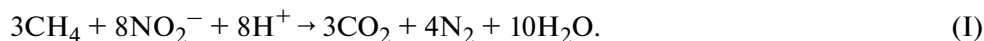
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Процесс NDAMO. Экспериментальная процедура была детально описана ранее [14]. Культура *Candidatus Microbilis Oxufera* была обогащена в среде без кислорода. При проведении двух инкубационных экспериментов использовали 60-мл стеклянные сосуды с объемами газовой и жидкой фаз 15.6 и 44.4 мл (R0.35, отношение объемов газовой и жидкой фаз равно 0.35) и с объемами газовой и жидкой фаз 44.4 и 15.6 мл (R2.8, отноше-

Целью настоящей работы является описание процесса NDAMO при рассмотрении дейтерия, стабильного изотопа водорода. Для сравнения теоретических кривых с экспериментальными данными для газообразного метана вычисляли изотопную сигнатуру по водороду:

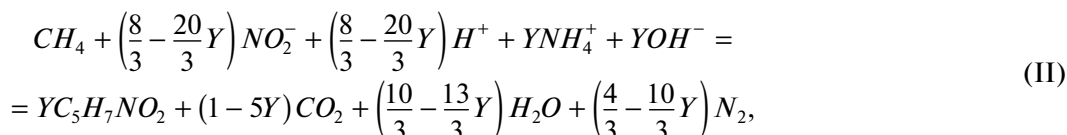
ние объемов газовой и жидкой фаз равно 2.8). В работе [15] ранее было вычислено, что начальная концентрация газообразного метана составляла около 790 мкМ (R0.35) и 4780 мкМ (R2.8). Необходимо отметить, что показанные на рис. 1 и 2 экспериментальные точки соответствуют разным сосудам, измерялись они лишь один раз. Согласно авторам работы [14], максимальная удельная скорость роста биомассы анаэробных метанокисляющих микроорганизмов (ANME) была почти одинаковой в обоих экспериментах (R0.35 и R2.8).

Динамическая модель NDAMO. Ранее авторы работы [16] предложили стехиометрическое уравнение для описания объединенного процесса анаэробного окисления метана и денитрификации нитрит-иона:



В работе [17] было показано, что процесс анаэробного окисления метана нитрит-ионом происходит внутри бактериальной клетки, при этом в ходе промежуточных реакций в процессе денитрификации нитрит-иона образуется кислород, который и окисляет метан. В работе [10] автором было предложено стехиометрическое уравнение

для описания фракционирования изотопов углерода при анаэробном окислении метана, осуществляемом культурой *Candidatus Microbilis Oxufera*. В настоящей работе это уравнение модифицировано, чтобы описать динамику фракционирования изотопов водорода в процессе NDAMO:



где Y – коэффициент трансформации субстрата в биомассу, $C_5H_7NO_2$ – обобщенная химическая формула бактерий, осуществляю-

щих реакцию. В анаэробных условиях величина Y гораздо меньше, чем в аэробных.

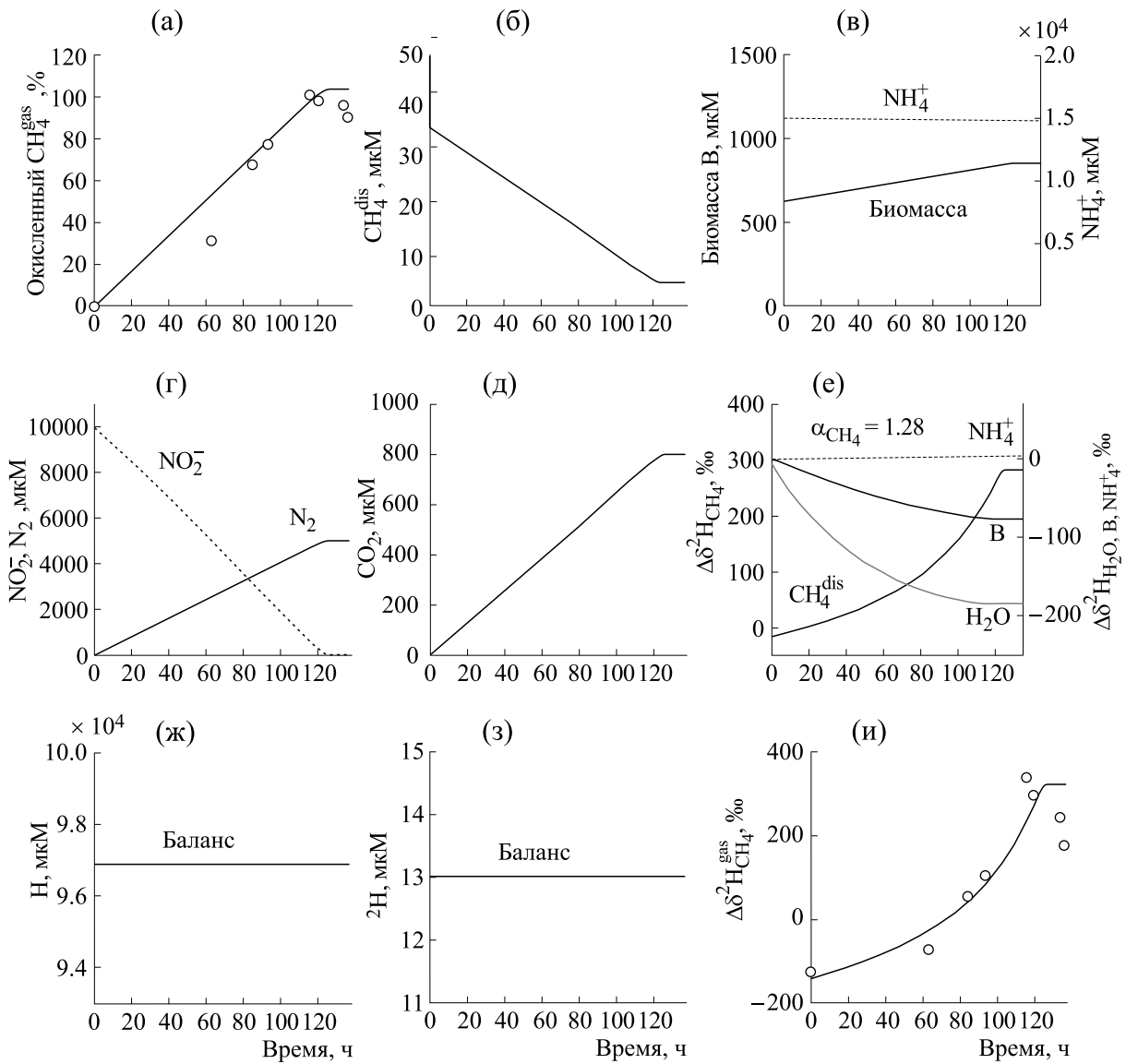
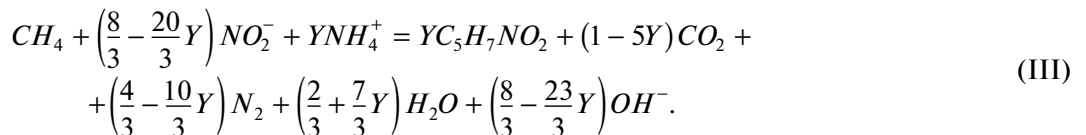


Рис. 2. Результаты расчета по динамической модели, описывающей анаэробное окисление метана нитритом NDAMO при начальных концентрациях газообразного метана $CH_4^{gas} = 4780$ мкМ, биомассы $B = 630$ мкМ, объемах газовой и жидкой фаз реактора 44.4 и 15.6 мл соответственно (эксперимент R2.8). Символы (кружки) – эксперимент [14], кривые – модель (10)–(11).

Перепишем уравнение (II) в виде, удобном для дальнейшего рассмотрения:



Следуя стехиометрическому уравнению (III), динамическую модель для общих переменных с учетом процессов массообмена газо-

образного и растворенного метана запишем в виде следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \frac{dCH_4^{gas}}{dt} = -K_L(SS-CH_4^{dis}), \\
 \frac{dCH_4^{dis}}{dt} = -R + K_L(SS-CH_4^{dis}), \\
 \frac{dNO_2^-}{dt} = -\frac{8-20Y}{3} R, \\
 \frac{dB}{dt} = YR, \\
 \frac{dN_2}{dt} = \frac{4-10Y}{3} R, \\
 \frac{dCO_2}{dt} = (1-5Y)R, \\
 \frac{dNH_4^+}{dt} = -YR, \\
 \frac{dH_2O}{dt} = \frac{d(H_2O_{недис} + OH^- + H^+)}{dt} = \frac{2+7Y}{3} R + \frac{8-23Y}{3} R + \frac{10-16Y}{3} R,
 \end{array} \right. \quad (8)$$

где $R = \rho_m B \frac{CH_4^{dis}}{K_{CH_4} + CH_4^{dis}} \frac{NO_2^-}{K_{NO_2^-} + NO_2^-} \frac{NH_4^+}{K_{NH_4^+} + NH_4^+}$ – скорость окисления растворенного метана в виде нелинейной функции Моно для трех субстратов. При этом CH_4^{gas} , CH_4^{dis} , NO_2^- , N_2 , CO_2 , NH_4^+ , $H_2O_{недис}$, OH^- – концентрации соответствующих веществ; B – концентрация метанотрофов; ρ_m – их максимальная удельная скорость окисления; K_{CH_4} , $K_{NO_2^-}$, $K_{NH_4^+}$ – соответствующие константы полунасыщения; K_L – коэффициент массообмена между растворенным метаном и метаном в газовой фазе. В системе уравнений (8) рассматривается полная концентрация воды: $H_2O = H_2O_{недис} + H^+ + OH^-$.

При описании процесса массообмена метана между жидкой и газовой фазами равновесные

концентрации CH_4^{dis} и CDH_3^{dis} вычислялись как $SS = K_H P_{CH_4}$ и $SSD = K_H P_{CDH_3}$, где K_H – константа Генри, $P_{CH_4} = 22.4^{-6} \times V_L \times CH_4^{gas} / V_G$ и $P_{CDH_3} = 22.4 \times 10^{-6} V_L \times CDH_3^{gas} / V_G$ – парциальные давления метана и метана, содержащего $^2H(D)$, выраженные в атм; V_L , V_G – соответственно объемы жидкости и газа в исследуемом реакторе в литрах. Из работы [18] можно заключить, что изменение константы Генри для CDH_3 не окажет сильного влияния на результаты, поскольку метан мало растворим в воде. В связи с необходимостью рассматривать содержание дейтерия в воде, в модель в качестве переменной была введена концентрация воды H_2O . Оценку величины начальной концентрации воды проводили следующим образом:

$$H_2O = \frac{m_{H_2O}}{M_{H_2O}} \frac{1}{V_L} = \frac{\rho_{H_2O} V_{H_2O}}{M_{H_2O}} \frac{1}{V_L} = 5.6 \cdot 10^4 \frac{V_{H_2O}}{V_L} \text{ (мкмоль/мл)}. \quad (9)$$

Таким образом, начальная концентрация воды зависит от объема, который занимают остальные вещества, находящиеся в сосуде ($V_{H_2O} = V_L - V_{\text{вещества}}$). В табл. 2 приведены используемые в модели начальные концентрации воды для R0.35 и R2.8. В соответствии с существенно большим начальным содержанием веществ в случае R2.8 (причем в модели рассматриваются только вещества, входящие в стехиометрическое уравнение (III)) начальная концентрация воды в R2.8 много ниже, чем в R0.35.

Ранее [15] для изотопов водорода в процессе NDAMO кинетический изотопный эффект рассматривался лишь для одного субстрата – метана. При этом фракционирование изотопов водорода в продукте реакции – воде – вообще не вычисля-

лось. Если для рассмотрения динамики ^{13}C необходимо было учитывать только один субстрат (CH_4), один продукт (CO_2) и биомассу микроорганизмов ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$), содержащие углерод, то для рассмотрения динамики ^2H необходимо принять во внимание уже два субстрата (CH_4 и NH_4^+), один продукт (H_2O) и биомассу ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$), содержащие водород (см. «Приложение»).

Допуская различные факторы фракционирования изотопов водорода для субстратов метана (α_{CH_4}) и аммония ($\alpha_{\text{NH}_4^+}$), можно записать следующие уравнения для изменения концентраций изотопных переменных:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dCDH_3^{dis}}{dt} &= -\frac{1}{\alpha_{\text{CH}_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} R + \frac{1}{\alpha_{g\text{CH}_4}} K_L (SSD - CDH_3^{dis}) \\ \frac{dCDH_3^{gas}}{dt} &= -\frac{1}{\alpha_{g\text{CH}_4}} K_L (SSD - CDH_3^{dis}) \\ \frac{d^{2H}B}{dt} &= \frac{R}{1 + \lambda} \left(\frac{1}{\alpha_{\text{CH}_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{Y}{\alpha_{\text{NH}_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right) \\ \frac{dHDO}{dt} &= \frac{R}{1 + 1/\lambda} \left(\frac{1}{\alpha_{\text{CH}_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{Y}{\alpha_{\text{NH}_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right) \\ \frac{dNDH_3^+}{dt} &= -\frac{1}{\alpha_{\text{NH}_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} YR \end{aligned} \right. \quad (10)$$

где $\alpha_{g\text{CH}_4}$ – кинетический фактор фракционирования по водороду в процессе массообмена метана из воды в газовую фазу, соответственно: CDH_3^{dis} , CDH_3^{gas} , ^{2H}B , HDO , NDH_3^+ – концентрации соответствующих реагентов, имеющих лишь один изотоп дейтерия; λ – доля дейтерия, которая в результате реакции оказывается в воде (см. «Приложение»). В системе уравнений (10) фактор кинетического изотопного фракционирования

по водороду между метаном в газовой фазе и растворенным в воде метаном вводится как параметр, величина которого мала ($\alpha_{g\text{CH}_4} = 0.01$ [19]).

Для того чтобы баланс в реакциях с изотопами дейтерия сохранялся, необходимо считать, что часть выделяющейся воды и биомассы остается без дейтерия (см. «Приложение»). Тогда в модель для общих переменных (8) следует добавить малые поправки:

$$\left\{ \begin{aligned}
 \frac{dCH_4^{gas}}{dt} &= -K_L(SS-CH_4^{dis}), \\
 \frac{dCH_4^{dis}}{dt} &= -R \left(1 + \frac{1}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right) + K_L(SS-CH_4^{dis}), \\
 \frac{dHNO_2}{dt} &= -\frac{8-20Y}{3} R \left(1 + \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{1}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right), \\
 \frac{dB}{dt} &= R \left(Y + \left(Y - \frac{1}{1+\lambda} \right) \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{1}{1+1/\lambda} \frac{Y}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right), \\
 \frac{dN_2}{dt} &= \frac{4-10Y}{3} R \left(1 + \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{1}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right), \\
 \frac{dCO_2}{dt} &= (1-5Y)R \left(1 + \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \frac{1}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right), \\
 \frac{dNDH_3^+}{dt} &= -YR \left(1 + \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} \right), \\
 \frac{dH_2O}{dt} &= R \left(\frac{10-16Y}{3} + \left(\frac{10-16Y}{3} - \frac{1}{1+1/\lambda} \right) \frac{1}{\alpha_{CH_4}} \frac{CDH_3^{dis}}{CH_4^{dis}} + \right. \\
 &\quad \left. + \left(\frac{10-16Y}{3} - \frac{Y}{1+1/\lambda} \right) \frac{1}{\alpha_{NH_4^+}} \frac{NDH_3^+}{NH_4^+} \right).
 \end{aligned} \right. \quad (11)$$

Изотопные сигнатуры веществ по водороду вычисляли, используя величины переменных модели, по следующим формулам:

$$\delta^2H_{CH_4} [\text{‰}] = 10^3 \left[\frac{CDH_3 / 4CH_4}{0.000150022503} - 1 \right], \quad (12)$$

$$\delta^2H_{NH_4^+} [\text{‰}] = 10^3 \left[\frac{NDH_3^+ / 4NH_4^+}{0.000150022503} - 1 \right], \quad (13)$$

$$\delta^2H_B [\text{‰}] = 10^3 \left[\frac{{}^2H_B / 7B}{0.000150022503} - 1 \right], \quad (14)$$

$$\delta^2H_{H_2O} [\text{‰}] = 10^3 \left[\frac{\frac{2(2+7Y) + (8-23Y)}{10-16Y} HDO / 2H_2O}{0.000150022503} - 1 \right]. \quad (15)$$

В табл. 1 содержатся кинетические коэффициенты полной динамической модели (10) – (11), а в табл. 2 – соответствующие начальные значения переменных. Из систем дифференциальных уравнений (10) и (11) видно, что величина коэф-

фициента трансформации субстрата в биомассу Y имеет существенное значение. ANME являются медленно растущими микроорганизмами, что соответствует небольшой величине Y . Ранее в работе [16] сообщалось, что время удвоения

Таблица 1. Параметры полной динамической модели (8)–(9)

Параметр	Значение
ρ_m	0.054 мкМ/сут
Y	0.05 мкМ/мкМ
K_{CH_4}	2.00 мкМ
K_{HNO_2}	43.00 мкМ
K_{NH_3}	0.01 мкМ
α_H	1.31
α_{gCH_4}	1.01
K_L	100.0 сут ⁻¹
K_H	0.923 мкМ/атм
V_L	44.4 мл
V_G	15.6 мл

биомассы T_d микроорганизмов ANME равно одной-двум неделям. Возьмем промежуточное значение: $T_d = 1.5$ недели. Используем формулу $T_d = \ln 2 / \mu_m$, где μ_m – удельная максимальная скорость роста биомассы. Из нее найдем, что $\mu_m = Y$, $\rho_m = 0.0028 \text{ ч}^{-1}$. Взяв значение $\rho_m = 0.054 \text{ мкМ} \cdot \text{мкМ}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, приведенное в табл. 1, получим $Y \approx 0.052 \text{ мкМ} \cdot \text{мкМ}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 показана теоретическая динамика процесса NDAMO для двух случаев (R0.35 и R2.8). Динамика для R2.8 с измененными объемами газа и жидкости была использована нами для проверки предложенной математической модели. Видно, что теоретическая модель, включающая в качестве переменных концентрации веществ, содержащих дейтерий, в том числе биомассу, успешно прошла эту проверку.

В динамической модели учитывается, что процесс массообмена метана между газовой и жидкой фазами происходит быстро, а микробиологическая реакция NDAMO, идущая в воде, продолжается достаточно долго. Концентрация растворенного метана является небольшой (рис. 1б и 2б). Еще раз подчеркнем, что показанные на рис. 1 и 2 экспериментальные точки соответствуют разным сосудам и получены в результате однократного измерения. Поэтому две точки на рис. 1а при $t > 20$ ч были исключены из рассмотрения, поскольку являлись артефактами

Таблица 2. Начальные значения переменных динамической модели (8)–(9)

Переменная	Значение, мкМ
CH_4^{gas}	788.3
CH_4^{dis}	31.5
HNO2	2500.0
B	1100.0
N2	0.01
CO2	0.000001
NH3	3000.0
H2O	10000.0
$^2H-CH_4^{dis}$	0.004
$^2H-CH_4^{gas}$	0.098
^2H-B	0.136
$^2H-H_2O$	0.372
$^2H-HNO_2$	0.310
$^2H-NH_3$	0.372

[15]. Длительность реакции NDAMO зависит от начальных концентраций CH_4 , NO_2^- и биомассы ANME. В процессе окисления метана концентрация биомассы увеличивается. В эксперименте R2.8, несмотря на значительно увеличенную начальную концентрацию NO_2^- (табл. 2), длительность реакции NDAMO существенно возрастает, поскольку начальная концентрация биомассы ANME значительно меньше, чем в эксперименте R0.35 (сравни рис. 1в и 2в). Процесс прекращается, когда концентрация одного из субстратов уменьшается до 0: CH_4 в R0.35 и NO_2^- в R2.8 (сравни рис. 1б и 2г).

Поскольку начальные величины δ^2H для реагентов и биомассы были нам неизвестны, на рис. 1е и 2е показана разница между текущими и начальными значениями соответствующих величин δ^2H , а именно: $\Delta\delta^2H = \delta^2H(t) - \delta^2H(0)$. Фракционирование изотопов водорода прекращается, когда скорость реакции NDAMO (III) стремится к 0. Фактор кинетического изотопного фракционирования водорода для метана в процессе NDAMO является одинаковым, равным 1.28 в обоих экспериментах (рис. 1е и 2е). Он гораздо больше, чем фактор фракционирования в процессе массообмена метана между его газооб-

разной и растворенной формами ($\alpha_{CH_4} = 1.28$ и $\alpha_{gCH_4} = 1.01$).

В системе сохраняется баланс атомов водорода Н и дейтерия D (рис. 1з и 2з):

$$4 \frac{dCH_4^{dis}}{dt} + 4d \frac{dCH_4^{gas}}{dt} + 7 \frac{dB}{dt} + 4 \frac{dNH_4^+}{dt} + 2 \frac{dH_2O}{dt} = 0,$$

$$\frac{dCDH_3^{dis}}{dt} + \frac{dCDH_3^{gas}}{dt} + \frac{d^{2H}B}{dt} + \frac{dNDH_3^+}{dt} + \frac{dHDO}{dt} = 0,$$

где множители указывают на количество элемента водорода в субстратах, биомассе и воде как продукте реакции, тогда как для дейтерия считается, что лишь один его атом присутствует в реактах и биомассе.

В процессе микробиологической реакции, идущей в воде, вследствие кинетического изотопного эффекта происходит изменение доли дейтерия в реагирующих молекулах: субстраты (растворенный метан и аммоний) обогащаются дейтерием, а продукт реакции (вода) и биомасса им обедняются. Если в эксперименте R0.35 концентрация биомассы лишь немного возрастает (рис. 1в), то в эксперименте R2.8 концентрация биомассы возрастает существенно (рис. 2в). Значительное возрастание концентрации биомассы в процессе NDAMO (сравни рис. 2в и 1в) приводит к значительному изменению величины ее сигнатуры $\Delta\delta^2H_B$ (сравни рис. 2е и 1е). Также при небольшой начальной концентрации воды (табл. 2) значительно падает и содержание дейтерия в воде (сравни рис. 2е и 1е).

Увеличение содержания дейтерия в метане (рис. 2е) прекращается, когда реакция NDAMO заканчивается (рис. 2г). Резкое увеличение величины δ^2H в метане (рис. 1е и 2е) происходит вследствие резкого уменьшения его концентрации. Для аммония, концентрация которого изменяется мало (рис. 1в и 2в), незначительно изменяется и величина разности $\Delta\delta^2H_{NH_4^+}$ (рис. 1е и 2е).

В целом использование концентраций веществ, содержащих дейтерий (субстратов CDH_3 и NDH_3^+ , продукта HDO и биомассы $C_5DH_6NO_2$), в качестве изотопных переменных с сохранением баланса водорода и дейтерия позволило описать динамику процесса NDAMO. Согласно формулам (12)–(15), изменение соответствующих величин $\Delta\delta^2H$ зависит от отношения концентраций веществ, содержащих и не содержащих дейтерий.

В эксперименте динамика сигнатуры по водороду измерялась лишь для метана, что позволило определить фактор фракционирования Н в метане ($\delta^2H_{CH_4}$). Если в первом эксперименте, сопровождающемся небольшим падением содержания дейтерия в воде и биомассе, процесс фракционирования заканчивается при $t \geq 17$ ч, то во втором

эксперименте он заканчивается при $t \geq 140$ ч и сопровождается значительным падением содержания дейтерия в воде, зависящим от начальной концентрации воды, содержащей дейтерий. Это происходит из-за разбавления воды в сосуде обедненной дейтерием водой, образующейся в процессе NDAMO (рис. 3).

В табл. 3 приводятся значения факторов фракционирования α для одиннадцати биологических процессов, исследованных нами ранее. Среди них динамика роста водорослей (изотопы азота),

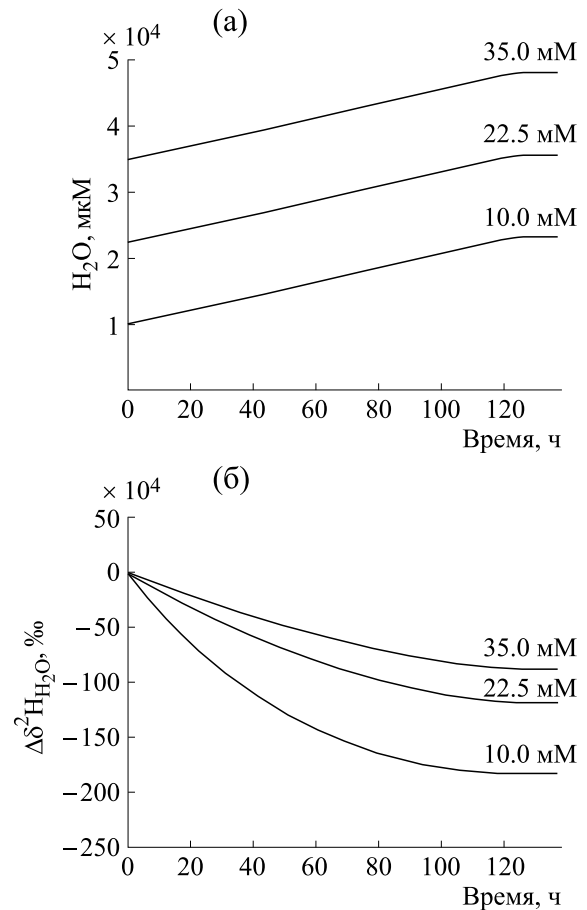


Рис. 3. Теоретические кривые изменений общей концентрации воды (а) и величин $\Delta\delta^2H_{H_2O}$ (б) в процессе NDAMO при разных начальных концентрациях воды (10, 22.5 и 35 мМ) для эксперимента R2.8.

Таблица 3. Исследуемые процессы, константа скорости и фактор фракционирования стабильных изотопов

Процесс	Максимальная удельная скорость роста биомассы (начальная концентрация биомассы) *	Фактор фракционирования изотопов	Примечания
1. Рост водорослей <i>Thalassiosira pseudonana</i> на отдельном N-субстрате и их смеси (данные [20], модель [21])	Аммоний: 0.095 ч ⁻¹ 9.3 мкМ	$\alpha_N = 1.02$	Для смеси N-субстратов высокая концентрация аммония ингибирует потребление нитрата и мочевины
	Нитрат: 0.071 ч ⁻¹ 3.2 мкМ	$\alpha_N = 1.0047$	
	Мочевина: 0.084 ч ⁻¹ 4.0 мкМ	$\alpha_N = 1.0008$	
2. Денитрификация нитрата в азот почвенными микроорганизмами с органическими субстратами глюкозой и этанолом (данные [22], модель [8])	Этанол: 0.72 сут ⁻¹ 0.0025 мМ	$\alpha_N = 1.0132$	Изотопные уравнения для субстрата, продукта и биомассы используется как составные части двух последовательных реакций. Промежуточная концентрация нитрита была небольшой для экспериментов с этанолом и большой для экспериментов с глюкозой
	Глюкоза: 1.64 сут ⁻¹ 0.0004 мМ	$\alpha_N = 1.0175$	
3. Метанизация ацетата (данные [23], модель [24]):			
а) при низкой концентрации аммония 0.18 г·л ⁻¹	<i>Merthanosarcina</i> - <i>ceae</i> : 0.36 сут ⁻¹ 0.0017 г·л ⁻¹	$\alpha_C = 1.02$	Идет конкуренция за ацетат между двумя группами ацетокластических метаногенов
	<i>Methanosae</i> - <i>taceae</i> : 0.2 сут ⁻¹ 0.0057 г·л ⁻¹	$\alpha_C = 1.005$	
б) при высокой концентрации аммония 5.4 г·л ⁻¹	<i>Methanosarcina</i> - <i>ceae</i> : 0.054 сут ⁻¹ 0.0017 г·л ⁻¹	$\alpha_C = 1.02$	Происходит замещение ацетокластического метаногенеза на водородотрофный метаногенез. При этом <i>Methanosae</i> - <i>taceae</i> полностью исчезают к концу реакции
	Синтрофы, окисляющие ацетат: 0.08 сут ⁻¹ 0.00011 г·л ⁻¹	$\alpha_C = 1.02$	
	Водородотрофн ые метаногены: 2 сут ⁻¹ 0.00000011 г·л ⁻¹	$\alpha_C = 1.065$	
4. Аэробное окисление метана (данные [25], модель [26]):			Фракционирование изотопов идет в процессе микробного окисления растворенного метана
а) рибулезо-фосфатный путь	<i>Methylocadmium</i> <i>gracile</i> : 0.176 ч ⁻¹ 0.2 мМ	$\alpha_C^{CH_4} = 1.015$ $\alpha_H^{CH_4} = 1.11$	Окисление метана по рибулезо-фосфатному пути идет гораздо медленнее, чем по сериновому

Таблица 3. Продолжение

б) сериновый путь	<i>Methylosinus sporum</i> : 1.12 ч ⁻¹ 0.025 мМ	Cu – в избытке:	В сериновом пути рост биомассы увеличивается с возрастанием концентрации CO ₂
		$\alpha_{\text{C}}^{\text{CH}_4} = 1.02$	
		$\alpha_{\text{H}}^{\text{CH}_4} = 1.15$	
		Cu – лимитирует:	
		$\alpha_{\text{C}}^{\text{CH}_4} = 1.017$	
		$\alpha_{\text{H}}^{\text{CH}_4} = 1.16$	
5. Образование метана и углекислого газа в донных отложениях тропических озер (озеро Jatoba) (данные [27], модель [28])	Ацетокластические метаногены: 0.0625 сут ⁻¹ 0.0028 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Ac-метаногенез}} = 1.01$	Доминирует водородотрофный метаногенез, поскольку ацетат переходит в H ₂ и CO ₂ из-за синтрофного окисления ацетата
	Синтрофы, окисляющие ацетат: 0.05 сут ⁻¹ 0.0034 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Ac-окисление}} = 1.01$	
	Водородотрофные метаногены: 1.5 сут ⁻¹ 0.000023 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{H}_2/\text{CO}_2\text{-метаногенез}} = 1.072$	
6. Образование метана в торфе бореального мезотрофного болота (данные [29], модель [30])	Ацетокластические метаногены: 0.02 сут ⁻¹ 0.0073 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Ac-метаногенез}} = 1.008$	Отношение ¹³ C/ ¹² C в CO ₂ определяет динамические изменения в скоростях отдельных реакций
	Водородотрофные метаногены: 0.125 сут ⁻¹ 0.0011 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{H}_2/\text{CO}_2\text{-метаногенез}} = 1.075$	
7. Образование метана в тропическом озере Ladario с задержкой из-за анаэробной респирации (данные [27], модель [31])	Кислотогенез: 1.0 сут ⁻¹ 0.00000023 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Кислотогенез}} = 1.002$	Анаэробное дыхание и кислотогенез конкурируют за мономер целлюлозы. Высокое соотношение CO ₂ /CH ₄ с задержкой образования метана интерпретировалось как доминирование анаэробного дыхания в начале процесса.
	Анаэробное дыхание: 2.5 сут ⁻¹ 0.00000056 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Анаэробное дыхание}} = 1.002$	
	Ацетокластический метаногенез: 0.075 сут ⁻¹ 0.00028 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Ac-метаногенез}} = 1.005$	
	Синтрофное окисление ацетата: 0.1 сут ⁻¹ 0.000056 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{Ac-окисление}} = 1.005$	
	Водородотрофный метаногенез: 1.75 сут ⁻¹ 0.000000011 г·л ⁻¹	$\alpha_{\text{C}}^{\text{H}_2/\text{CO}_2\text{-метаногенез}} = 1.05$	

Таблица 3. Окончание

8. Формирование анаэробного консорциума метан-окисляющих архей (ANME) и сульфат-редуцирующих бактерий (DSS) (данные [32], модель [33])	Начальные концентрации ANME и метана в газовой фазе:		В проточной системе с постепенным увеличением входящей концентрации метана идет увеличение концентрации ANME в консорциуме микроорганизмов и уменьшение фактора фракционирования изотопа серы в сульфате
	1.2 г·л ⁻¹ , 3.3 г·л ⁻¹	$\alpha_S = 1.040$	
	2.0 г·л ⁻¹ , 8.0 г·л ⁻¹	$\alpha_S = 1.024$	
	2.4 г·л ⁻¹ , 14 г·л ⁻¹	$\alpha_S = 1.023$	
	3.0 г·л ⁻¹ , 26 г·л ⁻¹	$\alpha_S = 1.022$	
	3.5 г·л ⁻¹ , 44 г·л ⁻¹	$\alpha_S = 1.018$	
9. Линейное окисление метана сульфатом в трех периодических реакторах, инокулированных морскими донными отложениями (данные [7], модель [33])	Начальные концентрации ANME:		Наименьший фактор фракционирования изотопа углерода в метане получен при наибольшей концентрации анаэробных метанотрофных микроорганизмов
	Hydrate Ridge: 8.4 мМ	$\alpha_C = 1.012$	
	Amon Mud Volcano: 1.2 мМ	$\alpha_C = 1.02$	
	Black Sea: 1.28 мМ	$\alpha_C = 1.04$	
10. Продукция метана и углекислого газа в образцах торфа западносибирского эвтрофного болота (данные и модель [34])	Гидролиз/кислотогенез целлюлозы: 0.013 сут ⁻¹	$\alpha_C^{\text{Кислотогенез}} = 1.002$	Продукция метана в три раза больше, чем продукция углекислого газа. Доминирование ацетокластического метаногенеза над водородотрофным из-за активности гомоацетогенов
	Ацетокластический метаногенез 0.105 сут ⁻¹	$\alpha_C^{\text{Ac-метаногенез}} = 1.005$	
	Водородотрофный метаногенез: 0.912 сут ⁻¹	$\alpha_C^{\text{H}_2/\text{CO}_2\text{-метаногенез}} = 1.08$	
	Гомоацетогенез: 0.912 сут ⁻¹	$\alpha_C^{\text{Гомоацетогенез}} = 1.08$	
11. Анаэробное окисление метана нитритом (данные [14], модель [10])	Анаэробное окисление метана нитритом: 0.016 сут ⁻¹ 0.014 г·л ⁻¹	$\alpha_C^{\text{массообмен}} = 1.001$	Концентрация растворенного метана лимитирует общую скорость его окисления. Идет обогащение метана более тяжелым углеродом ¹³ C. Фактор фракционирования изотопа углерода в метане при его микробиологическом окислении гораздо больше, чем в процессе массообмена между растворенной и газовой формами метана
		$\alpha_C^{\text{окисление}} = 1.030$	

Примечание. * – Величина максимальной удельной скорости роста биомассы μ_m зависит от начальной концентрации биомассы B_0 . Чем больше B_0 , тем ниже величина μ_m .

денитрификация нитрата почвенными микроорганизмами (изотопы азота), метанизация ацетата при различных концентрациях аммония (изотопы углерода), образование метана в донных отложениях тропических озер (изотопы углерода), анаэробное окисление метана сульфатом и формирование консорциума метан-окисляющих архей и сульфатредуцирующих бактерий в морских экосистемах (изотопы серы и углерода). В цитируемых в табл. 3 математических моделях использовался лишь один субстрат, содержащий разные стабильные изотопы, прежде всего, углерода ^{13}C в целлюлозе [21, 28, 30, 34] и ацетате [24] с образованием CH_4 и CO_2 , изотопы азота ^{15}N в азотсодержащих субстратах [21] и нитрите [9], трансформирующемся в закись азота и молекулярный азот, изотопы серы ^{35}S в сульфате [33], трансформирующемся в сероводород через образование нуль-валентной серы. При моделировании процессов аэробного [26] и анаэробного окисления метана сульфатом [10] наряду с изотопом ^{13}C использовался и изотоп дейтерия ^2H . Однако при этом не учитывалось, что помимо метана могут быть и другие дейтерийсодержащие субстраты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любая математическая модель основана на неизбежном упрощении свойств реального объекта. Измерение изотопных переменных позволяет по возможности заглянуть внутрь «черного ящика». При этом математическое описание динамики микробиологических процессов, учитывающее изотопы, может быть довольно сложным, поскольку оно всегда должно опираться на сохранение баланса химических элементов, в том числе их изотопов, и становится оправданным, если при этом открываются новые знания о системе. Совместное описание нелинейной динамики общих и изотопных переменных позволило стандартным способом математически анализировать последовательные и параллельные метаболические пути превращений различных субстратов в природных и техногенных химико-биологических системах.

Показано, что в процессе микробиологической реакции NDAMO, идущей в воде, вследствие кинетического изотопного эффекта происходит изменение доли дейтерия в реагирующих молекулах, при этом субстраты обогащаются дейтерием, а продукт (H_2O) и биомасса им обедняются.

В обобщающей табл. 3 приведены факторы фракционирования соответствующих изотопов для одиннадцати экологических процессов с примечаниями к «механизму» рассматриваемых процессов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.С. Брезгунову за ценные советы при описании динамики фракционирования стабильных изотопов и Д.С. Ремизову за предложенный метод оценки стехиометрических коэффициентов в использованных химических уравнениях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена согласно плану Института водных проблем РАН (номер темы Госзадания ААА-А18-118022090104-8).

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. Э. М. Галимов, *Изотопы углерода в нефтегазовой геологии* (Наука, М., 1973).
2. H. Craig, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **12**, 133 (1957).
3. J. W. C. Rayleigh, *Philos. Mag.*, **42**, 493 (1896).
4. A. Mariotti, J. C. Germon, P. Hubert, et al., *Plant and Soil*, **62**, 413 (1981).
5. Л. Меландер и У. Содерс, *Скорости реакций изотопных молекул* (Мир, М., 1983).
6. S. Bakkaloglu, D. Lowry, R. E. Fisher, et al., *Waste Managem.*, **132**, 162 (2021).
7. T. Holler T., G. Wegener, K. Knittel, et al., *Env. Microbiol. Rep.*, **1**, 370 (2009).
8. V. A. Vavilin and S. V. Rytov, *Chemosphere*, **134**, 417 (2015).
9. V. A. Vavilin, L. Y. Lokshina, and S. V. Rytov, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **58**, 44 (2022).
10. V. A. Vavilin, *Env. Dyn. Glob. Climate Change*, **12** (2), (2021). DOI: 10.17816/edgcc58932
11. D. J. Batstone, J. Keller, I. Angelidaki, et al., *Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1)* (IWA Press, Padstow, Cornwall, UK, 2002).
12. Y. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73** (6), 1241 (2007).
13. В. А. Вавилин и В. Б. Васильев, *Математическое моделирование процессов биологической очистки сточных вод активным илом* (Наука, М., 1979).
14. O. Rasigraf, C. Vogt, H. H. Richnow, et al., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **89**, 256 (2012).
15. V. A. Vavilin and S. V. Rytov, *Ant. Leewenh.*, **104**, 1097 (2013).

16. A.A. Raghoebarsing, A. Pol, K.T. van de Pas-Schoonen, et al., *Nature*, **440**, 918 (2006).
17. K. F. Etwig, M. K. Butler, D. Le Paslier, et al., *Nature*, **464**, 543 (2010).
18. M. F. Costa Gomes and J.-P. Grolier, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **3**, 1047 (2001).
19. M. Knox, P. D. Quay, and D. Wilbur, *Geophys. Res.*, **97** (C12), 20335 (1992).
20. N. A. D. Waser, P. J. Harrison, B. Nielsen, et al., *Limnol. Oceanogr.*, **43** (2), 215 (1998).
21. V. A. Vavilin, S. V. Rytov, and L. Y. Lokshina, *Ecol. Modell.*, **279**, 45 (2014).
22. G. Vidal-Gavilan, A. Folch, N. Otero, et al., *Appl. Geochem.*, **32**, 153 (2013).
23. J. Grossin-Debattista, Docteur these (Universite Bordeaux-1, Bordeaux, France, 2011). http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2011/GROSSIN-DEBATTISTA_JULIEN_2011.pdf
24. V. A. Vavilin and S. V. Rytov, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **53**, 135 (2017).
25. S. Feisthauer, C. Vogt, J. Modrzynski, et al., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **75**, 1173 (2011).
26. V. A. Vavilin, S. V. Rytov, N. Shim, and C. Vogt, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **52**, 185 (2016).
27. R. Conrad, M. Noll, P. Claus, et al., *Biogeosciences*, **8**, 795 (2011).
28. V. Vavilin, S. Rytov, and R. Conrad, *Ecol. Modell.*, **363**, 81 (2017).
29. P. Galand., K. Yrjälä, and R. Conrad, *Biogeosciences*, **7**, 3893 (2010).
30. V. A. Vavilin, S. V. Rytov, and L. Y. Lokshina, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **54**, 475 (2018).
31. V. A. Vavilin, S. V. Rytov, and L. Y. Lokshina, *Ecol. Modell.*, **386**, 59 (2018).
32. C. Deusner, T. Holler, G. L Arnold, et al., *Earth Planet. Sci. Lett.*, **399**, 61 (2014).
33. V. A. Vavilin, L. Y. Lokshina, and S. V. Rytov, *Wat. Sci. Technol.*, **79** (11), 2056 (2019).
34. L. Y. Lokshina, V. A. Vavilin, Y. Litti, et al., *Wat. Resour.*, **46** (Suppl.), S110 (2019).

Application of the Basic Isotope Equations for Description of the Dynamics of Microbiological Processes: Deuterium Redistribution

V.A. Vavilin* and L.Y. Lokshina*

**Water Problems Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119333 Russia*

Basic equations used to describe isotope dynamics that take into account the retention of deuterium equilibrium, were helpful in two laboratory experiments for analyzing the dynamics of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (NDAMO) at different initial concentrations of the substrates and deuterium isotope variables. Notably, in the second experiment, the initial amount of water in a closed vessel was reduced to about 2.8 times. Methane is completely consumed but nitrite ions are still present in excessive amounts at the end of the first experiment, while methane is present but nitrite ions are completely exhausted at the end of the second experiment. In the model, concentrations of the substrates containing a single deuterium atom (CH_4 and NH_4^+), concentration of the product (H_2O), and concentration of the biomass of methanotrophic microorganisms ANME ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$) are taken as isotope variables. Stoichiometric reaction equations are derived to describe the redistribution of deuterium between the reaction substrates, product (water), and biomass. The isotope fractionation is shown to proceed in the course of a microbiological reaction in water. As a result, the substrates become enriched in deuterium, as water and biomass become depleted of deuterium. In the first experiment accompanied by a slight drop in the content of deuterium in biomass and water, the fractionation process ends after $t \geq 17$ h. In the second experiment, the content of deuterium in water and biomass decreases significantly and fractionation ends after $t \geq 140$ h. This is due to the dilution of the water in the vessel with the deuterium-depleted water generated by the NDAMO process. This paper also provides a summary of the results of our study on the modeling of the dynamics of eleven biological processes, in which mainly stable carbon isotopes have been measured, based on the information gathered in a longitudinal study. The isotope fractionation factors used in the simulation are presented.

Keywords: dynamics of ecological processes, kinetic isotope effect, basic isotope equations, serial and parallel reactions

УДК 577.3

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА НА ЛИМФОЦИТЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А.К. Чигасова*, Л.А. Островская*., Д.Б. Корман*

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

#E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 23.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Проведено исследование механизма действия полиакрилата золота (аурумакрила) на лимфоциты крови человека, включающее оценку влияния препарата на жизнеспособность клеток, структуру ДНК и способность к генерации активных форм кислорода. Установлено, что аурумакрил обладает доза- и экспозиционно- зависимым цитотоксическим действием, индуцирует однонитевые разрывы ДНК и вызывает генерацию внутриклеточных активных форм кислорода.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), лимфоциты человека, цитотоксичность, однонитевые разрывы ДНК, активные формы кислорода.

DOI: 10.31857/S0006302922060126, EDN: LKICKI

Препарат полиакрилата золота (аурумакрил), как было показано ранее, проявляет значительную противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) *in vivo*, а также обладает цитотоксической эффективностью в отношении клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) *in vitro* [1-5].

Важной особенностью действия препарата является обнаруженное нами в экспериментах с культурой клеток опухоли человека MCF-7 отсутствие перекрестной резистентности между аурумакрилом и такими широко применяемыми в клинической практике средствами как цисплатина и доксорубин [6].

Исследование механизма действия аурумакрила на опухолевые клетки (культура MCF-7) показало, что апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной препаратом гибели клеток [7].

Установлено, что ДНК опухолевых клеток является одной из основных мишеней для аурумакрила, вызывающего структурные изменения макромолекулы в виде сшивок [7].

Препарат вызывает также значительные изменения в кинетике клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток. Воздей-

ствии аурумакрила приводило к накоплению клеток в фазе пролиферативного покоя G_0 , снижению доли делящихся клеток и к утрате выжившими клетками репродуктивной способности [3].

Наряду с этим необходимо отметить, что золотосодержащие соединения, согласно литературным данным, относят к потенциальным противоопухолевым агентам с мультитаргетным механизмом действия, способным не только влиять на структуру ДНК и пролиферативные процессы в опухолевых клетках, но и вызывать значительные изменения в антиоксидантном статусе опухоли [8, 9].

В продолжение исследования механизма действия аурумакрила проведено изучение цитотоксической активности препарата в отношении лимфоцитов крови человека, а также его влияния на структуру ДНК (однонитевые разрывы) и генерацию внутриклеточных активных форм кислорода (АФК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследованный препарат аурумакрил – это неполная золотая соль полиакриловой кислоты, содержащая 8 масс. % ионов металла и отвечающая общей формуле $(-CH_2-CH-COOH-)_n(-CH_2CHCOO(AuCl_3H-))_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения

Сокращение: АФК – активные формы кислорода.

карбоксылной и карбоксилатной групп соответственно при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде [1]. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл.

Культура лимфоцитов крови человека. В экспериментах использована гепаринизированная кровь здоровых доноров в возрасте 20–30 лет, давших информированное согласие на проведение исследования.

Выделение лимфоцитов из крови проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографина (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, США) в соответствии с приложенной инструкцией.

После выделения из крови отмытые лимфоциты ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Суспензию свежeweделенных лимфоцитов инкубировали с аурумакрилом, примененным в указанных выше концентрациях, при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч.

Оценка цитотоксического эффекта. Исследование цитотоксичности аурумакрила в отношении лимфоцитов крови человека проведено в тесте с использованием 0.4% раствора трипанового синего, восприимчивость к которому характеризует жизнеспособность клеток. Клеточную суспензию смешивали в равных пропорциях с раствором 0.4% трипанового синего, далее ресуспендировали и непосредственно после этого оценивали клеточную гибель путем подсчета окрашенных (погибших) клеток в камере Горяева при анализе 500 клеток для каждой точки.

Полученные данные представлены в виде кривых, характеризующих изменение доли погибших после воздействия аурумакрила клеток по отношению к контролю в зависимости от концентрации препарата.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет).

Суспензию контрольных или обработанных аурумакрилом клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали при 4°C в течение 10 мин.

Затем в течение 1 ч клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton-X100) и ше-

лочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, рН > 13, стабилизация по напряжению – 0.75 В/см, 20 мин при 4°C) с последующей нейтрализацией (3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C).

Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, рН 7.4).

Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Оценка генерации активных форм кислорода. Для оценки генерации АФК использовали краситель 5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (Invitrogen, США), который легко проникает через клеточную мембрану и гидролизуется в клетке эстеразами с последующим окислением до флуоресцирующего комплекса. Окисленный краситель хорошо удерживается клетками и считается маркером внутриклеточных АФК [10].

Контрольные или обработанные полиакрилатом золота клетки инкубировали при 37°C в фосфатном буфере (рН 7.4) с красителем (2 мкмоль/л) в течение 60 мин и измеряли интенсивность их флуоресценции на флуориметре Qubit (Invitrogen, США) при длине волны возбуждения 480–490 нм и длине волны излучения 520–530 нм.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью программы Statistica 7.0. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений для пяти независимых измерений с учетом стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование механизма действия аурумакрила на лимфоциты крови человека включало оценку влияния препарата на жизнеспособность клеток, структуру ДНК и способность к генерации АФК.

Цитотоксичность аурумакрила. Влияние аурумакрила на жизнеспособность лимфоцитов характеризуют данные, представленные на рис. 1.

Как видно из представленных данных, цитотоксичность аурумакрила для лимфоцитов крови человека существенным образом зависит от концентрации и главным образом от времени воздействия препарата на клетки. Так, при инкубации препарата с клетками в течение 1 ч гибель клеток с возрастанием концентрации препарата не увеличивается и находится практически на уровне

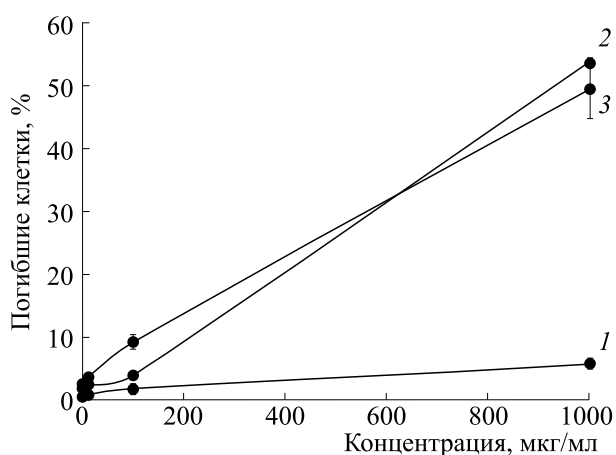


Рис. 1. Изменение доли погибших лимфоцитов крови человека в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила. Время: 1 – 1 ч, 2 – 6 ч, 3 – 24 ч.

контроля (рис. 1, кривая 1). С увеличением времени инкубации до 6 и 24 ч гибель лимфоцитов линейно возрастает с повышением концентрации аурумакрила, достигая максимума – гибели примерно 50% клеток – при воздействии препарата в концентрации 1000 мкг/мл в течение как 6 ч, так и 24 ч (рис. 1, кривые 2 и 3). Иными словами, максимальный цитотоксический эффект препарата наблюдается при воздействии в концентрации 1000 мкг/мл в течение 6 ч. Дальнейшее увеличение экспозиции до 24 ч не приводит к повышению цитотоксического эффекта аурумакрила в отношении лимфоцитарных клеток крови человека.

Таким образом, показано, что расчетная доза препарата, летальная для 50% лимфоцитов (IC_{50}), составляет 1000 мкг/мл (80 мкг/мл в пересчете на содержание золота) как при инкубации с аурумакрилом в течение 6 ч, так и при инкубации в течение 24 ч.

Отметим, что показатель цитотоксичности аурумакрила IC_{50} для опухолевых клеток (MCF-7), определенный в тесте с использованием красителя трипановый синий, составляет для аурумакрила 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота).

Приведенные данные свидетельствуют о более высокой цитотоксичности аурумакрила в отношении опухолевых клеток (культура MCF-7) по сравнению с нормальными клетками (лимфоциты крови) человека.

Индукция аурумакрилом односторонних разрывов ДНК. Известно, что при анализе структурных изменений ДНК методом ДНК-комет доля фрагментированной (получившей односторонние разрывы) ДНК, мигрирующей во время электрофореза в геле агарозы к аноду и создающей так

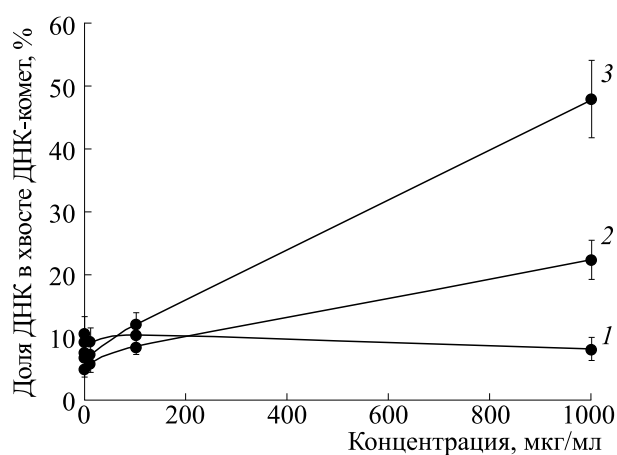


Рис. 2. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет лимфоцитов крови человека в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила. Время: 1 – 1 ч, 2 – 6 ч, 3 – 24 ч.

называемый «хвост» ДНК-комет, регистрируется путем оценки показателя электрофоретической подвижности ДНК.

Изменение доли фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила и времени воздействия препарата охарактеризовано кривыми, представленными на рис. 2.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что доля фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет зависит от концентрации аурумакрила, но в большей степени – от времени воздействия препарата. Видно, что при экспозиции лимфоцитов с аурумакрилом в течение 1 ч доля фрагментированной ДНК практически не отличается от контрольного уровня, колеблющегося в пределах от 6 до 10%, при использовании всех концентраций в изученном диапазоне (рис. 2, кривая 1). Доля фрагментированной ДНК в хвосте ДНК-комет увеличивается до 22% при удлинении экспозиции до 6 ч, а при воздействии препарата в течение 24 ч – до 48% при применении препарата в концентрации 1000 мкг/мл, то есть в 2.2 и 4.8 раза по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 2 и 3 соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии аурумакрила на структуру ДНК лимфоцитов, выражающемся в увеличении доли фрагментированной ДНК, мигрирующей в хвост ДНК-кометы, что может быть истолковано как способность препарата индуцировать односторонние разрывы ДНК. При этом наибольший эффект – увеличение доли фрагментированной ДНК в лимфоцитах крови человека до 48% – наблюдается при воздействии препарата в максимальной из изученных концентраций 1000 мкг/мл в течение 24 ч.

Генерация аурумакрилом активных форм кислорода. Содержание внутриклеточных АФК принято оценивать в соответствии с показателем интенсивности флуоресценции клеток, обработанных специфическим красителем (5(6)-хлорометил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом) [10].

Изменение интенсивности флуоресценции лимфоцитов в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила показано на рис. 3.

Представленные данные свидетельствуют о способности аурумакрила вызывать генерацию внутриклеточных АФК. Причем выраженность этого эффекта зависит как от концентрации препарата, так и в большей степени от времени его воздействия на клетки.

Как видно, уровень АФК при инкубации лимфоцитов с аурумакрилом в течение 1 ч и 6 ч достигает максимальных значений, равных 0.70 и 0.85 отн. ед. соответственно, при применении препарата в наибольшей из изученных концентраций (1000 мкг/мл) (рис. 3, кривые 1 и 2 соответственно).

При инкубации лимфоцитов с аурумакрилом, примененным в той же максимальной концентрации (1000 мкг/мл) в течение 24 ч уровень АФК достигает значения, равного 1.78 отн. ед. (рис. 3, кривая 3).

Значения показателя АФК в контроле колеблются в узком диапазоне, равном 0.27–0.30 отн. ед. (рис. 3).

Таким образом, показано, что воздействие аурумакрила (1000 мкг/мл) в течение 1, 6 и 24 ч приводит к увеличению содержания АФК в лимфоцитах крови человека в 2.3, 2.8 и 6.0 раз соответственно, что является убедительным свидетельством влияния препарата на окислительно-восстановительные процессы в клетке.

Анализируя результаты проведенного исследования, отметим следующие экспериментально установленные факты.

Аурумакрил обладает определенным дозо- и экспозиционно-зависимым цитотоксическим действием на лимфоциты крови человека, менее выраженным, однако, чем его летальный эффект в отношении опухолевых клеток. IC_{50} препарата составляет 1000 мкг/мл (80 мкг/мл в пересчете на содержание золота) для лимфоцитов и 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота) для опухолевых клеток (MCF-7).

Аурумакрил оказывает деструктивное действие на ДНК лимфоцитов крови человека, индуцируя однонитевые разрывы в структуре макромолекулы. Доля фрагментированной ДНК, определенная методом ДНК-комет, возрастает под

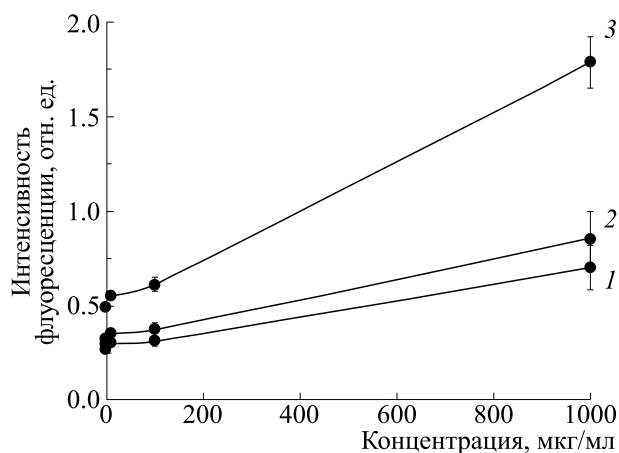


Рис. 3. Генерация активных форм кислорода в лимфоцитах крови человека под влиянием аурумакрила. Изменение интенсивности флуоресценции клеток в зависимости от концентрации и времени воздействия препарата. Время: 1 — 1 ч, 2 — 6 ч, 3 — 24 ч. По оси абсцисс — концентрация аурумакрила, по оси ординат — интенсивность флуоресценции лимфоцитов.

влиянием препарата (1000 мкг/мл, инкубация 24 ч) в 4.8 раза по сравнению с контролем.

Аурумакрил обладает способностью вызывать генерацию внутриклеточных АФК. Воздействие препарата (1000 мкг/мл, инкубация 24 ч) приводит к увеличению содержания АФК в лимфоцитах крови человека в шесть раз по сравнению с контролем.

При рассмотрении представленных результатов необходимо подчеркнуть, что данные, полученные с использованием культуры лимфоцитов крови человека, не могут быть однозначно истолкованы как свидетельство нежелательного токсического действия аурумакрила на нормальные клетки.

В связи с вышесказанным уместно упомянуть о детальном обсуждении данного аспекта действия противоопухолевых препаратов, проведенном нами ранее по поводу обнаружения цитотоксического эффекта аурумакрила в отношении фибробластов кожи человека линии hFB-hTERT6 [11].

Отмечалось, что цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам свойственна многим конвенциональным противоопухолевым препаратам, что не явилась препятствием для внедрения в широкую клиническую практику эффективных противоопухолевых средств, таких, в частности, как цисплатина и доксорубицин.

Согласно существующим представлениям не следует рассматривать выявляемую в опытах *in vitro* непосредственную цитотоксичность в отношении нормальных клеток в качестве указания

на отсутствие селективности действия препарата по отношению к опухоли *in vivo*.

При этом естественно вопрос о клинической безопасности препарата может быть решен только после проведения стандартного доклинического токсикологического изучения в специальных экспериментах.

В заключение отметим, что полученные в проведенном исследовании результаты расширяют представление о механизме действия аурумакрила как потенциального противоопухолевого препарата и имеют определенное значение для понимания механизма действия биологически активных золотосодержащих соединений в целом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.). От всех участников экспериментов было получено информированное согласие на проведение исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., Хим. физика, **38** (12), 64 (2019).
2. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., Рос. биотерапевтич. журн., **19** (4), 74 (2020).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., Биофизика, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
5. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., Биофизика **67** (5), 947 (2022).
7. А. К. Чигасова, Л. А. Островская и Д. Б. Корман, Биофизика, **67** (6), (2022).
8. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, Вопр. онкологии, **64** (6), 697 (2018).
9. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., Биофизика, **66** (6) 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
10. Y. Nakajima, K. Tsuruma, M. Shimazawa, et al., BMC Complement Altern. Med., **9**, 4 (2009).
11. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., Биофизика, **65** (6), 1093 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060071

Mechanism of Cytotoxic Activity of Aurum Polyacrylate against Human Blood Lymphocytes

A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, and D.B. Korman*

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

This study focused on an exploration of the mechanism of action of aurum polyacrylate (aurumacryl) on human blood lymphocytes, including an assessment of the effect of the drug on cell viability, DNA structure and the ability of the drug to induce reactive oxygen species. It was found that aurumacryl exhibited a dose- and exposure-dependent cytotoxic activity, caused single-stranded DNA breaks and induced generation of intracellular reactive oxygen species.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), human lymphocytes, cytotoxicity, single-stranded DNA breaks, reactive oxygen species

АКТИВНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

© 2022 г. Р. А. Халилов*, А. М. Джафарова*.,#, В. Р. Абдуллаев*

*Дагестанский государственный университет, ул. М. Гаджиева,
43а, Махачкала, Республика Дагестан, 367000, Россия

#E-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 16.08.2022 г.

Ранее нами было показано, что кратковременная умеренная (30°C) гипотермия способствует существенному повышению интенсивности свободно-радикальных процессов и изменению ряда биоэнергетических параметров митохондрий, а ее пролонгирование в течение трех часов – их нормализации, что может быть связано с модуляцией активности и каталитических свойств сукцинатдегидрогеназы. Данное исследование показывает, что умеренная гипотермия, особенно пролонгированная в течение трех часов, существенно повышает скорость катализа сукцинатдегидрогеназы и влияет на характер ее концентрационной и температурной зависимости. Модуляция активности сукцинатдегидрогеназы в динамике гипотермии происходит за счет изменений ее кинетических и термодинамических характеристик, из которых наиболее значимый вклад в эффективность катализа фермента вносит параметр V_{\max} – максимальная скорость. Эти изменения могут играть важную роль в сохранении энергосинтезирующей функции митохондрий и снижения в них интенсивности свободно-радикальных процессов.

Ключевые слова: гипотермия, крысы, митохондрии, сукцинатдегидрогеназа, кинетические характеристики.

DOI: 10.31857/S0006302922060138, EDN: LKLTTR

Гипотермия – это состояние, развивающееся у гомойотермных животных при снижении температуры их тела. В зависимости от этиологии развития гипотермического состояния различают несколько видов гипотермии – случайная, интраоперационная, искусственная. Случайная гипотермия может иметь место у животных, обитающих в регионах со значительными колебаниями температурного режима [1]. При проведении обширных операций с использованием наркоза человек может подвергаться так называемой «интраоперационной» гипотермии [2]. Искусственные гипотермических состояния широко применяются при операциях на сердце и мозге, а также в терапевтических целях для предупреждения рисков развития ишемических и реперфузионных повреждений жизненно важных органов и защиты от последствий гипоксии, ишемии-реперфузии, инсульта и инфаркта, травм [3–5]. За-

щита, обусловленная понижением температуры тела, является результатом снижения скорости метаболических процессов и уменьшения потребности тканей в кислороде и глюкозе [6]. Наиболее часто для этих целей используют умеренную пролонгированную гипотермию [7].

Наряду с положительными терапевтическими эффектами умеренная гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений в организме [6], что ограничивает потенциальные возможности ее применения. Понимание основных механизмов деструктивных или компенсаторно-приспособительных изменений, лежащих в основе терапевтической гипотермии, жизненно важно для разработки надлежащего и эффективного лечения.

На начальных этапах гипотермия сопровождается возбуждением симпатической нервной системы провоцируя дрожь, гипертонию, тахикардию, тахипноэ и сужение сосудов. Изменения микроциркуляции могут снизить скорость кровотока, способствовать седиментации эритроцитов, увеличению вязкости крови. Все это в совокупно-

Сокращения: ЭТЦ – электрон-транспортная цепь, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ФАД – флавинадениндинуклеотид, АФК – активные формы кислорода.

сти приводит к состоянию гипоксии и развитию окислительного стресса [6, 8, 9]. Существенные физиологические изменения при низких температурах тела животного могут сопровождаться адаптивными или патологическими изменениями в энергетическом метаболизме клетки, ключевую роль в которых играют электрон-транспортные цепи (ЭТЦ), локализованные в мембранах митохондрий.

Одним из структурных элементов ЭТЦ митохондрий является комплекс II – сукцинат: убинон-оксидоредуктаза, представленный олигомерным, встроенным в липидную матрицу внутренней мембраны митохондрий ферментом – сукцинатдегидрогеназой (СДГ), окисляющим сукцинат до фумаровой кислоты сопряженно с восстановлением флавинадениндинуклеотида (ФАД). Кроме того, СДГ является функциональным участником цикла трикарбоновых кислот, играющим ключевую роль в промежуточном метаболизме [10]. Полученные относительно недавно экспериментальные данные свидетельствуют о существенном вкладе комплекса II, наряду с комплексами I и III, в продукцию активных форм кислорода (АФК) при различных патологических состояниях организма, сопровождающихся гипоксией [11]. Важной особенностью этого фермента является независимость его активности от соотношения восстановленного и окисленного никотинадениндинуклеотида (НАДН/НАД⁺), что позволяет сохранять энергосинтезирующую функцию митохондрий в условиях гипоксии при нарушении НАД-зависимого дыхания клеток [12].

Ранее нами было показано, что кратковременная умеренная (30°C) гипотермия крыс повышает скорости глутамат- и сукцинат-зависимого дыхания изолированных митохондрий печени. При этом коэффициент окислительного фосфорилирования и дыхательный контроль снижаются, а уровни маркеров окислительного стресса, напротив, увеличиваются. Пролонгирование гипотермии до одного часа сопровождается дальнейшей интенсификацией сукцинат-зависимого дыхания и свободно-радикальных процессов в митохондриях, снижением коэффициента окислительного фосфорилирования и дыхательного контроля, в то время как пролонгирование до трех часов приводит к нормализации данных параметров [13, 14]. Обнаруженные изменения респираторных характеристик митохондрий могут быть связаны с модуляцией активности и каталитических свойств СДГ при низких температурах тела.

Целью данной работы явилось исследование эффектов гипотермии различной длительности на активность, кинетические и термодинамические характеристики СДГ митохондрий печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и моделирование гипотермии. Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар возраста три с половиной месяца с массой тела 200–220 г., полученных из питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России» (Чеховский район Московской области) и содержащихся в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета. В контрольных и экспериментальных группах было использовано по 8–10 животных.

Моделирование гипотермических состояний. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с «рубашкой», через которую циркулировала холодная (5°C) вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со средней скоростью 0.28°C/мин. При таком способе моделирования в течение 30 ± 1.0 мин температура тела животных снижалась до 30°C (кратковременная умеренная гипотермия). По достижении этой температуры крыс сразу же декапитировали. Для моделирования состояний пролонгированной гипотермии после того, как температура тела животных достигла 30°C, поддерживали этот уровень гипотермии в течение 1 и 3 ч (пролонгированная часовая и трехчасовая умеренная гипотермия) путем контроля температуры воды в «рубашке» камеры. Мониторинг температуры тела проводили с помощью ректального цифрового термометра MS6501. В качестве контроля служили интактные крысы с нормальной (37°C) температурой тела.

Выделение митохондрий. Крыс декапитировали, после чего быстро выделяли печень и промыли ее ледяной средой выделения (1°C) в течение 5 мин. Печень предварительно измельчали, пропускали через пресс и готовили 10%-й гомогенат в среде выделения, после чего центрифугировали 10 мин при 1800 g. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный дважды отмытый осадок доводили до 2 мл и суспендировали в 0.32 М сахарозе. Суспензию митохондрий наслаивали на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы (содержащий 3.5 мл – 1.1 М; 7.5 мл – 0.8 М; 7.5 мл – 0.5 М и 5 мл – 0.3 М сахарозы) и центрифугировали в бакет-роторе SW32 Ti при 7000 g на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США).

Митохондрии, находящиеся в слоях 0.5–0.8 М, отсасывали специальным приспособлением для отбора фракций и осаждали при 15000 g на центрифуге MR 23i. Полученные митохондрии промыли в среде выделения и повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде инкубации и замораживали при температуре –70°C.

Все растворы сахарозы, использованные для создания градиента ее плотности в пробирке, были приготовлены на 10 мМ HEPES-буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА (pH 7.2) и 0.1% альбумина. Состав среды выделения: 0.25 М сахарозы (AppliChem, Германия), 5 мМ HEPES (AppliChem, Германия), 0.5 мМ ЭДТА (AppliChem, Германия), 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) (pH 7.4). Среда инкубации содержала 0.32 М сахарозы, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, 13 мМ KCl (pH 7.4). Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [15].

Определение активности сукцинатдегидрогеназы. Для оценки активности СДГ применяли метод, в котором в качестве конечного акцептора электронов выступает ферроцианид калия (K₃[Fe(CN)₆]). Принцип метода заключается в восстановлении ферроцианида калия, раствор которого имеет желтую окраску, до бесцветного ферроцианида калия сукцинатом под действием СДГ [16]. Для определения активности СДГ в суспензии митохондрий готовили растворы опытной и контрольной проб, содержащие 1.48 мл 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.8), 0.1 мл янтарной кислоты (Sigma, США) (pH 7.8), 0.1 мл 25 мМ ЭДТА (pH 7.8), 0.1 мл 150 мМ азида натрия (Sigma, США), 0.1 мл дистиллированной воды. В контрольную пробу вносили 2 мл 20% трихлоруксусной кислоты (Acstos Organics, Бельгия), которая приводит к денатурации СДГ с начала инкубации, что препятствует специфическому восстановлению ферроцианида калия сукцинатом. Затем в обе пробирки вносили по 0.1 мл суспензии митохондрий, содержащей 100 мкг белка и инкубировали в течение 5 мин для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия. Реакцию начинали добавлением 0.1 мл 25 мМ ферроцианида калия (Sigma, США), затем пробы инкубировали 15 мин при температуре 30°C, после чего в опытную пробирку добавляли 2 мл охлажденной 20%-й трихлоруксусной кислоты. Растворы центрифугировали при 1800 g и в надосадочной жидкости определяли оптическую плотность при λ = 420 нм. По разнице оптической плотности контрольной и опытной проб определяли количество ферроцианида калия, восстановленного за время инкубации, используя калибровочную кривую.

Поскольку реакция протекает стехиометрически и 1 моль сукцината восстанавливает 2 моля ферроцианида, можно выразить активность СДГ через количество окисленного сукцината.

Активность фермента (в мкМ сукцината/мг белка за 1 мин) вычисляется по следующей формуле:

$$A = \frac{m \cdot 1000}{2M \cdot b \cdot t}, \quad (1)$$

где *m* – количество восстановленного ферроцианида (в мкг); *M* – молекулярная масса ферроцианида калия; *b* – содержание белка в пробе в мг; *t* – время инкубации в мин.

Определение кинетических и термодинамических характеристик сукцинатдегидрогеназы. Концентрационную зависимость активности СДГ определяли, измеряя активность СДГ в диапазоне концентраций сукцината 0.065–35 мМ. В соответствии с литературными данными кинетика СДГ хорошо описывается классической моделью ферментативной кинетики Михаэлиса–Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \quad (2)$$

где *V* – скорость реакции, *V*_{max} – максимальная скорость, *K*_M – константа Михаэлиса.

Данное уравнение было использовано для расчета кинетических характеристик фермента с помощью многомерного нелинейного регрессионного анализа.

Температурную зависимость активности СДГ определяли, измеряя активность СДГ в диапазоне температур 5–37°C и концентрации субстрата в среде инкубации 4.37 мМ. По полученным результатам вычисляли активность фермента, строили линейные анаморфозы в координатах Аррениуса, по которым определяли энергии активации (*E*_a) и энтальпии активации (Δ*H*_a).

Статистическая обработка. Обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка. Достоверность различий между нормально распределенными данными определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости *p* ≤ 0.05. Для оценки взаимосвязи между нормально распределенными переменными был использован корреляционный анализ Пирсона. Данные в диаграммах приведены в виде среднего ± ошибка среднего. Каждая кривая на графиках концентрационной и температурной зависимости скорости катализа СДГ – среднее из восьми-десяти независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрационная зависимость активности и кинетические характеристики сукцинатдегидрогеназы. Исследована активность и концентрационная зависимость СДГ митохондрий печени контрольных крыс в диапазоне концентраций сукцината 0.065–35 мМ. Из рис. 1, на котором представлены графики концентрационной зави-

симости активности СДГ, видно, что с повышением концентрации сукцината *in vitro* активность СДГ в митохондриях печени контрольных крыс увеличивается, достигая максимального значения при концентрации 4.37 мМ. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не оказывает эффекта на скорость катализа СДГ. Таким образом, кинетика катализа СДГ носит классический характер и может быть адекватно описана классической моделью Михаэлиса–Ментен. При этом необходимо отметить следующую особенность кинетики СДГ: в области низких концентраций сукцината имеет место сигмоидный характер зависимости скорости катализа фермента от содержания субстрата в среде инкубации. Это указывает на то, что в данном диапазоне концентраций янтарной кислоты незначительные изменения ее притока в компартмент локализации фермента приводят к резкому повышению активности фермента.

Снижение температуры тела крыс до 30°C в течение 30 мин (умеренная кратковременная гипотермия) сопровождается существенным повышением активности фермента и изменениями характера его концентрационной зависимости (рис. 1). При этом повышение при различных концентрациях субстрата носит неоднозначный характер: при низких концентрациях оно более выражено, нежели при высоких. Например, у гипотермических крыс активность СДГ при концентрации сукцината 0.065 мМ увеличивается в 3.21 раза (в контроле – 1.07 ± 0.12 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 3.44 ± 0.22 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), при 4.37 мМ – на 58.9% (в контроле – 54.6 ± 7.9 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 86.71 ± 9.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), а при 35 мМ – на 68.7% (в контроле – 54.9 ± 5.6 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 92.7 ± 4.9 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$).

Пролонгированная гипотермия в течение 1 ч сопровождается дальнейшими повышениями активности СДГ и изменениями ее концентрационной зависимости (рис. 1). Так, при концентрации 0.065 мМ скорость катализа фермента увеличивается по сравнению с кратковременной гипотермией на 20% (4.13 ± 0.27 мкмоль/мин·мг), при концентрации 4.37 мМ – на 15.4% (100.5 ± 7.9 мкмоль/мин·мг), а при 35 мМ – на 26.1% (116.9 ± 8.6 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$). Трехчасовая гипотермия продолжает повышать активность СДГ: при концентрации сукцината 0.065 мМ она становится в 4.7 раза выше уровня контроля (5.08 ± 0.32 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), при 4.37 мМ – в 2.2 раза (120.3 ± 8.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), а при 35 мМ – в 2.6 раза (142.9 ± 9.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$).

Из рис. 1 видно, что в динамике пролонгирования гипотермии насыщение активных центров

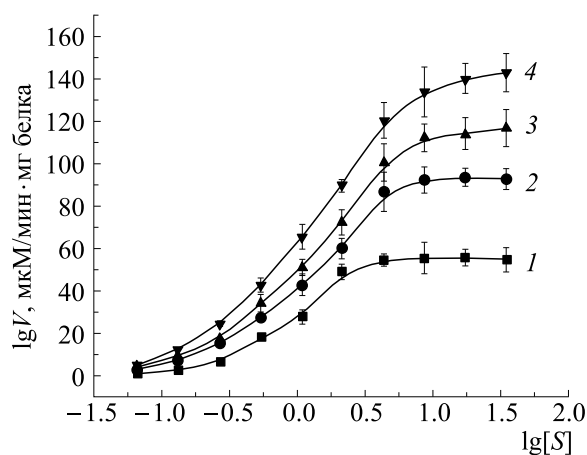


Рис. 1. Концентрационные зависимости активности СДГ митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – логарифм концентрации сукцината, по оси ординат – скорость ферментативной реакции.

молекул СДГ достигается при более высоких концентрациях субстрата, а кооперативная кинетика связывания становится менее выраженной.

Исследование кинетических характеристик показало, что кратковременная гипотермия способствует повышению V_{\max} – на 66.2% (рис. 2а). При этом значение K_M тоже увеличивается – на 26.4% (рис. 2б). Более выраженное повышение V_{\max} по сравнению с K_M способствует тому, что отношение V_{\max}/K_M , приближенно отражающее эффективность катализа фермента при физиологических концентрациях субстрата в клетке, тоже становится выше контрольных значений (на 31.5%, рис. 2в).

Пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует значительному повышению V_{\max} СДГ (примерно в два раза). При этом, несмотря на более существенное по сравнению с кратковременной гипотермией повышение K_M (на 35.4% относительно контроля), эффективность катализа продолжает увеличиваться, достигая уровня, который выше уровня контроля на 51.4% (рис. 2).

Дальнейшее пролонгирование гипотермии (до 3 ч) продолжает увеличивать значение V_{\max} . Оно становится в 2.46 раз выше контрольных значений и на 20.1% выше уровня у животных с гипотермией 1 ч. При этом наблюдается незначительное по сравнению с часовой гипотермией снижение K_M . Оно способствует еще более выраженному повышению эффективности катализа, достигающему 95.1% от уровня контрольных животных (рис. 2).

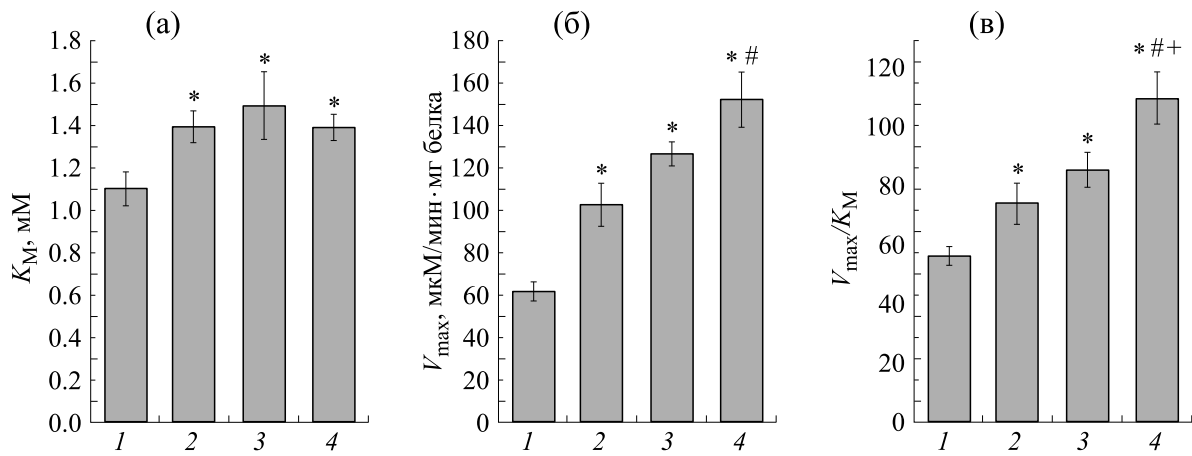


Рис. 2. Кинетические характеристики ((а) – V_{max} , (б) – K_M , (в) – V_{max}/K_M) СДГ митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – состояния животных, по оси ординат – значения кинетических характеристик.

Температурная зависимость активности и термодинамические параметры сукцинатдегидрогеназы. Исследована зависимость активности СДГ митохондрий печени крыс от температуры инкубации фермента *in vitro* (в диапазоне 5–37°C). Результаты исследования, представленные на рис. 3 в виде графиков в координатах Аррениуса ($1000/T - \lg V$), демонстрируют тот факт, что температурная зависимость скорости катализа СДГ носит нелинейный характер (рис. 3). Она представлена двумя линейными анаморфозами, пересекающимися у контрольных животных при тем-

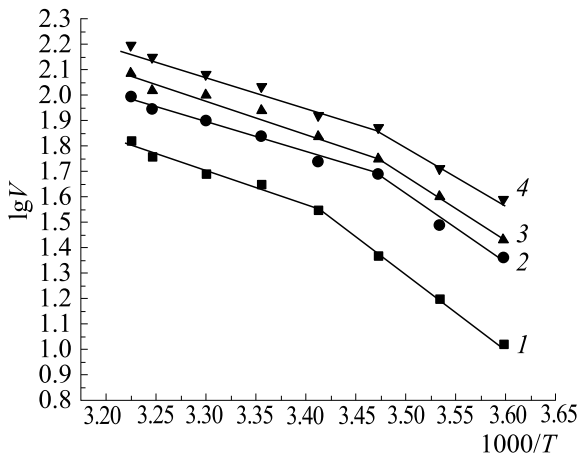


Рис. 3. Температурные зависимости активности СДГ митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – температура в обратных единицах, по оси ординат – логарифм скорости ферментативной реакции.

пературе инкубации $20.0 \pm 1.6^\circ\text{C}$ – точке излома всей температурной кривой.

Умеренная кратковременная гипотермия увеличивает активность фермента при всех температурах его инкубации *in vitro*. Примечателен тот факт, что с повышением температуры инкубации разница в активности СДГ между контрольными и гипотермическими животными становится менее выраженной. Кроме того, кратковременная гипотермия способствует изменению характера температурной зависимости. Позиция излома на графике температурной зависимости смещается в сторону более низких температур – $15.0 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$). Пролонгирование умеренной гипотермии способствует дальнейшему повышению активности фермента при всех температурах его инкубации и незначительным изменениям в наклонах температурных анаморфозов, при этом паттерны температурной зависимости фермента остаются в совокупности схожими с таковыми для крыс, подверженных кратковременной гипотермии.

Из наклонов линейных анаморфозов были рассчитаны эффективные энергии активации выше (E_{a2}) и ниже (E_{a1}) точки излома. Результаты исследования представлены на рис. 4а. Оказалось, что у всех исследованных групп крыс E_{a1} существенно выше E_{a2} (например, у контрольной группы животных – в 2.15 раза). Кратковременная гипотермия способствует незначительному снижению E_{a1} . Это снижение в динамике пролонгирования гипотермии становится более выраженным, достигая в течение 3 ч гипотермии уровня, который на 21.7% ниже такового нормотермических крыс. При этом значения E_{a2} у гипотермированных животных претерпевают лишь незначительные флуктуации.

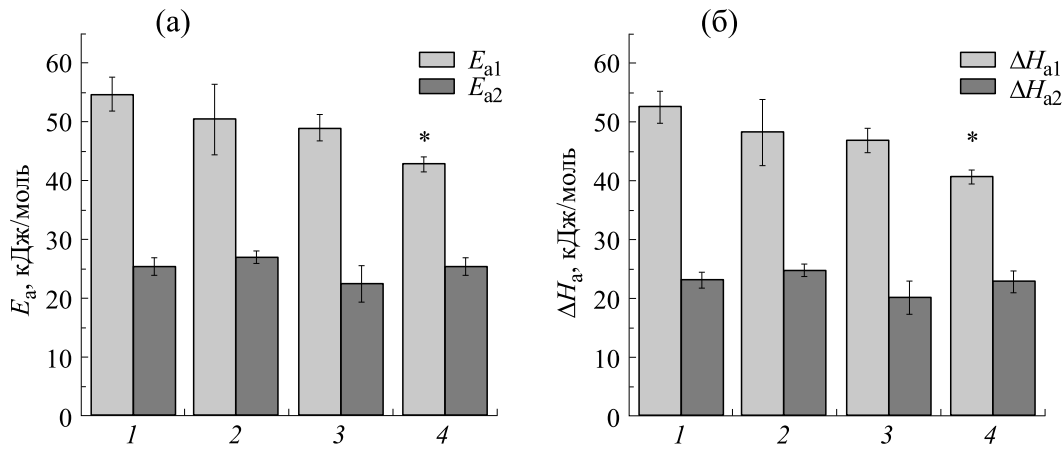


Рис. 4. Термодинамические параметры ((а) – энергия активации ниже точки излома (E_{a1}) и выше точки излома (E_{a2}), (б) – энтальпия активации ниже точки излома (ΔH_{a1}) и выше точки излома (ΔH_{a2})) СДГ митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – состояния животных, по оси ординат – величины термодинамических параметров.

Из значений эффективных энергии активации были вычислены значения изменений энтальпии активации СДГ ниже (ΔH_{a1}) и (выше ΔH_{a2}) точки излома в соответствии со следующей формулой:

$$\Delta H = E_a - RT. \quad (3)$$

Из рис. 4б видно, что данный термодинамический параметр СДГ митохондрий печени крыс в период низкотемпературного воздействия претерпевает изменения, характерные для E_a . Кратковременная гипотермия способствует незначительному снижению ΔH_{a1} , однако в динамике пролонгирования значения ΔH_{a1} становятся существенно ниже контрольных. При этом гипотермия не оказывает значительного эффекта на ΔH_{a2} .

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что на начальных этапах развития гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [17].

Эта активация может индуцировать терморегуляторные реакции, направленные как на увеличение производства тепла, так и на снижение теплопотерь. Для увеличения теплопродукции включаются механизмы дрожательного и недрожательного термогенеза. Усиливается обмен веществ, увеличивается распад гликогена и липидов, повышается содержание глюкозы и жирных кислот в крови [18].

Дрожь, возникающая при снижении температуры ниже 35.5°C и прекращающаяся при темпе-

ратуре менее 30°C , увеличивает скорость метаболизма и потребление кислорода [19]. Это может увеличить производство метаболического тепла в пять-шесть раз по сравнению с уровнем метаболизма в покое, а также потребление кислорода на 50–400% [20, 21]. Ранее нами было показано, что кратковременная гипотермия способствует значительной интенсификации глутамат- и сукцинатзависимого дыхания митохондрий печени крыс [13].

Реакции, направленные на снижение теплопотерь, основаны на вазоконстрикции и централизации кровотока. Возникновение спазма периферических сосудов повышает вязкость крови и нарушает микроциркуляцию [22]. Все это, в совокупности со сдвигом при низких температурах кривой диссоциации оксигемоглобина влево, приводит к ситуации тканевой гипоксии [9].

Снижение концентрации кислорода в клетках может привести к изменениям редокс-состояния компонентов дыхательной цепи и мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) митохондрий. Результатом таких изменений может стать дисфункция митохондрий и их деэнергизация, сопровождающаяся нарушениями функционально-метаболических показателей, контролирующих жизнедеятельность клетки. Кроме того, накопление восстановительных эквивалентов в митохондриальных цепях переноса электронов при гипотермии может увеличить производство активных форм кислорода в митохондриях и способствовать развитию окислительного стресса [23]. Изменения функциональной активности комплексов ЭТЦ могут играть немаловажную роль в развитии у гомойотермных животных как компенсаторно-приспо-

собоительных, так и патологических реакций при низких температурах тела.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что снижение температуры тела крыс сопровождается значительными изменениями как в активности, так и в кинетических характеристиках одного из ключевых компонентов дыхательной цепи — сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы. Умеренная гипотермия уже в первые 30 мин снижения температуры тела способствует повышению скорости катализа СДГ при всех исследованных концентрациях субстрата, причем это повышение по мере пролонгирования гипотермического состояния становится более существенным. Особый интерес представляют серьезные изменения характера концентрационной зависимости СДГ. Если у контрольных крыс наблюдается сигмоидальный характер зависимости от концентрации субстрата, то в динамике пролонгирования гипотермии кооперативная кинетика связывания субстрата становится менее выраженной.

Известно, что комплекс СДГ имеет сложную структуру и состоит из четырех субъединиц, включая две гидрофильные субъединицы — СДГ-А и СДГ-В, которые вместе образуют каталитический центр энзима, и две гидрофобные субъединицы — СДГ-С и СДГ-Д [10]. Основная функция СДГ-А заключается в превращении сукцината в фумарат и преобразовании ФАД в ФАДН₂. Электроны ФАДН₂ передаются субъединице СДГ-В. СДГ-В содержит три железосерных кофактора, через которые опосредуется транспорт электронов от СДГ-А к СДГ-С и СДГ-Д и, в конечном счете, к убихинону [10]. Таким образом, механизм катализа СДГ и передачи электронов на убихинон достаточно сложный и определяется функциональным состоянием и взаимодействием нескольких его субъединиц.

Изменения активности СДГ происходят за счет изменения его каталитических параметров — V_{\max} и K_M . Мы обнаружили достаточно выраженные однонаправленные изменения как со стороны K_M , так и со стороны V_{\max} . Обе величины в разной степени увеличиваются. При этом повышение V_{\max} положительно коррелирует с повышением активности СДГ ($r = 0.90$, $p < 0.05$), в отличие от значений K_M , корреляционные связи которой со скоростью катализа СДГ незначительны и статистически недостоверны ($r = 0.30$, $p > 0.05$). Таким образом, основной вклад в повышение эффективности катализа СДГ при гипотермии вносят именно изменения V_{\max} , а не K_M . Можно предположить, что повышение K_M СДГ при гипотермии посредством снижения аффинности субстрата к активному центру фермента направлено на компенсацию резких скачков V_{\max} .

Повышение K_M для СДГ является свидетельством того, что насыщение фермента субстратом происходит при более высоких концентрациях, что увеличивает возможности регуляции активности фермента в широком диапазоне концентраций сукцината. С другой стороны, повышение K_M могло быть обусловлено хорошо описанным в литературе конкурентным ингибированием активности СДГ оксалоацетатом. Однако, учитывая тот факт, что изменения значения K_M при гипотермии не носит драматический характер, а также то, что наряду с повышением K_M активность СДГ и значения V_{\max} тоже увеличивается, вероятность конкурентного ингибирования СДГ оксалоацетатом можно исключить. Возможно на начальных этапах снижения температуры тела, интенсификация дыхания митохондрий *in vivo*, приводит к накоплению оксалоацетата, ингибирующего СДГ до тех пор, пока концентрации сукцината не достигнут достаточно высоких уровней. С этой точки зрения повышение K_M для СДГ при гипотермии может иметь биологический смысл: оно позволит увеличить концентрации субстрата, при которых фермент работает с максимальной эффективностью, и тем самым снять ингибирующий эффект оксалоацетата. Известно, что значения K_M приблизительно соответствуют физиологическим концентрациям субстрата в клетке или ее компартаментах [24].

Исходя из полученных нами экспериментальных данных можно предположить, что при гипотермии содержание сукцината в митохондриях существенно увеличивается. Действительно, было обнаружено, что у гомойотермных животных в период воздействия низких температур окружающей среды уровень циркулирующего сукцината значительно возрастает [25]. Скорее всего, такое повышение является отражением усиленного катаболизма липидов и углеводов на начальных этапах гипотермии.

Кроме этого, накопление сукцината в митохондриях может происходить вследствие дефицита кислорода в клетке. Так, было показано, что при ишемии и гипоксии в митохондриях увеличивается концентрация фумарата, что способствует обращению реакции, катализируемой комплексом II, в сторону образования сукцината. Такая реверсия становится возможной благодаря тому, что комплекс I регенерирует восстановленный убихинон, необходимый для поддержания обратной реакции (превращения фумарата в сукцинат) [26].

V_{\max} — это величина, которая зависит от концентрации фермента и от числа его оборотов (k_{cat}). Повышение концентрации фермента возможно либо вследствие интенсификации процессов его биосинтеза, либо из-за снижения скоро-

сти его деградации. Одним из первичных транскрипционных регуляторов митохондриального биогенеза является респираторный фактор-1 (NRF-1), который индуцирует экспрессию СДГ посредством связывания с промоторами генов SDH-A и SDH-D [27].

Однако в условиях низких температур тела скорости всех энергоёмких процессов, к которым относится и биосинтез белка, сильно снижаются [28]. Кроме того временные рамки гипотермии ограничены и учитывая то, что биосинтез белка является слишком инерционным механизмом, за столь короткий период достижения гипотермического состояния (30 мин) быстрое увеличение концентрации СДГ за счет высоких скоростей процессов транскрипции и трансляции представляется сомнительным. Было показано, что при трехчасовой гипотермии, вызванной анестезией, в печени происходит снижение экспрессии целого ряда белков, связанных с синтезом АТФ, электрон-транспортной цепью и биосинтезом мочевины, а также экспрессии шаперонов Hspa 5, Hsp90b1, Pdia3, Dnajb11 [29]. Следует также учесть, что в отличие от других комплексов дыхательной цепи ни одна из субъединиц комплекса II не кодируется митохондриальной ДНК [30]. Поэтому ко времени и энергоёмкости биосинтеза отдельных субъединиц СДГ и их последующей сборки добавляется время и энергоёмкость их транспорта в митохондрии и последующей сборки.

Вместе с тем имеется ряд работ, в которых показано, что низкие температуры индуцируют синтез небольшого подмножества белков холодового шока, таких как индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (CIRP) и мотив 3 холодоиндуцируемого РНК-связывающего белка (RBM3) [31–33], и увеличивают экспрессию мРНК белка теплового шока hsp72 [34]. Таким образом, гипотермия способствует повышенной экспрессии лишь ограниченного числа «стрессорных» белков, при этом биосинтез большинства других белков остается подавленным. Отсюда следует, что обнаруженные изменения V_{\max} связаны с реализацией других механизмов регуляции, направленными на повышение числа оборотов СДГ (k_{cat}).

Срочная регуляция, следы которой остаются *in vitro*, скорее всего, осуществляется посредством посттрансляционной модификации фермента. Посттрансляционные модификации регулируют активность СДГ четырьмя способами: деацетилирование фосфорилирование, сукцинирование и пропионилирование [27]. Обратимое ацетилирование множественных остатков лизина СДГ-А в митохондриях млекопитающих ослабляет ее каталитическую активность. При этом основной деацетилазой, регулирующей уровень ацетилиро-

вания СДГА, является SIRT3 - представитель сиртуинового семейства НАДФ-зависимых деацетилаз митохондрий [35].

Было обнаружено, что в фосфорилировании СДГ принимает участие тирозинкиназа FGR, которая является одной из киназ, нацеленных на аминокислотные остатки тирозина Y535 и Y596 СДГ-А у крыс [36]. Впоследствии было установлено, что АФК опосредуют активацию тирозинкиназы FGR, которая фосфорилирует СДГА по Y604, и что эта функция FGR требуется для корректировки метаболизма в различных условиях, таких как гипоксия/реоксигенация и активация Т-клеток [37]. В митохондриях была обнаружена растворимая аденилатциклаза, которая может активироваться путем изменения содержания АТФ, ионов кальция и бикарбоната. Такая активация может стимулировать внутримитохондриальную протеинкиназу А, которая способна фосфорилировать многие белки ЭТЦ, изменяя их активность [38].

Митохондрии также содержат фосфатазы, которые действуют в обратном направлении по отношению к киназам, то есть осуществляют дефосфорилирование СДГ-А. Примером этого является РТЕН-подобная митохондриальная фосфатаза-1 – фермент, дефосфорилирующий фосфатидилглицеролфосфат (в пути биогенеза кардиолипина) [39], а также СДГ-А. Его ингибирование приводит к усилению фосфорилирования и активации СДГ и, как следствие, к снижению концентрации глюкозы [40].

Сукцинирование является недавно открытой посттрансляционной модификацией, которая превращает катионную боковую цепь лизина в анион с различными последствиями для структуры и функции белка. Десукцинирование Lys в клетках млекопитающих и бактерий осуществляется с помощью SIRT5 (глобальный регулятор сукцинирования Lys в митохондриях) [27].

Изменения кинетических параметров СДГ при гипотермии могут быть связаны и окислительной модификацией аминокислотных остатков фермента посредством АФК. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что начальные этапы гипотермии сопровождаются интенсификацией свободно-радикальных процессов в различных тканях животных [6, 8, 14]. Обнаружено, что кратковременная гипотермия увеличивает уровни карбонильных групп в белках мембран митохондрий печени, при этом содержание тиоловых групп значительно снижается. Кроме того, снижается интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков митохондрий, что указывает на окисление в них остатков ароматических аминокислот. Обнаружены изменения и в спектрах флуоресценции

белков, которые могут свидетельствовать об их конформационных перестройках [14].

Известно, что сукцинат-связывающий участок СДГ-А и убихинон-связывающий участок, сформированный Гис207 субъединицы В, Сер27 и Арг31 субъединицы С и Тир83 субъединицы D, взаимодействуют между собой с помощью Fe/S участков СДГ-В [41]. Все эти аминокислотные остатки могут оказаться чувствительны к АФК, особенно Сер27, и их модификация может существенно изменить эффективность катализа СДГ. При этом следует отметить, что уровень маркеров окислительной модификации белков при пролонгировании гипотермии в течение 1 ч продолжает увеличиваться, однако через 3 ч происходит его нормализация [14]. В то же время результаты настоящего исследования показали, что активность СДГ в динамике пролонгирования гипотермии продолжает расти.

Поскольку субъединицы СДГ-С и СДГ-D фермента погружены в липидный бислой внутренней мембраны митохондрий, то изменения структурно-динамического состояния липидной матрицы также могут оказать существенный эффект на активность СДГ. Ранее, при исследовании мембран митохондрий с помощью флуоресцентного зонда пирена, нами было обнаружено, что кратковременная умеренная гипотермия и ее пролонгирование увеличивают коэффициент эксимеризации пирена в анулярных и общих липидах митохондриальных мембран, что указывает на снижение их микровязкости [42]. Обнаруженные изменения физического состояния мембранных липидов, скорее всего, обусловлены ремоделированием их жирнокислотного состава. По данным работы [43], при снижении температуры тела до 28–27°C происходят изменения фосфолипидного спектра и содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах митохондрий миокарда белых крыс и собак. Повышение степени ненасыщенности мембранных липидов при умеренной гипотермии приводит к снижению их микровязкости и сдвигу фазового перехода в область низких температур [43].

К сожалению, в доступной нам более современной литературе мы не обнаружили какую-либо новую информацию о влиянии гипотермии на липидный состав митохондриальных мембран гомойотермных животных. При этом имеются работы, в которых показано, что умеренная гипотермия и ее пролонгирование изменяют ЖК состав липидов синаптических и эритроцитарных мембран в направлении повышения степени их ненасыщенности [44, 45].

Вероятнее всего, в митохондриях при гипотермии происходит включение механизмов ремоделирования мембранных фосфолипидов путем их деацилирования и реацилирования. В качестве

субстратов для ремоделирования мембраны могут использоваться ненасыщенные жирные кислоты, содержание которых в крови гипотермированных животных увеличивается [46]. Быстрые изменения индекса ненасыщенности мембранных липидов могут быть связаны и с активностью ферментов десатураз, играющих важную роль в температурных адаптациях не только пойкилотермных, но и, как показала работа [46], гомойотермных животных.

Перестройки в липидной матрице также могут быть связаны с окислительной модификацией мембранных фосфолипидов. Ранее нами было установлено, что кратковременная умеренная гипотермия стимулирует перекисное окисление липидов в митохондриях [14]. Известно, что процессы обновления фосфолипидов могут ускоряться после их окислительной модификации, в результате чего окисленные ацильные цепи быстро удаляются из фосфолипидов мембран под действием фосфолипазы А2 [47].

Таким образом, повышение эффективности катализа СДГ при гипотермии вполне могло бы объясняться снижением вязкости общих и анулярных липидов внутренней мембраны митохондрий. Однако в соответствии с экспериментальными данными, представленными в предыдущем исследовании [42], в динамике пролонгирования гипотермии дальнейший изменений показателей микровязкости не происходит, а интенсивность перекисного окисления липидов и вовсе нормализуется [14], в то время как в настоящей работе активность СДГ продолжает увеличиваться.

Особый интерес представляет исследование температурной зависимости СДГ. Обнаружено, что она носит нелинейный характер, то есть в координатах Аррениуса представлена двумя пересекающимися в точке излома прямыми, имеющими различные энергии активации. Это может быть обусловлено несколькими причинами: фазовыми переходами в отдельных субъединицах СДГ или ее липидном микроокружении, сменой лимитирующей катализ стадии, ассоциацией-диссоциацией субъединиц СДГ в определенном температурном диапазоне или изменением характера взаимодействия комплекса II с другими компонентами ЭТЦ.

Известно, что внутренняя мембрана митохондрий характеризуется необычно высоким содержанием белков (до 75%). Основная часть этих белков – белки, входящие в комплексы ЭТЦ. Было обнаружено, что комплексы при определенных условиях могут интегрироваться в так называемые суперкомплексы, образование которых сопряжено с наиболее эффективным окислительным фосфорилированием. В частности, было показано, что суперкомплексы в митохондриях печени крыс образуются в области температуры

19°C, при этом электронная микроскопия демонстрирует изменение морфологии крист с образованием, так называемых, «сухих крист» [48]. Эта температура примерно соответствует температуре точки излома на графике температурной зависимости СДГ печени крыс, представленном в нашем исследовании. Следовательно, нелинейный характер температурной зависимости СДГ может быть обусловлен температурной зависимостью работы ЭТЦ митохондрий в режиме суперкомплекса.

Известно, что СДГ может быть очень чувствительна к фазовым переходам в липидах внутренней мембраны митохондрий [49], поэтому точка излома на графиках Аррениуса может соответствовать температуре фазового перехода липидной матрицы митохондриальной мембраны

Кратковременная гипотермия и ее пролонгирование смещают точку излома температурной кривой в более низкотемпературную область – 15°C. Такое смещение очень хорошо коррелирует с нашими ранними данными о том, что гипотермия снижает вязкость общих и аннулярных липидов митохондриальных мембран [42], что, вероятнее всего, обусловлено изменением их жирнокислотного состава в сторону повышения индекса ненасыщенности. Повышение текучести мембраны способствует тому, что фазовые переходы аннулярных липидов, в которые погружены гидрофобные субъединицы СДГ, происходят при более низких температурах. Однако нельзя исключать возможности того, что при гипотермии происходят изменения в условиях работы митохондрий в режиме суперкомплекса.

Особое внимание заслуживает тот факт, что при кратковременной гипотермии и в динамике ее пролонгирования эффективные энергии активации и энтальпии активации ниже точки излома снижаются, достигая минимальных значений при трехчасовой гипотермии.

Известно, что константа скорости химической реакции зависит от ее энергии активации в соответствии с уравнением Аррениуса:

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-\Delta E_a}{RT}}. \quad (4)$$

Таким образом, чем ниже энергия активации, тем больше скорость катализа.

Корреляционный анализ показал, что между E_{a1} , ΔH_{a1} и эффективностью катализа СДГ имеется отрицательная корреляция ($r = -0.99$, $P < 0.05$). При этом следует отметить, что изменения скорости катализа СДГ при гипотермии имеют более резкий и существенный характер по сравнению с энергией и энтальпией активации. Более того, изменения термодинамических параметров E_{a2} , ΔH_{a2} и вовсе незначительны. Следовательно, вклад энтальпии активации в повыше-

ние скорости катализа СДГ, скорее всего, незначителен.

Объяснение данному факту можно дать исходя из элементарных представлений химической кинетики, если обратиться к уравнению Эйринга. Согласно данному уравнению скорость химического процесса определяется изменением его свободной энергии:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G^* / RT), \quad (5)$$

где k – константа скорости реакции, k_B – константа Больцмана, h – постоянная Планка, ΔG^* – свободная энергия активации.

Изменение свободной энергии активации (ΔG) химической реакции можно вычислить по следующей формуле:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (6)$$

Из формулы видно, что вклад в изменение ΔG вносит как ΔH , так и энтропия активации – ΔS . Исходя из вышеприведенных предположений, повышение скорости катализа СДГ может быть обусловлено более значимым вкладом энтропийного фактора в снижение свободной энергии активации ферментативной реакции. Возможно, что при гипотермии структурно-динамические изменения в молекуле СДГ или ее окружении способствуют существенному повышению энтропии активации СДГ, что позволяет снизить ΔG СДГ и тем самым, существенно повысить скорость ее катализа. Повышение ΔS , скорее всего, тесно связано с изменениями в липидной подложке фермента и повышением его конформационной подвижности. Оно направлено на компенсацию воздействия на фермент низкотемпературного фактора.

Имеет ли повышение активности СДГ при гипотермии биологическую значимость или является отражением патологических процессов, происходящих в митохондриях на уровне ЭТЦ?

Известно, что в условиях нормоксии в интактных митохондриях основной вклад в работу дыхательной цепи вносит комплекс I ЭТЦ, окисляющий НАД-зависимые субстраты. Только 25–30% митохондриального дыхания в этих условиях связано с комплексом II и окислением сукцината, содержание которого в матриксе митохондрий невелико [50]. В условиях гипоксии происходят изменения работы дыхательной цепи: обратимое подавление функции комплекса I и компенсаторная активация комплекса II. При этом резко возрастают содержание сукцината в крови и тканях [51] и вклад сукцинатаоксидазного окисления в общее дыхание. Дыхание на сукцинате может достигать 70–80% [50].

Переход на преимущественное окисление сукцината представляет собой один из механизмов

повышения устойчивости клетки к гипоксии. Лимитирующими факторами при этом являются наличие достаточного количества сукцината и активность сукцинатдегидрогеназы. Было показано, что содержание сукцината в первые 30 мин гипоксии возрастает на порядок, достигая 4–7 ммоль/л [52]. Одновременно при гипоксии наблюдается активация сукцинатдегидрогеназы и сукцинатоксидазного окисления, а также увеличение вклада последнего в дыхание и синтез энергии [53].

По мнению некоторых авторов, переход на преимущественное окисление сукцината в условиях гипоксии, возможно связан с тем, что наиболее удаленные от кислорода пиридиннуклеотиды – НАД и НАДФ, как правило, восстановлены на 100%, тогда как часть флавопротеидов и цитохромный участок дыхательной цепи остаются в значительной мере окисленными. Такие различия в степени восстановленности пиридиннуклеотидов и флавопротеидов в условиях гипоксии создают возможность для преимущественного окисления янтарной кислоты, поскольку, сукцинатдегидрогеназа в отличие от большинства других дегидрогеназ является флавинозависимым ферментом [54].

Предположено, что переключение путей окисления субстратов дыхательной цепи от НАД-зависимого на сукцинатоксидазный является эволюционно сформированным срочным механизмом адаптации к гипоксии, который снижает характерные для гипоксии нарушения синтеза АТФ и способствует устранению гипоксического ацидоза. Репрограммирование работы субстратного участка дыхательной цепи при гипоксии происходит очень быстро. Было показано, что изменения кинетических показателей основных ферментов Комплексов I и II наблюдаются уже через 30 мин после самых различных гипоксических воздействий [55].

Феномен активного окисления янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой получил название «монополизации дыхательной цепи», биологическое значение которого заключается в быстром ресинтезе АТФ клетками и повышении их антиоксидантной активности [56]. Это важно в условиях гипоксии, когда развивается дефицит НАД-зависимых субстратов, приводящий к нарушению функционирования первого комплекса митохондриальной дыхательной цепи. В этой патологической ситуации янтарная кислота «поставляет» электроны непосредственно на комплекс II дыхательной цепи, восстанавливая электрохимический градиент на митохондриальной мембране и обеспечивая тем самым «бесперебойную» работу митохондрий, что поддерживает уровень и адекватность энергетического обеспечения клетки. В противном случае при ингибировании

первого комплекса происходит деполяризация внутренней мембраны митохондрий, сопровождающаяся тяжелыми нарушениями трансмембранного транспорта, что, в конечном счете, может явиться причиной гибели клетки [57].

Поскольку, многие исследования указывают на высокую вероятность развития гипоксии на ранних этапах индукции гипотермического состояния, то повышение эффективности катализа СДГ за счет V_{max} , скорее всего, является одним из компенсаторно-приспособительных механизмов развития адаптации к условиям дефицита кислорода в митохондриях. Повышение K_M для СДГ, обнаруженное нами на начальных этапах развития гипотермического состояния, может указывать на то, что фермент при гипотермии функционирует в условиях высокого содержания сукцината.

В последние годы внимание многих исследователей привлекает участие СДГ в генерации АФК в митохондриях. Первоначально основными источниками митохондриальных АФК считались дыхательные комплексы I и III, а вклад комплекса II игнорировался. Выявление мутаций в комплексе II, приводящих к увеличению продукции АФК при различных заболеваниях, и доказательства того факта, что он играет решающую роль в продукции АФК посредством обратного переноса электронов через комплекс I, демонстрируют значительный вклад комплекса II в генерацию АФК, который имеет важные физиологические или патологические последствия [11].

Было показано, что во время ишемии и гипоксии в митохондриях происходит накопление сукцината до тех пор, пока не будет исчерпан источник фумарата или не начнется реперфузия, во время которой комплекс II метаболизирует доступный сукцинат с образованием убихинона, что приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны [58]. Сочетание высоких уровней убихинона и гиперполяризованного мембранного потенциала «заставляет» комплекс I входить в так называемое состояние обратного переноса электронов и продуцировать АФК с чрезвычайно высокой скоростью [26]. Таким образом, накопление сукцината в митохондриях, может стать ключевым фактором ишемически-реперфузионного повреждения [26]. Можно предположить, что высокая активность СДГ при гипотермии предотвращает накопление сукцината в митохондриях и снижает продукцию АФК посредством обратного переноса электронов, оказывая тем самым протекторный эффект.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу предположения о возможном переключении окисления субстратов дыхательной цепи от НАД-зависимого на сукцинатоксидазный путь, которое происходит уже на

начальных этапах гипотермии и становится более выраженным в динамике ее пролонгирования. Это переключение обусловлено изменениями в каталитических свойствах СДГ, увеличивающими ее активность, и является срочным регуляторным и компенсаторным механизмом адаптации, который реализуется в условиях дефицита кислорода в печени, а возможно и в других органах. Такая модуляция активности СДГ, обеспечивает сохранение энергосинтезирующей функции дыхательной цепи при нарушении кислородного гомеостаза и снижает скорости генерации в них АФК. Действительно, ранее нами было обнаружено, что в динамике пролонгирования гипотермии происходит нормализация ряда биоэнергетических параметров митохондрий (скорости фосфорилирования, значений коэффициента окислительного фосфорилирования и дыхательного контроля) [13], а также интенсивности в них свободно-радикальных процессов [14]. Все эти данные в совокупности указывают на активацию у гомойотермных животных при длительном воздействии низких температур эволюционно сформированных компенсаторных механизмов, способствующих повышению неспецифической резистентности организма к экстремальным факторам окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (FZNZ-2020-0002).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В ходе исследования были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Brown, H. Brugger, and J. Boyd, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1930 (2012).
2. Z. Sun, J. E. Dalton, D. Yang, et al., *Anesthesiology*, **122** (2), 276 (2015).
3. X. N. Tang and M. A. Yenari, *Ageing Res. Rev.*, **9** (1), 61 (2010).
4. K. Søreide, *Injury*, **45** (4), 647 (2014).
5. M. Andresen, J. T. Gazmuri, A. Marín, et al., *Scand. J. of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* **23** (1), 2 (2015).
6. N. Alva, J. Palomeque, and T. Carbonell, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 10 (2013).
7. Л. В. Усенко и А. В. Царев, *Общая реаниматология*, **5** (1), 21 (2009).
8. Э. З. Эмирбеков и Н. К. Кличханов, *Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии* (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2011).
9. V. V. Zinchuk and S. V. Hlutkin, *Asian J. Pharmacy, Nursing and Med. Sci.*, **3** (2), 55 (2015).
10. V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Törnroth, et al., *Science*, **299**, 700 (2003).
11. K. H. Vanova, M. Kraus, J. Neuzil, and J. Rohlena, *Redox Rep.*, **25** (1), 26 (2020).
12. В. В. Афанасьев, Е. Р. Баранцевич и Т. П. Вишневецкая, *Азбука нейроцитопroteкции* (Изд. дом «СТЕЛЛА», С-Пб., 2016).
13. Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова и В. Р. Абдуллаев, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **169** (1), 33 (2020).
14. Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, С. И. Хизриева и В. Р. Абдуллаев, *Цитология*, **91** (7), 536 (2019).
15. D. H. Lowry, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
16. М. И. Прохорова, *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* (Изд-во ЛГУ, Л., 1982).
17. М. Т. Д. Маяхи и Н. К. Кличханов, *Изв. Самарского науч. центра РАН*, **14**, 273 (2012).
18. Н. Г. Волжина, *Дис. ... д-ра биол. наук* (Ростовский гос. ун-т, Ростов-на-Дону, 1992).
19. M. E. Nunnally, R. Jaeschke, G. J. Bellingan, et al., *Crit. Care Med.*, **39**, 1113 (2011).
20. D. Danzl, in *Auerbach PS, ed. Wilderness medicine. 6th edn.* (Elsevier, Philadelphia, 2012), pp. 116–142.
21. O. Karcioğlu and N. Koyuncu, *Vasc. Med. Surg.* **6** (1), 1 (2018).
22. N. Alva, T. Carbonell, and J. Palomeque, *J. Thermal Biol.*, **29**, 259 (2004).
23. В. П. Скулачев, А. В. Богачев и Ф. О. Каспаринский, *Мембранная биоэнергетика* (МГУ, М., 2012).
24. P. Hochachka and G. Somero, *Biochemical adaptation* (Oxford University Press, Oxford, 2002).
25. E. L. Mills, K. A. Pierce, M. P. Jedrychowski, et al., *Nature*, **560**, 102 (2018).
26. E. T. Chouchani, V. R. Pell, E. Gaude, et al., *Nature*, **515** (7527), 431 (2014).
27. B. Moosavi, X. Zhu, W.-C. Yang, and G.-F. Yang, *Biol. Chem.*, **401** (3), 319 (2020).
28. M. Erecinska, M. Thoresen, and I. A. Silver, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 513 (2003).
29. T. Oda, K. Shimizu, A. Yamaguchi, et al., *Cryobiology*, **65**, 104 (2012).
30. G. Cecchini, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 77 (2003).
31. G. Tong, S. Endersfelder, L. M. Rosenthal, et al., *Brain Res.*, **1504**, 74 (2013).

32. H. K. Hsu, P. L. Shao, K. L. Tsai, et al., *J. Mol. Endocrinol.*, **34** (2), 433 (2005).
33. D. Wang and J. Zhang, *Mol. Med. Rep.*, **11**, 1759 (2015).
34. K. E. Cullen and K. D. Sarge, *J. Biol. Chem.*, **272** (3), 1742 (1997).
35. N. I. Fedotcheva, M. N. Kondrashova, E. G. Litvinova, et al., *Biophysics*, **63**, 743 (2018).
36. M. Salvi, N. A. Morrice, and A. M. Brunati, *FEBS Lett.*, **581**, 5579 (2007).
37. R. Acin-Perez, I. Carrascoso, F. Baixauli, et al., *Cell Metab.* **19**, 1020 (2014).
38. F. Valsecchi, et al., *Physiology (Bethesda)*, **28**, 199 (2013).
39. A. Bezawork-Geleta, J. Rohlena, L. Dong, et al., *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 312 (2017).
40. A. K. Nath, J. H. Ryu, Y. N. Jin, et al., *Cell Rep.*, **10**, 694 (2015).
41. J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, *Mitochondrion*, **10** (4), 393 (2010).
42. P. A. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова и В. Р. Абдулаев, *Биол. мембраны*, **5**, 351 (2021).
43. A. P. Shepelev, *Biofizika*, **23**, 465 (1977).
44. А. М. Каландаров, З. И. Раджабова, С. А. Забелинский и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54** (2), 81 (2018).
45. З. Г. Раджабова, С. А. Забелинский, М. А. Чеботарева и др., *Биол. мембраны*, **37** (2), 134 (2020).
46. S. Gonzalez, A. M. Nervi, R. O. Peluffo, and R. R. Brenner, *Lipids*, **18**, 7 (1983).
47. J. J. Van den Berg, J. A. Op den Kamp, and B. H. Lubin, *Biochemistry*, **32**, 4962 (1993).
48. Л. С. Ягужинский, Ю. А. Скоробогатова и С. В. Нестеров, *Биофизика*, **62** (3), 518 (2017).
49. J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, *Mitochondrion*, **10** (4), 393 (2010).
50. L. D. Lukyanova, E. L. Germanova, Y. I. Kirova, in *The Adaptation Biology and Medicine. Cell Adaptations and Challenges*, Ed. by P. Wang, C. H. Kuo, N. Takeda, and P. K. Singal (New York, 2011), pp. 251–277.
51. D. M. Stroka, T. Burkhardt, and I. Desballerts, *FASEB J.*, **15**, 2445 (2001).
52. A. King, M. A. Selak, and E. Gottlieb, *Oncogene*, **25** (34), 4675 (2006).
53. S. L. Vargas, I. Toma, J. J. Kang, et al., *J. Amer. Soc. Nephrol.*, **20**, 1002 (2009).
54. Э. Ш. Абиева, *Изв. НАН Азербайджана (сер. Биологические и медицинские науки)*, **70**, 55 (2015).
55. Л. Д. Лукьянова, *Фізіол. журн.*, **59** (6), 141 (2013).
56. А. В. Смирнов, О. Б. Нестерова, Р. В. Голубев и др., *Сукцинатсодержащие диализирующие растворы в практике гемодиализа* (Левша, С.-П., 2014).
57. Е. В. Екушева, *Эксперим. клинич. фармакология*, **81** (8), 37 (2018).
58. J. N. Bazil, D. A. Beard, and K. C. Vinnakota, *Biophys. J.*, **110** (4), 962 (2016).

Activity and Catalytic Characteristics of Rat Liver Mitochondrial Succinate Dehydrogenase at Moderate Hypothermia

R.A. Khalilov*, A.M. Dzhafarova*, and V.R. Abdulaev*

*Dagestan State University, ul. Gadjeva 43a, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000 Russia

Previously, it was shown in our study that short-term moderate hypothermia (30°C) contributes to a significant increase in the intensity of free-radical processes and a change in a number of bioenergetics parameters of mitochondria, and its prolongation for 3 hours leads to their normalization. The detected changes may be associated with modulation of the activity and catalytic properties of succinate dehydrogenase. This study shows that moderate hypothermia, and especially prolonged exposure to a colder environment for 3 hours, significantly increases the rate of succinate dehydrogenase catalysis and affects the nature of its concentration and temperature dependences. Modulation of succinate dehydrogenase activity in the dynamics of hypothermia occurs due to changes in its kinetic and thermodynamic parameters, of which the maximum rate (V_{\max}) makes the most significant contribution to the efficiency of enzyme catalysis. These changes may play an important role in maintaining the energy-synthesizing function of mitochondria and reducing the intensity of free-radical processes in them.

Keywords: hypothermia, rats, mitochondria, succinate dehydrogenase, kinetic characteristics

УДК 577.3

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ – ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОФУРАНА

© 2022 г. Г.Ж. Парра*, Л.П. Феррейра**, Г.П. Борисевич***, Ю.Е. Борисевич***, #

**Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 – Butantã, São Paulo 05503-900, Brazil*

***Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Av. Prof. Roberto Frade Monte, 389 – Aeroporto, Barretos – SP, 14783-226, Brazil*

****Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil*

#*E-mail: iourib@ffclrp.usp.br*

Поступила в редакцию 26.08.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 29.08.2022 г.

Фотохимиотерапия – в настоящее время метод лечения различных заболеваний, включая онкологические, в форме фотодинамической терапии. В организм вводится фотосенсибилизатор, который накапливается в больной ткани. Облучение видимым светом переводит накопленный фотосенсибилизатор в электронно-возбужденные состояния, которые, взаимодействуя с кислородом, переводят его в активные формы, разрушающие больные клетки. Однако энергия электронного возбуждения может расходоваться путем флуоресценции и внутренней и интеркомбинационной конверсий. Это ограничивает эффективность фотодинамической терапии, стимулируя поиск альтернативных путей фотохимиотерапии, с использованием невозбужденных активных частиц, например, свободных радикалов. Среди свободных радикалов интересен радикал NO^{\bullet} , в малых концентрациях участвующий во многих жизненно важных процессах, а в высоких концентрациях вызывающий гибель клеток. Среди различных классов фотосенсибилизаторов, способных к фотовысвобождению NO^{\bullet} , внимание привлекают производные нитрофурана. Представитель этого класса нитрофурантоин, применяемый как лекарство в урологии, продемонстрировал высокую фотоактивность против ряда раковых клеток и бактерий.

Ключевые слова: фотохимиотерапия, альтернативные механизмы, производные нитрофурана, фотовысвобождение NO^{\bullet} , нитрофурантоин.

DOI: 10.31857/S000630292206014X, EDN: LKQTPP

Мне странно, когда кто-то называет себя ученым...

Кто такие эти «ученые»?

Я знаю только одного – «кота ученого»!

Л.А. Блюменфельд

Фундаментальная наука – штука, конечно, увлекательная.

Вон Милликен, к примеру, уйму времени потратил,

определяя заряд электрона. Но надо же помнить

и о больных и умирающих людях, которые ждут нашей помощи.

С.Э. Шноль

(из беседы со студентами-биофизиками)

Фотохимиотерапия – неинвазивная медицинская технология, применяемая при лечении рака, грибковых, бактериальных и вирусных заболева-

ний, в настоящее время – в форме фотодинамической терапии [1, 2]. Эта технология основана на введении в организм пациента фотоактивного ве-

Сокращения: ФС – фотосенсибилизатор, НФТ – нитрофурантоин, МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, СТЕ – цитотоксический эффект (cytotoxic effect).

щества (фотосенсибилизатора, ФС), который накапливается в больной ткани, и последующем облучении этой ткани видимым светом. Поглощение квантов видимого света переводит накопленный ФС в электронно-возбужденные синглетное и триплетное состояния, которые, взаимодействуя с молекулярным кислородом, формируют его активные состояния, такие как синглетно-возбужденное состояние «синглетный кислород», анион супероксид и т. д., разрушающие больные клетки в результате прямых или вторичных реакций, в частности, цепных [1–3]. Преимуществами фотохимиотерапии по сравнению с классическими методами радио- и химиотерапии является отсутствие негативных побочных эффектов, поскольку, в отличие от химиотерапевтических препаратов, ФС не являются токсичными в невозбужденном состоянии, а видимый свет также не представляет опасности для организма пациента. Привлекательной является также техническая простота метода. Надо отметить, что в последнее время проводятся исследования по применению фотохимиотерапии в сельскохозяйственной ветеринарии с использованием Солнца в качестве естественного источника видимого облучения.

Однако эффективность фотохимиотерапии в форме фотодинамической терапии ограничивается рядом факторов. Дело в том, что энергия электронно-возбужденных состояний как ФС, так и кислорода, кроме желательных реакций, может расходоваться путем излучательной (флуоресценция) и безизлучательной (внутренняя и интеркомбинационная конверсия) релаксации [4]. Кроме того, для раковых тканей характерно низкое содержание молекулярного кислорода, что понижает вероятность его реакции с возбужденными состояниями ФС. Эти факторы ограничивают эффективность фотодинамической терапии, стимулируя поиск альтернативных путей фотохимиотерапии, не требующих участия молекулярного кислорода и возбужденных состояний ФС. Одним из возможных путей может быть использование в качестве активных частиц свободных радикалов, высвобождаемых под действием видимого света.

Среди свободных радикалов особый интерес представляет нитроксильный радикал NO^\bullet , в низких концентрациях участвующий во многих жизненно важных процессах, а в высоких концентрациях вызывающий гибель клеток [5–7]. Задача сводится к поиску ФС, высвобождающих NO^\bullet под действием света [8–10]. Среди различных ФС, возможных фотодоноров NO^\bullet , особое внимание привлекают производные нитрофурана, такие как фурацилин, нитрофурантоин, фуразолидон, фуразидин, нифуроксазид, хинифурил. Привлекательность этих веществ в том, что они

уже широко используются в медицине, главным образом как бактерицидные, противогрибковые и противовоспалительные препараты, механизм которых основан на высвобождении NO^\bullet в процессе их метаболизма [11]. Кроме того, в отличие от применяемых в настоящее время ФС, они дешевы и широкодоступны, что важно для их применения особенно в ветеринарии.

Интенсивная, главным образом желто-зеленая окраска производных нитрофурана указывает на наличие оптического поглощения в видимой части спектра, что говорит о возможности их фотореакций при облучении видимым светом.

Ранее мы обнаружили высокую фотоактивность бактерицидного препарата хинифурила против лейкемии мышей P388 [12, 13] и установили, что она обусловлена формированием при фотовозбуждении трех активных частиц: радикала NO^\bullet , синглетного кислорода и анион супероксида [13].

Другим представителем этого класса является нитрофурантоин, который привлекает внимание из-за широкого променения в качестве лекарственного препарата в урологии [14], а также в сельском хозяйстве, как обеззараживающая добавка к кормам сельскохозяйственных животных [15]. В наших исследованиях мы установили его высокую фотоактивность против ряда раковых клеток и бактерий.

В данной статье мы представляем результаты исследования фотоактивности нитрофурантоина против клеток *murine melanoma B16F10*, а также обсуждаем возможные механизмы его фотоактивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах был использован нитрофурантоин (НФТ, рис. 1) производства Sigma Chemical Co (США). НФТ плохо растворим в воде, поэтому его исходный раствор приготавливали в диметилсульфоксиде.

Спектральные и фотофизические характеристики НФТ были исследованы в фосфатном буфере при pH 7.2 и в этиловом спирте.

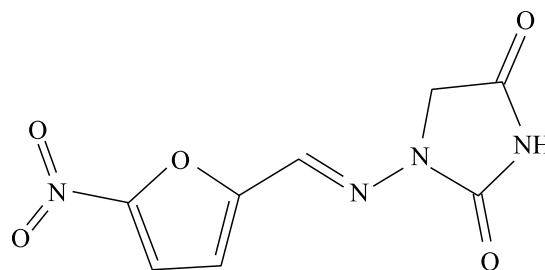


Рис. 1. Структурная формула нитрофурантоина.

Кинетику формирования и диссипации нитроксильного радикала NO^{\cdot} и его квантовый выход (Φ_{NO}) определяли методом хемилюминесценции [16].

Детектирование синглетного кислорода осуществляли путем регистрации во времени его фосфоресценции при $\lambda = 1270$ нм [17].

Эксперименты с культурой клеток *murine melanoma B16F10*. Методика экспериментов с культурой клеток *murine melanoma B16F10* детально описана в работе [18]. Была использована культура клеток из «American Type Culture Collection» (Rockville, MD, США). Перед использованием в экспериментах с культурой клеток основной раствор НФТ (21 мМ в диметилсульфоксиде) был солибилизован в среде RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, США).

Клетки выращивали в среде RPMI 1640 с фетальным красным с добавкой 10% Fetal Calf Serum, глутамина и антибиотиков при 35°C во влажной среде, содержащей 5% CO_2 и 95% воздуха. Все реагенты получены от Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, США).

Осевшие клетки отмывали дважды в фосфатном буфере, а затем диспергировали в трипсин-ЭДТА (2.5 г/л, Sigma-Aldrich, США), центрифугировали при 1100 об/мин в течение 8 мин при 10°C в полной среде и высевали. Клетки распределяли на подложки с 96 ячейками по 0.2 мл среды при плотности $2 \cdot 10^4$ клеток на каждую ячейку. После 24 ч роста из ячеек удаляли среду и добавляли свежую среду RPMI с различным содержанием НФТ (0.1–100 мкМ). Клетки инкубировали,

а затем растворы сенсibilизатора удаляли и добавляли свежую среду. Для экспериментов со светом была использована среда RPMI, свободная от красного фенола, поскольку часть его спектра поглощения совпадает со спектром НФТ.

Определение фототоксичности. Для светового облучения культуры на подложках с 96 ячейками использовали источник из 96 светодиодов с длиной волны излучения 385 нм, распределенных равномерно по поверхности. Интенсивность света измеряли радиометром USB4000 (Ocean Optics, США), а время облучения выбирали так, чтобы получить дозы 2, 6 и 12 Дж/см². Были проделаны контрольные эксперименты, а именно: ячейки, содержащие клетки без сенсibilизатора и без облучения (контроль 0); ячейки с клетками, обработанные сенсibilизатором, но без облучения (контроль 1); ячейки с облученными клетками без сенсibilизатора (контроль 2).

Тест на выживание клеток был проделан с применением 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в соответствии с методикой, описанной Моссманом [19]. МТТ добавляли к образцу после 24-часовой инкубации с НФТ в темноте или после облучения светом. В каждую ячейку добавляли 200 мкл раствора RPMI-МТТ (0.5 мг/мл) и через 3 ч заменяли на 200 мкл диметилсульфоксида.

Величину оптической плотности в ячейках определяли при длине волны 492 нм с помощью Thermoplate Reader[®]. Цитотоксический эффект (cytotoxic effect, СТЕ) рассчитывали по формуле:

$$\text{СТЕ}(\%) = \left(1 - \frac{\text{Оптическое поглощение обработанных клеток}}{\text{Оптическое поглощение необработанных клеток}} \right) \times 100.$$

Летальные концентрации НФТ в темноте (IC_{50}) и при световом облучении (LD_{50}) определяли из зависимости СТЕ от концентрации НФТ. Все результаты представлены как средние по 3 экспериментам величины СТЕ с ошибкой, полученные для 18 индивидуальных ячеек.

Проникновение НФТ в клетки, его внутриклеточная локализация и определение внутриклеточного NO^{\cdot} с помощью флуоресцентной микроскопии. Эксперименты были проведены с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti, оборудованного инкубационной системой «stage top». Были использованы специфические красители для клеточных органелл. Митохондрии окрашивали с помощью родамина 123, а для ядер был использован препарат Hoechst (оба – Sigma, США). В качестве индикатора образования NO^{\cdot} в клетках был использован диаминофлуоресцеин в форме диацетата, гарантирующей его проникновение в клетку [20].

Во всех флуоресцентных экспериментах клетки выращивали в чашках Петри и тщательно промывали после инкубации и перед экспериментами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные и фотофизические характеристики НФТ. Спектральные и фотофизические характеристики НФТ были впервые детально изучены в работе [21].

Спектры оптического поглощения и флуоресценции НФТ в фосфатном буфере при pH 7.2 представлены на рис. 2. НФТ имеет два интенсивных пика оптического поглощения в фиолетовой и близкой ультрафиолетовой спектральных областях с коэффициентами молярного поглощения $\epsilon_{378\text{nm}} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $\epsilon_{273\text{nm}} = 1.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

При облучении светом в области оптического поглощения раствор НФТ излучает очень слабую

флуоресценцию с максимумом при $\lambda = 544$ нм (рис. 2) и квантовым выходом $\phi_{\text{фл}} = (3.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$ [21]. Кинетическая кривая затухания флуоресценции имеет биэкспоненциальный характер с временами жизни $\tau_1 = 1.3 \pm 0.3$ нс и $\tau_2 = 0.030 \pm 0.003$ нс [21]. Тем не менее, наличие собственной, хотя и слабой, флуоресценции позволило установить места локализации НФТ внутри клетки.

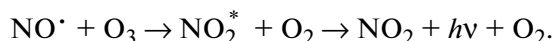
Методом импульсного фотолиза [22, 23] было зарегистрировано формирование триплетного состояния НФТ с крайне низким квантовым выходом ($\phi_T \approx (1-5) \cdot 10^{-6}$) и со временем жизни в отсутствие молекулярного кислорода $\tau_T = 0.2 \pm 0.1$ мкс [21]. Триплетное состояние тушится молекулярным кислородом с бимолекулярной константой тушения $k_q = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [21], характерной для процессов, контролируемых диффузией [4, 24]. Тушение сопровождается формированием синглетного кислорода. Однако интенсивность излучения при $\lambda = 1270$ нм находилась на уровне шумов, что не позволило достоверно определить величину квантового выхода синглетного кислорода даже при насыщении раствора кислородом.

Обычно времена жизни триплетных состояний органических молекул, включая производные нитрофурана [4, 13], в растворах находятся в интервале от десятков микросекунд до миллисекунд. Столь короткие времена жизни НФТ, а также низкие квантовые выходы его флуоресценции и триплетного состояния, указывают на наличие альтернативных мономолекулярных процессов диссипации энергии электронного возбуждения НФТ. Одним из таковых может являться фотоизомеризация молекулы НФТ, что характерно для молекул, в структуре которых присутствует цепь π -сопряжения [25].

Другая возможность диссипации энергии электронного возбуждения НФТ — фотовысвобождение радикала NO^* , аналогично наблюдающемуся в случае хинифурила [13].

Чтобы проверить эту гипотезу, были проделаны эксперименты по регистрации NO^* при облучении буферных растворов НФТ.

Фотовысвобождение NO^* . Детектирование NO^* при облучении растворов НФТ видимым светом в диапазоне 400–450 нм проводили хемилюминесцентным методом в соответствии со следующей реакцией:



На рис. 3а представлена кривая формирования и расходования NO^* в зависимости от времени облучения.

Параллельно с формированием радикала NO^* мы наблюдали изменение оптического по-

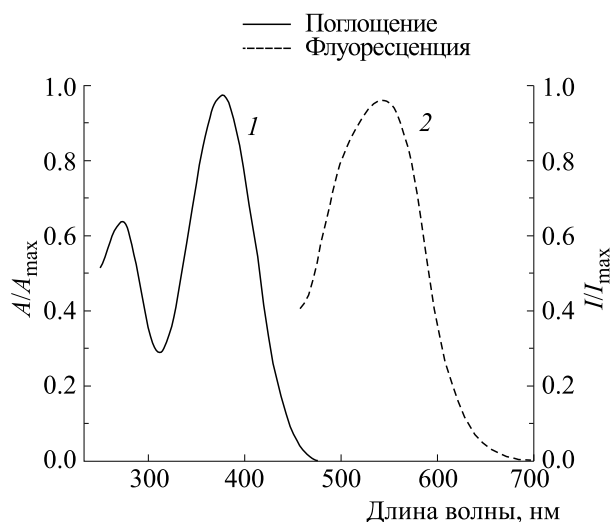


Рис. 2. Нормированные спектры оптического поглощения и флуоресценции нитрофурантоина при pH 7.2 [21].

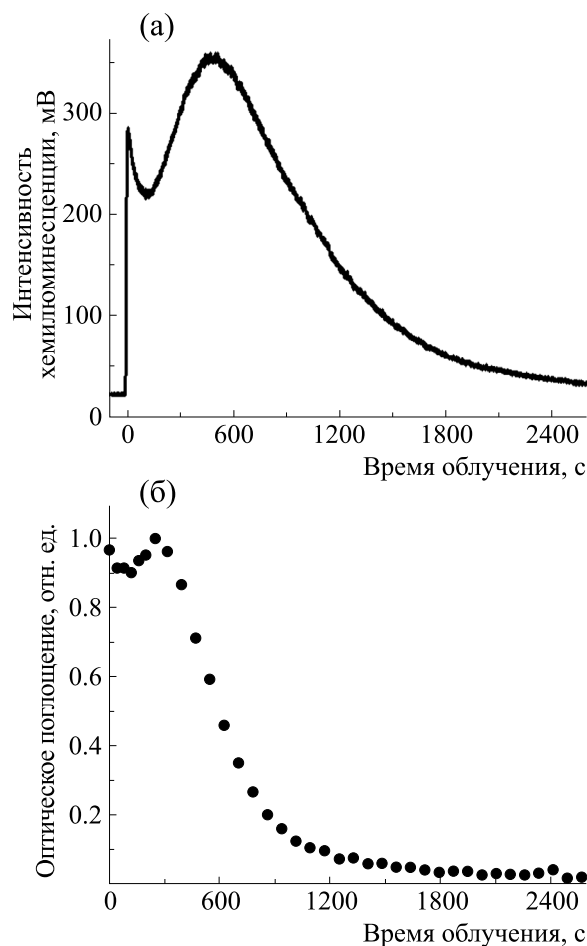


Рис. 3. (а) — Зависимость от времени облучения интенсивности хемилюминесценции буферного раствора нитрофурантоина, вызванной фотовысвобождением радикала NO^* ; (б) — Зависимость от времени облучения нормализованного оптического поглощения раствора нитрофурантоина при $\lambda = 355$ нм.

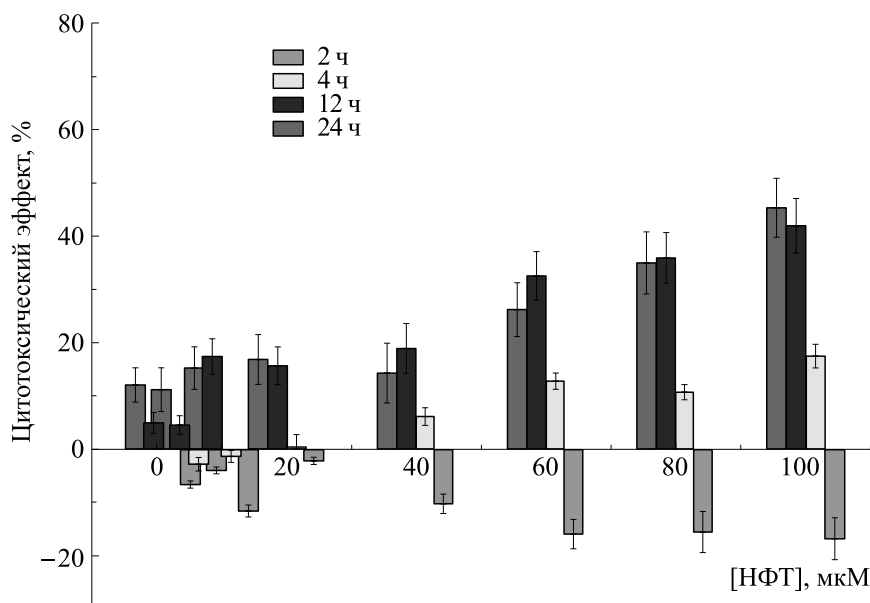


Рис. 4. Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток B16F10 через 2, 4, 12 и 24 ч инкубации в темноте [18].

глошения НФТ, временная зависимость которой (рис. 3б) подобна временной зависимости концентрации NO^{\bullet} .

Сложный характер этих кривых говорит о том, что фототрансформация НФТ и, соответственно, фотовысвобождение NO^{\bullet} происходят в несколько этапов. Полная схема этих процессов нуждается в дополнительном исследовании, однако факт фотовысвобождения NO^{\bullet} сомнений не вызывает. Основываясь на этом факте можно было ожидать, что НФТ будет проявлять фотоцитотоксичность. Это предположение было подтверждено экспериментами с клетками *murine melanoma B16F10* [18].

Интернализация НФТ и его локализация внутри клеток *murine melanoma B16F10*. Прежде всего было проведено исследование кинетики проникновения НФТ внутрь клеток (интернализация) и его локализации по отношению к внутриклеточным структурам [18]. Эти исследования были проведены с помощью флуоресцентной микроскопии.

Клетки инкубировали с НФТ в концентрации 20 мкМ в течение 1, 2, 4 и 24 ч; флуоресценция НФТ в клеточной среде для разных времен инкубации ($t_{\text{инк}}$) была визуализирована с использованием соответствующих фильтров.

При временах инкубации $t_{\text{инк}}$, меньших 4 ч, интенсивность флуоресценции НФТ в клетках была очень слабой и диффузной. При повышении $t_{\text{инк}}$ наблюдался рост интенсивности флуоресценции и ее локализация в определенных органеллах внутри клетки, что указывает на увеличение концентрации НФТ внутри клетки и его связывание с клеточными структурами. Сравне-

ние локализации НФТ с локализацией маркеров ядер и митохондрий показало, что распределение в клетках НФТ и родамина 123 одинаково, а именно, что оба они связываются с митохондриями, но избегают клеточных ядер, с которыми связывается краситель Hoechst.

Высвобождение NO^{\bullet} при облучении НФТ внутри клетки. При облучении культуры клеток с НФТ светом с длиной волны 385 нм наблюдается уменьшение флуоресценции НФТ, что свидетельствует о его фототрансформации. Параллельно с уменьшением флуоресценции НФТ, в клетке наблюдается формирование NO^{\bullet} , которое фиксировалось с помощью диацетата диаминофлуоресцеина, специфического флуоресцентного маркера внутриклеточного NO^{\bullet} [20]. Клетки инкубировали с НФТ в течение 6 часов и коинкубировали с диаминофлуоресцеином в течение 10 мин. Интенсивность флуоресценции диаминофлуоресцеина возрастает с ростом дозы облучения, доказывая таким образом, что источником NO^{\bullet} в клетках действительно является НФТ, преобразующийся под действием света.

Цитотоксичность НФТ по отношению к клеткам *murine melanoma B16F10* в темноте и на свету. На рис. 4 представлены данные по цитотоксическому эффекту НФТ в темноте в зависимости от времени инкубации. Для $t_{\text{инк}} = 2$ ч НФТ не проявляет цитотоксичности во всем диапазоне использованных концентраций (0.1–100 мкМ). Более того, наблюдается пролиферация клеток, увеличивающаяся с ростом концентрации НФТ. Для $t_{\text{инк}} = 4$ ч пролиферация клеток уменьшается с ростом концентрации НФТ вплоть до ее критического зна-

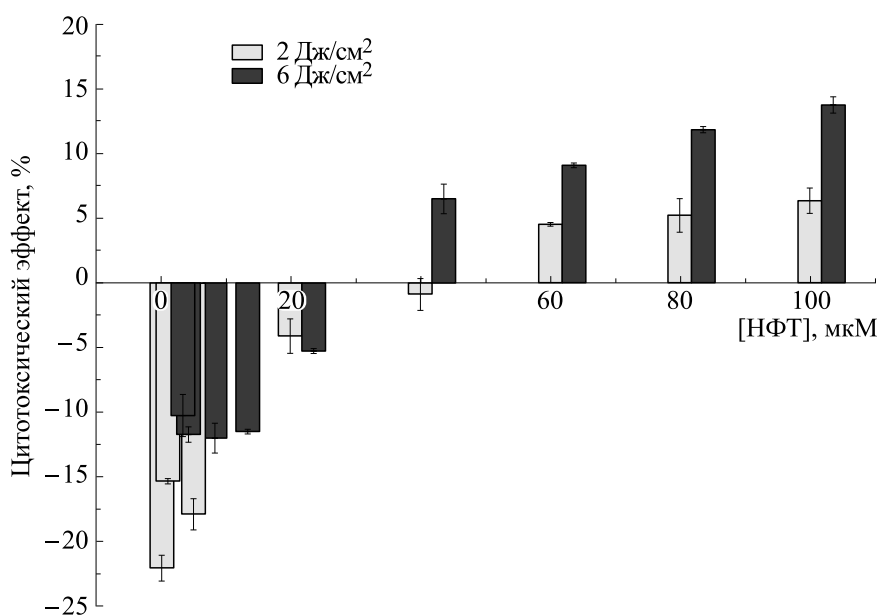


Рис. 5. Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток V16F10 после двухчасовой инкубации и последующего облучения светом 385 нм с дозами 2 и 6 Дж/см² [18].

чения $[НФТ]_{кр} \approx 40$ мкМ, при которой не наблюдаются ни пролиферация, ни токсичность. Для $[НФТ] > [НФТ]_{кр}$ наблюдается только токсичность, а СТЕ увеличивается с ростом концентрации НФТ. Для $t_{инк}$ 12 и 24 ч наблюдается только цитотоксичность и СТЕ растет с ростом концентрации НФТ.

При облучении образцов, содержащих НФТ, светом с длиной волны 385 нм для $t_{инк} = 2$ ч при облучении (рис. 5) НФТ в концентрациях ниже 40 мкМ вызывает пролиферацию вплоть до дозы облучения 2 Дж/см². Для более высоких концентраций наблюдается гибель клеток, причем СТЕ растет с увеличением содержания НФТ. Для дозы 6 Дж/см² наблюдается аналогичное поведение, однако пролиферация менее эффективна, токсический эффект появляется при меньших концентрациях НФТ, а СТЕ превышает наблюдаемый при 2 Дж/см².

Интересно отметить, что при низких концентрациях НФТ пролиферация при облучении светом гораздо эффективнее наблюдаемой в темноте (рис. 4 и 5). Однако для времен инкубации 4, 12 и 24 ч при облучении вообще нет пролиферации, наблюдается только гибель клеток. СТЕ растет с увеличением $t_{инк}$, дозы облучения и концентрации НФТ (рис. 6). Для $t_{инк} = 24$ ч и дозы 12 Дж/см² СТЕ достигает сатурации $\approx 100\%$ уже при $[НФТ] = 20$ мкМ, в то время как при этих условиях в темноте величина СТЕ всего около $\approx 15\%$.

Летальные концентрации в темноте (IC_{50}) и при облучении светом (LD_{50}) были получены из данных, представленных на рис. 4–6, а их соответствующие величины представлены в табл. 1.

Основываясь на приведенных данных, мы можем утверждать, что НФТ проявляет против раковых клеток V16F10 фотоцитотоксичность, многократно превосходящую его цитотоксичность в

Таблица 1. IC_{50} и LD_{50} нитрофурантоина для клеток V16F10 в зависимости от времени инкубации и дозы облучения [18]

Доза света, Дж/см ²	IC_{50} (12 ч), мкМ	LD_{50} (12 ч), мкМ	IC_{50} (24 ч), мкМ	LD_{50} (24 ч), мкМ
0	> 100	—	> 100	—
2	—	90	—	13
6	—	70	—	6
12	—	50	—	2

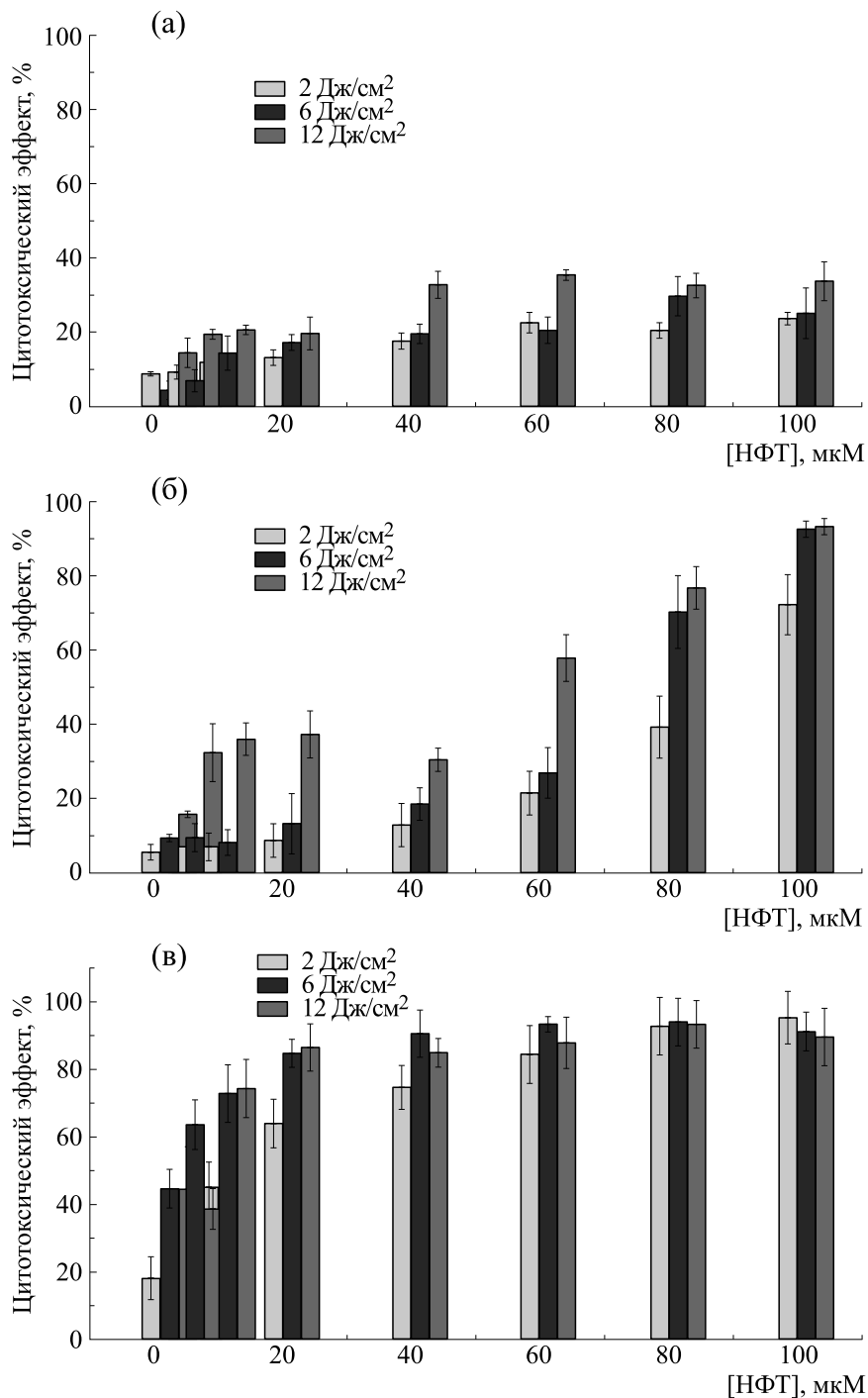


Рис. 6. Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток V16F10 после инкубации в течение 4 ч (а), 12 ч (б) и 24 ч (в) и последующего облучения светом 385 нм с дозами 2, 6 и 12 Дж/см² [18].

темноте. Фототоксичность НФТ обусловлена его фототрансформацией, сопровождающейся высвобождением радикала NO^{\cdot} . Интересен тот факт, что при низких внутриклеточных концентрациях НФТ и низких дозах облучения наблюдается эффект стимуляции роста клеток (пролиферация). Этот эффект обусловлен тем, что NO^{\cdot} в

низких концентрациях стимулирует различные биопроцессы в клетках и организме, тогда как при высоких концентрациях он их подавляет, приводя к гибели клеток [5–7].

Важно отметить также, что фототоксичность НФТ не связана с наличием или отсутствием в системе молекулярного кислорода.

В наших экспериментах мы не наблюдали разрушение клеточной мембраны. Это указывает на то, что механизм фотоцитотоксичности НФТ имеет, скорее всего, характер не некроза, а апоптоза. Это соответствует тому факту, что НФТ связан с клеточными митохондриями, а не с внешней мембраной. Однако детальный механизм фотоцитотоксичности НФТ требует дальнейшего изучения.

Недостатком НФТ как фотоактивного вещества для фотохимиотерапии является то, что спектр его оптического поглощения расположен в области 350–450 нм, т. е. вне фототерапевтического окна (600–800 нм), где биологические ткани относительно прозрачны. Поэтому его применение должно ограничиваться лечением поверхностных (кожных) заболеваний, и он не может быть использован для лечения массивных опухолей. Однако незначительные изменения в его структуре, такие как удлинение цепи π -сопряжения, могут привести к смещению его оптического спектра в нужную область [26]. Кроме того, нами было установлено, что как НФТ, так и хинифурил демонстрируют интенсивное двухфотонное поглощение [27], что позволяет инициировать их фотореакции при облучении квантами света с длиной волны 700–900 нм.

Представляет интерес также возможность применения НФТ в одонтологии при лечении зубных каналов, характеризующихся низким содержанием кислорода.

ВЫВОДЫ

Основываясь на исследовании фототоксичности производных нитрофурана, нитрофурантоина и хинифурила, мы можем утверждать, что его производные представляют собой новый класс фотоактивных веществ для применения в фотохимиотерапии. Преимуществом этого класса фотоактивных веществ по сравнению классическими фотосенсибилизаторами для фотодинамической терапии является то, что их фототоксичность основана не на формировании под действием света электронно-возбужденных состояний с последующей реакцией с молекулярным кислородом и формировании его активных форм, а на фотовысвобождении нитроксильного радикала NO^\cdot . Это должно увеличивать эффективность процесса, так как энергия электронно-возбужденных состояний фотосенсибилизатора и кислорода, помимо ожидаемых процессов, может быть рассеяна по альтернативным путям, как излучательным (флуоресценция), так и безызлучательным (внутренняя конверсия). Преимуществом производных нитрофурана также является то, что они относятся к легкодоступным и деше-

вым медицинским препаратам, разрешенным к использованию в медицине.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке следующих Агентств финансирования (Бразилия):

– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – гранты No. 304863/2017-3, No. 305303/2013-9;

– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

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. V. V. Kuznetsov, Res. Practic. Med. J., **2** (4), 98 (2015).
2. J. F. Algorri, Mario Ochoa, P. Roldán-Varona, et al., Cancers **13** (17), 4447 (2021).
3. S. Kwiatkowski, В. Кнап, D. Przystupski, et. al., Biomed. Pharmacother., **106**, 1098 (2018).
4. Н. Туппо, *Молекулярная фотохимия* (Мир, М., 1967).
5. S. Moncada, R. M. Palmer, and E. A. Higgs, Pharmacol. Rev., **43** (2), 109 (1991).
6. D. D. Thomas, L. A. Ridnour, et al., Free Radic. Biol. Med., **45** (1), 18 (2008).
7. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
8. S. A. Cicillini, A. C. L. Prazias, A. C. Tedesco, et al., Polyhedron, **28**, 2766 (2009).
9. S. Gupta, N. Ahmad, and H. Mukhtar, Cancer Res., **58** (9), 1785 (1998).
10. M. Korbelik, C. S. Parkins, H. Shibuya, et al., Br. J. Cancer, **82** (11), 1835 (2000).
11. N.A. Daghasanli, M. M. Rossa, H. S. Selistre-De-Araujo, et al., J. Photochem. Photobiol. B, **75**, 27 (2004).
12. N. A. Daghasanli, I. A. Degterev, A. C. Tedesco, et al., Braz. J. Med. Biol. Res., **37**, 1873 (2004).
13. N. A. Daghasanli, I. A. Degterev, G. B. Olivera, et al., J. Photochem. Photobiol. A, **184**, 98 (2006).
14. A. Porreca, D. D'Agostino, D. Romagnoli, et al., Control Trials. Urol. Int., **105** (7–8), 531 (2021).

15. M. Vass, K. Hruska, and M. Franek, *Veterinari Medicina*, **53**, 469 (2008).
16. *Nitric Oxide Analyser (NOA 280). Operation and Service Manual*, Ed. by P. M. Sievers, (Software Version 2.05, Sievers, USA, 1997).
17. А. А. Красновский, А. С. Бендикис и А. С. Козлов, *Биохимия*, **84** (2), 240 (2019).
18. L. P. Ferreira, G. G. Parra, D. C. K. Codognato, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16**, 1071 (2017).
19. T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* **65** (1–2), 55 (1983).
20. T. Nagano and T. Yoshimura, *Chem. Rev.* **102**, 1235 (2002).
21. G. G. Parra, L. P. Ferreira, D. C. K. Codognato, et al., *Lumin.*, **185**, 10 (2017).
22. G. Porter, *Science*, **160**, 1299 (1968).
23. Y. E. Borissevitch, A. S. Tatikolov, and V. A. Kuzmin, *High Energy Chem.*, **5**, 474 (1978).
24. Дж. Лакович, *Основы флуоресцентной спектроскопии* (Мир, М., 1986).
25. P. Russegger, *Chem. Phys. Lett.*, **69** (2), 362 (1980).
26. Новый справочник химика и технолога, под ред. Ю. В. Поконова (Мир и семья, М., 2005), гл. 4.3.5.2. Полиметиновые красители. http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimi-ka_i_tekhnologa/12_obshchie_svedeniya/6152.
27. L. De Boni, D. S. Correa, D. L. Silva, et al., *J. Chem. Phys.*, **134**, 014509 (2011).

Alternative Photosensitizers for Photochemotherapy Based on Medicinal Drugs That are Derivatives of Nitrofuran

G.G. Parra*, L.P. Ferreira, G.P. Borissevitch***, and I.E. Borissevitch*****

**Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 – Butantã, São Paulo 05503-900, Brazil*

***Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Av. Prof. Roberto Frade Monte, 389 – Aeroporto, Barretos – SP, 14783-226, Brazil*

****Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil*

Photochemotherapy is now a method for treating different diseases, which include cancer, and employing a photosensitizers used for photodynamic therapy. A photosensitizer, upon its introduction into the organism, is accumulated in the diseased tissue. Irradiation of the photosensitizer by visible light results in the formation of the electronically excited state of the accumulated photosensitizer; this state undergoes reactions in the presence of oxygen to form reactive active species which destroys diseased cells. However, the excited state energy can also dissipate through fluorescence and internal and intercombination conversions. This limits the efficiency of photodynamic therapy, stimulating a search for alternative pathways in photochemotherapy, using unexcited active particles, for example, free radicals. Among free radicals, NO^\bullet radical is of a special interest as in low concentrations it takes part in many vital processes, and elevated levels of this radical is a cause of cell death. Nitrofurantoin derivatives receive attention out of the different classes of photosensitizers, that lead to release of NO^\bullet under light. One of them, nitrofurantoin, used as a drug in treatment of urinary infections, demonstrates high photoactivity against a number of cancer cells and bacteria.

Keywords: photochemotherapy, alternative mechanisms, nitrofurantoin derivatives, NO^\bullet photorelease, nitrofurantoin

УДК 577.3

МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТА ЗОЛОТА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2022 г. А.К. Чигасова*, Л.А. Островская*., Д.Б. Корман*

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

#E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Проведено исследование роли апоптоза в индуцируемом полиакрилатом золота (аурумакрилом) процессе гибели опухолевых клеток, а также изучение влияния препарата на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7. Установлено, что аурумакрил, будучи активным цитотоксическим агентом, вызывает гибель клеток, изменение их морфологической структуры, индуцирует сшивки в молекуле ДНК. Показано, что апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной аурумакрилом гибели клеток.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), культура клеток MCF-7 цитотоксичность, апоптоз, сшивки ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG

Металлоцены, содержащие благородные металлы – золото и серебро, – весьма широко исследуются в последние годы в качестве веществ, проявляющих разностороннюю биологическую, в том числе противоопухолевую активность [1, 2].

Особое место среди такого рода веществ занимает полиакрилат золота (аурумакрил), представляющий собой единственное из изученных препаратов соединение на полимерной основе, содержащее наноструктурированное золото [3, 4].

Показано, что аурумакрил проявляет значительную противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) *in vivo*, а также обладает цитотоксической эффективностью в отношении клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) *in vitro* [5–9].

Принципиальные отличия в физико-химической структуре аурумакрила от других широко исследуемых металлокомплексов дают основания полагать, что, возможно, мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила иные, чем у ряда известных лекарственных средств, в частности, таких как цисплатина. Экспериментальным подтверждением такого рода соображений могут служить полученные нами данные об отсутствии перекрестной резистентности между аурумакрилом и цисплатиной [10].

Согласно существующим представлениям золотосодержащие соединения относят к потенциальным противоопухолевым агентам с мульти-таргетным механизмом действия, способным вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток, влиять на пролиферативные и окислительно-восстановительные процессы в опухоли, воздействуя на ДНК и антиоксидантные ферменты (тиоредоксин редуктаза) в опухолевых клетках [1, 2].

Ранее нами было установлено, что аурумакрил, обладая выраженным цитотоксическим эффектом, вызывает также значительные изменения в кинетике клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток. Воздействие аурумакрила приводило к накоплению клеток в фазе пролиферативного покоя G₀, снижению доли делящихся клеток и к утрате выжившими клетками репродуктивной способности [7].

Задача представленной работы состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом процессе гибели опухолевых клеток и в изучении влияния препарата на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследовавшийся препарат аурумакрил представляет собой неполную золотую

соль полиакриловой кислоты, содержащую 8 масс. % ионов металла, отвечает общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n(-CH_2CHCOO AuCl_3H-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 cm^{-1} . Субстанция препарата представляют собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде [3]. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл.

Культура клеток. Эксперименты проведены с использованием культуры клеток рецептор-положительной карциномы молочной железы человека MCF-7, полученной из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва).

Культирование клеток проводили в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% фосфатно-солевого буфера (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) путем термостатирования при 37°C в 5% CO₂ (CO₂-инкубатор MCO-18AC, Sanyo, Япония). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и пассировали с плотностью 200 клеток/см² в той же культуральной среде. Пассирование клеток проводили при достижении культурой 80–90% монослоя. Замену среды осуществляли каждые четверо суток.

Экспериментальное изучение аурумакрила проведено на клетках, находящихся в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~ 80%). Клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА с последующей инактивацией трипсина и отмывкой клеток в полной среде. Клетки пассировали в чашки Петри диаметром 35 мм, содержащие покровные стекла (SPL Lifesciences, Южная Корея). Действие аурумакрила в различных концентрациях (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) изучено при инкубации клеток с препаратом при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч, при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля [7].

Оценка цитотоксического эффекта. Исследование цитотоксичности аурумакрила в отношении клеток MCF-7 проведено в тесте с использованием 0.4%-го раствора трипанового синего, восприимчивость к которому характеризует жизнеспособность клеток.

Клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (рН 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспен-

зию. Затем в равных пропорциях смешивали раствор 0.4%-го трипанового синего и клеточной суспензии, смесь ресуспендировали и непосредственно после этого оценивали клеточную гибель путем подсчета окрашенных (погибших) клеток в камере Горяева при анализе 500 клеток для каждой точки [7].

Полученные данные представлены в виде кривых, характеризующих изменение доли погибших после воздействия аурумакрила клеток по отношению к контролю в зависимости от концентрации препарата.

Морфологический анализ клеток. Морфологические изменения клеток MCF-7 под влиянием аурумакрила фиксировали на микрофотоизображениях клеток, полученных с помощью инвертированного микроскопа CKX 41 SF (Olympus, Япония), оснащенного CCD камерой Infinity 3-1 и объективом 20× (Lumenera Corp., Канада).

Анализ апоптотической гибели клеток. Для определения пути гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аурумакрила использовали метод оценки доли апоптотических клеток среди всех погибших клеток с помощью ДНК-связывающего флуоресцентного красителя YO-PRO-1, который избирательно проникает через мембрану только апоптотических клеток.

Данный метод основан на представлениях о том, что в период апоптоза активируется рецептор P2X7 неселективного катионного канала P2X7R, управляемого аденозинтрифосфатом, что приводит к превращению этого канала в цитолитическую пору [11]. Некоторые красители, такие как флуоресцентный краситель YO-PRO-1, могут проникать внутрь этих пор, после чего клетки начинают флуоресцировать в зеленой области спектра, тогда как другие красители, такие как йодистый пропиций, не обладают этим свойством в данных условиях. Таким образом, YO-PRO-1 может служить ранним маркером апоптотической гибели клеток [12]. Добавление йодистого пропиция позволяет дифференцировано окрасить погибшие клетки, флуоресцирующие после окраски в красной области спектра. Через мембрану живых клеток эти красители не проникают.

Оценку доли клеток на ранней стадии апоптоза проводили с использованием коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 с флуоресцентными красителями YO-PRO-1 и йодистым пропицием (Invitrogen, США). Клетки окрашивали в соответствии с протоколом производителя.

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия аурумакрила) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА. Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли по 1 мкл раствора YO-PRO-1 и йодистого пропиция из упомянутого

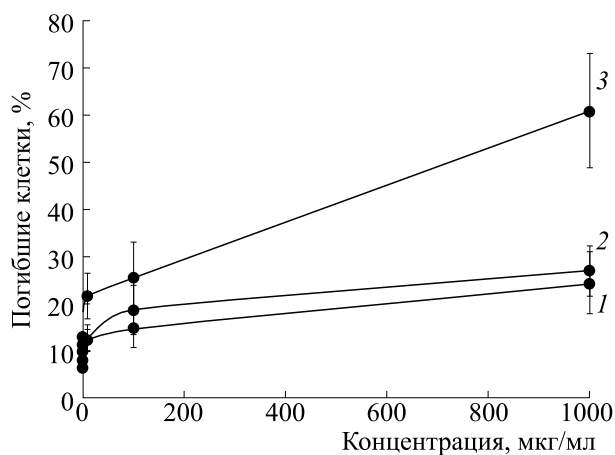


Рис. 1. Изменение доли погибших опухолевых клеток культуры MCF-7 в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила: 1 – инкубация 1 ч, 2 – инкубация 6 ч, 3 – инкубация 24 ч.

коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета апоптотических клеток. Подсчет клеток в апоптозе проводили с помощью люминесцентного микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) со следующими светофильтрами: В-2Е/С с излучением зеленой флуоресценции для YO-PRO-1 (возбуждение на 465–495 нм и эмиссия на 515–555 нм) и Y-2Е/С с испусканием красной флуоресценции для йодистого пропидия (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 300 клеток для каждой точки.

Анализ сшивок ДНК. Изучение влияния аурумакрила на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с использованием метода ДНК-комет в щелочных условиях.

Клетки инкубировали с аурумакилом в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (рН 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую 1×10^6 клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных полиакрилатом золота клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 75 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C. Затем в течение 1 ч клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: NaCl – 2.5 моль/л, трис-HCl – 20 ммоль/л, Na₂ЭДТА – 100 ммоль/л, ДМСО – 10%, Triton-X100 – 1%) и щелочной денатурации с последующим проведением электро-

фореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: NaOH – 100 ммоль/л, Na₂ЭДТА – 1 ммоль/л, рН 12.5; стабилизация по напряжению – 2 В/см; 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, рН 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых результатов \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжение исследования механизма действия аурумакрила в данной работе представлены результаты изучения влияния препарата на жизнеспособность и морфологию клеток карциномы молочной железы человека MCF-7, их апоптотическую гибель и структуру ДНК.

Цитотоксичность аурумакрила. Установлено, что аурумакил обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от времени воздействия препарата и его концентрации. Максимальный эффект – гибель 61% клеток – наблюдается через 24 ч после воздействия аурумакрила в концентрации 1000 мкг/мл (рис. 1)

Расчетная доза, летальная для 50% опухолевых клеток (IC_{50}), определенная в тесте с использованием красителя трипановый синий, составляет для аурумакрила 720 мкг/мл (58 мкг/мл в пересчете на содержание золота).

Следует отметить, что ранее при оценке цитотоксичности аурумакрила с помощью МТТ-теста было установлено, что коэффициент IC_{50} препарата составляет 125 мкг/мл (10 мкг/мл в пересчете на содержание золота) [12].

Можно полагать, что столь существенные отличия в показателях цитотоксического эффекта препарата отражают разницу в чувствительности примененных методов оценки гибели клеток, в основе которых лежит использование различных реагентов – трипанового синего и МТТ, и не оказывают принципиального влияния на оценку аурумакрила как высокоактивного цитотоксического агента.

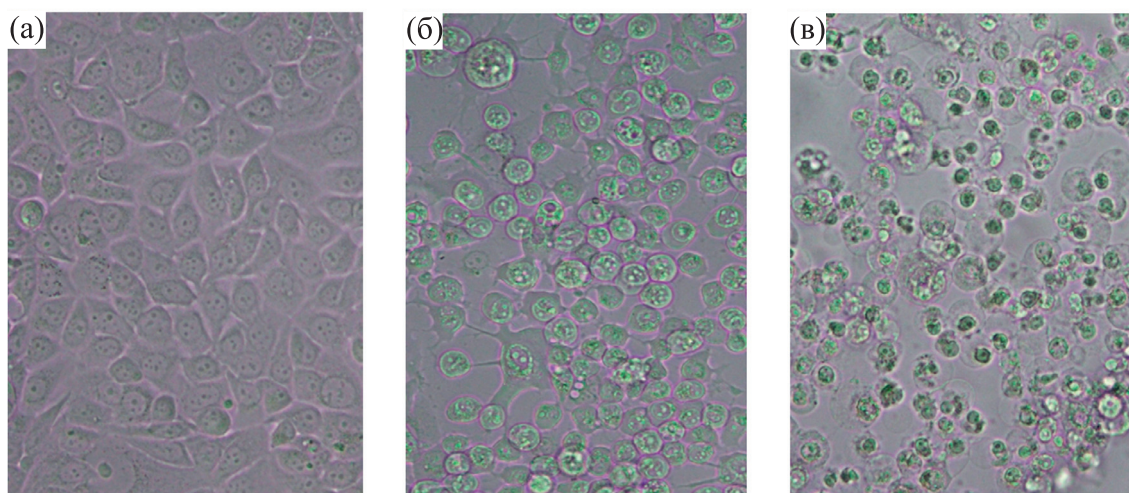


Рис. 2. Микрофотографии клеток MCF-7 после инкубации с аурумакрилом (1000 мкг/мл) в течение 1 ч (а), 6 ч (б) и 24 ч (в).

Влияние аурумакрила на морфологическую структуру клеток. Воздействие аурумакрила в концентрации 1000 мкг/мл вызывает изменения в морфологической структуре клеток MCF-7.

Как видно из представленных на рис. 2 микрофотографий, уже через 6 ч инкубации с препаратом клетки приобретают несвойственную им округлую форму (рис. 2б), а через 24 ч — сжимаются и уменьшаются в размерах (рис. 2в).

Механизм гибели клеток под влиянием аурумакрила. Изменения доли апоптотических клеток среди погибших клеток в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила характеризуют данные, представленные на рис. 3.

Как видно, при увеличении времени инкубации клеток с аурумакрилом с 1 до 24 ч наблюдается закономерное снижение доли апоптотических

клеток среди общего числа погибших клеток для всех изученных концентраций препарата. Наиболее значительное снижение доли апоптотических клеток отмечено при 24-часовой инкубации, при которой регистрировалась наибольшая гибель клеток.

Полученные данные позволяют предположить, что гибель клеток, индуцированная аурумакрилом, происходит не благодаря развитию апоптоза, а является следствием других процессов, возможно, связанных с нарушением митотического цикла клеток, о чем упоминалось ранее [7].

Известно, что одним из механизмов цитотоксичности наночастиц золота может быть блок клеточного цикла. В ряде исследований показано блокирование клеток в G_1 -фазе, накопление кле-

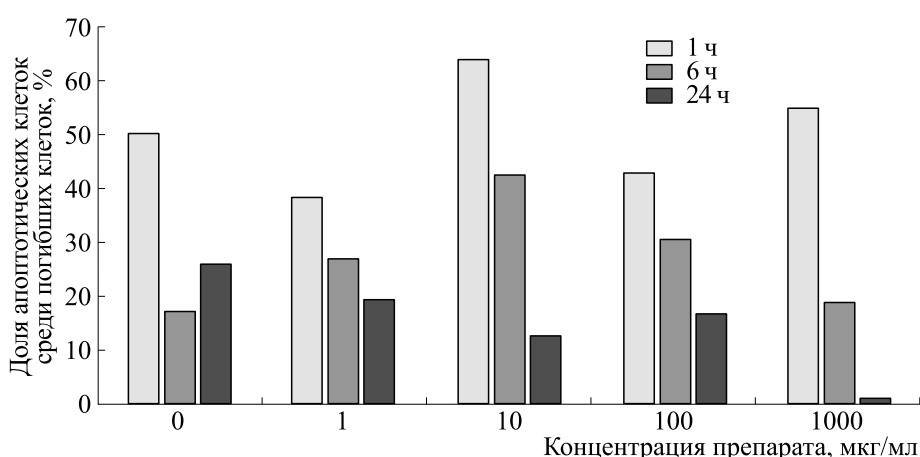


Рис. 3. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации и времени воздействия аурумакрила.

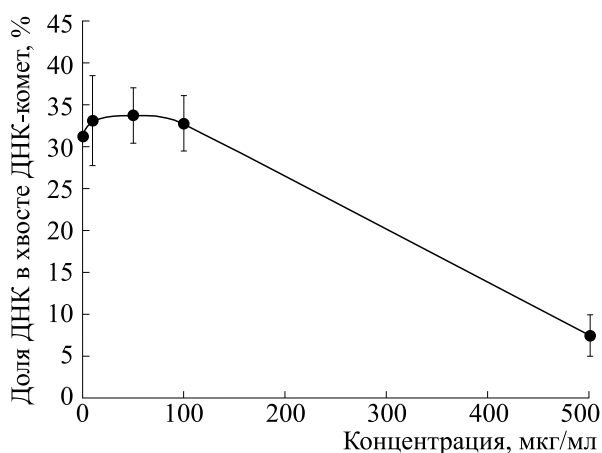


Рис. 4. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила.

ток в фазе G_0/G_1 и уменьшение содержания клеток в S- и G_2/M -фазах под влиянием золотосодержащих препаратов [1, 2].

Нами, в частности, было показано, что аурумакрил вызывает значительные изменения в клеточной кинетике опухоли. Так, доля «покоящихся» клеток через 24 ч инкубации с аурумакрилом возрастает с 40%, наблюдающихся в контроле, до 93%, регистрируемых на этот срок при воздействии препарата в дозе 1000 мкг/мл. Наряду с этим среди выживших клеток наблюдается уменьшение под влиянием аурумакрила доли делящихся клеток с 60%, регистрируемых в это время в контроле, до 7%, что было расценено как репродуктивная гибель клеток [7].

Индукция сшивок ДНК аурумакрилом. Известно, что при анализе структурных изменений ДНК методом ДНК-комет доля фрагментированной ДНК, мигрирующей во время электрофореза в ге-

ле агарозы к аноду и создающей так называемый «хвост» ДНК-комет, регистрируется путем оценки показателя электрофоретической подвижности ДНК.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, воздействие аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл приводит к снижению доли неповрежденной и фрагментированной ДНК в хвосте кометы. Доля ДНК в хвосте ДНК-комет под влиянием препарата снижается примерно в четыре раза — с 31.2%, регистрируемых в контрольном образце, до 7.4%, определяемых в клетках, подвергавшихся воздействию аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл (рис. 4). Соответственно возрастает доля «сшитой» ДНК, остающейся в голове ДНК-кометы и не мигрирующей к аноду.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии аурумакрила на структуру ДНК опухолевых клеток, выражающемся в индуцировании препаратом сшивок ДНК.

Морфологические изменения, происходящие с клетками MCF-7 под влиянием аурумакрила, наглядно иллюстрируют микрофотографии ДНК-комет (рис. 5).

В контроле отчетливо виден «хвост» ДНК-кометы, содержащий неповрежденную ДНК, выход которой составляет более 30% (рис. 5а), в то время как после воздействия аурумакрила наблюдается практически полное исчезновение «хвостов» ДНК-комет и сжимание, уменьшение в размерах ядер у основного количества клеток (рис. 5б).

Распределение клеток карциномы молочной железы MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет через 1 ч после инкубации с аурумакрилом (500 мкг/мл), показано на рис. 6.

Как видно, около 70% клеток карциномы молочной железы MCF-7 в контроле после проведе-

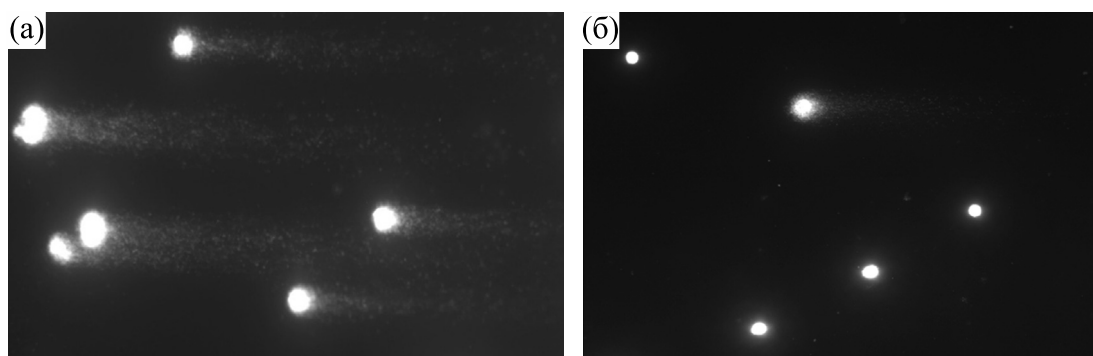


Рис. 5. Микрофотографии ДНК-комет клеток карциномы молочной железы MCF-7: (а) — контроль, (б) — аурумакрил (500 мкг/мл, инкубация 1 ч). Напряженность электрического поля 2.0 В/см.

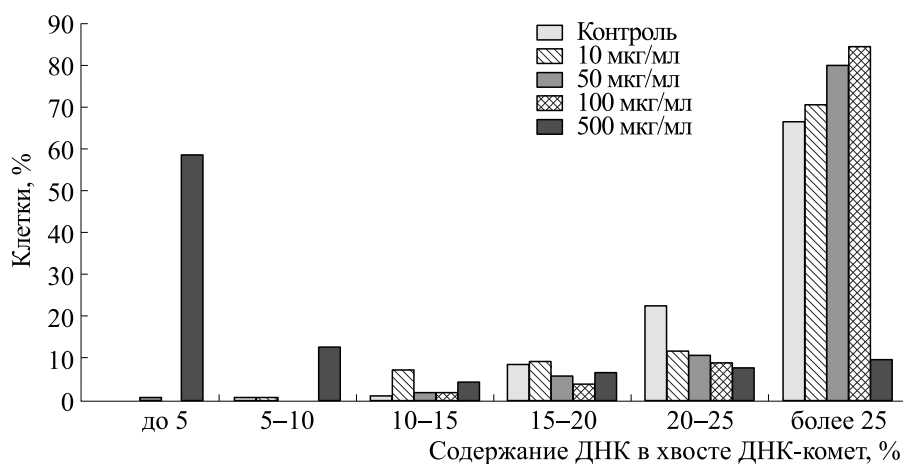


Рис. 6. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы MFC-7 в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет после воздействия аурумакрила в различных концентрациях (инкубация 1 ч).

ния электрофореза содержали более 25% ДНК в хвосте ДНК-комет.

Аналогичное распределение клеток в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет наблюдается для клеток, подвергавшихся в течение часа воздействию аурумакрила в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл.

Иное распределение клеток наблюдается при воздействии аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. Показано, что среди 60% проанализированных клеток менее 5% клеток содержали ДНК в хвосте ДНК-комет, что свидетельствует о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток (рис. 6).

Таким образом, в результате исследования влияния аурумакрила на клетки карциномы молочной железы MFC-7 человека установлено:

– аурумакрил, будучи активным цитотоксическим агентом, вызывает гибель клеток и изменение их морфологической структуры;

– апоптоз не является доминирующим механизмом в индуцированной аурумакрилом гибели клеток;

– молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией сшивок в молекуле ДНК.

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. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, **66** (12), 2333 (2017).
7. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Биофизика*, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
8. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
9. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
10. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (5), 951 (2022).
11. R. Kopp, A. Krautloher, A. Ramírez-Fernández, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 183 (2019).
12. S. Fujisawa, Y. Romin, A. Barlas, et al., *Cytotechnology*, **66**, 259 (2013).

Aurum Polyacrylate: Mechanism of Cytotoxic Action on Tumor Cells**A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, and D.B. Korman*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The role of aurum polyacrylate (aurumacryl)-induced apoptosis in tumor cells as well as the effect of this antitumor drug on the DNA structure of human breast carcinoma cells MCF-7 were studied. It was established that aurumacryl as an active cytotoxic agent can induce cell death, produce cellular morphological changes, and cause crosslinking in a DNA molecule. It was shown that apoptosis is not a dominant mechanism in aurumacryl-induced cell death.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), MCF-7 cell culture, cytotoxicity, apoptosis, DNA cross-linking

ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ И ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ В МОЗГЕ И В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ: ОСЬ «МОЗГ – КИШЕЧНИК»

© 2022 г. В.П. Реутов^{*,#}, Е.Г. Сорокина^{**,#}

^{*}Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутлерова, 5а, Москва, 117485, Россия

[#]E-mail: valentinreutov@mail.ru

^{**}Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Ломоносовский проспект, 2, Москва, 119991, Россия

^{##}E-mail: sorokelena@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 02.09.2022 г.

Принята к публикации 23.09.2022 г.

Мозг и желудочно-кишечный тракт являются важнейшими органами, отвечающими за обнаружение, передачу, интеграцию и реагирование на сигналы, поступающие из внутренней и внешней среды. Двухнаправленная система нейрогуморальной связи (ось «кишечник–мозг»), объединяет деятельность кишечника и мозга (или мозга и кишечника) человека. Она влияет на развитие и поведение человека. В работе проводится анализ данных литературы о существовании взаимосвязи между центральной и энтеральной нервными системами. На основе данных о количестве нейронов в энтеральной нервной системе (около 250 млн. нервных клеток) в зарубежной литературе была предложена концепция «второго мозга» в кишечнике, который по своему влиянию на головной мозг может оказывать более мощное влияние, чем спинной мозг (около 10 млн. нейронов) с его вегетативной нервной системой. Однако оказалось, что российские ученые – академики АН СССР И.П. Павлов, К.М. Быков и А.М. Уголев еще в XX веке анализировали кортико-висцеральные взаимоотношения и писали о существовании связи между центральной и энтеральной нервными системами. Одной из актуальных проблем современной физиологии, патофизиологии, биофизики, биохимии и медицины является выяснение причинной взаимосвязи между центральной и энтеральной нервными системами, а также между неврологическими, психическими и желудочно-кишечными заболеваниями с целью объединения усилий специалистов различного медико-биологического профиля для решения актуальных проблем медицины.

Ключевые слова: головной мозг, центральная и энтеральная нервные системы, воспалительные заболевания кишечника, оксидативный и нитрозативный стресс при воспалительных заболеваниях кишечника.

DOI: 10.31857/S0006302922060163, EDN: LKZIYS

*«Тайна взаимодействия между душой (psyche) и телом (soma) – это неисчерпаемый источник научного поиска, в котором интегрируются знания и усилия специалистов различного профиля для решения конкретных медико-биологических задач»
Академик РАН П.И. Сидоров*

Известна древняя латинская поговорка «Post hoc non ergo propter hoc». В переводе на русский язык означает: «После того – не значит вследствие того». Она предостерегает от распространенной ошибки – видеть причинно-следственную связь в тех обстоятельствах, которые ему предшествова-

ли. Причинно-следственная связь – это такая связь между явлениями, при которой одно явление, называемое *причиной*, при наличии определенных условий может породить другое явление, называемое *следствием*. Для установления причинно-следственной связи необходимо выяс-

Сокращения: ЭНС – энтеральная нервная система, ЖКТ желудочно-кишечный тракт, ЦНС – центральная нервная система, СРК – синдром раздраженного кишечника, ВЗК – воспалительные заболевания кишечника.

нить: а) главную причину явления; б) найти следствие, вытекающее из причины; в) проанализировать причину и следствие в отдельности; г) обосновать гипотезу взаимосвязи причины и следствия; д) не допускать смешения *корреляционной связи* и *причинно-следственной*. Корреляционная связь — это статистическая взаимосвязь двух или более случайных величин. При этом изменения значений одной или нескольких из этих величин сопутствуют систематическому изменению значений другой или других величин. Количественная оценка корреляционной связи (коэффициент корреляции) — это количественная мера силы и направления вероятностной взаимосвязи двух переменных, которая может изменяться от -1 до $+1$. Все вышесказанное было учтено, прежде чем появилось название, в котором причинно-следственная связь была вынесена на первое место. Прежде всего, мы имеем в виду те многочисленные статьи, которые появились в XXI веке, указывающие на существование так называемой оси «мозг—кишечник» или «кишечник—мозг» [1–9]. Авторы этих статей всегда выделяли анализируемый ими объект на первое место. Это обусловлено обстоятельством, при котором исследователь всегда очерчивает определенные границы, исходя из цели и задачи исследования, а потом переводит эту сложную реальность в ту или иную схему. Учитывая тот факт, что публикации, выявившие причинно-следственную связь между головным мозгом и желудочно-кишечным трактом, были опубликованы в самых престижных журналах, например, «Nature Review» [1, 2], «Science» [9] и в других журналах, входящих в первый и второй квартиль [3–8, 10–12], нам представляется необходимым проанализировать и обобщить данные, появившиеся в последние десятилетия XXI века [13–30].

Мозг и желудочно-кишечный тракт являются важнейшими органами чувств, отвечающими за обнаружение, передачу, интеграцию и реагирование на сигналы, поступающие из внутренней и внешней среды [2–11]. Установлено, что двусторонняя система нейрогуморальной связи (ось «кишечник—мозг»), объединяет деятельность кишечника и мозга (или мозга и кишечника) человека. Она влияет на развитие и поведение человека [3–13]. Кишечник посылает сигналы в мозг через спинальные и блуждающие висцеральные афферентные пути и получает симпатические и парасимпатические входы через вагус — блуждающий нерв (лат. *nervus vagus*) — десятую пару, так называемых черепных нервов (X-пара), которая идет от мозга к брюшной полости, содержит двигательные, чувствительные и вегетативные (парасимпатические) нервные волокна [1–8]. Что же представляет собой энтеральная нервная система?

Энтеральная нервная система (ЭНС) представляет собой разветвленную сеть, состоящую из 200–250 млн нейронов и глиальных клеток, содержащихся в стенке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Структура и нейрохимия ЭНС накладывают центральную нервную систему (ЦНС). В связи с этим механизмы, влияющие на деятельность ЦНС или вызывающие расстройства ЦНС, могут приводить к дисфункции ЭНС, а нервы, соединяющие ЭНС и ЦНС, могут быть каналами распространения болезни [9–11]. Основные функции ЭНС, которые наиболее изучены, включают, прежде всего, регуляцию местной перистальтики кишечника, секреции и кровотока. Другие области, которым уделяется повышенное внимание, включают его взаимодействие с иммунной системой, микробиотой кишечника и его участие в оси «кишечник—мозг», а также нейроэпителиальные взаимодействия. Таким образом, ось «мозг—кишечник» (или «кишечник—мозг») играет центральную роль в кишечном гомеостазе, и это становится особенно очевидным, когда в системе проведения сигналов имеются изменения, например, при нарушениях развития нервной системы или нейродегенеративных расстройствах [9, 10]. Энтеральная нервная система — большая и сложная. Она обладает уникальной способностью управлять поведением желудочно-кишечного тракта независимо от ЦНС. Интактная ЭНС необходима для жизни, а дисфункция ЭНС часто связана с расстройствами пищеварения. Роль ЭНС в неврологических расстройствах становится все более очевидной. Как указывалось выше, структура и нейрохимия ЭНС сходна со структурой и нейрохимией в ЦНС, поэтому патогенные механизмы, вызывающие расстройства ЦНС, могут также приводить к дисфункции ЭНС [11].

ВТОРОЙ МОЗГ НАХОДИТСЯ В КИШЕЧНИКЕ?

Важную роль в развитии представлений о существовании оси «мозг—кишечник» сыграли исследования группы ученых в Колумбийском университете США под руководством заведующего кафедрой анатомии и клеточной биологии Колумбийского университета Майкла Гершона (Michael Gershon) (рис. 1), автора книги «Второй мозг» (рис. 2).

Его идеи и развиваемые представления становятся все более популярными. Еще несколько лет назад заявление М. Гершона, что второй мозг находится в животе, казались фантастическими. В своих выступлениях он говорил: человеку даны две ноги, две руки и два мозга, один из которых пульсирует в черепной коробке, а другой находится и активно работает в кишечнике. Многим ученым это казалось невероятным. Однако Гер-



Рис. 1. Майкл Гершон (Michael Gershon) — заведующий кафедрой анатомии и клеточной биологии Колумбийского университета.

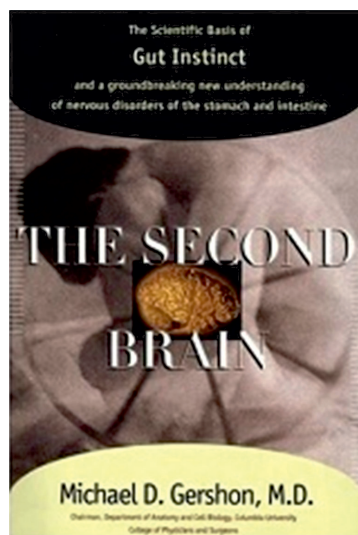


Рис. 2. Книга Майкла Герсона «Второй мозг».

шону и его коллегам удалось доказать, что нервная система ЖКТ — это на порядок более сложный механизм взаимодействия нервных окончаний, тканей и узлов, нежели считалось ранее [11].

Нейроны пищеварительного тракта вырабатывают значительную часть нейромедиаторов. Установлено, что нарушение деятельности ЖКТ может приводить к дефициту серотонина [12, 13]. Серотонин регулирует развитие и долгосрочные функции ЦНС и ЭНС. Нарушение в продукции нейронами серотонина могут приводить к дисфункции головного мозга и кишечника [13]. Быстрый рост эпидемии психосоматозов, составляющих от 20 до 60% в общей медицине, заставляет искать новые подходы к анализу патогенеза дисфункций головного мозга и кишечника, а также к течению, лечению и профилактике этих состояний [12, 13].

Многие западные ученые считают, что в XX веке именно с этих позиций никто и не думал изучать взаимосвязь ЦНС и ЭНС. Однако, начав изучать ее, ученые были очень сильно удивлены тому, что «второй мозг» имеет такое большое количество нейронов: от 100 до 250 миллионов нейронов (по разным оценкам). Для сравнения: по современным представлениям мозг взрослого человека содержит 86 ± 8 млрд нейронов и примерно такое же количество (85 ± 10 млрд) других нервных клеток. Спинной мозг, обеспечивающий связи головного мозга с периферией и осуществляющий сегментарную рефлекторную деятельность, содержит около 10 млн нервных клеток. Некоторые ученые полагают, что энтеральная нервная система устроена гораздо сложнее, чем спинной мозг. Она передает сигнал го-

ловному мозгу, который посылает ответный импульс. Нервная система пищеварительного тракта отвечает за настроение и при правильной стимуляции может способствовать значительному снижению депрессии, а также быть одним из факторов в лечении эпилепсии. Некоторые болезни желудочно-кишечного тракта (например, синдром раздраженного кишечника (СРК), воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) или гастрит) можно будет лечить, учитывая влияние некоторых нейромедиаторов (например, серотонина). Таким образом, «второй мозг», расположенный в кишечнике, вмещает эквивалент мозга небольшого животного, такого как кошка (около 250 млн. нервных клеток), деятельность которого уже невозможно игнорировать в настоящее время. Конечно, речь идет не о мыслительных способностях «второго мозга», но о не менее значимых функциях мозга — гормональной деятельности. «Второй мозг» призван обеспечить реализацию базовых эмоций. Он определяет ритм сна и бодрствования, а также эмоции, определяющие гнев, восторг и радость (рис. 3).

Современные методы нейровизуализации, такие как структурная и функциональная магнитно-резонансная томография и методы неинвазивной стимуляции мозга, такие как транскраниальная магнитная стимуляция, все чаще используются в исследованиях неврологических расстройств [14–17]. Во время эксперимента ученые стимулировали желудок здоровым людям, и тем, кто страдает заболеваниями пищеварительной системы и одновременно исследовали функциональную магнитно-резонансную томографию головного мозга. Оказалось, что в головном

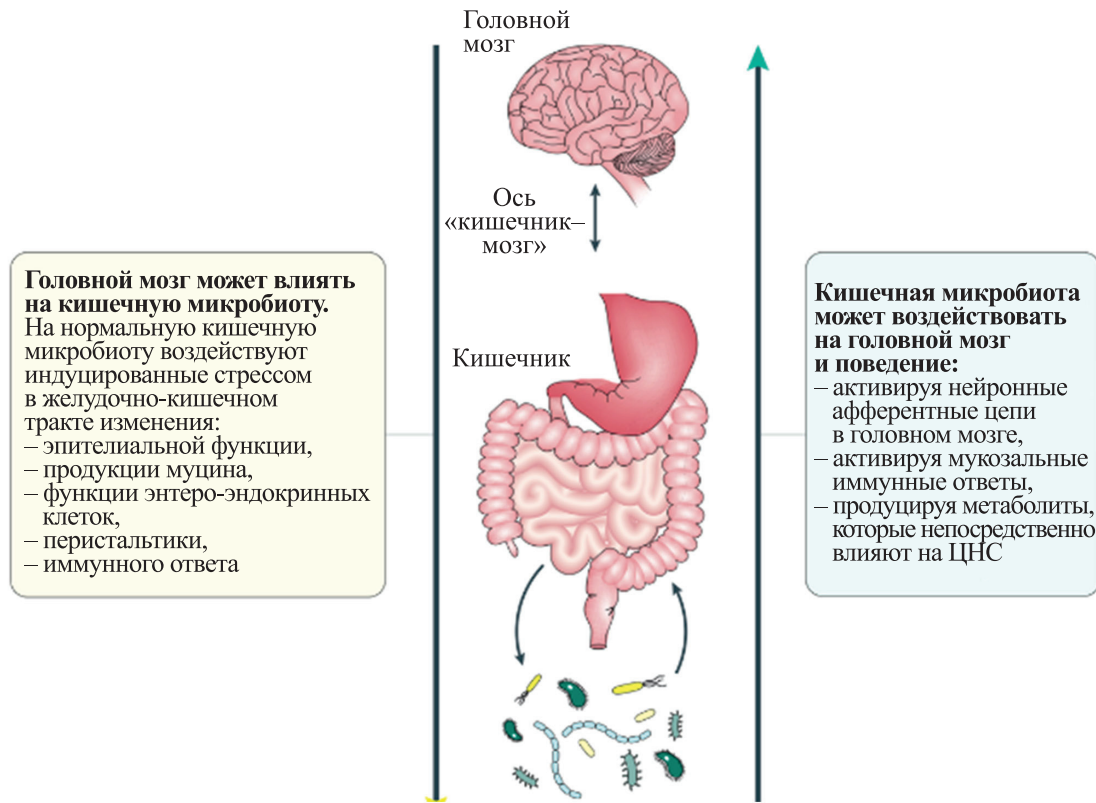


Рис. 3. Взаимодействие между головным мозгом и кишечником: ось «мозг–кишечник» (<https://medach.pro>).

мозге на это раздражение реагируют разные зоны: у первых – зоны, отвечающие за удовольствие, а у вторых – за дискомфорт [14, 15]. Измененная interoception, то есть то, как мозг обрабатывает афферентные сигналы от тела, может способствовать желанию принять наркотики (например, чтобы избавиться от боли), а впоследствии и развитию зависимости от них [16].

По мнению М. Герсона стенки желудка и других пищеварительных органов покрыты сетью нейронов, общее число которых не менее 100 миллионов. Маленький мозг в нашем животе взаимодействует с главным – головным, в значительной степени определяет наше настроение и играет ключевую роль в возникновении некоторых заболеваний [13]. Однако необходимо отметить, что русский ученый, физиолог, создатель науки о высшей нервной деятельности и формировании рефлекторных дуг, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1904) Иван Петрович Павлов (1849–1936) (рис. 4) получил эту награду за работу «по физиологии пищеварения».

Российский и советский физиолог академик АН СССР (1946) и АМН СССР (1944), заслуженный деятель науки РСФСР (1940) генерал-лейтенант медицинской службы Константин Ми-

хайлович Быков (1886–1959), проводивший исследования влияния коры головного мозга на внутренние органы до печально известной совместной сессии АН СССР и АМН СССР («Павловской сессии» 1950) был не только учеником И.П. Павлова, известным физиологом, но и «культурнейшим и обаятельнейшим человеком» (академик АМН СССР А.Л. Мясников).

Его книга о кортико-висцеральных взаимоотношениях в физиологии и патологии («Кора мозга и внутренние органы» [31]) получила всеобщий резонанс среди физиологов. Кортико-висцеральные отношения (от лат. cortex — кора и viscera — внутренности), естественное функциональное взаимодействие между корой больших полушарий головного мозга и внутренними органами. После главного доклада К.М. Быкова на печально известной «Павловской сессии» (1950), несмотря на многочисленные ордена, медали, премии, а также высокую должность директора Института физиологии АН СССР, его труды стали забывать. Эта история трудная, сложная. На протяжении всего периода нашей работы мы старались сохранить преемственную связь между учеными разных поколений, рассказывая об их достижениях так, как бы мы рассказывали о своих родителях, которые дали нам жизнь [32]. При этом мы старались не забывать, что в тех услови-

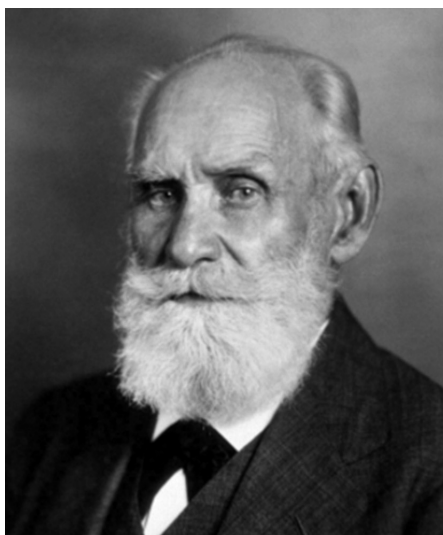


Рис. 4. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1904) Иван Петрович Павлов (1849–1936).



Рис. 5. Один из учеников и последователь И.П. Павлова, академик АН СССР и АМН СССР Константин Михайлович Быков (1886–1959).

ях, когда наука и культура находились под практически полным контролем И.В. Сталина, судьба генетики, физиологии и кибернетики также зависела от политических взглядов и пристрастий лидера страны.

Академик АН СССР по Отделению физиологии (1984) Александр Михайлович Уголев (1926–1991) (рис. 6), впервые открывший пристеночное пищеварение [32], в последние годы жизни (1985/1987–1991) на общественных началах возглавлял лабораторию физиологии безусловных



Рис. 6. Академик АН СССР Александр Михайлович Уголев (1926–1991).

реакций в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН.

Работа А.М. Уголева «Пристеночное (контактное) мембранное пищеварение» была признана как научное открытие и внесена в Государственный реестр открытий СССР под № 15. Формула открытия: «Обнаружено, что у высших животных помимо ранее известных типов пищеварения (полостного и внутриклеточного) существует пищеварение на внешней поверхности кишечных клеток – пристеночное (контактное) пищеварение. Последнее (контактное пищеварение) осуществляется под влиянием ферментов, адсорбированных из химуса, и собственно кишечных, фиксированных на внешней поверхности кишечного эпителия в щеточной кайме, образованной микроворсинками. Пристеночное пищеварение занимает промежуточное положение между полостным пищеварением и всасыванием и характеризуется рядом особенностей по сравнению с ранее известными типами пищеварения. Благодаря пристеночному пищеварению осуществляются заключительные стадии расщепления белков, углеводов и т.д. Создаются чрезвычайно благоприятные условия для всасывания и стерильности заключительных стадий расщепления пищевых веществ». Автор: А.М. Уголев; номер и дата приоритета: № 15, декабрь 1958 г.

За свои работы и особенно за развитие *теории адекватного питания* (1991) А.М. Уголев был награжден золотой медалью им. И.И. Мечникова (1990). Открытие им пристеночного пищеварения – одно из крупнейших достижений мировой физиологии XX века. В отличие от полостного пищеварения, которое происходит в полости же-

лудочно-кишечного тракта под влиянием пищеварительных соков, пристеночное пищеварение начинается при контакте пищевых веществ с поверхностью кишечного эпителия в порах щеточной каймы. Благодаря пристеночному пищеварению осуществляются заключительные стадии расщепления пищевых веществ, создаются благоприятные условия непрерывного перехода от пищеварения к всасыванию. Открытие № 15 и созданная на его основе теория адекватного питания проливает свет на закономерности переработки и всасывания пищевых веществ одноклеточными, многоклеточными и высшими животными.

А.М. Уголевым было выяснено, что ЖКТ является эндокринным органом, более мощным, чем все эндокринные органы, вместе взятые. Удаление даже части эндокринной системы ЖКТ приводит к тяжелым заболеваниям, а иногда и к гибели животного. Возникающая патология касается общих, а не только пищеварительных функций организма. Например, после удаления двенадцатиперстной кишки наблюдаются выраженные структурные изменения таких эндокринных органов, как щитовидная железа, кора надпочечников, гипофиз, гипоталамус. Кого же на самом деле можно считать первооткрывателями *причинно-следственной связи между мозгом и кишечником?* Учитывая тот факт, что эндокринные клетки ЖКТ вырабатывают более 30 гормонов и гормоноподобных соединений, действующих не только на пищеварительную систему, но и далеко за ее пределами, становится неудивительным, что на самом деле И.П. Павлова, К.М. Быкова и А.М. Уголева, наряду с современными зарубежными учеными [1–35], можно отнести к первооткрывателям *причинно-следственной связи между мозгом и кишечником.*

Специалист в области физиологии, психиатрии и биологии университета Калифорнии Эмерман Мейер [35] и его коллеги считают, что задачи неврологии и психиатрии на ближайшее будущее – научиться корректировать психосоматические реакции, учитывая нервную деятельность не только головного, но и второго мозга человека, расположенного в ЖКТ [18–21, 35]. Может ли микрофлора ЖКТ влиять на эмоции и поступки человека? Триллионы микроорганизмов, обитающих в кишечнике, используя нейромедиаторы и другие соединения, участвуют во внутри- и межклеточной сигнализации, находятся в постоянной связи друг с другом и с головным мозгом. Общее состояние человека и даже принятие им жизненных решений во многом зависит от взаимосвязи/взаимодействия между мозгом и ЖКТ. Сбои в этом взаимодействии ведут к развитию депрессии, аутизму, деменции, болезни Паркинсона, а также влияют на желудочно-кишечные заболевания, включая болезнь Крона, СРК и

другие воспалительные заболевания кишечника [35].

Комментируя последние работы, описывающие причинно-следственные отношения между физиологическими и патологическими процессами в мозге и в ЖКТ, академик Наталья Петровна Бехтерева (1924–2008) однажды отметила: «повидимому «первый» и «второй» мозг заняты решением разных задач тела и души... В кишечнике образуется множество пептидных, белковых форм, которые имеют прямое отношение к деятельности головного мозга. Плохая работа желудка и кишечника вызывает депрессию, что известно всем язвенникам. Может быть, из внутренних органов кишечника более всего связан с головным мозгом. Болезни Альцгеймера и Паркинсона укладываются в пептидные представления. Гипотезу о существовании не отдельных нервных клеток, а нейронных сетей в брюшной полости надо внимательно проверить» [33].

БОЛЕЗНЬ КРОНА, ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ, СИНДРОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА И ДРУГИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА

Термин «воспалительное заболевание кишечника» относится в основном к двум основным категориям хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний кишечника: болезни Крона и язвенному колиту. В мире 5 млн. человек страдают ВЗК. В США в настоящее время подсчитано, что около 1.5 млн. человек имеют все признаки ВЗК, которые, причиняя значительные страдания пациентам, увеличивают смертность и экономический ущерб. Известно, что в настоящее время патология неизлечима. Однако при своевременной диагностике ее развитие можно замедлить.

По данным ряда исследований распространенность ВЗК в России в среднем колеблется от 3.7 до 20.4 нового случая на 100 тыс. населения. По данным Минздрава РФ рост заболеваемости язвенным колитом с 2012 по 2015 гг. составил 31.7%, а болезни Крона – 20.4%. Клинические работы, описывающие варианты течения ВЗК в России, единичны. Смертность от гастроэнтерологических причин в России по сравнению со странами ЕС (с 1990 по 2010) представлена на рис. 7. Эти заболевания занимают третье место после сердечно-сосудистых и онкологических болезней, где Россия, Украина и Китай лидируют по числу смертей на 100 тыс. населения. Минздрав России отметил: уровень смертности россиян от болезней органов пищеварения составил в 2017 г. 63.3 на 100 тыс. населения. Этот показатель на 28.1% выше, чем число умерших пациентов в 2012 г., – 49.4 на 100 тыс. населения. Всего от

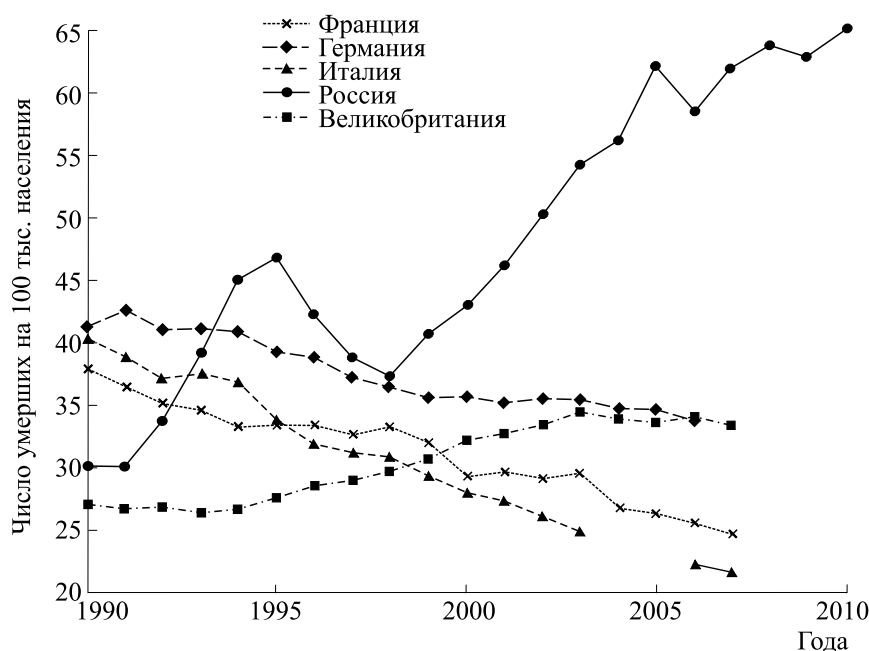


Рис. 7. Смертность от заболеваний органов пищеварения на 100 тыс. населения в России по сравнению со странами ЕС (с 1990 по 2010 гг.). Представленные данные не включают онкологические заболевания ЖКТ.

болезней органов пищеварения в 2017 г. умерло 92989 человек (в 2012 г. — 70793 человека). Актуальность этих медико-биологических исследований с учетом демографической ситуации в России особенно возрастает.

Известно, что болезнь Крона и язвенный колит постепенно разрушают стенки кишечника. Это катастрофически ухудшает качество жизни больных и грозит им опасными осложнениями. Тем не менее, причина ВЗК неизвестна, и пока ученые и врачи не поймут больше о механизмах, лежащих в основе развития ВЗК, профилактика или лечение будут невозможны [23, 24].

Болезнь Крона. Это заболевание называют одним из самых загадочных. Болезнь названа по имени американского гастроэнтеролога Баррила Бернарда Крона (1884–1983), который в 1932 г. вместе с двумя коллегами по нью-йоркской больнице Маунт-Синай — Леоном Гинзбургом (1898–1988) и Гордоном Оппенгеймером (1900–1974) — опубликовали первое описание 18 случаев неизвестного в то время заболевания. До настоящего времени точная причина болезни Крона остается неизвестной. Ключевые признаки для диагностики болезни Крона включают в себя комбинацию рентгенологических, эндоскопических и патологических данных, демонстрирующих очаговые,

Таблица 1. Ожидаемая продолжительность жизни в возрасте 65 лет в некоторых странах в 1965 и 2015 гг

	Мужчины			Женщины		
	1965	2015	Прирост	1965	2015	Прирост
Россия	12.7	13.4	0.7	16.3	17.7	1.4
Германия	12.2	17.9	5.7	14.8	21.0	6.2
Испания	13.2	19.0	5.8	15.8	23.0	7.2
Италия	12.9	18.9	6.0	15.1	22.2	7.1
Нидерланды	13.9	18.4	4.5	16.1	21.1	5.0
Норвегия	14.2	18.9	4.7	16.4	21.6	5.2
Франция	12.6	19.4	6.8	16.1	23.5	7.4
Швеция	13.9	18.9	5.0	16.0	21.5	5.5
Япония	11.9	19.3	7.4	14.6	24.2	9.6

Примечание. Источники — Росстат и Евростат, 2016.

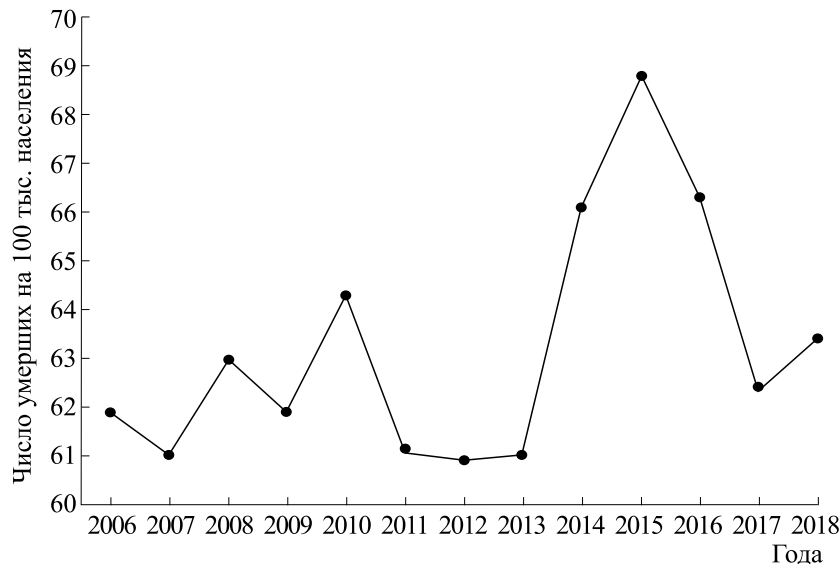


Рис. 8. Число умерших от болезней органов пищеварения в расчете на 100 тыс. населения (оперативные данные) (<https://gastroscan.livejournal.com/736500.html>).

асимметричные, трансмуральные или гранулематозные признаки. Абдоминальная компьютерная томография и энтерография являются наиболее предпочтительным рентгенологическим исследованием первой линии, используемым для оценки болезни Крона тонкой кишки. Диагностическая точность магнитно-резонансной энтерографии/энтероклизиса аналогична компьютерной томографии, а также предотвращает воздействие ионизирующего излучения на организм. Эндоскопические показатели считаются золотым стандартом для измерения активности болезни Крона, и они чаще используются в клинических испытаниях для измерения эффективности различных препаратов в отношении индукции и поддержания заживления слизистой оболочки. Наиболее распространенные системы оценки, используемые для измерения клинической активности заболевания, включают индекс активности болезни Крона (CAI), HBI-индекс Харви–Брэдшоу (HBI), краткий опросник по воспалительным заболеваниям кишечника (SIBDQ) [25–29].

Индекс активности болезни Крона — это исследовательский инструмент, используемый для количественной оценки симптомов пациентов с болезнью Крона. Он имеет значение в исследованиях лекарств, используемых для лечения болезни Крона; большинство крупных исследований новых лекарств используют CAI для определения ответа или ремиссии заболевания.

Индекс Харви-Брэдшоу был разработан в 1980 г. как более простая версия CAI для целей сбора

данных. Он состоит только из клинических параметров: общее самочувствие (0 = очень хорошо, 1 = чуть ниже среднего, 2 = плохо, 3 = очень плохо, 4 = ужасно); боль в животе (0 = нет, 1 = легкая, ...).

Краткий опросник воспалительных заболеваний кишечника является широко используемым инструментом для оценки качества жизни, связанного со здоровьем у пациентов с ВЗК [25–29]. Лечение болезни Крона рассматривается как развивающаяся проблема из-за ее широко гетерогенных проявлений, совпадения характеристик с другими воспалительными заболеваниями, часто неуловимых внекишечных проявлений и неопределенной этиологии. Среди причин называют *генетические, инфекционные, иммунологические* факторы [36–45].

Наследственные факторы. Выявлена повышенная частота мутации гена *CARD15* (ген *NOD2*). Ген *CARD15* кодирует белок, содержащий домен активации каспазы (caspase recruitment domain-containing protein 15) [40–42]. Некоторые генетические варианты *CARD15* влияют на аминокислотные последовательности в лейцин-обогащенных повторах или в соседних областях белка. Благодаря наличию лейцин-обогащенных повторов белок *CARD15* активизирует ядерный транскрипционный фактор NF-κB [43–45]. Последний представляет собой универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов *иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла*. Нарушение регуляции NF-κB вызывает

воспаление, аутоиммунные заболевания, а также развитие вирусных инфекций [40–45].

Лейцин-обогащенные повторы также действуют как внутриклеточные рецепторы для компонентов болезнетворных микробов. Обычно выделяют четыре варианта (Arg702Trp, Gly908Arg, Ins3020C, IVS8+158), связанных с повышенным риском болезни Крона. Судя по выборкам в европейских популяциях, каждый из этих вариантов встречается не более чем у 5 % населения. Однако к настоящему времени известно не менее 34 вариантов генов, ответственных за проявление болезни Крона. Некоторые ученые и врачи считают, что, по крайней мере, 25 из этих 34 вариантов непосредственно связаны с болезнью Крона.

Инфекционные факторы. В настоящее время их роль не подтверждена. Однако введение смывов кишечника лабораторным животным (крысам) иногда позволяет вызвать болезнь Крона у последних. Высказывались предположения о вирусной или бактериальной природе. Однако на данный момент времени они не являются доказанными [46–48].

Иммунологические факторы: системное поражение органов при болезни Крона наталкивает на аутоиммунную природу заболевания [49–51]. У пациентов обнаруживают патологически высокое число Т-лимфоцитов, ответственных за первую линию обороны в борьбе с инфекционными факторами; антитела к кишечной палочке – вид грамотрицательных палочковидных бактерий, широко распространенных в нижней части кишечника теплокровных животных; белку коровьего молока; липополисахаридам, активирующим оксидативный и нитрозативный стрессы. Из крови больных в периоды обострений выделены иммунные комплексы, образующиеся при реакции связывания антител с антигенами как результат иммунного ответа на чужеродные антигены. Существуют нарушения клеточного и гуморального иммунитета. Однако, скорее всего, они носят вторичный характер. Один из возможных механизмов нарушений — это наличие какого-то специфического антигена в просвете кишки/крови больных, приводящего к активации Т-лимфоцитов, клеточных макрофагов, — к выработке антител, цитокинов, простагландинов, активных форм азота и активных форм кислорода, которые активируют оксидативный и нитрозативный стресс и вызывают образование диоксида азота (NO₂), ОН-радикалов и пероксинитритов, способных вызывать различные повреждения клеток и тканей [52–54]. Эксклюзивное энтеральное питание является обыч-

ным способом в лечении активной стадии болезни Крона [55, 56].

Язвенный колит. Язвенным колитом называют хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки толстого кишечника, возникающее в результате нарушений/дисбаланса иммунной системы, в результате которого выделяются антитела к собственному эпителию слизистой оболочки. Пик заболеваемости приходится на ранний взрослый возраст, но у пациентов заболевание может развиваться с раннего детства до зрелого возраста. Анемия и повышенная скорость оседания эритроцитов или уровень С-реактивного белка могут свидетельствовать о воспалительном заболевании кишечника, но отсутствие лабораторных отклонений не исключает язвенный колит. Диагноз подозревается клинически и подтверждается эндоскопической биопсией. Пациенты с язвенным колитом имеют повышенный риск развития рака толстой кишки и должны проходить периодическую колоноскопию. Уровень заболеваемости: примерно 3–5 случаев на 100 тыс. населения. Язвенный колит может обостряться без явной причины. Однако чаще всего это происходит под воздействием стресса, неправильного питания, и, при лечении некоторыми лекарствами. До настоящего времени точная причина активации выработки антител остается неизвестной [57, 58].

Синдром раздраженного кишечника. Знания о патофизиологии СРК развивались, начиная с нарушений моторики и заканчивая висцеральной гиперчувствительностью и, в конечном счете, изменениями в двунаправленной связи между мозгом и кишечником, где ключевую роль играют нейротрансмиттеры, такие как серотонин. Недавно была предложена многокомпонентная модель заболевания, которая объединяет все эти изменения. Эта модель разделена на физиологические, когнитивные, эмоциональные и поведенческие компоненты, которые объясняют как желудочно-кишечные, так и конституциональные симптомы. В последние годы произошел взрыв исследований вместе с новыми разработками в области фармакологического лечения СРК, которые поддерживают каждый компонент этой модели [59, 60].

Многочисленные исследования продемонстрировали способность пероральных иммуноглобулинов улучшать прибавку в весе, поддерживать барьерную функцию кишечника и уменьшать тяжесть энтеропатии у животных. Совсем недавно исследования на людях предоставили доказательства того, что полученный из сыворотки бычий иммуноглобулин/белковый изолят без-

опасен и улучшает пищевой статус и желудочно-кишечные симптомы у пациентов с энтеропатией, связанной с синдромом раздраженного кишечника [61]. Имеются работы, авторы которых обобщили исследования, демонстрирующие влияние энтеропатии на статус питания и то, как специально разработанные иммуноглобулины крупного рогатого скота могут помочь восстановить гомеостаз кишечника и статус питания у пациентов с определенными энтеропатиями. Такие белковые препараты могут обеспечить определенную пищевую поддержку, необходимую для диетического управления пациентами, которые из-за терапевтических или хронических медицинских потребностей имеют ограниченную или нарушенную способность переваривать, всасывать или метаболизировать обычные продукты питания или определенные питательные вещества, или другие особые потребности в питательных веществах [61].

ПСИХИЧЕСКИЕ И СОМАТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ: КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Взаимодействие между «душой» и «телом», между психическими и соматическими факторами в болезни было известно еще врачам античности. Эти аспекты рассматривал Демокрит (V в. до н.э.). Он полагал, что «душа» часто может служить причиной болезней и других бедствий «тела». Платон (IV в. до н.э.) был убежден, что сумасшествие (мания) у многих людей возникает в силу соматического недуга [22]. Сохранившиеся сведения в истории медицины позволяют считать первым «психосоматиком» М. Цицерона (I в. до н.э.). Он высказывал аргументированные суждения по поводу воздействия горя, сильных душевных волнений и переживаний на здоровье человека и описал возникновение телесных болезней от душевных страданий. Еще 2400 лет назад Сократ (ок. 469–399 г. до н.э.) утверждал, что не существует телесной болезни, отделенной от болезни душевной, а Платон, его знаменитый ученик, сетовал: «Большая ошибка совершается там, где телесные и душевные болезни лечат разные врачи» [22, 30].

В Новое время (после 1600 г.) были совершены открытия, которые позволили перейти от умозрительных построений к конкретным экспериментальным и клиническим данным. Клетка, как известно, была впервые обнаружена с помощью микроскопа Робертом Гуком в 1665 г. [62]. Первая клеточная теория была создана Теодором Шванном и Маттиасом Шлейденем в 1830-х годах [62–64]. Клеточная патология и теория медицины, основанные на учении Р. Вирхова о клетке как материальном субстрате болезни, были сформули-

рованы Рудольфом Вирховым в 1855–1858 гг. [64–69]. Наличие мембран вокруг живых клеток было установлено в работах немецкого ботаника К.В. Негели в 1855 г. Он обнаружил, что неповрежденные клетки могут изменять свой объем при изменении осмотического давления окружающей среды.

Идеи о том, что основная единица всего живого — *клетка* — представляет собой структурно-функциональную элементарную единицу строения и жизнедеятельности всех организмов, постоянно эволюционировали [62, 68]. Клетка обладает собственным обменом веществ, способна к самовоспроизведению.

На протяжении всего времени врачи старались выявить *специфические изменения* клеток при развитии патологических процессов. В 1894 г. немецким ученым Р. Альтманом впервые были обнаружены субклеточные структуры, которые немецкий гистолог К. Бенда в 1898 г. назвал митохондриями [69–73]. Эндоплазматический ретикулум впервые был описан американским биологом К.Р. Портером в 1945 году. К середине XX века была создана симбиотическая теория происхождения митохондрий, согласно которой потомки определенных групп бактерий вступили в симбиоз с предками современных эукариот [72–78]. Согласно этой теории, в ходе эволюции бактерии-эндосимбионты превратились в полуавтономные биоэнергетические станции клеток, способные продуцировать АТФ и митохондриальный мембранный потенциал.

Митохондрии также сохранили способность автономно от клетки синтезировать некоторые белки и размножаться путем деления. Эндосимбиотическая гипотеза происхождения митохондрий и эндоплазматического ретикулума [72–78] и гипотеза о нитратно-нитритном дыхании [79–82] как предшественнике кислородного дыхания получили развитие и подтверждение в многочисленных работах [69–82].

ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА В СВЕТЕ РИМСКИХ КРИТЕРИЕВ IV ПЕРЕСМОТРА

Желудочно-кишечные симптомы широко распространены. Однако у многих людей, у которых они есть, нет органического объяснения их симптомам. Эти состояния затрагивают до 40% людей в любой момент времени, и у двух третей этих людей наблюдаются хронические, изменчивые симптомы. Патофизиология функциональных желудочно-кишечных расстройств сложна. Она включает двунаправленное нарушение регуляции взаимодействия кишечника и мозга (через ось

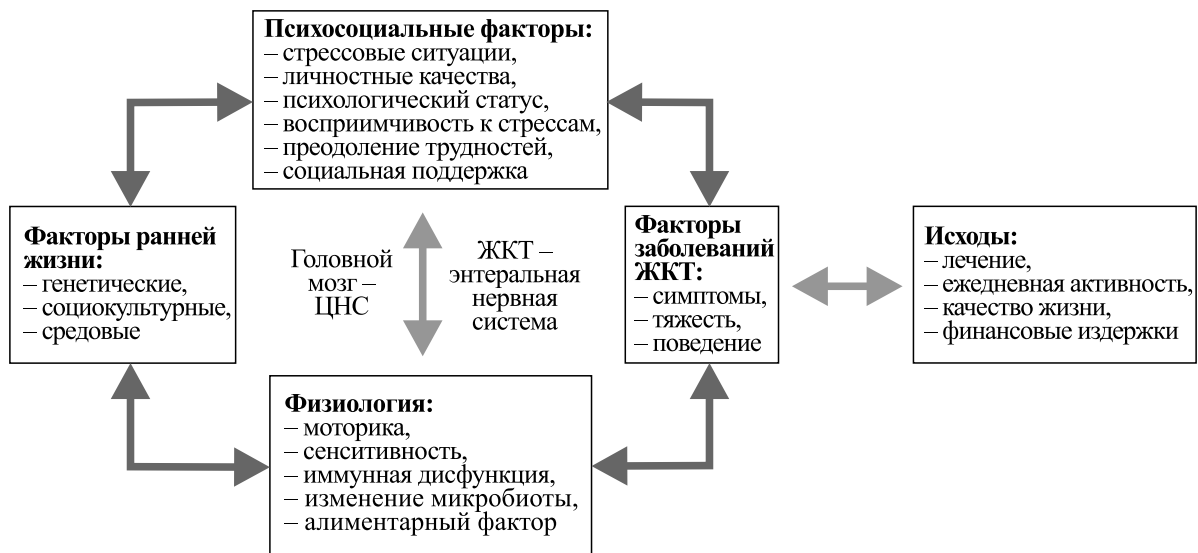


Рис. 9. Биопсихосоциальная модель генеза функциональных заболеваний ЖКТ [83, 84].

«кишечник–мозг»), а также микробный дисбактериоз в кишечнике, измененную иммунную функцию слизистой оболочки, висцеральную гиперчувствительность и аномальную моторику желудочно-кишечного тракта [83–85]. Следовательно, номенклатура относится к этим состояниям как к состояниям с нарушениями взаимодействия кишечника и мозга. Функциональные расстройства ЖКТ являются наиболее распространенными расстройствами, встречающимися в клинической практике гастроэнтеролога. В ходе работы по формированию Римских критериев IV пересмотра (Rome Foundation, 1916) были достигнуты определения функциональных расстройств ЖКТ, позволяющие подразделять пациентов на отдельные диагностические категории. Согласно новому определению, предложенному экспертным советом Римского фонда IV пересмотра, функциональные заболевания ЖКТ – это нарушения взаимодействия головного мозга и ЖКТ [83, 84]. В обновленную классификацию функциональных заболеваний ЖКТ добавлены новые нозологические единицы с известными причинно-следственными факторами. В рамках новой модели формирования функциональных заболеваний ЖКТ центральное место занимает дисфункция оси «головной мозг – ЖКТ» на сенсорном, моторном и нейроэндокринном уровнях (рис. 9).

Согласно современным представлениям под влиянием стрессовых ситуаций и психических травм могут возникать эмоциональные реакции, проявляющиеся вегетативно-соматической симптоматикой. У больных часто определяется высокий уровень невротизации, тревожности, депрессивных состояний, «соматовегетативных

расстройств». Тревога наблюдается примерно у 50% пациентов с функциональными заболеваниями ЖКТ [83–93]. Известно, что тревога индуцируется стрессовым ответом, опосредованным в первую очередь через высвобождение кортикотропин-рилизинг-гормона из гипоталамуса. Такой стрессовый ответ приводит к физиологическим изменениям, включая нарушения моторики ЖКТ. Помимо этого, кортикотропин-рилизинг-гормон может влиять на центральную обработку ноцицептивных сигналов, участвуя в формировании феномена висцеральной гиперчувствительности [83–86].

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Механизмы, включающиеся в патологические процессы при воспалительных заболеваниях кишечника, могут негативно влиять на продолжительность жизни пациентов с ВЗК. Как указывалось выше, смертность от заболеваний органов пищеварения на 100 тыс. населения в России по сравнению со странами ЕС (с 1990 по 2010) бьет все антирекорды (рис. 7). Ранее мы анализировали причины снижения средней продолжительности жизни и повышенной смертности в СССР/РФ с 1962 г. по 2022 г. [95–100]. Особое внимание было уделено последним пяти годам – с 2017 по 2022 гг. [95, 96, 98–101]. Анализ причин и выяснение механизмов, участвующих в указанных выше процессах, привели нас к выводу о том, что практически все патологические процессы, протекающие на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов и активации иммунных/аутоиммунных реакций имеют общую составляющую. Эта составляющая обусловлена

возникновением химического или свободно радикального резонанса между активными формами азота ($\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$) и активными формами кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ -радикалами).

В ходе этого свободнорадикального резонанса повышенные концентрации $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ взаимодействуют друг с другом с очень высокими скоростями и завершаются образованием высокотоксичных и высокореакционных соединений — $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$ -радикалов, пероксинитритов, которые вновь превращаются в $\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалы, замыкая тем самым патогенетический цикл [101–119]. Это такие реакции, которые способны к *цепным свободно радикальным процессам*, разрушающим практически все компоненты клеток и субклеточных структур. Однако если снизить концентрацию $\bullet\text{NO}$ или $\bullet\text{O}_2^-$ при помощи ингибиторов NO-синтаз, ловушек $\bullet\text{NO}$ (например, диэтилдитиокарбамата — дисульфирама) и/или ингибиторов свободно радикальных процессов с участием $\bullet\text{NO}$ 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 [95–130].

Формулируя новые обобщения, мы видели, что они легко встраиваются в существующую систему знаний [103, 120, 123–126, 143]. Это позволило нам выйти на *теорию типового патологического процесса* [102], активно развиваемую в последние десятилетия [144–149]. Оказалось, что концепции циклов $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ [103, 119, 120, 150–154], принципы цикличности и голографический принцип [124, 143], хорошо дополняют теорию типового патологического процесса [102, 143–149]. Самыми существенными обобщениями 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 не допускают прямого взаимодействия $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ и образования диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$) и $\bullet\text{OH}$ -радикалов, способных разрушать практически все компоненты клеток и субклеточных структур; 3) нарушение указанных выше циклов $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ ведут к переходу от нормы к развитию различных патологических процессов. Патологический процесс, развивающийся при пандемии COVID-19, также оказался зависимым от оксидативного и нитрозативного стресса [98–101].

Ранее нами было показано, что такие процессы развиваются также на фоне нитратно-нитритного загрязнения окружающей среды [95, 97]. У нас есть все основания предполагать, что эти же процессы развиваются при хронических воспалительных заболеваниях кишечника. На фоне оксидативного и нитрозативного стресса они могут способствовать формированию фиброза, и, в конце концов, негативно влиять на продолжительность жизни пациентов с ВЗК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных о причинно-следственной связи между физиологическими и патологическими процессами в мозге и в желудочно-кишечном тракте свидетельствует о том, что ось «мозг–кишечник» играет центральную роль в кишечном гомеостазе. Под влиянием стрессовых ситуаций и психических травм могут возникать эмоциональные реакции, проявляющиеся вегетативно-соматической симптоматикой. Нервная система ЖКТ, то есть энтеральная нервная система, обладает способностью управлять ЦНС. Патогенные механизмы, связанные с наследственными, иммунными/аутоиммунными и, возможно, инфекционными факторами находятся в центре внимания многих исследователей. Это обусловлено тем, что интактная ЭНС необходима для жизни, а дисфункции ЭНС часто связаны не только с расстройствами пищеварения, но и неврологическими расстройствами. С другой стороны, стрессы, переходящие в дистрессы (по Г. Селье), вызванные разными причинами, могут запускать причинно-следственные связи, приводящие к сокращению средней продолжительности жизни. В России смертность от заболеваний органов пищеварения на 100 тыс. населения значительно превосходит такой же показатель по сравнению со странами Европейского сообщества. Такими же особенностями, по данным Росстата и Евростата, характеризуется ожидаемая средняя продолжительность жизни населения России. Более того, Россия вместе с Украиной и Китаем оказались в числе лидеров по смертности среди европейских стран от сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Выяснение причинно-следственной связи между неврологическими, психическими и желудочно-кишечными заболеваниями необходимо для объединения усилий специалистов различного медико-биологического профиля с целью научиться корректировать психосоматические реакции при ВЗК.

По объединенным данным Всемирной Организации Здравоохранения, от 38 до 42% всех пациентов, посещающих кабинеты соматических

врачей, относятся к группе функциональных психосоматиков. Термин психосоматика происходит от древнегреч. ψυχή — душа и σῶμα — тело. Психосоматическая медицина — это направление в медицинской психологии, изучающее влияние психологических факторов на возникновение, течение и исход соматических (телесных) заболеваний [87–94]. Римский процесс и Римские критерии — это международные усилия по сбору научных данных, которые могут помочь в диагностике и лечении функциональных психосоматических желудочно-кишечных расстройств [83–85]. Первая попытка классифицировать новую область функциональных желудочно-кишечных расстройств была предпринята в 1962 г. Впоследствии было проведено несколько эпидемиологических и клинических исследований, оценивающих распространенность и частоту симптомов СРК у здоровых людей и пациентов с СРК. Согласно новому определению, предложенному экспертным советом Римского фонда IV пересмотра (2016 г.), функциональные заболевания ЖКТ — это нарушения взаимодействия головного мозга и ЖКТ. В рамках новой модели формирования функциональных заболеваний ЖКТ центральное место занимает дисфункция оси «головной мозг — ЖКТ» на сенсорном, моторном и нейроэндокринном уровнях [83–93].

Однако кроме функциональных заболеваний ЖКТ существуют более серьезные заболевания ЖКТ, такие как воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) — болезнь Крона и язвенный колит, которые постепенно разрушают стенки кишечника. Это те заболевания, которые ухудшают качество жизни больных и грозят им опасными осложнениями. Однако причина ВЗК неизвестна, и пока ученые и врачи не поймут больше о механизмах, лежащих в основе развития ВЗК, эффективная профилактика или лечение будут невозможны. Кишечный фиброз представляет собой поздний фенотип воспалительного заболевания кишечника, который лежит в основе большинства отдаленных осложнений и хирургических вмешательств у пациентов, особенно при болезни Крона. Несмотря на эти проблемы, антифиброзная терапия все еще недостаточна, в основном из-за отсутствия понимания патогенетических механизмов, которые опосредуют фиброгенез у пациентов с хроническим воспалением кишечника. Хотя *фиброз вызывается рецидивирующими эпизодами воспаления и заживления ран*, современные методы лечения ВЗК, тем не менее, не снижают частоту стеноза, что позволяет предположить, что механизмы, лежащие в основе воспаления и способствующие фиброзу, для современной медицины неизвестны. И это несмотря на широко рекламируемый ферментный препарат

лонгидаза, который обладает гиалуронидазной активностью, способной расщеплять кислые мукополисахариды, и, тем самым, увеличивать проницаемость соединительных тканей и способствовать их расщеплению. Этот препарат в течение суток выводится как через почки (45–50 %), так и через кишечник (3–5%). Поэтому можно было бы ожидать, что он может быть эффективным средством не только при лечении урологических заболеваний, но и заболеваний ЖКТ с кишечным фиброзом. Однако современная медицина все еще не использует *лонгидазу* в качестве средства для антифиброзной терапии.

Выше было отмечено, что *фиброз вызывается рецидивирующими эпизодами воспаления и заживления ран*. Согласно развиваемым в литературе представлениям важную роль в развитии многих патологических процессов, протекающих на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных и иммунных/аутоиммунных процессов играют нарушения циклической регуляции активных форм азота и активных форм кислорода [95]. 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 свободно радикальный резонанс [101]. 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 поступление в организм продуктов питания с высоким содержанием нитратов, уменьшить объем потребляемой пищи или снизить концентрацию NO или $\bullet\text{O}_2^-$ при помощи ингибиторов NO-синтаз, ловушек NO (например, диэтилдитиокарбамата — дисульфирама) и/или ингибиторов свободно радикальных процессов, то тем самым можно влиять на интенсивность развития патологических процессов. Тех процессов, которые, в свою очередь, могут оказывать влияние и на среднюю продолжительность жизни [102]. Особое внимание нужно обращать на овощи/корнеплоды, произрастающие в почве или на самой поверхности почвы: свеклу, кабач-

ки, арбузы. Именно эти продукты способны накапливать большое количество нитратов, которые могут превращаться в организме в нитриты и еще более активные соединения – NO и NO₂. Поэтому профилактика практически всех заболеваний, в том числе и заболеваний ЖКТ, должна начинаться со снижения воспалительных процессов, оксидативного и нитрозативного стресса, уменьшения активности иммунных и аутоиммунных реакций в организме человека. Мы надеемся, что анализ представленной проблемы будет полезен для физиологов и патофизиологов, биофизиков и биохимиков, а также для врачей, которые занимаются профилактикой ВЗК и лечением пациентов с воспалительными заболеваниями ЖКТ, включая болезнь Крона и язвенный колит.

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. S. M. Collins, M. Surette, and P. Bercik, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10** (11), 735 (2012).
2. S. H. Rhee, C. Pothoulakis, and E. A. Mayer, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **6** (5), 306 (2009).
3. A. Mulak and B. Bonaz, *Med. Sci. Monit.*, **10** (4), RA55 (2004)
4. M. J. Schmulson, *Isr. Med. Assoc. J.*, **3** (2), 104 (2001).
5. E. A. Mayer, B. D. Naliboff, and L. Chang, *Eur. J. Surg. Suppl.*, **587**, 3 (2002).
6. L. Ohman and M. Simrén, *Dig. Liver Dis.*, **39** (3), 201 (2007).
7. A. Gasbarrini, E. C. Lauritano, M. Garcovich, et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., Suppl* **1**, 111 (2008)
8. B. W. Petschow, B. P. Burnett, A. L. Shaw, et al, *Dig. Dis. Sci.*, **60** (1), 13 (2015).
9. G. Agirman, K. B. Yu., and E. Y. Hsiao, *Science*, **374** (6571), 1087. (2021).
10. C. Fung, P. Vanden Berghe, *Cell Mol. Life Sci.* **77** (22), 4505 (2020).
11. M. Rao, M.D. Gershon, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **13** (9), 517 (2016).
12. L. Wei, R. Singh, S. E. Ha, et al., *Gastroenterology*, **160** (7), 2451(2021).
13. https://www.pravda.ru/mysterious/1057413-2nd_brain_in_stomach.
14. J. L. Stewart., S. S. Khalsa, R. Kuplicki, et al., *Addict. Biol.*, **25** (6) (2020)
15. C. E. Maracic and S. J. Moeller, *Curr. Behav. Neurosci. Rep.*, **8** (4), 113 (2021)
16. J. L. Stewart, A. C. May, S. F. Tapert, and M. P. Paulus, *Drug. Alcohol. Depend.*, **154**, 264 (2015).
17. F. C. Hummel, *Nervenarzt* **85** (6), 708 (2014).
18. E. A. Mayer, K. Tillisch, and A. Gupta, *J. Clin. Invest.*, **125** (3), 926 (2015).
19. C. R. Martin, V. Osadchiy, A. Kalani, and E. A. Mayer, *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **6** (2), 133 (2018).
20. K. G. Margolis, J. F. Cryan, and E. A. Mayer, *Gastroenterology*, **160** (5), 1486 (2021).
21. L. Galland, *J. Med. Food*, **17**(12), 1261 (2014).
22. gastroscan.livejournal.com/736500.html.
23. J. Torres, S. Mehandru, J. F. Colombel, and L. Peyrin-Biroulet, *Lancet*, **389** (10080), 1741 (2017).
24. B. Veauthier and J. R. Hornecker, *Am. Fam. Phys.*, **98** (11), 661 (2018).
25. M. Gajendran, P. Loganathan, A. P. Catinella, and J. G. Hashash, *Dis. Mon.*, **64** (2), 20 (2018).
26. W. P. W. Chan, F. Mourad, and R. W. Leong, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **33**(5), 998 (2018)
27. C. M. Verbugt, M. Ghiboub, M. A. Benninga, et al., *Nutrients*, **13** (1), 212 (2021).
28. J. Jiang, L. Chen, Y. Chen, and H. Chen, *BMC Gastroenterol.*, **22** (1), 212 (2022).
29. A. MacLellan, J. Moore-Connors, S. Grant, et al., *Nutrients*, **9** (5), 447 (2017).
30. Е. Ю. Плотникова, А. М. Селедцов, М. А. Шамрай и др., *Лечащий врач*, **10**, 96 (2012).
31. К. М. Быков, *Кора мозга и внутренние органы (Воен.-мор. мед. акад., Киров, 1942)*.
32. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, **12-2** (82), 166 (2021).
33. <https://blog.bc-pf.org/gut-brain-axis/sensit.ru>.
34. <https://medach.pro>.
35. Э. Майер, *Второй мозг: Как микробы в кишечнике управляют нашим настроением, решениями и здоровьем* (ООО «Альпина нон-фикшн», М., 2016).
36. Z. Shen, C. Zhu, Y. Quan, et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **32** (11), 1804 (2017):
37. I. Koutroubakis, O. N. Manousos, S. G. Meuwissen, and A. S. Pena, *Hepatogastroenterology*, **43** (8), 381 (1996).
38. H. Asakura, K. Suzuki, T. Kitahora, and T. Morizane, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23** (12), 1794 (2008).
39. S. Danese, M. Sans, and C. Fiocchi, *Autoimmun. Rev.*, **3** (5), 394 (2004).
40. I. Siddique, A. S. Mustafa, I. Khan, et al., *Saudi J. Gastroenterol.*, **27** (4), 240 (2021).
41. N. Abu Freha, W. Badarna, M. Abu Tailakh, et al., *Isr. Med. Assoc. J.*, **20** (11), 695 (2018).
42. A. Boukercha, H. Mesbah-Amroun, A. Bouzidi, et al., *World J. Gastroenterol.*, **21** (25), 7786 (2015).
43. E. Leshinsky-Silver, A. Karban, S. Cohen, et al., *Int. J. Colorectal. Dis.*, **22** (9), 1021 (2007).

44. W. Klein, A. Tromm, C. Folwaczny, et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, **19** (2)153 (2004).
45. M. Zhang, J. Huang, X. Tan, et al., *Med. Sci. Monit.*, **21**, 3186 (2015).
46. J. Carrière, A. Darfeuille-Michaud, and H. T. Nguyen, *World J. Gastroenterol.*, **20** (34), 12102. (2014)
47. M. C. Cenit., M. Olivares, P. Codoñer-Franch, and Y. Sanz, *Nutrients*, **7** (8), 6900 (2015).
48. G. De Hertogh, J. Aerssens, K. P. Geboes, and K. Geboes, *World J. Gastroenterol.*, **14** (6), 845 (2008).
49. B. Orts, A. Gutierrez, L. Madero, et al., *Front. Pharmacol.*, **12**, 795272 (2022).
50. L. Qiao, M. Golling, F. Autschbach, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **97** (2), 303 (1994).
51. S. Sedda, G. Bevivino, and G. Monteleone, *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **14** (11), 907 (2018).
52. N. Avdagić, A. Začiragić, N. Babić, et al., *J. Basic Med. Sci.*, **13** (1), 5 (2013).
53. M. Pool, G. Oudkerk, J. J. Bouma, et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, **30** (8), 784 (1995).
54. B. Gawrońska, J. Matowicka-Karna, M. Kralisz, and H. Kemon, *Oncotarget*, **8** (40), 68108 (2017).
55. D. Goens and D. Micic, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **22** (4), 19 (2020).
56. J. Jiang, L. Chen, and Y. Chen, *BMC Gastroenterol.*, **22** (1), 212 (2022).
57. I. Ordás, L. Eckmann, M. Talamini, et al., *Lancet*, **380** (9853), 1606 (2012).
58. S. M. Adams and P. H. Bornemann, *Am. Fam. Physician.*, **87** (10), 699 (2013).
59. A. Gasbarrini, E. C. Lauritano, M. Garcovich, et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **12** (Suppl 1), 111 (2008).
60. B. W. Petschow, B. P. Burnett, A. L. Shaw, et al., *Dig. Dis. Sci.*, **60** (1), 13 (2015).
61. B. Z. Shao, S. L. Wang, P. Pan, et al., *Inflammation*, **42** (4), 1147 (2019).
62. L. Wolpert, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **349** (1329), 227 (1995).
63. D. Ribatti, *Exp. Cell Res.*, **364** (1), 1 (2018).
64. L.M. Buja, *Exp. Mol. Pathol.*, **121**, 104660 (2021).
65. R. H. de Gouveia, J. Gulczynski, V. Canzonieri and G. Nesi, *Virchows Arch.*, **479** (6), 1063 (2021).
66. H. Ellis and R. Linssen, *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*, **82** (10), 1 (2021).
67. H. Ellis and R. Linssen, *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*, **82** (10), 1 (2021).
68. G. Ling, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **39** (1), 1 (2007).
69. Л. Маргелис, *Роль симбиоза в эволюции клетки* (Мир, М., 1983).
70. Э. Брода, *Эволюция биоэнергетических процессов* (Мир, М., 1978).
71. V. Zimorski, C. Ku, W. F. Martin, and S. B. Gould, *Curr. Opin. Microbiol.*, **22**, 38 (2014).
72. L. Margulis and D. Bermudes, *Symbiosis*, **1**, 101 (1985).
73. L. Margulis, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **29**, 21 (1975).
74. A. V. Pinevich and A. G. Desnitskiĭ, *Tsitologiya*, **21** (7), 755 (1979).
75. D. S. Schwarz and M. D. Blower, *Cell Mol. Life Sci.*, **73** (1), 79 (2016).
76. R. Cazzolla Gatti, *Theor. Biol. Forum*, **111** (1–2), 13 (2018).
77. L. M. Westrate, J. E. Lee, W. A. Prinz, and G. K. Voeltz, *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 791 (2015).
78. S. Chen, P. Novick, S. Ferro-Novick, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25** (4), 428 (2013).
79. B. Kraft, M. Strous, and H. E. Tegetmeyer, *J. Biotechnol.*, **155** (1), 104 (2011).
80. B. Kraft, H. E. Tegetmeyer, R. Sharma, et al., *Science*, **345** (6197), 676 (2014).
81. C. E. Goh, B. Bohn, C. Marotz, et al., *J. Am. Heart Assoc.*, **11** (10), e023038 (2022).
82. C. E. Goh, P. Trinh, and P. C. Colombo, *J. Am. Heart Assoc.*, **8** (23), e013324 (2019).
83. D. A. Drossman, *Gastroenterology*, **S0016-5085** (16), 00223-7 (2016).
84. J. Tack and D. A. Drossman, *Neurogastroenterol. Motil.*, **29** (9), e13053 (2017).
85. C. J. Black, D. A. Drossman, N. J. Talley, and J. Ruddy, *Lancet*, **396** (10263), 1664. (2020).
86. Holzer, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 929332 (2022).
87. О. В. Ташьян, Дис ... канд. мед. наук (Первый МГМУ имени И. М. Сеченова, М., 2017).
88. А. П. Погромов, О. В. Ташьян, М. Г. Мнацакян и Г. М. Дюкова, *Клинич. медицина*, **94** (10), 795 (2016).
89. G. M. Diukova, V. L. Golubev, A. P. Pogromov, and M. G. Mnatsakanyan, *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova*, **116** (12), 137 (2016).
90. M. G. Mnatsakanyan, G. M. Dyukova, A. P. Pogromov, and O. V. Tashchyan, *Klin. Med. (Mosk.)*, **94** (10), 764 (2016).
91. V. I. Chernyak, A. I. Savel'ev, I. V. Men'shikova, and A. P. Pogromov, *Klin. Med. (Mosk.)*, **94** (2), 108 (2016).
92. A. P. Pogromov, M. G. Mnatsakanyan, and K. Y. Kolosova, *Klin. Med. (Mosk.)*, **94** (6), 470 (2016).
93. G. M. Diukova, V. L. Golubev, A. P. Pogromov, and M. G. Mnatsakanyan, *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova*, **116** (12) 137 (2016).
94. M. G. Mnatsakanyan, G. M. Dyukova, A. P. Pogromov, O. V. Tashchyan, *Klin. Med. (Mosk.)*, **94** (10), 764 (2016).
95. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, **9** (31), 34 (2017).
96. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, **10** (68), 183 (2020).
97. Я. И. Ажипа, В. П. Реутов и Л. П. Каюшин, *Физиология человека*, **20** (3), 165 (1990).
98. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, **10-2** (80), 117 (2021).
99. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, *Евразийское научное объединение*, **12-2** (82), 117 (2021).
100. В. П. Реутов, *Евразийское научное объединение*, **5-2** (75), 130 (2021).
101. В. П. Реутов, Л. А. Давыдова и Е. Г. Сорокина, *Биофизика*, **67** (5), 1021 (2022).
102. В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Е. Г. Сорокина, *Биофизика*, **64** (2), 316 (2019).

103. В. П. Реутов, Успехи биол. химии, **35**, 189 (1995)
104. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, Цитология **42** (1), 72 (2000).
105. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **378** (3), 417 (2001).
106. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, Цитология, **47** (3), 214 (2005).
107. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, Морфология, **129** (2), 84 (2006)
108. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, Н. П. Ларионова и Л. М. Чайлахян, Морфология, **131** (2), 53 (2007).
109. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, Бюл. эксперим. биологии и медицины **146** (7), 13 (2008).
110. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, Бюл. эксперим. биологии и медицины **150** (8), 212 (2010).
111. Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Н. П. Ларионова, Морфология, **140** (4), 13 (2011).
112. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **393** (5), 698 (2003).
113. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **401** (3), 419 (2005).
114. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. В. Самосудова и Л. М. Чайлахян, Морфология, **129** (2), 53 (2006).
115. Н. П. Ларионова, В. П. Реутов, Н. П. Самосудова и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **432** (2), 276 (2010).
116. Н. П. Ларионова, Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **369** (6), 836 (1999).
117. Н. П. Ларионова, Н. В. Самосудова, В. П. Реутов и Л. М. Чайлахян, Докл. РАН, **376** (5), 701 (2001).
118. Н. С. Косицын, В. П. Реутов и М. М. Свинов, Молекуляр. биология, **32** (2), 369 (1998)
119. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, Молекуляр. биология, **32** (2), 377 (1998).
120. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин и Н. С. Косицын, *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих* (М., 1997).
121. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков и В. П. Реутов, Биохимия, **65** (4), 485 (2000).
122. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова и В. П. Реутов, Вестн. РАМН, № 4, 30 (2000).
123. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, Биохимия, **63** (7), 1029 (1998).
124. В. П. Реутов, Биохимия, **64** (5), 634 (1999).
125. В. П. Реутов, Вестн. РАМН, **4**, 35 (2000).
126. В. П. Реутов, Биохимия, **67** (3), 353 (2002).
127. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и В. Н. Швалев, Успехи физиол. наук, **43** (4), 73 (2012).
128. V. P. Reutov, E. G. Sorokina and O. I. Sukmansky. *Curr. Res. Biopolymers*, **2**, 112 (2020). DOI: 10.29011/CRBP-112.000012
129. Н. В. Самосудова и В. П. Реутов, Биофизика, **63** (3), 528 (2018).
130. V. P. Reutov, N. V. Samosudova, and E. G. Sorokina, *Biophysics*, **64** (2), 233 (2019).
131. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, Н. В. Самосудова и Н. В. Захарчук, Тихоокеанский мед. журн. **3** (69), 37 (2017).
132. V. P. Reutov, Ia. I. Azhipa, and L. P. Kayushin, *Izv. AN SSSR, Ser. Biol.*, **3**, 408 (1983).
133. В. П. Реутов и Е. Г. Сорокина, Молекуляр. биология, **32** (2), 377 (1998).
134. J. O. Lundberg, M. T. Gladwin, A. Ahluwalia, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **5** (12), 865 (2009).
135. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин и др., Успехи физиол. наук, **38** (4), 39 (2007).
136. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., Тихоокеанский мед. журн., **1** (55), 10 (2014).
137. В. Н. Швалёв, А. Н. Рогоза, В. П. Реутов и др., Казанский мед. журн., **95** (2), 175 (2014).
138. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., Морфологич. ведомости, № 3, 6 (2012).
139. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза и др., Морфологич. ведомости, № 1, 6 (2014).
140. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, В. Б. Сергиенко и др., Казанский мед. журн., **97** (4), 598 (2016).
141. В. Н. Швалев, А. Н. Рогоза, Н. А. Тарский и др., Тихоокеанский мед. журн., **1** (67), 42 (2017).
142. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и В. Н. Швалев, Успехи физиол. наук, **43** (4), 73 (2012).
143. V. P. Reutov, E. G. Sorokina, and O. I. Sukmansky, *Curr. Res. Biopolymers*, **2**, 112 (2020). DOI: 10.29011/CRBP-112.000012
144. В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и Е. А. Степовая, *Физиология и патофизиология эритроцита* (Томск, 2004).
145. В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и Е. А. Степовая, *Клинический патоморфоз эритроцита. Атлас* (Томск, 2003).
146. В. В. Новицкий, Е. А. Степовая и И. Г. Баженова, Бюл. эксперим. биологии и медицины, **126** (8), 204 (1998).
147. В. В. Новицкий, Е. А. Степовая и В. Е. Гольдберг, Бюл. эксперим. биологии и медицины, **127** (6), 680 (1999).
148. Н. В. Рязанцева и В. В. Новицкий, Успехи физиол. наук, **35** (1), 53 (2004).
149. *Типовые патологические процессы*, под ред. Ф. И. Висмонта и др. (Минск, 2013).
150. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, Н. В. Самосудова и др., Евразийское научное объединение, **7** (29), 41 (2017)
151. В. П. Реутов, Евразийское научное объединение, **9** (31), 34 (2017).
152. В. П. Реутов, Вестн. РАМН, **4**, 35 (2000).
153. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин и др., Успехи физиол. наук, **38** (4), 39 (2007).
154. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина и Н. С. Косицын, Успехи соврем. биологии, **125** (1), 41 (2005).
155. С. В. Гусакова, И. В. Ковалев, Л. В. Смаглий и Ю. Г. Бирulina, Успехи физиол. наук, **46** (4), 53 (2015).
156. С. В. Гусакова, Л. В. Смаглий, Ю. Г. Бирulina и И. В. Ковалев, Успехи физиол. наук, **48** (1), 24 (2017).

Causal Relationship between Physiological and Pathological Processes in the Brain and in the Gastrointestinal Tract: the Brain–Gut Axis

V.P. Reutov* and E.G. Sorokin**

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

***National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Lomonosovsky prosp. 2, Moscow, 119991 Russia*

The brain and gastrointestinal tract are critical organs responsible for detecting, transmitting, integrating and responding to signals from the internal and external environment. A bidirectional system of neurohumoral communication (the “gut-brain” axis) combines the activity of the intestines and the brain (or the brain and the intestines) of a person. It affects the development and behavior of a person. The paper aims to analyze the literature on the existence of a relationship between the central nervous system and the enteric nervous system. Based on the data about the number of neurons in the enteric nervous system (approximately 250 million nerve cells), in foreign research published, researchers proposed a concept of the “second brain” in the intestine, that can exert greater powerful influence on the brain than the spinal cord (about 10 million neurons) with its autonomic nervous system. However, it turned out that as long ago as in the XX century, the Russian scientists I.P. Pavlov, K.M. Bykov and A.M. Ugolev, who are academicians of the USSR Academy of Sciences, analyzed the cortico-visceral relationships and wrote about the existence of a connection between the central nervous system and the enteric nervous system. One of the urgent problems of modern physiology, pathophysiology, biophysics, biochemistry and medicine is the elucidation of the causal relationship between the central nervous system and the enteric nervous system, as well as between neurological, mental and gastrointestinal diseases in order to combine the efforts of specialists of various medical and biological profiles to solve urgent problems of medicine.

Keywords: brain, central and enteral nervous systems, inflammatory bowel disease, oxidative and nitrosative stress in inflammatory bowel disease

ВЛИЯНИЕ НЕЛИНЕЙНОСТИ УПРУГИХ СВОЙСТВ РОГОВИЦЫ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ТОНОМЕТРИИ ПО ШИОТЦУ: ОЦЕНКА НА ОСНОВЕ ДВУХКОМПОНЕНТНОЙ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

© 2022 г. И.Н. Моисеева^{*,#}, А.А. Штейн^{*,##}

**Институт механики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Мичуринский пр., 1, Москва, 117899, Россия*

#E-mail: moiseeva.ir@yandex.ru

##E-mail: stein.msu@bk.ru

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принята к публикации 25.07.2022 г.

При тонометрии по Шиотцу роговица глаза, предварительно нагруженная вогнутым тяжелым штампом (стопой), дополнительно нагружается стержнем (плунжером), по глубине погружения которого в роговицу судят о величине внутриглазного давления. Выполнено математическое моделирование этого процесса на базе эффективной модели глазного яблока, ранее разработанной и протестированной авторами. В отличие от базового (физически линейного) варианта этой модели, упругие свойства системы характеризуются здесь не двумя, а тремя существенными параметрами, один из которых отвечает за нелинейность упругого поведения роговицы. Численно анализируется влияние такой нелинейности на тонометрическую разность — превышение тонометрического давления (в глазу, нагруженном тонометром) над истинным (до нагружения). Обнаружена отсутствующая в линейной модели возможность немонотонной зависимости тонометрической разности от истинных давлений, когда последние малы. Оценена вносимая нелинейностью поправка в расчет истинного давления по тонометрическому. Эта поправка имеет разный знак в зависимости от истинного давления и оказывается существенной для достаточно высоких значений этой величины: в этом случае учет нелинейности уменьшает тонометрическую разность. Однако зависимость от обеих присутствующих в модели жесткостей (роговичной и склеральной) в большинстве случаев более существенна, чем влияние нелинейности. Использование при расчете истинного давления средних значений этих жесткостей вместо индивидуальных может приводить к фатальным ошибкам для глаз, жесткость которых сильно отклоняется от средней, что, в частности, имеет место при глаукоме. Зависимости, используемые в клинике при стандартной обработке данных тонометрии по Шиотцу, могут при некоторых значениях упругих параметров давать с практической точностью правильные результаты, но значительно отклоняются от расчетных даже при средних значениях этих констант, и тем заметнее, чем больше вес плунжера. Полностью корректный подход к оценке механического состояния и механических характеристик глаза должен включать несколько измерений по крайней мере двумя разными тонометрами с последующей численной обработкой результатов.

Ключевые слова: глаз, упругие свойства, роговица, нелинейная упругость, тонометрия, тонометр Шиотца, математическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302922060175, EDN: LLEFQM

В 2011 г. нами была опубликована работа [1], в которой предложен эффективный подход к математическому моделированию механического нагружения роговицы глаза внешними устройствами. Этот подход основан на представлении роговицы безмоментной поверхностью, а склеральной области — нульмерным элементом, откликающимся изменением объема на изменения внутреннего давления. В работе [1] поверхность, представляющая роговицу, предполагалась линейно упругой, изотропной и пространственно

однородной, а склеральный элемент считался линейно упругим. Предложенный подход был использован в той же работе для моделирования апланационной тонометрии по Маклакову. В дальнейшем исходная (базовая) модель была применена при моделировании нагружения глаза различными устройствами и обобщена на случай пространственно неоднородной роговицы [2–4].

В отличие от большинства численных исследований механики глаза, разрабатываемые нами модели содержат лишь небольшое количество па-

раметров, определяющих упругие свойства глазного яблока (в базовой модели их всего три, из них два существенных). Таким образом, внутриглазное давление и индивидуальные представительные механические характеристики глаза, влияющие на интерпретацию результатов клинических измерений, могут быть определены в небольшом количестве опытов после математической обработки полученных данных. В конечном счете такая методика обосновывает, обобщает и уточняет ту оценку механического состояния и механических характеристик глаза на основе эмпирических зависимостей, которая традиционно используется в клинике для интерпретации результатов измерений [5–7]. При численных расчетах, основанных на учете множества параметров, характеризующих упругие свойства глазных тканей, такое обобщение невозможно, и получаемые выводы сводятся лишь к общим рекомендациям [8, 9]. Это связано с тем, что упругие характеристики глазного яблока сильно индивидуальны [10]: они не могут быть определены для конкретного живого глаза заранее и при корректной методике должны оцениваться в процессе измерений. Более того, оценка индивидуальных упругих свойств глазного яблока оказывается существенной для диагностики, в первую очередь глаукомы. Для такой оценки разработаны базирующиеся на тонометрии процедуры: эластотонометрия и дифференциальная тонометрия. Однако, строго говоря, величина внутриглазного давления и упругие свойства в большинстве случаев не могут оцениваться раздельно, и их определенность представляет собой единую задачу.

При всей грубости полуэмпирических моделей, положенных в основу стандартной методики обработки измерений, эти модели учитывают (хотя и не вполне корректно) наблюдаемую в экспериментах нелинейность упругого отклика глазного яблока на изменения давления [11–15]. В большинстве исследованных нами ситуаций нелинейность, тем не менее, не слишком существенна, поскольку при нагружении тонометром давления (a , следовательно, и напряжения), как правило, меняются в достаточно узком диапазоне. Однако в случае тонометра Шиотца ситуация оказывается иной: в ненагруженном и нагруженном тонометром глазу давления различаются значительно — на десятки миллиметров ртутного столба, т.е. меняются в диапазоне, для которого эксперименты демонстрируют заметную нелинейность упругого поведения роговицы [16–18] и глазного яблока в целом [11–15].

С целью учета эффектов, связанных с нелинейностью упругого поведения глазных тканей, мы разработали физически нелинейное обобщение нашей базовой модели, максимально приспособленное к решаемым задачам [19]. При этом оказалось, что можно принять ряд допущений,

значительно упрощающих моделирование. Во-первых, было показано, что в рассматриваемых диапазонах давлений деформации остаются малыми, что позволило сохранить прежнюю форму уравнений равновесия, написанных в предположении малости деформаций (при допущении конечных перемещений) [19]. Во-вторых, выяснилось, что для элемента, представляющего склеральную область, правомерно сохранить линейную зависимость объема от давления [20]. В-третьих, предложено [19] физически корректное экспоненциальное соотношение, связывающее возникающие в поверхности, моделирующей роговицу, усилия (двумерные напряжения) с ее деформациями. Для случая изотропной и однородной (как поверхность) роговицы такая нелинейность приводит к появлению лишь одного дополнительного к линейной модели параметра нелинейности, т.е. упругие свойства объекта характеризуются теперь тремя существенными параметрами.

Сравнение результатов расчетов по линейному варианту модели с данными опытов на живом глазу позволило ранее оценить порядок двух упругих параметров — роговичной и склеральной жесткостей — присутствующих в модели [1]. Значения этих параметров для конкретного обследуемого глаза могут при этом существенно отличаться от рассчитанных по множеству глаз средних значений. Порядок параметра нелинейности был оценен [19] на основании сравнения расчетов по модели с данными по растяжению изолированной роговицы давлением и затем уточнен [20] при сравнении с результатами опытов по введению известных объемов жидкости в энуклеированный глаз. При этом было показано, что оценки значений упругих констант, сделанные ранее в рамках линейной модели, сохраняются и для нелинейной, если под жесткостью роговицы понимать ее жесткость при физиологически нормальных давлениях. Нелинейное обобщение исходной модели было использовано для оценки влияния нелинейности роговицы на результаты тонометрии по Маклакову. В целом связанные с нелинейностью поправки оказались, как и ожидалось, не слишком существенными.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния нелинейности упругих свойств роговицы на результаты тонометрии по Шиотцу. Основной вопрос, на который предполагается ответить: в каком диапазоне упругих параметров использование линейной модели может привести к существенным ошибкам при оценке внутриглазного давления?

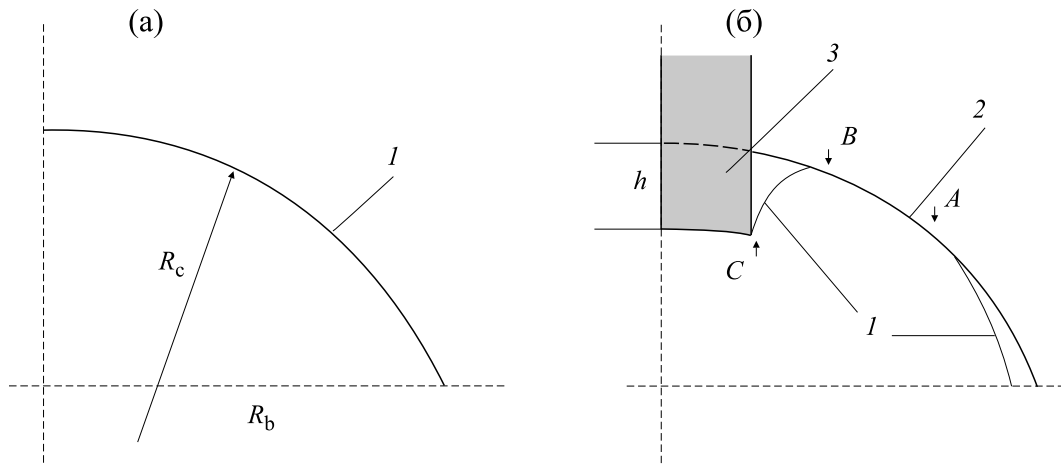


Рис. 1. К постановке задачи: роговица до внешнего нагружения (а) и нагруженная тонометром Шиотца (б): 1 – свободная роговица, 2 – вогнутый штамп (стопа), 3 – стержень (плунжер); стрелки и буквы А и В указывают точки отрыва роговицы от стопы, буква С – точку отрыва роговицы от плунжера. На схеме показана конфигурация изучаемого объекта справа от оси симметрии (оси глаза); R_c – радиус не нагруженной извне роговицы; R_b – радиус круга, на который она опирается; h – заглубление плунжера.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Схема нагружения в импрессионном тонометре Шиотца представлена на рис. 1. Роговица глаза лежащего пациента нагружается вогнутым штампом (стопой). Через ее центральное отверстие свободно опускается стержень (плунжер) с вогнутой торцевой поверхностью, вдавливающейся в роговицу. Непосредственно измеряемая величина – заглубление плунжера под поверхность стопы.

Общая постановка задачи в рамках базовой (физически линейной) модели подробно описана в [1] и конкретизирована для тонометра Шиотца в работе [3]. Модификация модели с учетом нелинейности упругого отклика роговицы представлена и обоснована в [19]. Здесь ограничимся воспроизведением необходимых соотношений без обоснований и обсуждений.

Рассматривается осесимметричная деформация роговицы как упругой безмоментной двумерной поверхности, первоначально распертой только внутренним давлением p_0 (истинное давление), а затем нагруженной тонометром. В результате этого нагружения устанавливается тонометрическое давление p_t . Предполагается, что в не нагруженном извне состоянии роговица имела форму сферического сегмента радиуса R_c с радиусом основания R_b (рис. 1а). В областях свободной роговицы (вне контакта с приложенной нагрузкой, на рис. 1б обозначены цифрой 1) уравнения равновесия в предположении малых деформаций с учетом конечности смещений имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} (r_0 T_1)' - T_2 \cos \varphi &= 0, \\ -T_2 \sin \varphi - r_0 \varphi' T_1 + \lambda r_0 p_t &= 0, \\ r' &= \lambda \cos \varphi, \end{aligned} \tag{1}$$

$$r_0 = R_c \sin \varphi_0, \quad \varphi_0 = \frac{s}{R_c}, \quad \lambda = 1 + \varepsilon_1, \quad \varepsilon_2 = \frac{r}{r_0} - 1.$$

Здесь независимым параметром считается координата s , отсчитываемая по дуге образующей роговицы в ненагруженном состоянии от ее пересечения с осью симметрии; T_1 и T_2 – касательные усилия в меридиональном и перпендикулярном к нему направлениях (двумерные напряжения [19]); r – расстояние точки поверхности, представляющей роговицу, от оси; φ – угол между нормалью к этой поверхности и осью симметрии; ε_1 и ε_2 – деформации в направлении главных осей, отсчитываемые от начального состояния (без внешней нагрузки при давлении p_0). Угол φ считается положительным, если нормаль направлена во внешнюю относительно оси сторону. Функции $r_0(s)$ и $\varphi_0(s)$ – значения функций $r(s)$ и $\varphi(s)$ при начальной сферической конфигурации (рис. 1а). В этой конфигурации $T_1 = T_2 = T_0 = = p_0 R_c / 2$.

В областях контакта роговицы с элементами нагружающего устройства имеют место связи

$$\sin \varphi = \frac{r}{r_t}, \quad \sin \varphi = \frac{r}{r_p} \tag{2}$$

для стопы с радиусом r_t и плунжера с радиусом r_p соответственно. В предположении свободного проскальзывания роговицы по поверхностям контакта система (1) остается справедливой в об-

ластях контакта за исключением проекции уравнения равновесия на нормальное к роговице направление (второе уравнение из уравнений равновесия (1)), которое теперь заменяется соответствующей связью из уравнений (2).

$$\begin{aligned} T_1 &= A[B(\exp(B\varepsilon_1 + C\varepsilon_2) - 1) + C(\exp(B\varepsilon_2 + C\varepsilon_1) - 1)] + T_0, \\ T_2 &= A[B(\exp(B\varepsilon_2 + C\varepsilon_1) - 1) + C(\exp(B\varepsilon_1 + C\varepsilon_2) - 1)] + T_0, \\ A &= \frac{E_c^*(p_0)}{\zeta^2(1 - \nu_c)}, \quad B = \frac{\zeta}{2} \left(1 \pm \sqrt{\frac{1 - \nu_c}{1 + \nu_c}} \right), \quad C = \zeta - B, \end{aligned} \quad (3)$$

где $E_c^*(p_0)$ и ν_c – модуль растяжения и коэффициент Пуассона роговицы как двумерной упругой поверхности в начальном состоянии [19]; ζ – параметр нелинейности.

Если рассматривать не нагруженную извне роговицу (рис. 1а), закрепленную по границе, и принять, что она имеет при давлении p_0 форму сферического сегмента, то при другом давлении p_0' ее сферичность утратится, деформация уже не будет пространственно однородной, а тензор жесткости перестанет быть однородным и изотропным. Однако при нагружении только внутренним давлением остаются малыми не только деформации, но и перемещения. В силу этого для такого нагружения при расчете напряжений возможно пренебречь неоднородностью деформаций и изменением формы, что позволяет выбрать отсчетное (нагруженное только внутренним давлением) состояние произвольно, считая сегмент сферическим с тем же радиусом и полагая, что упругие константы для этих состояний связаны такими же соотношениями, как и для однородной деформации [19], т.е. ν_c и ζ не изменяются, а модуль растяжения E_c^* преобразуется по формуле

$$E_c^*(p_0') = E_c^*(p_0) + \frac{\zeta(1 - \nu_c)R_c}{2}(p_0' - p_0). \quad (4)$$

Таким образом, давление, при котором форма роговичного сегмента считается сферической, может практически выбираться произвольно с пересчетом E_c^* по формуле (4), что было проверено в пробных расчетах. Поскольку растяжимость распертой давлением роговицы сильно зависит от этого давления, сравнивать роговицы по их упругим свойствам целесообразно при одном и том же давлении, которое назовем отсчетным. В настоящей работе за отсчетное принято давление 12 мм рт. ст., находящееся в области значений, считающихся физиологически нормальными. Модуль растяжения роговицы при этом давлении далее обозначается E_c^* (без указания аргумента).

Определяющее соотношение, связывающее двумерные напряжения T_1 и T_2 с деформациями относительно начального, не нагруженного тонометром, состояния ε_1 и ε_2 задается в виде

В силу симметрии решение задачи ищется в области, лежащей по одну сторону от оси симметрии ($s \geq 0$). В качестве граничных условий на концах области принимаем (см. работу [1]) условие закрепления роговицы на склере, деформации и смещения которой считаются малыми, и условие ограниченности усилия T_1 в точке пересечения с осью симметрии. Последнее принимает форму асимптотического соотношения при $s \rightarrow 0$: $r \sim (1 + \varepsilon_1)s$ [21]. Условия на границах отрыва роговицы от твердых поверхностей имеют следующий вид [3]:

$$\begin{aligned} A: \quad r^- &= r^+, \quad \varphi^- = \varphi^+, \quad T_1^- = T_1^+, \\ &G + G_f = \pi r^2 \cdot p - T_1 \sin \varphi \cdot 2\pi r, \\ B: \quad r^- &= r^+, \quad \varphi^- = \varphi^+, \quad T_1^- = T_1^+, \\ C: \quad r^- &= r^+ = r^*, \quad T_1^- = T_1^+, \\ &G = \pi r^{*2} p - T_1 \sin(-\varphi^-) \cdot 2\pi r^*, \end{aligned} \quad (5)$$

где G и G_f – соответственно вес плунжера и стопы, r^* – радиус сечения плунжера, а индексами «–» и «+» обозначены значения переменных по разные стороны линии отрыва, причем знак «–» соответствует области, лежащей дальше от оси. В соотношениях, содержащих веса (условиях равновесия), функции, непрерывные на рассматриваемой поверхности разрыва, индексами «–» и «+» не помечены.

Приращение ΔV_c подроговичного объема (часть внутриглазного объема над плоскостью S круга, на который опирается роговица) связано с приращением всего заполненного жидкостью внутриглазного объема ΔV соотношениями

$$\begin{aligned} \Delta V_s &= K(p - p_0), \\ \Delta V &= \Delta V_c + \Delta V_s, \end{aligned} \quad (6)$$

где ΔV_s – приращение «склерального» объема (под плоскостью S), K – интегральная константа, определяющая упругое поведение склеральной области. При моделировании тонометрии принималось условие $\Delta V = 0$, соответствующее предпо-

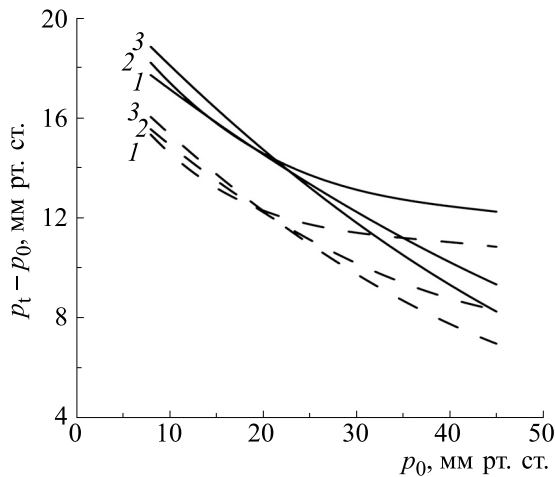


Рис. 2. Зависимость тонометрической разности от истинного давления для различных значений коэффициента нелинейности: $\xi = 1$ (кривые 1), $\xi = 30$ (кривые 2), $\xi = 60$ (кривые 3) при $E_c = 0.3$ МПа, $E_s = 10$ МПа. Сплошные линии — вес плунжера 7.5 г, штриховые линии — вес плунжера 5.5 г.

ложению о постоянстве объема жидкости под оболочкой глаза за время процедуры.

Для удобства сравнения с данными других авторов упругие константы модели далее были переопределены [1] по формулам $E_c^* = \delta E_c$, $K = (\xi E_s)^{-1}$, где $\delta = 0.5$ мм — средняя в норме толщина роговицы, а $\xi = 1.44 \cdot 10^{-5}$ мм⁻³. Константы E_s и E_c , имеющие размерность упругого модуля (и давления), далее именуются жесткостями — склеральной и роговичной (роговицы) соответственно. Роговичная жесткость E_c имеет смысл жесткости материала роговицы, осредненной по ее условной (нормальной) толщине. Склеральная жесткость E_s — средняя по толщине склеры жесткость ее материала при выборе специальной грубой модели склеральной области (однородная оболочка, имеющая форму сферического сегмента со стандартными для человеческой склеры радиусом и толщиной) [1]. Полагаем геометрические параметры роговицы равными их нормальным для человеческого глаза значениям: $R_c = 8$ мм, $R_b = 5.8$ мм. Коэффициент Пуассона принимается равным $\nu_c = 0.45$, что соответствует слабой сжимаемости роговицы как трехмерного объекта. Радиусы кривизны двух компонентов тонометра Шюотца — стопы и плунжера — полагаем равными $r_f = r_p = 15$ мм, а вес стопы $G_f = 11$ г. Это стандартные характеристики прибора. В расчетах исследовали два наиболее употребительных веса плунжера: $G = 5.5$ и 7.5 г. Грузы именно такого веса используются в тонографе GlauTest 60, применяющемся во многих российских клиниках.

Упругие константы E_s и E_c варьировались в широком диапазоне. В настоящей работе диапазон изменения этих величин несколько расширен в сторону их увеличения по сравнению с рассматривавшимся нами ранее, причем особое внимание обращено на случай одновременного значительного превышения значений обеих жесткостей над средними. Это связано с тем, что имеются данные об увеличении жесткостей как склеральной, так и роговичной ткани с возрастом и при глаукоме [22]. Необходимость такого расширения области исследуемых жесткостей подтверждается тем, что для некоторых глаз полученные в клинике при дифференциальной тонометрии результаты оказались возможным согласовать с теоретическими расчетами лишь для таких значений. Здесь и ниже под средними (нормальными) значениями жесткостей понимаются оценки, полученные нами ранее для здоровых глаз [1]: $E_s = 10$ МПа и $E_c = 0.3$ МПа. Исследуемый диапазон истинных давлений p_0 , наоборот, расширен в сторону уменьшения до значений $p_0 \sim 5$ мм рт. ст., поскольку именно при малых давлениях наблюдаются наиболее значительные отклонения показаний дифференциальной тонометрии от нормальных. Подробному анализу влияния нелинейности упругих свойств роговицы на результаты дифференциальной тонометрии будет посвящена отдельная статья.

Численное решение осуществлялось методом стрельбы с использованием схемы Рунге—Кутты четвертого порядка.

ВЛИЯНИЕ НЕЛИНЕЙНОСТИ РОГОВИЦЫ НА СВЯЗЬ МЕЖДУ ТОНОМЕТРИЧЕСКИМ И ИСТИННЫМ ДАВЛЕНИЕМ: ЧИСЛЕННЫЕ РАСЧЕТЫ

Процедуру интерпретации результатов тонометрии принято разделять на две составляющие. Сначала определяется тонометрическое давление p_t по непосредственно измеряемой геометрической величине (в случае тонометра Шюотца — по заглублению плунжера h), а затем ищется истинное давление p_0 по тонометрическому p_t . Разность между этими давлениями $p_t - p_0$ будем называть тонометрической разностью.

Первая из этих задач исследована нами с учетом нелинейности упругих свойств роговицы в работе [23]. Установлено, что нелинейность (как и вообще упругие свойства) роговицы сколь угодно заметно влияет на зависимость $p_t(h)$ лишь при очень низких, практически не наблюдаемых тонометрических давлениях порядка и ниже 20 мм рт. ст. Таким образом, для физического осмысления результатов тонометрии по Шюотцу основной становится задача о связи между истинным и тонометрическим давлениями.

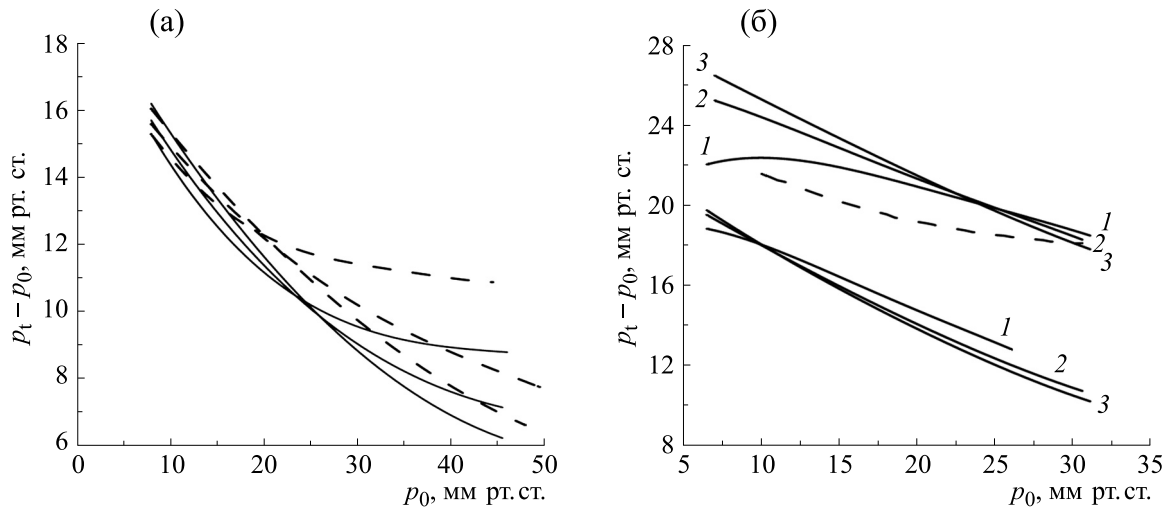


Рис. 3. Зависимость тонометрической разности от истинного давления для различных значений отсчетной жесткости роговицы. (а) – Сплошные кривые соответствуют $E_c = 0.6$ МПа, штриховые кривые – 0.3 МПа; $E_s = 10$ МПа, $G = 5.5$ г; $\zeta = 1, \zeta = 30, \zeta = 60$ (сверху вниз, если смотреть на кривые справа). (б) – $G = 7.5$ г, $\zeta = 60$, кривые нижнего семейства соответствуют склеральной жесткости $E_s = 10$ МПа, верхнего семейства – 40 МПа, $E_c = 0.3$ МПа (кривые 1), 0.6 МПа (кривые 2), 0.9 МПа (кривые 3); штриховая кривая в верхнем семействе имеет те же параметры, что и кривая 1, но соответствует практически линейному случаю ($\zeta = 1$).

На рис. 2 представлены зависимости тонометрической разности от истинного давления при разных значениях параметра нелинейности для весов плунжера 5.5 и 7.5 г и нормальных значений отсчетной роговичной и склеральной жесткостей $E_c = 0.3$ МПа и $E_s = 10$ МПа. Поскольку используемое уравнение состояния теряет смысл при $\zeta = 0$ (хотя и возможен предельный переход при стремлении к этому значению), здесь и далее в качестве минимального значения параметра нелинейности берется $\zeta = 1$, что дает зависимости, практически совпадающие с теми, которые получаются при строго линейной реологии. Далее в случае $\zeta = 1$ будем без специальных уточнений говорить о линейно упругой роговице. Видно, что при умеренных (низких и нормальных – до 20 мм рт. ст.) значениях истинного давления p_0 влияние нелинейности на тонометрическую кривую невелико: поправка меньше 1 мм рт. ст. Они возрастают с уменьшением давления. При значениях p_0 порядка 20 мм рт. ст. поправка меняет знак (тонометрическая разность с возрастанием степени нелинейности теперь падает, а не растет) и с дальнейшим ростом давления довольно быстро увеличивается по абсолютной величине. При $p_0 \sim 30$ мм рт. ст. и $\zeta = 60$ она имеет для стандартных жесткостей порядок 2 мм рт. ст. Интересно, что тонометрические кривые при возрастании степени нелинейности заметно спрямляются: их форма приближается к линейной.

Исследуем теперь влияние на тонометрические кривые обеих жесткостей. На рис. 3а показано влияние отсчетной роговичной жесткости при нор-

мальной склеральной жесткости $E_s = 10$ МПа и разных значениях параметра нелинейности. При более высокой жесткости роговицы (и том же параметре нелинейности) тонометрическая разность меньше. С ростом давления тонометрическая разность падает, тогда как разность между тонометрическими разностями при разных жесткостях роговицы растет, и она тем больше, чем выше параметр нелинейности: при $p_0 \sim 30$ мм рт. ст. и $\zeta = 60$ эта величина имеет порядок 2 мм рт. ст. При общем совпадении характера поведения кривых с их поведением на рис. 2 значение давления, при котором поправка на нелинейность меняет знак, оказывается выше для более жесткой роговицы. Соответственно, значение этой поправки в области достаточно высоких давлений, где она существенна, меньше: при $p_0 \sim 30$ мм рт. ст. для средней роговицы ($E_c = 0.3$ МПа) она достигает 2 мм рт. ст., а для более жесткой ($E_c = 0.6$ МПа) не превосходит 1 мм рт. ст.

Характер влияния жесткости роговицы на тонометрическую кривую заметно меняется в случае очень жесткой склеральной области. Из рис. 3б видно, что кривая, представляющая зависимость тонометрической разности от истинного давления при средней роговичной жесткости ($E_c = 0.3$ МПа) заметно загибается книзу, так что во всей области низких и умеренных давлений p_0 (не превосходящих 20 мм рт. ст.) тонометрическая разность практически (с точностью 1 мм рт. ст.) не зависит от давления. При заметно более жестких роговицах этот эффект не наблюдается, и с уменьшением давления тонометриче-

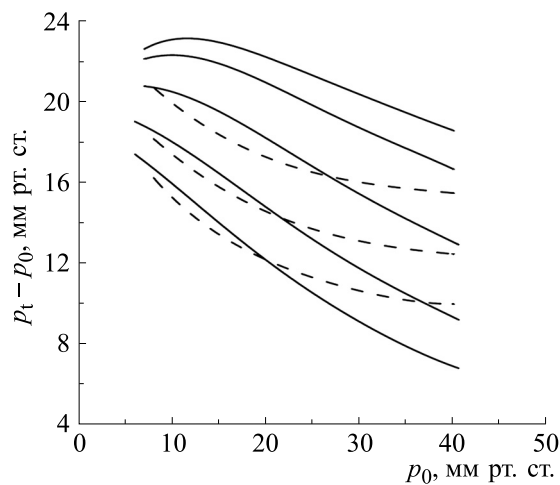


Рис. 4. Зависимость тонометрической разности от истинного давления для различных значений склеральной жесткости при отсчетной жесткости роговицы $E_c = 0.3$ МПа и весе плунжера $G = 7.5$ г. Сплошные кривые соответствуют нелинейной роговице ($\zeta = 60$), штриховые кривые — линейной роговице ($\zeta = 1$). Снизу вверх: склеральная жесткость для нелинейной роговицы (сплошные кривые) равна $E_s = 6, 10, 20, 40, 60$ МПа; для линейной роговицы (штриховые кривые) — $6, 10, 20$ МПа.

ская разность в этой области продолжает расти. В результате при давлении порядка $p_0 \sim 5$ мм рт. ст. для роговицы с отсчетной жесткостью $E_c = 0.3$ МПа она оказывается приблизительно на 4 мм рт. ст. больше, чем для роговицы с $E_c = 0.9$ МПа. При большой склеральной жесткости возрастание жесткости роговицы в области низких и умеренных давлений приводит уже не к убыванию, а возрастанию тонометрической разности. Представленная для сравнения штриховая кривая, соответствующая линейно упругой роговице со средней роговичной жесткостью ($E_c = 0.3$ МПа) и той же склеральной жесткостью 40 МПа, никакого загиба не демонстрирует, и тонометрическая разность с уменьшением давления продолжает расти. Таким образом, отмеченный эффект по существу связан с нелинейностью упругого поведения роговицы.

На рис. 4 показано влияние на тонометрическую кривую склеральной жесткости при нормальной отсчетной жесткости роговицы $E_c = 0.3$ МПа для веса плунжера $G = 7.5$ г. Как в линейном, так и в нелинейном случае тонометрическая разность с увеличением склеральной жесткости возрастает весьма значительно, и на тем большую величину, чем выше давление. При $p_0 \sim 30$ мм рт. ст. для нелинейной роговицы тонометрическая разность при $E_s = 60$ МПа больше тонометрической разности при $E_s = 6$ МПа на величину около 12 мм рт. ст. Нелинейность вносит не слишком значительную поправку, которая становится заметна при достаточно больших давлениях, при которых она с ростом давления возрастает. При

$p_0 \sim 30$ мм рт. ст. для кривых, приведенных на рис. 4, учет нелинейности уменьшает тонометрическую разность на величину не более 2 мм рт. ст. В нелинейном случае кривые «прямее», чем в линейном. Для больших склеральных жесткостей в этом случае наблюдается уже отмеченный выше эффект загиба кривой при малых давлениях.

Важнейшим остается вопрос о возможных ошибках при обработке данных тонометрии на основе тех соотношений, которые закреплены международными стандартами и используются в клинике [5, 6]. На рис. 5 показаны зависимости для расчета истинного давления по тонометрическому при нормальной склеральной жесткости $E_s = 10$ МПа и отсчетной жесткости роговицы $E_c = 0.6$ МПа для разных значений параметра нелинейности. Влияние нелинейности на тонометрические кривые сколько-нибудь заметно только при очень низких давлениях: для $\zeta = 60$ различие между кривыми, соответствующими линейному и нелинейному поведению роговицы, достигает при $p_0 < 10$ мм рт. ст. значений порядка 2 мм рт. ст. Отличие результатов нашего расчета от истинного давления, рассчитанного по тонометрическому в соответствии со стандартной методикой, оказывается в целом весьма значительно. Оно относительно невелико при малых давлениях. Учет нелинейности для таких давлений несколько приближает расчетные кривые к стандартным. С возрастанием давления расхождение возрастает. При $p_0 \sim 30$ мм рт. ст. отличие расчетных значений истинного давления от получаемых при стандартной обработке достигает 4 мм рт. ст.

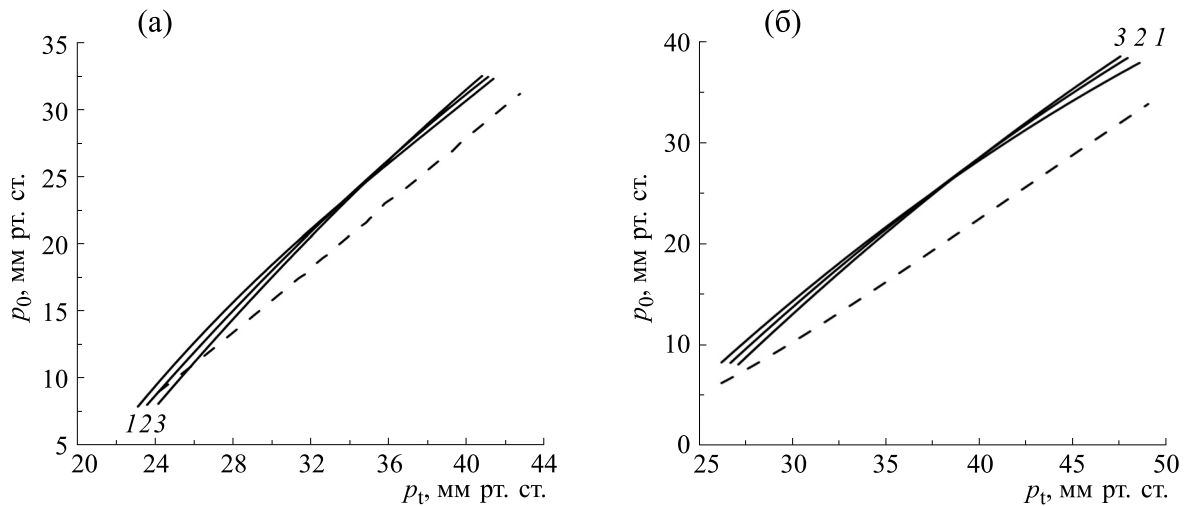


Рис. 5. Зависимость истинного давления от тонометрического для различных значений коэффициента нелинейности: $\zeta = 1$ (кривая 1), $\zeta = 30$ (кривая 2), $\zeta = 60$ (кривая 3) при $E_c = 0.6$ МПа, $E_s = 10$ МПа. Масса плунжера 5.5 г (а) и 7.5 г (б). Штриховая кривая соответствует зависимости, принимаемой при стандартной обработке данных.

для веса плунжера 5.5 г и 7 мм рт. ст. для плунжера весом 7.5 г.

Тем не менее, как видно из рис. 6, можно выбрать значения упругих констант глазного яблока таким образом, чтобы расчетные кривые с достаточно хорошей точностью (ошибка на интервале истинных давлений 7–30 мм рт. ст. меньше или порядка 1 мм рт. ст.) совпадали со стандартной зависимостью. При тонометрии плунжером с весом 5.5 г такое совпадение достигается при значениях констант $E_c = 0.3$ и $E_s = 12$ МПа, а при весе плунжера 7.5 г оно имеет место, например, при $E_c = 0.3$ и $E_s = 18$ МПа. Найти значения упругих параметров, при которых совпадение с такой точностью имеет место при обоих весах, не удастся. Однако если допустить меньшую точность совпадения (порядка 2.5 мм рт. ст., обычно считающуюся вполне достаточной при клинических измерениях) достаточное согласие расчетной и стандартной кривой при обоих весах имеет место, например, при $E_c = 0.3$, $E_s = 15$ МПа и $\zeta = 60$ (отсутствует на рис. 6). В задачу настоящей работы не входит анализ методики получения стандартной зависимости, да это с учетом давности соответствующих исследований в полной мере сейчас и невозможно. Можно предположить, что на результаты тех экспериментов оказало влияние использование при оценках энуклеированных глаз, для которых жесткость глазных тканей выше, чем для живых.

Рис. 7 наглядно демонстрирует отклонение расчетных истинных давлений от полученных с применением стандартной методики при различных упругих параметрах глазного яблока. Абс-

цисса каждой точки представленных на нем кривых равна истинному давлению, определенному по некоторому тонометрическому с использованием стандартной методики, а ордината — отклонению этой величины от начального давления, рассчитанного на базе нашей модели для того же тонометрического. Видно, что различия наиболее значительны при больших жесткостях роговицы,

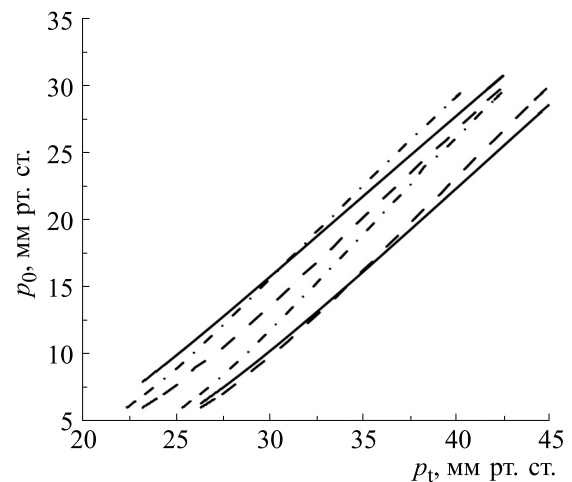


Рис. 6. Зависимость истинного давления от тонометрического для различных значений упругих коэффициентов при $\zeta = 60$ в сравнении со стандартной зависимостью (сплошные линии). Верхние кривые из каждой пары соответствуют весу плунжера 5.5 г, нижние — весу плунжера 7.5 г. Штриховые кривые рассчитаны для $E_c = 0.3$ МПа и $E_s = 18$ МПа, штрихпунктирные кривые — для $E_c = 0.3$ МПа и $E_s = 12$ МПа.

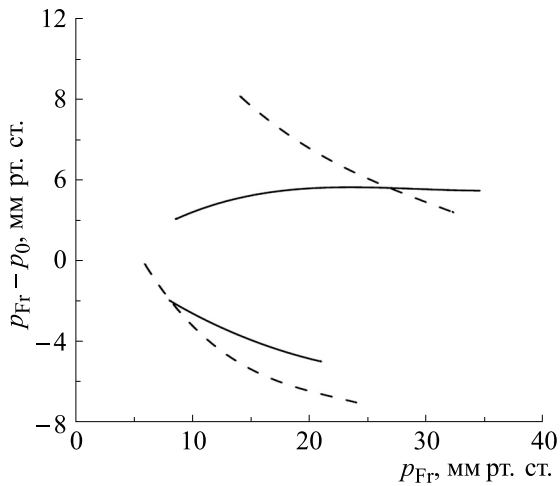


Рис. 7. Влияние упругих параметров глазного яблока на разность между истинным давлением, вычисленным по стандартной методике (p_{Fr}), и истинным давлением, рассчитанным на основании модели (p_0). Сплошные кривые соответствуют $E_c = 0.3$ МПа, штриховые кривые — $E_c = 0.9$ МПа. Верхняя пара кривых — $E_s = 40$ МПа, нижняя пара кривых — $E_s = 10$ МПа. Вес плунжера 7.5 г, $\zeta = 60$.

но давления, при которых различие особенно существенно, ниже при большой склеральной жесткости. В зависимости от величины склеральной жесткости разность $p_{Fr} - p_0$ может иметь разный знак.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная нами модель экспоненциально упругой роговицы позволяет оценивать влияние характеризующих упругость глазного яблока параметров при различных типах механического нагружения глазного яблока. На основе сравнения с результатами опытов, проводившихся на мертвой роговице, ранее была доказана эффективность этой модели и определен порядок упругих констант, в ней присутствующих. Заметим, что данные многочисленных экспериментов по растяжению вырезанных из роговицы фрагментов не позволяют непосредственно перейти к ее интегральным характеристикам, а кроме того сильно зависят от условий опыта. Разработанная же нами модель дает возможность оценивать эти характеристики в опытах как на целой роговице и интактном глазном яблоке, так и на живом глазу.

В настоящей работе на основании разработанного и тестированного нами интегрального подхода численно проанализировано влияние упругих характеристик глазного яблока на связь между тонометрическим и истинным давлениями при тонометрии по Шиотцу. Включение в рассмотрение параметра, эффективно характеризую-

ющего нелинейность упругого поведения роговицы, дало возможность сравнить влияние степени этой нелинейности с влиянием других интегральных упругих характеристик: роговичной и склеральной жесткостей. Поскольку ранее было показано, что нелинейностью упругого поведения склерального сегмента в задачах тонометрии можно пренебречь, такой анализ можно считать полным, если речь не идет о случаях сильной пространственной (геометрической или механической) неоднородности.

Оказалось, что даже в случае тонометрии по Шиотцу, при которой разность между тонометрическим и истинным давлениями относительно велика, влияние нелинейности на связь между ними в большинстве случаев не слишком значительно. Поправка к результатам расчета истинного давления по тонометрическому вследствие учета нелинейности оказывается весьма существенной лишь при достаточно больших истинных давлениях — порядка 30 мм рт. ст. и выше. Для таких давлений учет нелинейности уменьшает тонометрическую разность. В общем же случае поправка имеет разный знак в зависимости от величины давления. Обнаружена отсутствующая в линейной модели возможность немонотонной зависимости тонометрической разности от давлений, когда последние малы. Непосредственно на результат тонометрии (т.е. на зависимость истинного давления от тонометрического) этот эффект влияет мало, но может сказаться при дифференциальной тонометрии.

Зависимость от обеих присутствующих в модели жесткостей, как правило, более существенна, чем влияние нелинейности. Особенно велико влияние склеральной жесткости: расчет по ее среднему значению может давать громадную ошибку — до 10 мм рт. ст. и более. При большой склеральной жесткости существенным становится и влияние жесткости роговицы: ее возрастание в этом случае ведет при малых и умеренных истинных давлениях к увеличению тонометрической разности. В случае очень жесткой склеральной области растяжимость роговицы, хотя и занимающей существенно меньшую, чем склера, часть оболочки глаза, становится решающим фактором.

Имеются такие значения параметров, характеризующих жесткость глазного яблока, при которых стандартные зависимости, используемые в клинике при обработке данных тонометрии по Шиотцу, с практической точностью дают правильные результаты. Вообще говоря, они различны для плунжеров разного веса, однако при некотором ослаблении критериев можно подобрать такие наборы характеристик, которые дают приемлемое совпадение для обоих рассмотренных весов. В целом, для наиболее часто используемо-

го плунжера весом 5.5 г отклонения оказываются, хотя и заметными, но относительно умеренными, если упругие параметры остаются вблизи средних значений. Однако при весе плунжера 7.5 г расхождение полученных с помощью стандартной методики оценок истинного давления с расчетными может оказаться значительным и в этом случае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка внутриглазного давления с помощью единственного тонометрического измерения игнорирует индивидуальные упругие характеристики обследуемого глаза. Если все же необходимость в такой оценке есть, использование нашей модели при средних значениях упругих констант представляется более обоснованным, чем расчет на основе стандартных зависимостей. Тем не менее даже такой уточненный подход приводит к ошибкам, которые могут стать фатальными при обследовании глаза с аномальными упругими характеристиками. А глаукомный глаз, как правило, именно таков.

Тонометрия одним тонометром (даже при использовании разных весов плунжера) не дает возможности надежно оценить механическое состояние (внутриглазное давление) и механические (упругие) характеристики глаза [24]. Полностью корректный подход должен включать несколько измерений с использованием по крайней мере двух разных тонометров с последующей численной обработкой результатов.

Промежуточное положение занимает метод дифференциальной тонометрии, когда используется нагружение одним тонометром с двумя (или более) разными грузами. Он дает возможность получить некоторую (хотя и неполную) информацию об индивидуальных механических свойствах глаза. Традиционное представление о том, что по результату только дифференциальной тонометрии можно судить о жесткости глаза (ригидности), вообще говоря, неверно: измеряемый показатель (коэффициент эластоподъема) существенно зависит от давления [24]. Исследованию этого метода с учетом нелинейности упругих свойств роговицы будет посвящена отдельная работа. Отметим, что при расчетах в широком диапазоне параметров для определенных их комбинаций получены высокие значения коэффициента эластоподъема (выше 2 мм рт. ст./г). Такие значения, измеренные у некоторых пациентов в клинике, ранее не удавалось получить в рамках линейной модели.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госпрограммы АААА-А19-119012990119-3.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. Н. Моисеева и А. А. Штейн, Изв. РАН. Механика жидк. и газа, № 5, 3 (2011).
2. Г. А. Любимов, И. Н. Моисеева и А. А. Штейн, Изв. РАН. Механика жидк. и газа, № 6, 5 (2014).
3. И. Н. Моисеева и А. А. Штейн, Росс. журн. биомех., **19** (3), 243 (2015).
4. И. Н. Моисеева, А. А. Штейн и Г. А. Любимов, Биофизика, **64** (5), 1030 (2019).
5. J.S. Friedenwald, Am. J. Ophthalmol., **20** (10), 985 (1937).
6. J. S. Friedenwald, *Standartization of Tonometers: Decennial Report by the Committee on Standartization of Tonometers* (Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol., 1954).
7. R. A. Moses, Trans. Am. Ophthalmol. Soc., **69**, 494 (1971).
8. A. Elsheikh, D. Wang, A. Kotecha, et al., Ann. Biomed. Eng., **34**, 1628 (2006).
9. С. М. Бауэр, Л. А. Венатовская, Д. В. Франус и Л.А. Федотова, Росс. журн. биомех., **19** (2), 136 (2015).
10. I. G. Pallikaris, G. D. Kymionis, H. S. Ginis, et al., Invest. Ophthalm. Vis. Sci., **46** (2), 409 (2005).
11. J. H. Clark, Am. J. Physiol., **101**, 474 (1932).
12. F. J. Macri, T. Wanko, and P. A. Grimes, AMA Arch. Ophthalmol., **60** (6), 1021 (1958).
13. E. H. McBain, AMA Arch. Ophthalmol., **60** (6), 1080 (1958).
14. D. M. Silver and O. Geyer, Curr. Eye Res., **20** (2), 115 (2000).
15. D. W. Dyk and K. M. Miller, J. Cataract Refract. Surg., **44**, 231 (2018).
16. M. R. Bryant and P. J. McDonnell, J. Biomech. Eng., **118** (4), 473 (1996).
17. K. Anderson, A. El-Sheikh, and T. Newson, J. Roy. Soc. Interface, **1** (1), 3 (2004).
18. A. Elsheikh, D. Alhasso, and P. Rama, Exp. Eye Res., **86**, 783 (2008).
19. А. А. Штейн, И. Н. Моисеева и Г. А. Любимов, Росс. журн. биомех., **23** (3), 375 (2019).
20. И. Н. Моисеева, А. А. Штейн и Г. А. Любимов, Росс. журн. биомех., **24** (4), 412 (2020).
21. И. Н. Моисеева и А. А. Штейн, Росс. журн. биомех., **24** (3), 272 (2020).
22. В. Liu, S. McNally, J. I. Kilpatrick, et al., Surv. Ophthalmol., **63** (1), 56 (2018).
23. И. Н. Моисеева и А. А. Штейн, Росс. журн. биомех., **25** (3), 230 (2021).
24. И. Н. Моисеева, А. А. Штейн и Г.А. Любимов, Биофизика, **61** (6), 1219 (2016).

Influence of Nonlinearity of the Elastic Properties of the Cornea on the Results of Schiötz Tonometry: Estimation on the Basis of a Two-Component Mathematical Model

I.N. Moiseeva* and A.A. Stein*

**Institute of Mechanics, Lomonosov Moscow State University, Michurinsky prosp. 1, Moscow, 117899 Russia*

During Schiötz tonometry the cornea of the eye, previously loaded with a concave heavy stamp (footplate), is additionally loaded with a rod (plunger), by the depth of immersion of which into the cornea the intraocular pressure is estimated. Mathematical modeling of this process is performed on the basis of an effective model of the eyeball, previously developed and tested by the authors. In contrast to the basic (physically linear) version of this model, the elastic properties of the system are characterized here not by two, but by three essential parameters, one of which is responsible for the nonlinearity of the elastic behavior of the cornea. The influence of such a nonlinearity on the tonometric difference, i.e., the excess of the tonometric pressure (in the eye loaded with a tonometer) over the true one (before loading), is analyzed numerically. The possibility of a nonmonotonic dependence of the tonometric difference on the true pressures when the latter are small, which is absent in the linear model, is found. The correction introduced by the nonlinearity into the calculation of the true pressure from the tonometric one is estimated. This correction has a different sign depending on the true pressure and turns out to be significant for sufficiently high values of this quantity: in this case, taking into account the nonlinearity reduces the tonometric difference. However, the dependence on both stiffnesses present in the model (corneal and scleral) is in most cases more significant than the effect of nonlinearity. The use of the average values of these stiffnesses instead of individual ones when calculating the true pressure can lead to fatal errors for the eyes, the stiffness of which strongly deviates from the average, which, in particular, occurs in glaucoma. The dependences used in the clinic during the standard processing of Schiötz tonometry data can give correct results with practical accuracy for some values of elastic parameters, but deviate significantly from the calculated ones even at average values of these constants, and the more noticeably the greater the weight of the plunger. A completely correct approach to estimating the mechanical state and mechanical characteristics of the eye should include several measurements with at least two different tonometers, followed by numerical processing of the results.

Keywords: eye, elastic properties, cornea, nonlinear elasticity, tonometry, Schiötz tonometer, mathematical modeling

УДК 577.3

ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦ В УСЛОВИЯХ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ

© 2022 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, А.Ю. Теплов*, С.Н. Гришин*, А.У. Зиганшин*

*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

**Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

На изолированных двигательных мышцах мыши: «быстрой» (m. EDL) и «медленной» (m. soleus) методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлена роль пресинаптического звена сигнализации в процессах адаптации к аллергии. Различия в динамике функциональных характеристик мышц под влиянием экзогенной АТФ у интактных и сенсibilизированных яичным альбумином животных демонстрируют участие пуринергических механизмов в развитии приспособительных изменений в пресинаптическом звене «быстрой» мышцы, и меньшее вовлечение этих механизмов на сходной структуре у «медленной» мышцы. В процессе белковой сенсibilизации комплексная работа АТФ зависимых механизмов как пост-, так и пресинаптической мембраны обеспечивает адекватную перестройку сократительной функции локомоторных мышц в условиях аллергии, и у разных мышц эти механизмы существенно различаются.

Ключевые слова: белковая сенсibilизация, аллергия, АТФ, мышца, m. EDL, m. soleus.

DOI: 10.31857/S0006302922060157, EDN: LLXGMU

Изучение механизмов динамики сократительной функции мышечной системы в условиях аллергической перестройки остаются актуальными в современной спортивной медицине [1, 2]. В частности, как известно, обязательная вакцинация спортсменов перед соревнованиями приводит к изменению функции локомоторных мышц. Ранее нами было показано, что в условиях аллергии различные двигательные мышцы меняют силу своего сокращения на холиномиметик *in vitro*, что указывает на участие в механизмах адаптации постсинаптического звена сигнализации. Была продемонстрирована роль пуринергических механизмов в этих процессах. При этом у мышц с различным волоконным составом способность изменять силу своего сокращения на карбахолин после аппликации экзогенной АТФ проявляется в разной степени. Механизмы адаптации в условиях развивающейся аллергии у разных мышц также существенно различаются. В частности, если «медленная» мышца в условиях белковой сенсibilизации увеличивала силу своего карбахолин-индуцированного сокращения, то у «быстрой» мышцы наблюдалась обратная картина [3, 4]. И

если у «медленной» мышцы постсинаптический эффект обеспечивался АТФ-зависимыми механизмами, то у «быстрой» мышцы их реализация осуществлялась каким-то иным путем. Адаптация перечисленных мышц к аллергическим изменениям не ограничивается постсинаптическим звеном сигнализации, и мы можем предполагать иные механизмы реализации этих эффектов.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли пуринергических механизмов различных двигательных мышц мыши: «быстрой» — m. EDL и «медленной» — m. soleus в процессах адаптации организма при аллергической перестройке.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах m. soleus и m. EDL 24 белых мышей обоего пола, массой 25–32 г. Животных содержали в специальных боксах на обычном пищевом режиме, со свободным доступом к воде. Опытную группу животных предварительно сенсibilизировали овальбумином [3]. В качестве контроля использовали несенсibilизированных мышей.

Сокращение: БС — белковая сенсibilизация.

Условия проведения экспериментов по регистрации параметров сокращения. Мышечный препарат помещали вертикально в термостатируемых ванночках объемом 10 мл. Один конец мышцы был зафиксирован, другой при помощи лигатуры крепили к датчику механической активности. Ванночку заполняли модифицированным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄·7H₂O – 1.18, глюкоза – 11.0, pH 7.4 ± 0.1. Условия изометрии достигались растяжением препарата мышцы в ванночке в течении 20 мин с силой 0.5 г при постоянной перфузии раствором при температуре 37°C. Сократительные реакции изолированной мышцы вызывались при помощи электрического стимулятора MultiStim D330 (Digitimer, Великобритания) [5]. Прямоугольные электрические импульсы частотой 0.1 Гц и длительностью 0.5 мс наносились в течении двух минут (12 пиков). Среднее значение силы всех 12 сокращений анализировали как один результат. Силу сокращения оценивали в граммах. Ответы записывали с помощью изометрического механического датчика FSG-01 (Linton Instrumentation, Великобритания) и аналого-цифрового преобразователя MP100WSW (Vigorack, США) [6, 7]. Результаты исследования наблюдали на мониторе и хранили на персональном компьютере.

Эффекты пуринергических агонистов и антагонистов. В начале эксперимента сократительные ответы мышц на электрическую стимуляцию регистрировались дважды с интервалом 5 мин (для оценки стабилизации ответов). Раствор АТФ добавляли в концентрации 100 мкМ в ванночку с раствором Кребса, через 10 мин инкубации записывали сократительные ответы на электрическую стимуляцию. Затем ткань промывали несколько раз и инкубировали в течение 20 мин антагонистом (сурамином в концентрации 100 мкМ). После этого добавляли агонист (АТФ в концентрации 100 мкМ) и сократительные ответы записывали повторно. Все сократительные ответы вычисляли в процентах от исходных сокращений.

Достоверность различий. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы для статистической обработки SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

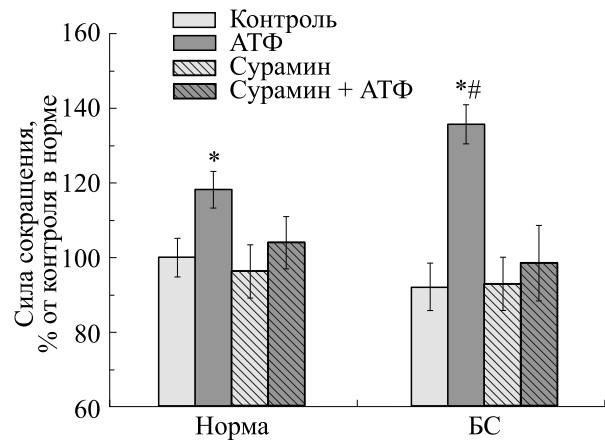


Рис. 1. Сила сокращений *m. EDL* мышцы, вызванных электрической стимуляцией у интактных («Норма», $n = 14$) и сенсibilизированных («БС», $n = 10$) животных, в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * – $p < 0.05$ от контроля в норме, # – $p < 0.05$ относительно эффектов в норме.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции снижала силу своего сокращения при белковой сенсibilизации (БС). Если у несенсibilизированной мышцы она составляла 302.4 ± 15.7 мг ($n = 14$), то в опытной серии – 278.5 ± 19.3 мг ($n = 10$).

Действие экзогенной АТФ (100 мкМ) на *m. EDL* обеих групп животных демонстрировало следующую динамику силы сокращения. У несенсibilизированных мышцей этот показатель возрастал до 357.4 ± 14.8 мг, то есть на 18.2% ($n = 14$, $p < 0.05$); у сенсibilизированных животных – до 410.3 ± 15.7 мг, то есть на 47.3% относительно контроля ($n = 10$, $p < 0.05$, рис. 1). Более выраженное увеличение силы сокращения «быстрой» мышцы у второй группы животных (18.2% против 47.3%; $p < 0.05$) свидетельствует об участии пуринергических механизмов пресинаптических образований в процессах адаптации. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

«Медленная» мышца в условиях электростимуляции увеличивала силу своего сокращения при БС. Если у несенсibilизированной мышцы она была 411.5 ± 18.5 мг ($n = 14$), то в опытной серии – 533.3 ± 29.2 мг ($n = 10$).

Влияние экзогенной АТФ на *m. soleus* обеих групп животных на различия в силе сокращения носило потенцирующий характер. Мы получили следующие значения. У несенсibilизированных мышцей показатель силы сокращения возрастал до

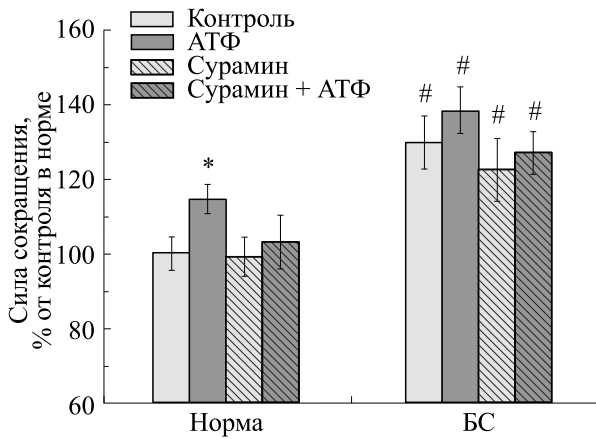


Рис. 2. Сила сокращений *m. soleus* мышцы, вызванных электрической стимуляцией, интактных («Норма», $n = 14$) и сенсibilизированных («BC», $n = 10$) животных в отсутствие и в присутствии АТФ (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ). Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * – $p < 0.05$ от контроля в норме, # – $p < 0.05$ относительно эффектов в норме.

471.1 ± 16 мг ($n = 14$, $p < 0.05$). У сенсibilизированных животных до 568.7 ± 25.5 мг ($n = 10$, $p > 0.05$, рис. 2). Различия в АТФ-опосредованном потенцировании силы сокращений до 14.5% в норме и до 8.6% при сенсibilизации не носят статистически достоверного характера. Инкубация мышцы с сурамином (100 мкМ) полностью предупреждала влияние АТФ на силу сокращений.

Таким образом, у *m. EDL* в процессе сенсibilизации подключаются пуринергические механизмы адаптации в пресинаптическом звене сигнализации. В противоположность этому, у *m. soleus* в сходных структурах данные механизмы задействованы незначительно либо вовсе не вовлекаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют данные, подтверждающие наличие постсинаптических и пресинаптических эффектов пуринов [8]. Определенную сложность в исследования вносит тот факт, что в физиологических условиях влияние АТФ и метаболитов в нервно-мышечном синапсе минимально, но становится более выраженным в некоторых патофизиологических ситуациях, таких как стресс [9], гипогравитация [10], травмы [11], ишемия или гипотермия [6, 7, 12, 13]. Кроме того, существуют данные, демонстрирующие разнонаправленность действия АТФ в нервно-мышечном синапсе разных типах двигательных единиц.

Модель электростимуляционной механомиографии позволяет анализировать процессы в пре-

синаптическом образовании. Результаты экспериментов показывают, что в «быстрых» и «медленных» мышцах мышцы в условиях БС включаются различные механизмы адаптации. Сенсibilизация разнонаправленно влияет на силу сокращения различных мышц *in vitro*. Если у «быстрой» мышцы она незначительно снижалась, то у «медленной» мышцы существенно возрастала.

Сравнение силы сокращения до и после аппликации АТФ демонстрирует работу пуринергических механизмов, которые существенно различаются у разных мышц, как у контрольных, так и у сенсibilизированных животных.

Невысокая лабильность силы сокращения «медленной» мышцы в условиях электростимуляции до и после воздействия АТФ у контрольных и сенсibilизированных мышцей свидетельствует о малом вовлечении пуринергических механизмов пресинаптической мембраны в процессах адаптации этой мышцы к аллергии.

Соотношение результатов, полученных на двух моделях инициации сокращения – электростимуляцией и холиномиметиком [3] позволяет отделить участие пост- и пресинаптической мембраны в процессах адаптации. В частности, у «медленной» мышцы в условиях аллергической перестройки показана работа АТФ-зависимых механизмов постсинаптической мембраны.

«Быстрая» мышца в условиях электростимуляции незначительно снижала силу своего сокращения, что обеспечивается механизмами пресинаптической мембраной. «Медленная» мышца, напротив, в условиях электростимуляции существенно увеличивает силу своего сокращения. Но адаптация в условиях развивающейся аллергии реализуется за счет работы постсинаптической мембраны и АТФ-зависимые механизмы пресинаптической мембраны в адаптации не участвуют.

Полученные методом непрямой электростимуляции данные дополняют общую схему изменений синаптических структур различных двигательных мышц, что обеспечивает развитие сложных механизмов адаптации при аллергической перестройке организма.

ВЫВОДЫ

Механизмы адаптации у «быстрых» и «медленных» локомоторных мышц мышцы в условиях аллергической перестройки организма имеют существенные различия. В условиях электростимуляции увеличение силы сокращения *m. EDL in vitro* сенсibilизированной мышцы после влияния экзогенной АТФ в сравнении с контролем более выражено. Адаптация «быстрой» мышцы в описанных условиях реализуется через пуринер-

гические механизмы пресинаптической мембраны.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство» (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского федерального университета, а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому государственному медицинскому университету Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Kjøbsted, N. Munk-Hansen, J. B. Birk, et al., *Diabetes*, **66** (3), 598 (2017).
2. D. Shrikrishna, R. J. Tanner, J. Y. Lee, et al., *Chest*, **146** (4), 932 (2014).
3. A. Y. Teplov, S. N. Grishin, M. A. Mukhamedyarov, et al., *Exp. Physiol.*, **94** (2), 264 (2009).
4. А. Ю. Теплов, А. М. Фархутдинов, О. В. Теплов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (9), 262 (2010).
5. L. P. Boulet and P. M. O'Byrne, *New Engl. J. Med.*, **372** (7), 641 (2015).
6. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., *Muscle & Nerve*, **55** (3), 417 (2017).
7. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle & Nerve*, **59** (4), 509 (2019).
8. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6423 (2020).
9. A. Ziganshin, R. Kamaliev, A. Gabdrakhmanov, et al., *Int. J. Pharmacol.*, **14** (8), 1198 (2018).
10. A. E. Khairullin, S. N. Grishin, and A. A. Ereemeev, *Biophysics*, **64** (5), 828 (2019).
11. A. E. Khairullin, D. V. Efimova, V. A. Markosyan et al., *Biophysics*, **66** (3), 483 (2021).
12. A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics*, **64**, 812 (2019).
13. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics*, **65**, 858 (2020).

Purinergic Mechanisms of Adaptation of Different Types of Motor Units in the Conditions of Allergic Reorganization

A.E. Khairullin*, **, A.Yu. Teplov*, S.N. Grishin*, and A.U. Ziganshin*

*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

The role for presynaptic signaling was found in the processes of adaptation to allergies during isometric contractions of mouse EDL (fast) and soleus (slow) muscles evoked by electrical stimulation and mechanomyography. Differences in the dynamics of functional characteristics of muscles under the influence of exogenous ATP in intact and egg albumin-sensitized animals demonstrate that purinergic mechanisms are involved more in the development of adaptive changes in the presynaptic side of the "fast" muscle than in the «slow» muscle. In the process of protein sensitization, the complex work of ATP-dependent mechanisms of the postsynaptic membrane and the presynaptic membrane ensures an adequate reorganization of the contractile function of locomotor muscles in case of allergy and these mechanisms differ significantly in different muscles.

Keywords: protein sensitization, allergy, ATP, mouse, m. EDL, m. soleus

УДК 51-76+57.087

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ТРАНСПОРТА РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ, МЕЧЕННЫХ ГАЛЛИЕМ-68

© 2022 г. А.С. Лунёв*., #, К.А. Лунёва*, **, Ф.И. Василевич**, М.Г. Рахимов*, А.А. Ларенков*

*ГНЦ РФ – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России,
ул. Живописная, 46, Москва, 123098, Россия

**Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина,
ул. Академика Скрябина, 23, Москва, 109472, Россия

#E-mail: mr.alekslunev@gmail.com

Поступила в редакцию 07.06.2022 г.

После доработки 02.08.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

При внутривенном введении радиофармацевтического препарата происходит его встраивание в метаболические пути организма путем связывания с транспортными молекулами, от кинетики которых будет зависеть достижение конечного результата – терапевтического или диагностического эффекта. Создание математической модели кинетики транспорта радиофармацевтического препарата *in silico* позволяет количественно оценить его переход между органами – камерами или компартментами. Одними из перспективных агентов для диагностической визуализации злокачественных новообразований и ревматоидных патологий являются конъюгаты фолиевой кислоты, меченные галлием-68. Исследование кинетики радиофармацевтических препаратов на основе фолиевой кислоты, опирающееся на результаты экспериментальных данных, полученных на крысах линии Wistar с моделями воспалительных процессов различной этиологии, подтвердило, что дополнительное введение в молекулу аминокислотного фрагмента His-Glu-His-Glu (в составе конъюгата [⁶⁸Ga]Ga-FA-II) позволяет значительно снизить накопление радиоактивности в почках по сравнению с немодифицированным аналогом [⁶⁸Ga]Ga-FA-I. Изменение фармакокинетических параметров при введении аминокислотного фрагмента подразумевает значительное снижение лучевых нагрузок на критические органы и ткани и благоприятно скажется на возможности применения исследуемых соединений в визуализации патологических процессов методом позитронно-эмиссионной томографии.

Ключевые слова: фармакокинетика, камерная модель, фолаты, радиофармпрепарат, биораспределение, галлий-68.

DOI: 10.31857/S0006302922060199, EDN: LLXPGC

При внутривенном введении радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) происходит его встраивание в метаболические пути организма путем связывания с транспортными молекулами, от кинетики которых будет зависеть достижение конечного результата – терапевтического или диагностического эффекта [1]. Однако применение РФЛП в диагностических или терапевтических целях сопряжены с риском развития ряда осложнений, напрямую связанных с ионизирующим излучением радионуклида [2, 3]. Поэтому на этапе разработки РФЛП необходимо рассчитать прогностические значения по-

глощенных доз, создаваемых в органах и тканях, для анализа которых необходимо построить камерную модель для исследования кинетики РФЛП.

Создание математической модели кинетики транспорта РФЛП *in silico*, опираясь на экспериментальные данные, позволяет количественно оценить переход РФЛП между органами – камерами или компартментами [4]. Метод камерных моделей и построения экспоненциальных функций камерного накопления-выведения дает возможность строить индивидуальные модели для конкретных РФЛП и анализировать их поведение в критических органах и патологических очагах.

Одними из перспективных агентов для диагностической визуализации методом позитрон-

Сокращения: РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат, ЮИА – ювенильный идиопатический артрит.

но-эмиссионной томографии злокачественных новообразований и ревматоидных патологий являются производные фолиевой кислоты, меченные галлием-68 [5, 6].

Ранее нами были проведены эксперименты *in vitro* и *ex vivo*, доказывающие возможность диагностического применения синтезированных соединений на основе фолиевой кислоты, меченных галлием-68, для визуализации злокачественных новообразований методом позитронно-эмиссионной томографии. Причина, по которой радиоконъюгаты фолиевой кислоты до сих пор практически не используются в клинической практике, может быть связана с их нежелательным высоким накоплением в ткани почки, которое является наиболее сложным препятствием для их внедрения в клиническую практику радиофармпрепаратов на их основе [7]. Исследование кинетики транспорта ^{68}Ga -меченных производных фолиевой кислоты поможет количественно описать течение процесса *in vivo*, а также правильно и корректно интерпретировать выбор определенного конъюгата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все процедуры проведенного исследования соответствовали принципам надлежащей лабораторной практики [8].

Основное различие между [^{68}Ga]Ga-FA-I и [^{68}Ga]Ga-FA-II заключается в наличии аминокислотного фрагмента His-Glu-His-Glu в [^{68}Ga]Ga-FA-II, добавленного с целью уменьшения накопления в почках *in vivo*. Проведенные ранее эксперименты показали обнадеживающие результаты – при изучении биораспределения накопление (%/г от введенной активности) в почках [^{68}Ga]Ga-FA-II было в два-три раза ниже, чем [^{68}Ga]Ga-FA-I [7].

В качестве тест-систем были взяты крысы самки линии Wistar массой 234 ± 27 г, полученные из сертифицированного питомника лабораторных животных «Филиал «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России». Экспериментальных животных содержали в требуемых условиях, на стандартной полнорационной диете, свободном доступе к питьевой воде и пище. Животные были включены в эксперимент после десятидневного карантина. Все манипуляции с животными, в том числе, связанные с их эвтаназией, выполняли согласно Европейской Конвенции по их защите, изложенной в директиве Европейского сообщества [9] и Директиве по охране животных, используемых в научных целях [10].

Методика моделирования системного ювенильного идиопатического артрита на крысах. Методика моделирования системного ювенильного

идиопатического артрита (ЮИА) изложена в патенте РФ «Способ создания биологической модели системного ювенильного идиопатического артрита в эксперименте» [11].

Крысам в ступню правой задней конечности вводили внутрикожно 0.1 мл полного адьюванта Фрейнда (ThermoFisher Scientific, США). Затем внутривнутрибрюшинно вводился препарат «Пирогенал» (Филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия) в концентрации 50 мкг/мл, из расчета 1 мкг на крысу, доведенный до 1 мл водой для инъекций. Контрольным животным внутривнутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора. Внешнее состояние крыс после проведения инъекционных процедур сохранялось в норме. Наблюдение за состоянием животных проводили ежедневно.

На восемнадцатые сутки проводили повторную иммунизацию путем внутривнутрибрюшинного введения препарата «Пирогенал» 50 мкг/мл, из расчета 2 мкг на крысу, доведенного до 1 мл водой для инъекций. Контрольным животным внутривнутрибрюшинно вводился 1 мл физиологического раствора.

На 39 сутки была проведена очередная иммунизация путем внутривнутрибрюшинного введения препарата Пирогенал (50 мкг/мл, из расчета 10 мкг на крысу), доведенного до 1 мл водой для инъекций. Контрольным животным внутривнутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора.

Методика моделирования острого септического воспалительного процесса на крысах. Для моделирования септического воспаления мягких тканей использовали культуру клеток *E. coli*. Клетки культивировали в течение трех суток в термостате в среде LB (10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта и 10 г хлорида натрия на 1 л среды). Микробные тела в количестве $4 \cdot 10^6$ в объеме 0.2 мл вводили крысам внутримышечно в двуглавую мышцу бедра, после чего на пятые сутки развивалась острая форма воспаления [12, 13].

Методика моделирования острого асептического воспалительного процесса на крысах. Традиционно для экспериментального воспроизведения гнойного асептического воспаления используют различные химические раздражающие агенты. Скипидарное воспаление было выбрано для настоящего исследования как легко воспроизводимая, точно дозируемая и безопасная для персонала классическая модель острого локального асептического воспаления с выраженной клеточной реакцией [14]. Асептическое воспаление вызывали путем внутримышечного введения 0.2 мл скипидара в двуглавую мышцу бедра. Рекомендуемый объем вводимого раствора скипидара был получен опытным путем при анализе зависимости введения различного объема ирританта от процента гибели животных, сроков формирова-

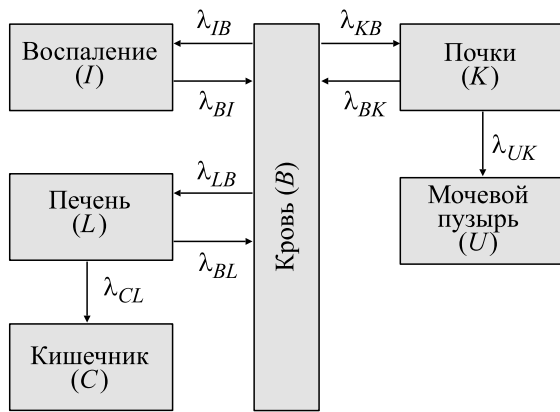


Рис. 1. Камерная модель кинетики транспорта исследуемых РФЛП.

ния и степени развития воспаления. Раствор скипидара стерилизовали фильтрованием через стерилизующий фильтр.

Исследование биораспределения *ex vivo*. Изучение биораспределения исследуемых радиофармацевтических соединений проводили на 42-е сутки от начала моделирования ЮИА и на 5-е сутки моделирования воспалительных процессов различной этиологии. Животные были разбиты на шесть групп, сформированных по критериям модели патологии и введения исследуемого радиофармацевтического соединения по пять крыс в каждой группе. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$ и $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$ (0.5 нмоль, 100 мкл; 500 нМ), 10–12 МБк/100 мкл для каждого меченого конъюгата) вводили внутривенно в объеме 0.1 мл. Радиохимическая чистота всех препаратов $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$ и $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$, используемых для биологических исследований, составляла $\geq 98\%$. Изучение биораспределения *ex vivo* проводили через 30, 60, 120 и 240 мин после внутривенного введения. Животных подвергали эвтаназии, отбирали органы и ткани (кровь, почки, печень, кишечник, мочевой пузырь с содержимым, патологический очаг), взвешивали пробы. Радиоактивность в отобранных пробах органов и тканей измеряли методом прямой радиометрии на автоматическом гамма-счетчике Wizard 2480 (PerkinElmer, США) с последующим определением содержания в них радиоактивности и выражали в %/орг или %/г органа.

Моделирование камерного перехода. Если орган (для математической модели и далее по тексту – камера) является открытой системой, то, кроме физического распада со скоростью $\lambda_{\text{физ}}$, ч^{-1} , меченый препарат будет подвергаться биологическому выведению со скоростью $\lambda_{\text{биол}}$, ч^{-1} . Поэтому общая эффективная скорость выведения $\lambda_{\text{эфф}}$,

описывающая время, за которое радиоактивность в камере снижается в два раза, равна (формула 1):

$$\lambda_{\text{эфф}} = \lambda_{\text{физ}} + \lambda_{\text{биол}}. \quad (1)$$

На рис. 1 показана камерная модель, описывающая кинетику исследуемых препаратов. Отражены камеры с наиболее активным накоплением РФЛП. Модель разбита на шесть камер с эффективными константами скоростей накопления и выведения.

При внутривенном введении исследуемых РФЛП происходит их дальнейшая миграция по камерам, кинетика которой может быть описана системой дифференциальных уравнений (формула 2):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dI}{dt} = \lambda_{IB}B - \lambda_{BI}I, \\ \frac{dL}{dt} = \lambda_{LB}B - (\lambda_{BL} + \lambda_{CL})L, \\ \frac{dK}{dt} = \lambda_{KB}B - (\lambda_{BK} + \lambda_{UK})K, \\ \frac{dU}{dt} = \lambda_{UK}K, \\ \frac{dC}{dt} = \lambda_{CL}L, \\ \frac{dB}{dt} = \lambda_{BI}I + \lambda_{BL}L + \lambda_{BK}K - (\lambda_{IB} + \lambda_{LB} + \lambda_{KB})B, \end{array} \right. \quad (2)$$

где эффективные константы скоростей накопления и выведения имеют вид $\lambda_{\text{куда/откуда}}$ (I – очаг воспаления, B – кровь, L – печень, K – почки, U – мочевой пузырь, C – кишечник).

Решением представленной системы дифференциальных уравнений является нахождение уравнений показательных функций с эффективными скоростями накопления-выведения.

Из решения уравнений (2) следует, что лишь экскрецию мочевым пузырем и кишечником можно описать моноэкспонентой, тогда как биологическое поведение других камер описывается полиэкспоненциальными функциями (с несколькими скоростями выведения). Следует отметить, что зачастую быструю аккумуляцию удобно описывать линейной функцией, что значительно упрощает процесс ее последующего интегрирования.

Расчет фармакокинетических параметров. Суммирование значений интегрированных частей (накопления и выведения) функции позволит определить общую площадь под кривой (AUC – area under curve), физическим смыслом которой является число ядерных распадов (формула 3) в каждой исследуемой камере:

$$AUC = \int_0^{t_{\text{max}}} F_1(t) dt + \int_{t_{\text{max}}}^{\infty} F_2(t) dt = S + \frac{C_{\text{max}}}{\lambda_{BI}}, \quad (3)$$

Таблица 1. Значения исследуемых биологических констант скоростей для камерной модели кинетики транспорта ^{68}Ga -меченных конъюгатов фолиевой кислоты

Константы скоростей для камерной модели	Перенос между камерами (куда → откуда)	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$, ч^{-1}	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$, ч^{-1}
IV	Воспаление → кровь	5.595*	5.853*
VI (ЮИА)	Кровь → воспаление	0.633	0.540
VI (СВ)	Кровь → воспаление	0.671	0.211
VI (АВ)	Кровь → воспаление	0.871	0.267
LB	Печень → кровь	0.078	0.012
BL	Кровь → печень	0.285	0.070
CL	Кишечник → печень	0.652	0.301
KB	Почки → кровь	6.252*	7.841*
BK	Кровь → почки	→0	→0
UK	М. пузырь → почки	0.620	0.088
B	Общая скорость для крови	0.692	0.835

Примечание. ЮИА – ювенильный идиопатический артрит; СВ – септическое воспаление; АВ – асептическое воспаление. Физическая константа скорости ^{68}Ga – 0.613 ч^{-1} . * – Резкое накопление в течение 30 мин после введения.

где $F_1(t)$ – функция быстрой аккумуляции препарата в камере, ограниченной во времени $[0, t_{\max}]$; $F_2(t)$ – функция выведения препарата из камеры с константой скорости λ_B ; C_{\max} – угловой коэффициент, отражающий максимально возможное накопление препарата (или радиоактивности) в камере; S – площадь, отражающая резидентное время в отрезке быстрого накопления и ограниченная функцией $F_1(t)$.

Клиренс CL (формула 4) отражает элиминацию РФЛП путем его выведения из камеры или биотрансформации:

$$CL = \frac{IA}{AUC}, \quad (4)$$

где IA – значение введенной активности (injected activity), МБк или кБк.

Чем больше значение клиренса, тем меньше описанная площадь под кривой AUC и, как следствие, препарат быстрее покидает ту или иную камеру. Очевидно, что уменьшение числа ядерных распадов на единицу массы камеры снижает абсорбцию эмиссионной энергии и приводит к уменьшению лучевых нагрузок на пациента в будущем.

Зная клиренс, можно найти объем биораспределения V_d (формула 5), который показывает, какой объем займет введенный радиофармпрепарат с текущей концентрацией C в исследуемой камере (формула 6) – чем ниже концентрация, тем больше объем биораспределения

$$V_d = \frac{CL}{\lambda_{\text{эфф}}}, \quad (5)$$

$$C = \frac{IA}{V_d}, \quad (6)$$

где $\lambda_{\text{эфф}}$ – эффективная константа скорости крови, рассчитанная с помощью камерной модели и метода аппроксимации Рунге–Кутты.

Статистическая обработка полученных результатов. Все полученные данные обработаны методами математической статистики с применением компьютерной программы Statistica™ (TIBCO Data Science). При статистической обработке результатов исследования определяли показатели средних арифметических значений (M), стандартных отклонений с учетом отклонения значений выборки от средних арифметических ($\pm m$). Достоверность различий оценивали с использованием U -критерия Манна–Уитни. Частоты признаков сравнивали с использованием критерия χ^2 . Различия считали достоверными при $p \leq 0/05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При начальных условиях $B(0) = 1$; $I(0) = 0$; $L(0) = 0$; $K(0) = 0$; $C(0) = 0$; $U(0) = 0$ и далее экспериментальных данных накопления препарата во времени с помощью решения дифференциальных уравнений идентифицировали значения констант скоростей накопления и выведения для всех исследуемых камер (табл. 1). Следует отметить, что почти любая константа скорости явля-

Таблица 2. Значения фармакокинетических параметров для ^{68}Ga -меченных конъюгатов фолиевой кислоты

Камера	Введение ^{68}Ga]Ga-X	Площадь под кривой, кБк/мл·ч	Клиренс, мл/ч	Объем биораспределения, мл	Средняя концентрация, кБк/мл
Кровь	X = FA-I	11.0 ± 1.1	163.7 ± 17.2	125.5 ± 13.8	14.3 ± 1.3
	X = FA-II	7.2 ± 0.7	249.5 ± 26.2	172.3 ± 19.0	10.4 ± 0.9
ЮИА	X = FA-I	27.3 ± 2.8	65.9 ± 6.9	52.9 ± 5.8	34.0 ± 3.1
	X = FA-II	25.5 ± 2.6	70.6 ± 7.4	61.3 ± 6.7	29.4 ± 2.6
СВ	X = FA-I	18.4 ± 1.9	97.6 ± 10.2	76.0 ± 8.4	23.7 ± 2.1
	X = FA-II	19.0 ± 2.0	95.0 ± 10.0	115.2 ± 12.7	15.6 ± 1.4
АВ	X = FA-I	10.9 ± 1.1	165.7 ± 17.4	111.7 ± 12.3	16.1 ± 1.4
	X = FA-II	18.5 ± 1.9	97.3 ± 10.2	110.6 ± 12.2	16.3 ± 1.5
Печень	X = FA-I	13.4 ± 1.4	134.3 ± 14.1	106.2 ± 11.7	17.0 ± 1.5
	X = FA-II	9.8 ± 1.0	183.6 ± 19.3	200.9 ± 22.1	9.0 ± 0.8
Почки	X = FA-I	16.1 ± 1.7	111.7 ± 11.7	87.4 ± 9.6	20.6 ± 1.9
	X = FA-II	13.5 ± 1.4	133.7 ± 14.0	134.3 ± 14.8	13.4 ± 1.2
Легкие	X = FA-I	25.6 ± 2.6	70.2 ± 7.4	78.2 ± 8.6	23.0 ± 2.1
	X = FA-II	22.2 ± 2.3	81.0 ± 8.5	118.6 ± 13.0	15.2 ± 1.4
Кишечник	X = FA-I	11.0 ± 1.1	163.7 ± 17.2	125.5 ± 13.8	14.3 ± 1.3
	X = FA-II	7.2 ± 0.7	249.5 ± 26.2	172.3 ± 19.0	10.4 ± 0.9

Примечание. ЮИА – ювенильный идиопатический артрит; СВ – септическое воспаление; АВ – асептическое воспаление.

ется одновременно для одной камеры константой накопления, а для другой выведения.

Анализ камерной модели кинетики транспорта на основе результатов, представленных в табл. 1, показал, что после внутривенного введения происходит максимально быстрая миграция препарата из крови в очаги воспаления и почки для обоих препаратов в течение первого часа.

Однако ^{68}Ga]Ga-FA-II заметно медленнее (в три-четыре раза) выводился из очагов септического и асептического воспаления по сравнению с ^{68}Ga]Ga-FA-I. Скорость миграции ^{68}Ga]Ga-FA-II в печень также была в шесть раз ниже, после чего лишь 20% попадало в общий кровоток, а 80% мигрировало в кишечник, напротив, для ^{68}Ga]Ga-FA-I эти значения составляли около 30 и 70% соответственно, с точки зрения скоростей переноса между камерами. Определить точную скорость транспорта РФЛП из почек обратно в кровь достоверно не представилось возможным в силу постоянной фильтрации крови через них, однако скорость выведения ^{68}Ga]Ga-FA-II из почек в сторону мочевого пузыря была в семь раз выше, чем для ^{68}Ga]Ga-FA-I.

Фармакокинетические параметры для исследуемых препаратов представлены в табл. 2.

При снижении площади под кривой (рис. 2) прямо пропорционально увеличивался клиренс введенного РФЛП из камеры (рис. 3). Для большинства органов и тканей нет статистически достоверной разницы между площадями под кривой для двух препаратов, за исключением крови, асептического воспаления и кишечника, что говорит о более контрастной визуализации очагов воспаления при применении ^{68}Ga]Ga-FA-II.

Увеличение клиренса определенных камер приводит к разбавлению радиоактивности и снижению лучевых нагрузок. Так, клиренс крови, печени и кишечника от галлия-68 для ^{68}Ga]Ga-FA-II статистически достоверно был выше по сравнению с ^{68}Ga]Ga-FA-I при сохранении более низких значений для очагов воспаления, что позитивно подтверждает эффективность использования таких РФЛП для контрастной визуализации методом позитронно-эмиссионной томографии. Клиренс почек от радиоактивности не различался для обоих препаратов.

Объем биораспределения (рис. 4) находится в обратном пропорциональной зависимости со сред-

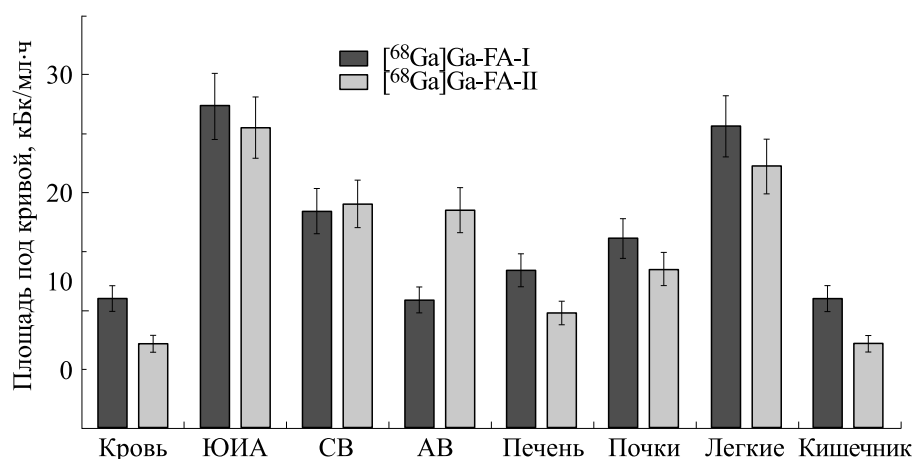


Рис. 2. Сравнение значений площади под кривой *AUC* для различных органов и тканей при введении ⁶⁸Ga-меченных конъюгатов фолиевой кислоты: ЮИА – ювенильный идиопатический артрит, СВ – септическое воспаление, АВ – асептическое воспаление.

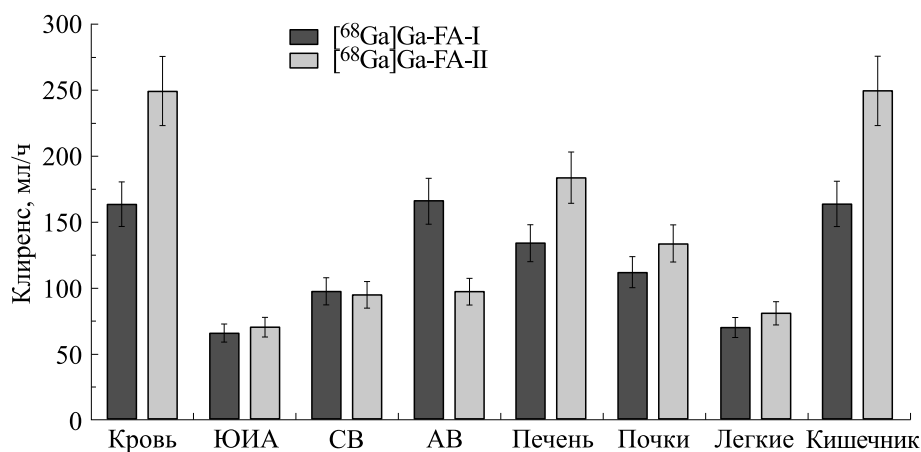


Рис. 3. Сравнение значений клиренса для различных органов и тканей от ⁶⁸Ga-меченных конъюгатов фолиевой кислоты: ЮИА – ювенильный идиопатический артрит, СВ – септическое воспаление, АВ – асептическое воспаление.

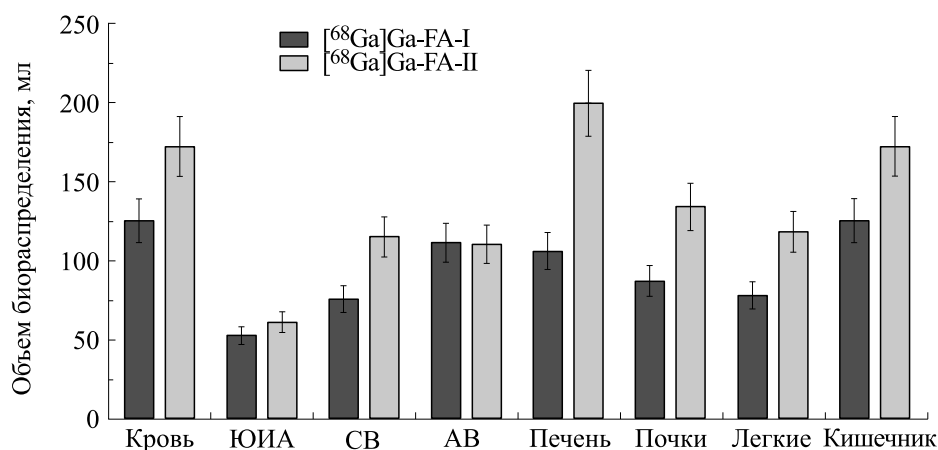


Рис. 4. Сравнение значений объема биораспределения для различных органов и тканей при введении ⁶⁸Ga-меченных конъюгатов фолиевой кислоты: ЮИА – ювенильный идиопатический артрит, СВ – септическое воспаление, АВ – асептическое воспаление.

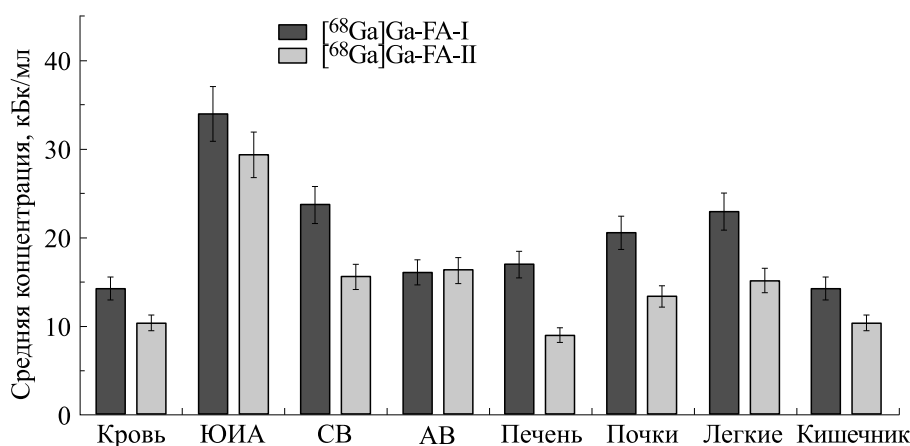


Рис. 5. Сравнение значений средней концентрации ^{68}Ga -меченных конъюгатов фолиевой кислоты для различных органов и тканей: ЮИА – ювенильный идиопатический артрит, СВ – септическое воспаление, АВ – асептическое воспаление.

ней концентрацией препаратов для органов и тканей (рис. 5).

Статистически достоверное различие в объеме биораспределения для многих органов и тканей подчеркивает разницу в фармакокинетическом поведении исследуемых препаратов: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$ из большинства органов и тканей выводится быстрее, чем $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$, при этом суммарно сохраняются одинаковые характеристики для очагов воспаления.

Таким образом, исследование кинетики транспорта радиофармацевтических препаратов на основе фолиевой кислоты подтвердило, что дополнительное введение в молекулу аминокислотного фрагмента His-Glu-His-Glu позволяет значительно снизить среднюю концентрацию (кБк/мл) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$ в почках (в 1.5 раза ниже по сравнению с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$) наряду со снижением накопления в три раза [7].

ВЫВОДЫ

Дополнительное введение в молекулу аминокислотного фрагмента His-Glu-His-Glu изменило динамику распределения соединения $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$ по сравнению с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-I}$. Наблюдалось снижение накопления $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FA-II}$ в почках, что позволило положительно скорректировать кинетику транспорта, согласно созданной камерной математической модели.

Изменение при введении аминокислотного фрагмента фармакокинетических параметров также подразумевает значительное снижение лучевых нагрузок на критические органы и ткани (кровь, печень, кишечник).

Математические расчеты количественно подтвердили, что дополнительное введение в молекулу

фрагмента His-Glu-His-Glu благоприятно скажется на возможности применения в визуализации воспалительных процессов методом позитронно-эмиссионной томографии.

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. В. И. Скворцова, *Ядерная медицина: справочник для персонала отделений, лабораторий и центров ядерной медицины*, 2-е изд., доп. (ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, М., 2020).
2. M. G. Stabin and J. A. Siegel, *Health Physics*, **85** (3), 294 (2003).
3. А. Н. Клёпов, Ю. А. Кураченко, В. А. Левченко и др., *Применение методов математического моделирования в ядерной медицине* (Обнинск, 2006).
4. A. Ferreira, H. Martins, J. C. Oliveira, et al., *Current Drug Metabolism*, **22** (2), 150 (2021).
5. C. Müller, *Molecules*, **18**, 5005 (2013).
6. M. Fernandez, F. Javaid, V. Chudasama, *Chem. Sci.*, **9** (4), 790 (2018).
7. A. Larenkov, M. Rakhimov, K. Lunyova, et al., *Molecules*, **25**, 2712 (2020).
8. Государственный стандарт РФ ГОСТ 33044-2014. *Принципы надлежащей лабораторной практики* (Стандартинформ, М., 2019).

9. *Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей* (ЕЭС, Страсбург, 1986).
10. *Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях* (Rus-LASA, СПб, 2012).
11. Патент RU 2 612 843 С1, **8**, 2017.
12. A. H. Groll, C. E. Gonzalez, N. Giri, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **43** (1), 95 (1999)..
13. А. С. Лунёв, Дис. ... канд. биол. наук (Моск. вет. академия им. К.И. Скрябина, М., 2016).
14. Е. И. Шишацкая, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **144** (12), 635 (2007).

Kinetic Study of Folate-Based Radiopharmaceuticals Labeled by ^{68}Ga

A.S. Lunev*, K.A. Lunyova*, **, F.I. Vasilevich**, M.G. Rakhimov*, and A.A. Larenkov*

*A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia

**K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,
ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

Radiopharmaceuticals that are given intravenously are moved into metabolic pathways in the organism by binding to carrier molecules, the kinetic schemes of which will be crucial in achieving the result (therapeutic or diagnostic effect). The development of *in silico* model of the transport kinetics of a radiopharmaceutical is important in that it can allow for extraction of quantitative information about transfer of a radiopharmaceutical between organs (cameras or compartments). Among promising agents for imaging purposes of malignant neoplasms and rheumatic pathologies is a ^{68}Ga labeled folic acid. The study of the kinetics of folic acid-based radiopharmaceuticals using experimental data obtained on a Wistar rat model of inflammation that has different causes confirmed that additional introduction of the amino acid fragment His-Glu-His-Glu to the molecule (as part of [^{68}Ga]Ga-FA-II conjugate) is useful to significantly reduce radioactivity uptake in the kidneys as opposed to unmodified analog [^{68}Ga]Ga-FA-I. Alterations in pharmacokinetic parameters after administration of the amino acid fragment imply a significant reduction in radiation doses on critical organs and tissues and will be associated with the possibility of using the studied compounds for imaging purposes of pathological processes during positron emission tomography.

Keywords: pharmacokinetics, camera model, folates, radiopharmaceuticals, biodistribution, gallium-68

ГИПЕРКАЛЬЦИЕВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АТФ

© 2022 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, С.Н. Гришин*, А.Ю. Теплов*, А.А. Еремеев**, Т.В. Балтина**, А.У. Зиганшин*

*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

**Казанский федеральный университет, ул. Кремлёвская, 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

Выявление пре- и постсинаптических эффектов АТФ методологически весьма сложная задача. Ранее мы использовали технику карбахолин-индуцированных сокращений для оценки вовлеченности P2-сигнализации в процессы синаптической передачи. Поиск моделей, позволяющих фиксировать постсинаптическое звено пуриnergической сигнализации в условиях электрической стимуляции привел нас к идее купировать пресинаптический сегмент АТФ-опосредованной модуляции. В экспериментах *in vitro* на выделенных нервно-мышечных препаратах *m. soleus* и *m. EDL* крысы методом изометрической электростимуляционной механомиографии выявлены постсинаптические эффекты АТФ на фоне гиперкальциевой среды. Так, влияние АТФ на фоне повышенного содержания Ca^{2+} проявилось в полуторном усилении сокращения на *m. soleus* и угнетении сократимости *m. EDL*, что соотносилось с данными, полученными ранее на карбахолин-вызванных сокращениях. Нами продемонстрированы АТФ-зависимые процессы, локализованные в постсинаптическом сегменте, способные вносить существенный вклад в реализацию механизмов адаптации в условиях гипотермии.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, гиперкальциевая модель, АТФ, сурамин, постсинаптические эффекты.

DOI: 10.31857/S0006302922060205, EDN: LLXPKJ

Важная роль ионов кальция в регуляции функциональной активности почти всех клеток и тканей неоспорима. В покое концентрация свободного кальция в цитоплазме крайне мала – примерно в двадцать тысяч раз ниже, чем во внеклеточной среде. Повышение содержания ионов кальция до 10^{-6} – 10^{-5} М запускает каскад биохимических реакций, в результате которых, например, может произойти экзоцитоз медиатора в синаптическую щель из нервного окончания.

К настоящему времени безусловно доказано, что в нервно-мышечном соединении АТФ модулирует амплитуду многоквантовых токов, активируя пресинаптические P2Y-рецепторы [1–3]. Угнетающее действие АТФ на амплитуду пресинаптических токов может быть обусловлено изменением активности кальциевых каналов, вход кальция через которые запускает процесс экзоцитоза синаптических везикул. Действительно, АТФ обратимо снижала Ca^{2+} -ток в перисинаптическом отделе аксона [4] и уменьшала амплитуду Ca^{2+} -транзientа, зарегистрированного в различ-

ных отделах нервной терминали лягушки [5]. Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзientа отражает изменение концентрации свободных ионов кальция внутри терминали [6], и ее изменение при действии АТФ может свидетельствовать о влиянии этого пурина на активность пресинаптических кальциевых каналов. На нервной терминали функционируют несколько типов потенциал-зависимых кальциевых каналов [7].

В мионевральных синапсах теплокровных является не только пресинаптический, но и постсинаптический эффект АТФ [8–10]. При этом в синапсе «быстрой» мышцы эффект схож по знаку с негативным постсинаптическим, тогда как в «медленных» двигательных единицах он, наоборот, потенцирующий. Является ли постсинаптическое модулирующее действие АТФ в мионевральных синапсах теплокровных таким же Ca^{2+} -зависимым?

МЕТОДЫ

Исследования проводили на мышечных препаратах белых лабораторных крыс-самцов массой

140–180 г, которых содержали в группах по три-пять особей с водой и пищей *ad libitum*. Животных погружали в наркоз, вводя внутривенно этанал натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли на задних конечностях *m. soleus* (камбаловидную мышцу) и *m. EDL* (длинный разгибатель пальцев). Выделенные мышцы фиксировали вертикально, присоединяя один конец к датчику механической активности, и погружали в ванночки объемом 10 мл, заполненные раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄·7H₂O – 1.18, глюкоза – 11, рН 7.4, $t = 37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Термостат поддерживал заданное значение температуры. Мышцы были растянуты начальной нагрузкой в 1 г, далее оставались в покое на 30 мин для привыкания к среде.

Сокращения регистрировали сначала в нормальном растворе Кребса, а потом в растворе с повышенным содержанием ионов кальция (7.2 мМ).

Электростимуляцию проводили путем стимуляции культы нерва, которую помещали в сакшн-электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали стимулятор MultiStim D330 (Digitimer Ltd, Великобритания). Сокращения мышц вызывали стимуляцией прямоугольными импульсами частотой 0.1 Гц, длиной 0.5 мс и амплитудой 10 В в течение 2 мин. Силу сокращений регистрировали изометрическим датчиком механической активности FSG-01 (Linton, Великобритания), аналоговый сигнал оцифровывали и обрабатывали с помощью системы сбора данных Biopack MP100WSW (Biopack, США). Средние значения всех сокращений, полученных в течение 2 мин (12 ответов), обрабатывали как один результат [11]. Сократительные ответы рассчитывали в процентах относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

Через 30 мин после фиксации ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в 5 мин, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

В ванночку с раствором Кребса добавляли 100 мкМ АТФ и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 мин. Далее ткань инкубировали с неселективным антагонистом P₂-рецепторов сураминол (100 мкМ) в течение 20 мин с последующим добавлением АТФ и вновь регистрировали сократительные ответы.

Все полученные данные рассчитывали в процентах относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента при 37°C.

Влияние температуры на сократительную активность *m. soleus* и *m. EDL* оценивали в экспериментах с АТФ и сураминол при инициировании сокращения как электрическим полем, так и аппликацией карбахолина при температуре 37°C.

Далее температуру последовательно снижали до 34, 30, 26, 22, 18 и 14°C. При каждой температуре добавляли АТФ и оценивали сократительные ответы мышцы через 10 мин после аппликации. Далее ткань инкубировали с сураминол в течение 20 мин с последующим добавлением АТФ. Температуру раствора регулировали с помощью водяного насоса TE-8A (Techne, Великобритания), быстрое снижение температуры жидкости в водяном насосе проводили добавлением льда.

Результаты механомиографических экспериментов на *m. soleus* и *m. EDL* крысы анализировали с применением метода ANOVA. За достоверный принимали уровень значимости менее 0.05. Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего (n – число нервно-мышечных препаратов для механо-миографических экспериментов).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При увеличении концентрации внеклеточного кальция до 7.2 мМ сила сокращения «медленной» и «быстрой» двигательных единиц достоверно не изменилась. Так, при 37°C амплитуда сокращений составила $102 \pm 8.2\%$ ($n = 11, p > 0.05$) для *m. soleus* и $104 \pm 3.9\%$ ($n = 11, p > 0.05$) для *m. EDL* относительно сокращений при нормальном содержании кальция [12, 13].

АТФ в концентрации 100 мкМ при 37°C никак достоверно не модифицировала силу сокращения камбаловидной мышцы ($95.8 \pm 5.1\%$ от исходных значений до подачи агента, $n = 11, p > 0.05$).

При понижении температуры омывающего камбаловидную мышцу раствора эффект экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ проявлялся в экспоненциальном повышении силы сокращения вплоть до полуторного увеличения при 14°C. Так, при этой температуре на 10-й минуте сила сокращения составила $214.6 \pm 5.7\%$ ($n = 12, p < 0.05$) от значения этого параметра до подачи АТФ при 37°C (рис. 1).

Неселективный антагонист P₂-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ отменял не только потенцирующий эффект экзогенной АТФ, но и гипотермия-ассоциированные изменения сократимости *m. soleus*.

При увеличении до 7.2 мМ концентрации внеклеточного кальция АТФ в концентрации 100 мкМ при 37°C угнетала силу сокращения мышцы длинного разгибателя пальцев ($85.2 \pm 5.6\%$ от исходных значений до подачи АТФ, $n = 11, p > 0.05$).

При понижении температуры омывающего исследуемую мышцу раствора проявлялось усиление ингибиторного эффекта экзогенной АТФ в концентрации 100 мкМ. Так, при этой температуре на 10-й минуте сила сокращения составила

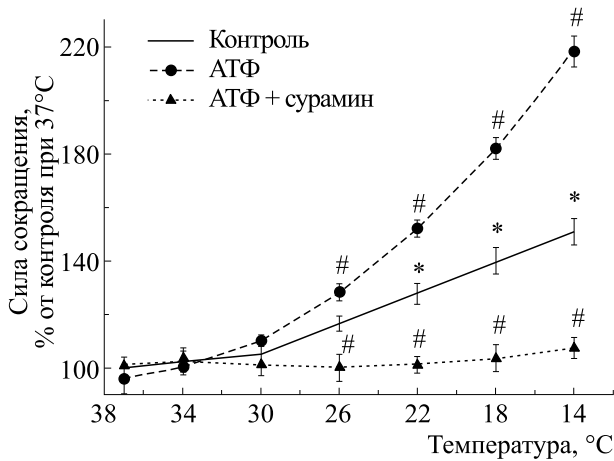


Рис. 1. Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7.2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. soleus* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ при различных температурных режимах; $n = 8 - 14$; * - $p < 0.05$ от эффекта при 37°C; # - $p < 0.05$ от контроля.

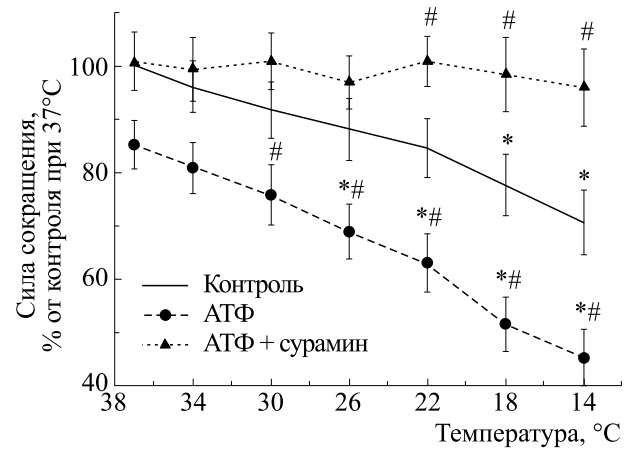


Рис. 2. Эффекты АТФ при повышенной концентрации Ca^{2+} (7.2 мМ) на силу вызванных электрическим током сокращений *m. EDL* в контроле и при аппликации сурамина в концентрации 100 мкМ, при различных температурных режимах; $n = 8 - 14$; * - $p < 0.05$ от эффекта при 37°C; # - $p < 0.05$ от контроля.

$43.1 \pm 4.6\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$) от значения этого параметра до подачи АТФ (рис. 2).

Сурамин (100 мкМ) в инкубационной среде предупреждал не только влияние АТФ на мышцу, но и частично ингибиторный эффект гипотермии на сокращения *m. EDL*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высвобождение нейромедиатора из нервных окончаний позвоночных модулируется пуринами: действуя через пуриновые рецепторы, они изменяют квантовый состав [2–6]. Но общеизвестно, что при этом как квантовый состав, так и кинетика секреции нейротрансмиттера напрямую зависят от уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в пресинаптических окончаниях [14, 15].

Нами было показано в периневральном отведении, что именно АТФ, а не его метаболит аденозин (как считалось ранее) ингибирует кальциевый вход в терминаль мотонейрона [2–4]. АТФ оказывает пресинаптическое ингибиторное действие на квантовый состав как через активацию фосфолипазы A_2 , так и посредством синтеза пероксида водорода [2]. В наших экспериментах последовательные продукты активации фосфолипазы A_2 арахидоновая кислота и простагландин E_2 так же, как и АТФ, на одну шестую снижали амплитуду кальциевой составляющей.

В представленной работе показана возможность выявления постсинаптических эффектов АТФ в условиях непрямого электростимуляции на фоне гиперкальциевой среды. Дана дифференцированная оценка степени участия АТФ-зависи-

мых механизмов в различных отделах мионеврального соединения. Использованная экспериментальная модель позволяет выявлять преимущественно постсинаптические эффекты пуринов, которые становятся более выражены в условиях гипотермии [16].

Существует данные, что гипотермия угнетает кальциевый ток через L-тип каналов [17]. Известно, что повышение концентрации внеклеточного кальция приводит к ряду пресинаптических эффектов, в том числе и к устранению пресинаптического ингибиторного действия АТФ [2, 8, 18]. С другой стороны, не обнаружено какого-либо значительного действия Ca^{2+} на постсинаптические холинорецепторы [19].

В наших экспериментах при повышенном содержании внеклеточного кальция при обычной электростимуляции воспроизводился потенцирующий эффект АТФ, который можно наблюдать при базовом перфузирующем растворе только при карбахолин-вызванных сократительных ответах [12, 13]. Это косвенно подтверждает постсинаптический характер действия данного пурина. Как известно, АТФ кроме выполнения в организме роли макроэрга является медиатором синаптической передачи [4].

Если при нормотермии АТФ не оказывает значимого эффекта на силу сокращения «медленной» мышцы, то гипотермия приводила к значительному приросту к силе сокращения и потенцирующему действию АТФ.

Различие динамики показателей, характеризующих постсинаптическое звено демонстрирует комплексную картину участия пуринов в адаптации мионеврального соединения к гипотермии.

ВЫВОДЫ

Приведенные в данной статье данные определенно доказывают, что гиперкальциевая модель может использоваться для вычленения постсинаптических эффектов АТФ в работах на нервно-мышечных препаратах. Верификация данной модели как раз и дала доказательства того, что постсинаптические эффекты АТФ — как потенцирующий в «медленной» мышце, так и ингибирующий в «быстрой» мышце — являются кальций-независимыми.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство» (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского федерального университета, а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому государственному медицинскому университету Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, and P. A. Fuchs, Sinauer Associates, Inc. 672 (2001).
2. E. Sokolova, S. Grishin, A. Shakirzyanova, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 1254 (2003).
3. С.Н. Гришин и А. У. Зиганшин, *Биол. мембраны*, **30**, (4), 243 (2013).
4. A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, A. E. Khairullin, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (17), 6423 (2020).
5. S. Grishin, A. Shakirzyanova, and A. Giniatullin, *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1271 (2005).
6. E. Khaziev, A. Golovyahina, and E. Bukharaeva, *Bio-NanoSci*, **7**, 254 (2017).
7. A. N. Tsentsevitsky, D. V. Samigullin, L. F. Nurullin, et al., in *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications* (Nova Science Publishers, Inc., New York, 2014), pp. 179–194.
8. С. Н. Гришин, *Биол. мембраны*, **31** (3), 155 (2014).
9. A. E. Khairullin, A. Yu. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics*, **64**, 812 (2019).
10. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics*, **65**, 858 (2020).
11. R. A. Eshpay, A. E. Khairullin, R. G. Karimova, et al., *Genes and Cells*, **10** (4), 123 (2015).
12. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle & Nerve*, **59** (4), 509 (2019).
13. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, V. V. Zobov, et al., *Muscle & Nerve*, **55** (3), 417 (2017).
14. B. Katz and R. Miledi, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **16** (161), 496 (1965).
15. D. Samigullin, E. A. Bukharaeva, E. E. Nikolsky, and F. Vyskočil, *Physiol. Res.*, **54** (1), 129 (2005).
16. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **11** (1), 1 (2017).
17. A. Findsen, J. Overgaard, and T. H. Pedersen, *J. Exp. Biol.*, **219**, 2340 (2016).
18. G. Burnstock, T. R. Arnett, and I. R. Orriss, *Purinergic Signal*, **9** (4), 541 (2013).
19. R. E. Poage and S. D. Meriney, *Physiology & Behavior*, **77** (4–5), 507 (2002).

A High Calcium Level-Based Model for Identifying Postsynaptic Effects of ATP

A.E. Khairullin*, **, S.N. Grishin*, A.Yu. Teplov*, A.A. Ereemeev**,
T.V. Baltina**, and A.U. Ziganshin*

*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

To identify the pre- and postsynaptic effects of ATP is indeed a methodological challenge. In our previous study, the role of P2 receptor signaling in synaptic transmission processes was evaluated using carbachol-induced skeletal muscle contractions. The search for models that can record the postsynaptic side of purinergic signaling during the application of electrical stimulation led to the idea of controlling the presynaptic terminal of ATP-mediated modulation. In *in vitro* experiments, the electromyograms and mechanomyograms during isometric contractions of isolated nerve-muscle preparations of rat soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles revealed postsynaptic effects of ATP in presence of high intracellular calcium level. Thus, the effects of ATP in presence of increased Ca^{2+} content were seen through contraction of soleus muscles that started to contract quicker by half and inhibition of contractility of EDL muscles; it was in accord with the data obtained earlier on carbachol-induced contractions. We have demonstrated ATP-dependent processes in the postsynaptic side that may contribute significantly to adaptation mechanisms in hypothermia.

Keywords: neuromuscular synapse, hypercalcium model, ATP, suramin, postsynaptic effects

УДК 577.359: 616.77

ОЦЕНКА ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В АРТЕРИЮ КРОЛИКА ПОЛИУРЕТАНОВОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА, ОБРАБОТАННОГО АЗОТНОЙ ПЛАЗМОЙ

© 2022 г. В.С. Чудинов*, #, И.Н. Шардаков*, В.В. Литвинов**, Г.Г. Фрейнд**, С.Ю. Солодников***, В.В. Маслова****

**Пермский государственный медицинский университет, Петропавловская ул., 26, Пермь, 614990, Россия

***Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Комсомольский просп., 29, Пермь, 614990, Россия

****Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России, ул. Свободы, 52, Санкт-Петербург, Красное село, 198320, Россия

#E-mail: chudinovsl@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2022 г.

После доработки 12.07.2022 г.

Принята к публикации 13.07.2022 г.

Образцы сосудистых протезов синтезировали из полиуретана на основе полипропиленгликоля, терминированного 2,4-толуилдиизоцианатом. Внешняя и внутренняя поверхности имплантатов обрабатывались ионами азота высокой энергии 20 и 10 кэВ соответственно. В результате ионно-плазменной обработки на поверхностях имплантатов был сформирован активный гидрофильный углеродный нанослой. На внутреннюю и внешнюю поверхности образцов, обработанных ионно-плазменным методом, нанесен белок тропоэластина. Обработанные и необработанные плазмой образцы протезов были имплантированы в сонную артерию кроликов. После недели экспозиции проведена морфологическая оценка тканей, окружающих стенки внутрисосудистых протезов. Показано, что внутри всех протезов сформировались тромбы. Однако морфологическая картина тканей вокруг стенок имплантатов, обработанных плазмой, характеризуется ускоренной канализацией тромба и пролиферацией эндотелия со стороны интимы сосуда по сравнению с необработанными имплантатами.

Ключевые слова: биосовместимость, тромб, полиуретан, ионно-плазменная обработка, углеродный слой.

DOI: 10.31857/S0006302922060217, EDN: LMDZHX

В ангиохирургии актуальным вопросом остается применение протезов вен и артерий малого диаметра, т.к. это может быть обусловлено дефицитом собственных сосудов для замещения пораженных участков [1, 2]. Следует отметить, что синтетические материалы для имплантации всегда вызывают реакцию на инородное тело, которая проявляется хроническим воспалением с формированием вокруг имплантата фиброзной ткани или тромботических масс при соприкосновении материала с кровью [3, 4].

В сосудистой хирургии широко распространено использование имплантатов из политетрафторэтилена. Важно отметить, что в 89–99% случаев применения протезов из политетрафторэтилена в краткосрочном периоде использования, до одного месяца, проблемы с их проходимость отсутствуют [5, 6]. Однако при долговре-

менном применении имплантатов из данных видов материалов статистика ухудшается, нарушается проходимость протезов по причине их тромбоза. Через три года применения этих имплантатов замена требуется в 31% случаев, а через пять лет – в 61% случаев [7, 8]. Еще в 1979 г. авторы работы [9] в наблюдениях за 362 имплантатами из растянутого политетрафторэтилена марки Gore-Tex, вживленными больным при операции бедренно-подколенного шунтирования, отметили проходимость протезов через три года лишь у 58% больных. Клинически применение синтетических эндопротезов сердечно-сосудистой системы вызывает опасность возникновения тромбозов и тромбоземболического синдрома, которые могут привести к смерти пациента. Наибольшая частота таких осложнений эндопротезирования сосудов наблюдается при таких достаточно распространенных сопутствующих заболеваниях как

сахарный диабет, злокачественные опухоли, а также при протезировании сосудов малого диаметра, менее 6 мм.

Ранее нами были проведены исследования взаимодействия белков и клеточных культур с углеродным нанослоем, сформированного обработкой ионами высокой энергии полиуретанов различных рецептур. Было продемонстрировано, что белки образуют ковалентную связь с гидрофильной углеродной поверхностью полиуретанов, образованной в результате плазменной обработки, что способствует улучшенной пролиферации эндотелиальных клеток на них [10, 11]. Образование ковалентной связи между адсорбированным белком и обработанной азотной плазмой поверхностью полимера обеспечивается наличием неспаренных электронов на краю углеродных кластеров в модифицированном ионным пучком поверхностном слое [12]. Неспаренные электроны в таких структурах могут длительное время (до года) находиться в активном состоянии по причине их стабилизации π -электронным облаком конденсированных полиароматических структур. Гидрофильность обработанной азотной плазмой поверхности позволяет сохранять каталитическую активность адсорбированных белков [13].

Процесс адсорбции белка аналогично происходит на модифицированной плазмой поверхности имплантата после его внедрения в живой организм. Важно отметить, что адсорбция белков на поверхности инородного тела является первым этапом взаимодействия организма и искусственного имплантата и влияет на дальнейшее развитие реакции организма на внедренный имплантат [14, 15]. На основании имеющихся результатов исследований предполагается, что реакция организма на внедрение имплантата, модифицированного азотной плазмой, будет отличаться от реакции после вживления имплантата без обработки. Это предположение было подтверждено нами в экспериментах с лабораторными животными. При подкожном внедрении образцов имплантатов в лабораторных крыс наблюдалась менее выраженная клеточная и тканевая реакция организма на полиуретаны после ионно-плазменной обработки при сравнении с необработанными [11, 16, 17].

В данной работе мы продолжаем комплекс исследований полиуретанов, обработанных азотной плазмой, в экспериментах на животных на примере имплантации внутрисосудистого протеза в сонную артерию кролика с морфологической оценкой тромбообразования. Описанный далее эксперимент является предварительным и показывает целесообразность дальнейших исследований полимерных материалов, обработанных ионно-плазменным методом, для сердечно-сосуди-

стой хирургии. В данной работе мы используем рецептуру полиуретанов с механическими свойствами максимально сходными с характеристиками мягких тканей [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза полиуретана на основе полипропиленгликоля-диизоцианата использовали компоненты фирмы Sigma-Aldrich (США). Полиуретан синтезировали из форполимера на основе полипропиленгликоля с концевыми гидроксильными группами, терминированными 2,4-толуилдиизоцианатом. Для отверждения форполимер смешивали с политетрагидрофураном в реакционном боксе при влажности 2–3% и температуре 23°C в течение 5 мин и наносили на стеклянные формы. Соотношение изоцианатных и гидроксильных групп составляло 100 : 35. Реакцию отверждения проводили в течение трех суток в заданных условиях, после чего полученный полиуретан отжигали в вакуумном термощкафу при температуре 120°C и давлении $7 \cdot 10^{-2}$ миллибар. Затем форму с полиуретаном погружали в толуол до равновесного набухания полиуретана. Данный растворитель разрешен к применению в технологии медицинских имплантатов согласно документации FDA. После этого полиуретан отслаивали от стеклянной формы и сушили на воздухе до полного удаления растворителя, что детектировалось методом ИК-спектроскопии многократно нарушенного полного внутреннего отражения. После синтеза низкомолекулярные продукты удаляли из полиуретана с помощью набухания в гептане. Для отмывки полиуретанов после синтеза использовали деионизированную воду с удельным сопротивлением 18 МОм·см при 25°C, получаемую из системы Direct Q5 (Millipore, США). Полученный имплантат после отмывки в деионизированной воде сушили на воздухе. При сушке полиуретан защищали от попадания пыли.

Для эксперимента по установке в кровеносный сосуд полимерного протеза по описанной методике синтеза были подготовлены 4 полые трубки из полиуретана. Внешний диаметр трубок составлял 2 мм, толщина стенки 100 мкм и длина 10 мм. Два протеза не подвергали предварительной обработке, еще два протеза были обработаны в Университете Сиднея (Австралия) ионно-плазменным методом, адаптированным к использованию для изделий сложной формы, описанным в патенте [19]. Для ионно-плазменной обработки внешней стороны протеза использовали метод плазменно-иммерсионной ионной имплантации при энергии ионов 20 кэВ и времени обработки 800 с, что соответствовало флюенсу 10^{16} ион/см². Плазменную обработку внутренней стенки про-

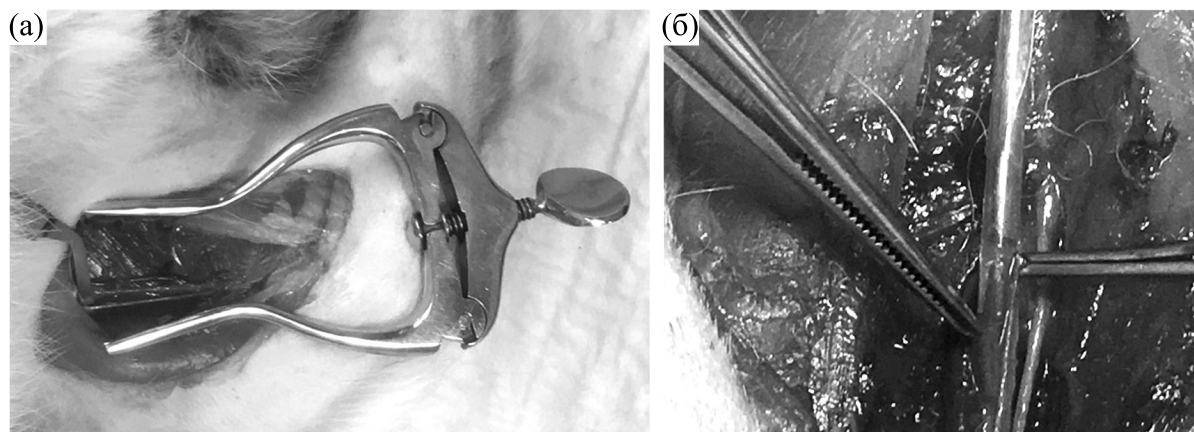


Рис. 1. Внедрение внутрисосудистого имплантата в лабораторное животное: выделение тупым способом левой сонной артерии (а) и внедрение имплантатов в сосуд (б).

теза выполняли в течение 10 мин при амплитуде напряжения 10 кэВ и давлении в подводящей трубке 2 торр. После обработки протезы погружали в буферный раствор с белком тропоэластином в концентрации 100 мкг/мл при рН 7.0. Далее образцы высушивали, упаковывали и транспортировали в Пермь (Россия). Все четыре протеза перед операцией имплантации подвергали стерилизации в течение 10 мин ультрафиолетом облучением с длиной волны 254 нм в ламинарном боксе Lamsystems и погружали в фосфатно-буферный раствор с рН 7.4 до момента операции.

Эксперимент проводили на четырех кроликах породы Советская шиншилла. Кроликам № 1 и 2 из опытной группы был имплантирован сосудистый протез, внутренняя поверхность которого была обработана ионно-плазменным методом с последующим нанесением слоя белка тропоэластин. Кроликам № 3 и 4 из контрольной группы вживлены полиуретановые образцы имплантатов без ионно-плазменной обработки.

Перед операцией всем животным вводили 0.05 мл гепарина и 0.1 мл 1%-го атропина. Операцию по вживлению сосудистых протезов выполняли под общим наркозом препаратом «Золетил» в дозе 8 мг/кг внутримышечно. После введения животного в наркоз место операции выбривали машинкой для стрижки животных. Скальпелем разрезали кожный покров, тупым способом выделяли левую сонную артерию (рис. 1а), на которую для остановки кровотока накладывали две сосудистые клипсы. В дистальном конце выделенного сосуда заточенной инъекционной иглой вскрывали оболочку сосуда и в просвет сосуда пинцетом вводили имплантаты (рис. 1б). На сосудистый дефект наносили два шва нитями PROLEN 007, для дополнительной герметизации артерии использовали сульфакрилатный клей. Снимали клипсы и визуально контролировали

восстановление кровотока в сосуде. Операционную рану ушивали шовным материалом «Викрил» 4/0. Швы обрабатывали 3%-й перекисью водорода. После операции животным вводили изотонический раствор хлорида натрия (20 мл) подкожно, внутримышечно вводили фуросемид в дозировке 0.5 мл, дексаметазон — 0.5 мл, сульфамфокаин — 0.5 мл, цефтриаксон — 100 мг. Продолжительность операции составляла 42–45 мин. Наблюдение за животными проводили непрерывно в течение шести часов, далее выполняли ежедневный ветеринарный осмотр в течение семи суток.

Эвтаназию животных проводили под наркозом «Золетил» в дозе 10 мг/кг. Извлеченные части сонной артерии с имплантатом разрезали поперек на две части и фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина.

Обработку препаратов внутрисосудистых имплантатов проводили по общепринятой методике. Срезы на микротоме делали с обеих сторон анастомоза и по середине исследуемого кровеносного сосуда, окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки зрелости фибрина применяли методики окраски по Зербино (оранжевый, кислотный красный, водный голубой). Зрелость фибрина оценивали в зависимости от сроков его образования. «Молодым» характеризовали фибрин, волокна которого окрашиваются в желто-оранжевый цвет, сроки его образования составляют 0–6 ч; «зрелым» называли фибрин, окрашиваемый в красный цвет, сроки его образования 6–24 ч; «старым» — фибрин, окрашиваемый в синий цвет, сроки его образования более 24 ч. На готовых гистологических срезах оценивали общую морфологическую картину, сохранную площадь просвета артерии, состав и зрелость структурных компонентов сформированного тромба.

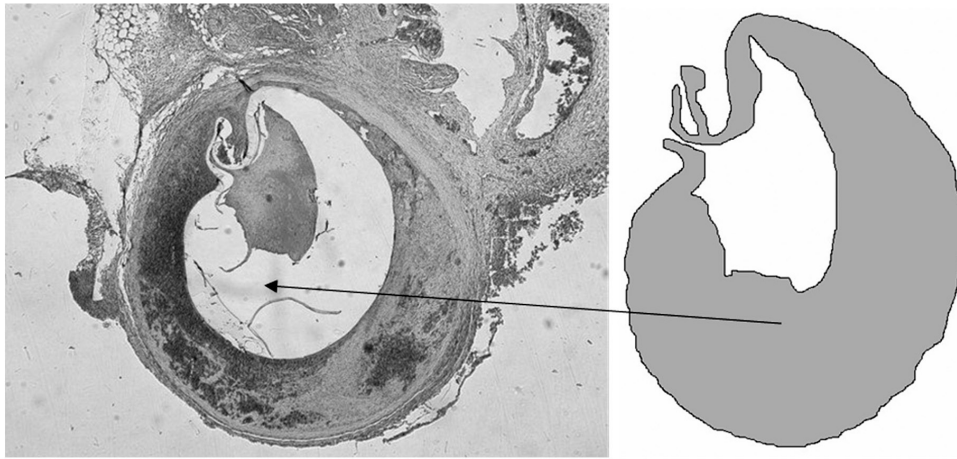


Рис. 2. Кролик № 1, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с модифицированной поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.

Для подсчета площади поперечного сечения восстановленного кровотока делали микрофотографии с помощью цифровой оптической системы микроскопии (Nigoh, Япония). Снимки обрабатывали с помощью программного пакета «Image J». Всего исследовали по четыре поперечных среза сонной артерии кролика, содержащей имплантат.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе ежедневного мониторинга состояния животных после оперативного вмешательства у всех четырех кроликов не выявлено нарушений в поведении, кожных покровах и питании.

Модифицированные плазмой имплантаты. При анализе опытного образца тканей кролика № 1 обнаружено, что тромботические массы рыхлые, характеризуются нитями фибрина и эритроцитами. Наблюдается тромб небольших размеров, на фоне которого встречаются пучки фибробластов. В тромботических массах преобладают волокна «зрелого» и «старого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч. Со стороны интимы отмечается пролиферация эндотелия, замещение тромботических масс соединительной тканью. Также наблюдается наличие крупных полостей — канализация тромба, в части полостей отмечается эндотелизация-реваскуляризация (рис. 2).

В тканях, окружающих имплантат кролика № 2, отмечается выраженная полиморфноклеточная инфильтрация сосудистой стенки (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы). Просвет сосуда выполнен тромбом с выраженными признаками организации и средними полостями канализации (рис. 3). В тромботических массах

преобладает «старый» фибрин, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч.

Необработанные контрольные имплантаты. Окружающие имплантат ткани кролика № 3 характеризуются формированием нескольких мелких полостей, выстланных эндотелием вблизи интимы сосуда. В просвете сосуда наблюдается крупный смешанный тромб с каналом средних размеров (рис. 4). В тромботических массах преобладают волокна «молодого» и единичные волокна «зрелого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 12 до 18 ч. В отдельных участках отмечается пролиферация интимы сосуда.

У кролика № 4 в просвете сосуда наблюдается крупный тромб, в одном из участков которого видна полость — канализация (рис. 5). В тромботических массах преобладают волокна «зрелого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч. Отмечается слабая пролиферация интимы и формирование щелевидной полости. Вблизи интимы сосудов локализуются небольшие фокусы соединительной ткани, свидетельствующие об организации тромба.

На рис. 6 представлен график средних значений площади поперечного сечения восстановленного кровотока в полости сосудов животных с имплантатами без обработки плазмой и обработанных ионно-плазменным методом.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам гистологического исследования в группе животных с необработанными полимерными имплантатами наблюдалась типичная картина тромбообразования на поверхности контактирующего с кровью инородного тела. Просвет сосуда был выполнен тромботическими массами со слабой пролиферацией эндотелия инти-

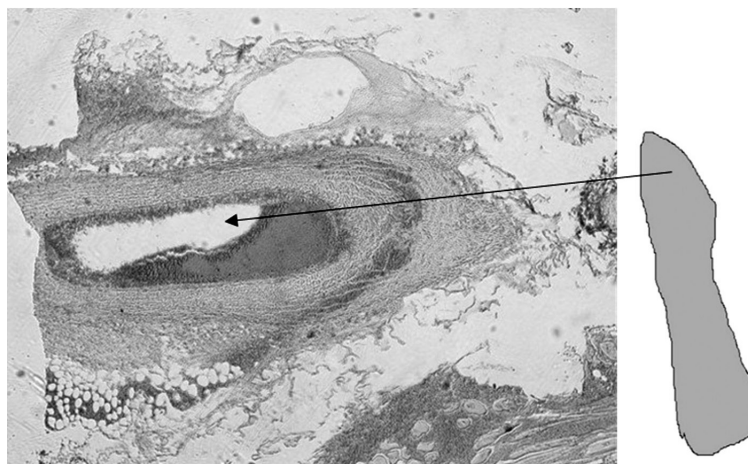


Рис. 3. Кролик № 2, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с модифицированной поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.

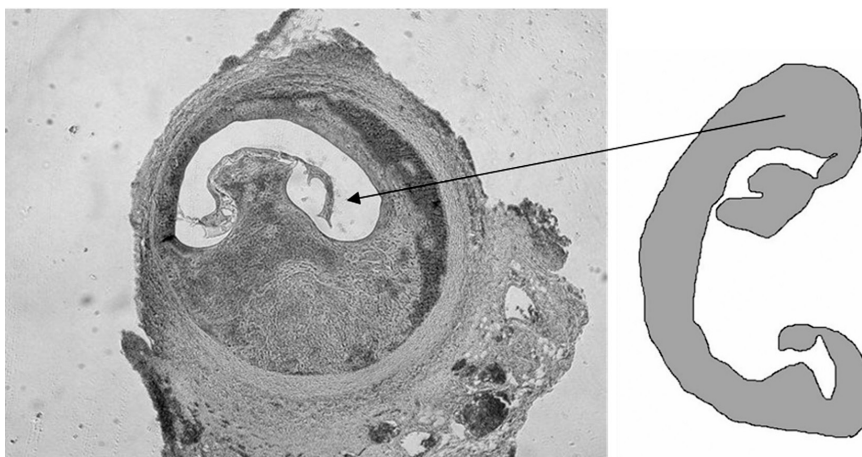


Рис. 4. Кролик № 3, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с немодифицированной плазмой поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.

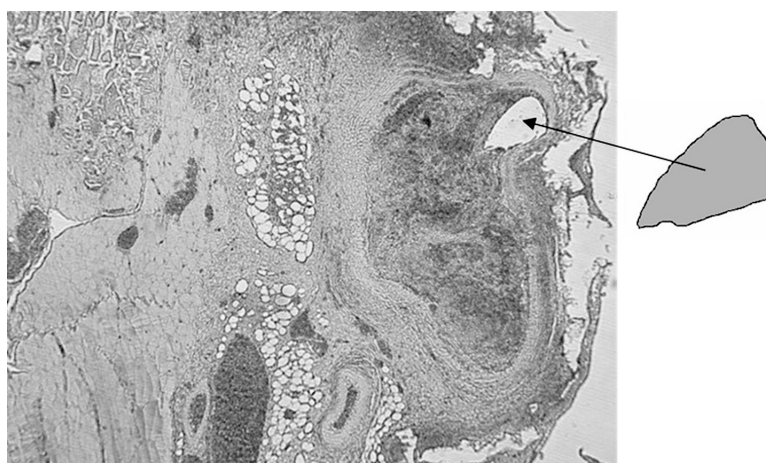


Рис. 5. Кролик № 4, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с необработанной плазмой поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.

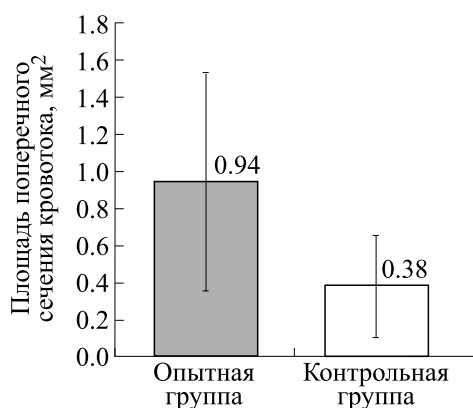


Рис. 6. Результаты гистологического исследования реканализации тромба в образцах протезов сосудов опытной (обработанной плазмой) и контрольной (не обработанной плазмой) групп животных.

мы и небольшим количеством щелевидных полостей. Наблюдалась медленно протекающая канализация тромба без его выраженной организации, что говорит о затяжном процессе тромбообразования.

В опытной группе животных с протезами сосудов, обработанными ионно-плазменным методом и с нанесенным белковым слоем тропоэластина, сформированные тромботические массы в просвете были меньших размеров по сравнению с группой контроля. Со стороны интимы наблюдалась пролиферация эндотелия и замещение тромботических масс соединительной тканью с выраженной канализацией тромба.

Образование тромбов и в опытной, и в контрольной группах обусловлено малыми диаметрами имплантатов и отсутствием антикоагулянтной терапии в послеоперационный период. Однако данная модель эксперимента создает наиболее подходящие условия для развития тромбообразования с возможностью оценки реакции организма на имплантацию искусственно-го сосудистого протеза.

Из оценки полученных результатов следует, что опытная группа характеризуется ускоренной канализацией и васкуляризацией тромба. Площадь участков для кровотока у опытной группы в два с половиной раза превышает размер таких участков у контрольной группы.

ВЫВОДЫ

По результатам морфологических исследований тканей, окружающих стенки сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию кроликов, выявлено, что внутри всех протезов, как обработанных ионно-плазменным методом, так и необработанных, сформировались тромбы.

При этом в опытной группе (с обработанными азотной плазмой имплантатами) канализованные участки кровотока по площади сечения в два с половиной раза превышают размеры у контрольной группы (необработанные имплантаты). Также со стороны интимы опытная группа характеризуется более выраженной пролиферацией эндотелия по сравнению с контрольной. На основании предварительного эксперимента по имплантации лабораторным животным сосудистых полиуретановых протезов, обработанных азотной плазмой, можно сделать вывод о возможности применения искусственных полиуретановых протезов с ионно-плазменными методами обработки. Для дальнейших исследований требуется отработать оптимальные режимы ионно-плазменной обработки, условия хранения и вживления имплантата, разработать протокол послеоперационной антикоагулянтной терапии, провести новые эксперименты с целью статистического подтверждения результата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарности исследователям А.В. Кондюрину и И.В. Кондюриной из «Эвингар Сайнтифик», проф. М. Билек, проф. Д. Маккензи и проф. А. Вайсу Университета Сиднея за разрешение работать в их лабораториях и предоставленный белок тропоэластин.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Пермского края (проект № 20-48-596014), а также Государственного задания ИМСС УрО РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Хирургические вмешательства, содержание, питание и эвтаназия животных соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. J. Veith, C. M. Moss, S. Sprayregen, et al., *Surgery*, **85** (3), 253 (1979).
2. Г. И. Попов, П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина и др., *Цитология*, **62** (1), 38 (2020).

3. И. В. Попова, А. О. Степанова, Д. С. Сергеевичев и др., Патология кровообращения и кардиохирургия, **19** (4), 63 (2015).
4. M. S. Lord, W. Yu, B. Cheng, et al., *Biomaterials*, **30** (28), 4898 (2009).
5. Л. А. Бокерия, М. Б. Темрезов и В. И. Коваленко, *Анналы хирургии*, № 2, 5 (2010).
6. C. Devine and C. McCollum, *J. Vasc. Surg.*, **40** (5), 924 (2004).
7. P. Klinkert, P. N. Post, P. J. Breslau, et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **27** (4), 357 (2004).
8. I. J. Rychlik, P. Davey, J. Murphy, et al., *J. Vasc. Surg.*, **60** (2), 506 (2014).
9. H. Haimow, F. Giron, H. J. Haimow, et al., *Arch. Surg.*, **114** (6), 673 (1979).
10. В. С. Чудинов, И. В. Кондюрина, И. Н. Шардаков и др., *Биофизика*, **63** (3), 444 (2018).
11. V. Chudinov, I. Kondyurina, V. Terpugov, et al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **440**, 163 (2019).
12. Б. Рэнби и Я. Рабек, *Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров*, под ред. Н. М. Эмануэля (Мир, М., 1978).
13. С. Т. Н. Гран, N. J. Nosworthy, A. Kondyurin, et al., *RSC Adv.*, **3**, 23604 (2013).
14. W. J. Hu, J. W. Eaton, T. P. Ugarova, et al., *Blood*, **98** (4), 1231 (2001).
15. *Биосовместимость*, под ред. В. И. Севастьянова и М. П. Кирпичникова (Медицинское информационное агентство, М., 1999).
16. В. С. Чудинов, И. В. Кондюрина, В. Н. Терпугов и др., *Мед. техника*, № 4, 19 (2020).
17. V. S. Chudinov, I. N. Shardakov, V. V. Maslova, et al., *In AIP Conf. Proc.*, **2167**, 020055 (2019).
18. I. Kondyurina, S. G. Wise, A. K. Y. Ngo, et al., *Biomed. Mater.*, **12** (4), 045002 (2017).
19. И. Н. Шардаков и В. С. Чудинов, Патент РФ № 2721280 (2020).

Assessment of Thrombus Formation during Implantation of a Polyurethane Vascular Prosthesis Treated with Nitrogen Plasma in the Rabbit Artery

V.S. Chudinov*, I.N. Shardakov*, V.V. Litvinov**, G.G. Friend**,
S.Yu. Solodnikov***, and V.V. Maslova****

**Institute of Continuous Media Mechanics, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia*

***Perm State Medical University, Petropavlovskaya ul. 26, Perm, 614990 Russia*

****Perm National Research Polytechnic University, Komsomolsky prosp. 29, Perm, 614990 Russia*

*****St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums, FMBA of Russia,
ul. Svobody 52, Krasnoe Selo, St. Petersburg, 198320 Russia*

Samples of vascular prostheses were made of polyurethane synthesized with polypropylene glycol terminated by 2,4-toluene diisocyanate. The outer and inner surfaces of the implants were treated by nitrogen ions with high energy of 20 keV and 10 keV, respectively. As a result of ion-plasma treatment, a hydrophilic active carbon nanolayer was generated on implant surface. Tropoelastin protein was attached to the inner and outer surfaces of the samples subjected to ion-plasma treatment. Prostheses that were and were not exposed to plasma were implanted in the rabbit carotid arteries. One week after carotid implantation, morphology of tissues surrounding the walls of the implanted vascular prostheses was assessed. It was shown that thrombus formation occurred on all the prostheses which had been implanted. However, the morphological pattern of tissues around the walls of plasma-treated implants is characterized by accelerated thrombus canalization and endothelial cell proliferation of intima as opposed to that around the walls of untreated implants.

Keywords: biocompatibility, thrombus, polyurethane, ion-plasma treatment, carbon layer

РАЗРАБОТКА МЕДИЦИНСКИХ СЕНСОРНЫХ СИСТЕМ В ПУЛЬМОНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ИЗМЕРЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПЕДАНСА

© 2022 г. В.Ю. Мишланов*, #, А.Л. Зуев**, ***, Я.В. Мишланов****

*Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера МЗ РФ,
Петропавловская ул., 26, Пермь, 614990, Россия

**Институт механики сплошных сред УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра
УрО РАН, ул. Академика Королева, 1, Пермь, 614013, Россия

***Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Комсомольский просп., 29, Пермь, 614013, Россия

****Пермский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Букирева, 15, Пермь, 614990, Россия

#E-mail: permmed@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

С целью экспериментального подтверждения зависимости биоэлектрического импеданса от скорости потока заряженных аэрозольных частиц и состава бронхиального секрета в мелких дыхательных путях изучен электрический импеданс аэрозоля 0.9%-го раствора NaCl в полиэтиленовых трубках различного диаметра. Также изучен электрический импеданс в цилиндрических камерах различного диаметра и объема, заполненных 0.9%-м раствором NaCl или раствором желатина. Исследования выполнены на частотах переменного электрического тока от 20 Гц до 150 кГц. Показано, что электрический ток не регистрируется в случае отсутствия потока аэрозольных частиц, а импеданс снижается при увеличении скорости потока. Модуль импеданса и фазовый угол электрического импеданса имеют выраженную зависимость от состава токопроводящей среды, модуль импеданса увеличивается в среде раствора желатина, при уменьшении диаметра проводника электрического тока и снижается при увеличении частоты зондирующего переменного тока. Таким образом, получено подтверждение гипотезы о влиянии скорости движения соленого аэрозоля и состава бронхиального секрета на результаты измерения электрического импеданса.

Ключевые слова: биоэлектрический импеданс, электроимпедансная спирометрия, аэрозоль, биологические жидкости, экспериментальное исследование.

DOI: 10.31857/S0006302922060229, EDN: LMEPMW

СЕНСОРЫ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ

Роль сенсорных систем в развитии средств электронной медицины. Вопросы разработки и клинического применения сенсоров являются сегодня активно обсуждаемой темой, способной в перспективе изменить основы современной диагностики и удаленного мониторинга больных. Сенсоры улавливают биологические сигналы физической, химической природы, а также функционального, т.е. физиологического или патофизиологического происхождения [1, 2]. Однако один сигнал не имеет большого клинического значения, даже если он отличается от нормы. Наличие такого сигнала можно сравнить только с фактором риска развития заболевания с определенной клинической значимостью. Клиническая

медицина нуждается в многочисленных исследованиях, чтобы ответить на вопросы, для какой группы больных или здоровых лиц предназначен конкретный биосенсор, какие клинические задачи он решает?

Биосенсорный сигнал не может иметь значения вне связи с другими признаками заболевания. Как любой объективный симптом (признак болезни), он должен быть связан с другими субъективными или объективными данными. Например, в системе синдромной диагностики – с другими признаками, указывающими на тот же механизм развития заболевания [3]. Следовательно, биосенсорный сигнал объединяется или с другими сенсорами, или с ответами пациента на интерактивные вопросы анкеты, что в совокупности

позволяет развивать новые методы предварительной диагностики и удаленного мониторинга пациентов. Среди различных методов регистрации биологических сигналов большое внимание заслуживает метод измерения биоэлектрического импеданса.

Электроимпедансные сенсоры оценки гемодинамики. Физической основой применения методов измерения электрического импеданса в кардиологии является наличие сосудов, содержащих биологические жидкости (кровь, лимфа и др.), выполняющих роль проводников электрического тока. В этой ситуации величина электрического импеданса преимущественно определяется активным сопротивлением, следовательно, диаметром кровеносного сосуда. Измерение электрического импеданса тела пациента следует производить вдоль сосуда – проводника электрического тока, но эта очевидная истина иногда нуждается в уточнении для практического врача, который должен наложить правильно электроды на тело пациента. Изменение диаметра сосуда под влиянием пульсовой волны приводит к изменению электрического импеданса при одинаковой длине измеряемого участка. Представленная теория полностью подходит для применения метода грудной тетраполярной реографии, предложенного для определения ударного объема крови и связанных с ним показателей сердечной деятельности [4, 5]. Неточность метода заключается в разных представлениях о путях распространения электрического тока, т.к. в грудной клетке существует несколько параллельных сосудов, изменяющих свой диаметр: аорта, другие артерии, вены и даже – камеры сердца. Точность измерения становится значительно выше, если электроды наложить непосредственно на сосуд, подлежащий исследованию или на близко расположенные проекционные точки в направлении этого сосуда [6]. В 2016–2019 гг. нами были проведены экспериментальные исследования и численные расчеты, продемонстрировавшие зависимость величины электрического импеданса от объема жидкости в камере с переменным диаметром, скорости потока жидкости в трубке, а также температуры и ионного состава электролита [7]. Построены математические модели, описывающие изменение объема жидкости в соответствии с изменением электрического импеданса [8, 9]. Кроме этого, были составлены эквивалентные электрические цепи, позволяющие производить расчет объема биологической жидкости в соответствии с величинами омического и емкостного сопротивления в цепи. При этом переменное емкостное сопротивление часто играет на практике роль неизменной переменной величины, что снижает точность метода и обусловлено влиянием кожных покровов, температуры, состава биологических тканей, в том числе присутствием элементов грубой во-

локнистой соединительной ткани. Эти помехи были минимальными при увеличении частоты зондирующего переменного электрического тока. Результатом исследований стала разработка нового метода измерения конечного диастолического объема левого желудочка, среднего давления в легочной артерии и фракции выброса левого желудочка методом высокочастотной электроимпедансной кардиометрии [10], а также метода ранней диагностики левожелудочковой недостаточности [11].

Биосенсоры оценки вентиляционной функции. Вентиляционная функция органов дыхания человека ассоциируется, в первую очередь, с насыщением организма кислородом, элиминацией углекислого газа. Но в деталях этот процесс делится на собственно вентиляционные механизмы – обмен газами между внешней средой и альвеолами посредством дыхательных путей, и диффузию газов через альвеолярно-капиллярную мембрану. Вентиляция – это движение воздушной смеси через дыхательные пути. Этот процесс характеризуется скоростью, объемами, сопротивлением и давлением. Основными методами клинической оценки этих параметров являются спирометрия и бодиплетизмография. В 2011 г. был предложен метод электроимпедансной спирометрии [12]. В основе метода лежит биполярная регистрация электрического импеданса между электродом, расположенным в мундштуке ингалятора, и вторым электродом, расположенным на грудной клетке пациента. Измерение проводят во время ингаляции 0.9%-го раствора хлорида натрия. Научному обсуждению подлежат две теории распространения электрического тока по дыхательным путям. Первая указывает на влияние скорости потока аэрозольных частиц хлорида натрия, а вторая – на изменения биохимического состава слизи, покрывающей слизистую дыхательных путей.

Биологические ткани и жидкости имеют различные электрические свойства, в том числе различную электропроводность. Электрический импеданс тканей и жидкостей складывается из элементов активного и реактивного сопротивления, что позволяет различать биохимические субстанции и ткани, а также регистрировать тканевые компартменты, разделенные тканями с высоким удельным сопротивлением (грубая волокнистая соединительная ткань). В случае применения электроимпедансной спирометрии можно выделить два главных компонента, влияющих на электрический импеданс: поток аэрозольных заряженных частиц и слизь, покрывающую эпителий дыхательных путей. Состав слизи меняется в зависимости от нозологической формы заболевания. Слизь состоит из двух компонентов: гель – продукт подслизистых бронхиальных желез, содержащий гликопротеины, пептиды, иммуноглобулины, биологически активные вещества, а так-

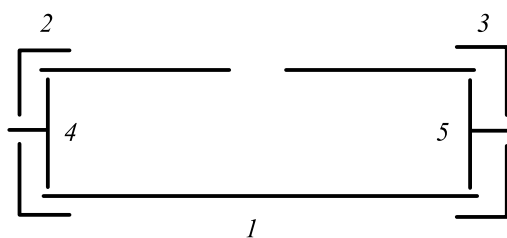


Рис. 1. Схема измерительной камеры: 1 – измерительная камера, 2 и 3 – колпачки, 4 и 5 – электроды.

же золь – жидкий продукт бокаловидных клеток слизистой оболочки бронхов, преимущественно содержащий растворы солей (ионы). Известно, что бронхообструктивные заболевания сопровождаются изменением состава бронхиального секрета с увеличением доли продуктов подслизистых бронхиальных желез, содержащих муцины и воспалительные белки. Особенно вязкий, часто стекловидный, иногда в виде слепков бронхов секрет характерен для бронхиальной астмы. Его состав определяется продуктами воспалительных клеток, включая эозинофилы, продуцирующие эозинофильный катионный белок, большой основной белок, эозинофильную пероксидазу, эозинофильный белок X, другие ферменты и пептиды. В этой связи нужно помнить, что именно для больных бронхиальной астмой установлены особенно высокие показатели электрического импеданса в результате применения метода электроимпедансной спирометрии [13].

Целью исследования явилось экспериментальное подтверждение теоретических положений применения электроимпедансной спирометрии в диагностике и мониторинге респираторных заболеваний, зависимости биоэлектрического импеданса от скорости потока заряженных аэрозольных частиц и состава бронхиального секрета в мелких дыхательных путях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка аэродинамики. Изучение аэродинамических факторов выполнялось в полиэтиленовых трубках длиной 7 см и диаметром 2 и 1 см. Такие параметры были выбраны с условием имитации движения аэрозоля в мундштуке ингалятора между установленным в нем электродом и слизистой оболочкой дыхательных путей. Изучали электропроводность аэрозоля 0.9%-го раствора натрия хлорида, который двигался в трубках с различной скоростью. Для создания аэрозоля и заполнения камер применяли небулайзерные ультразвуковые ингаляторы V.Well WN-116 U и «Муссон-3». Производительность распыления ингалятора V.Well WN-116 U составляла 0.5 мл/мин, средний размер аэрозольных частиц – 3.8 мкм. Ингалятор

«Муссон-3» имел сопоставимую производительность – 0.4 мл/мин, но аэрозоль отличался по размеру аэрозольных частиц: 10% имели размер до 100 мкм, 90% – менее 10 мкм. Сравнивали два режима заполнения исследуемой трубки: нагнетание аэрозоля в наглухо закрытое пространство (режим 1) и прокачивание аэрозоля через полую трубку (режим 2). Электроды размером 8 × 20 мм, изготовленные из технической стали, располагали в одной плоскости внутри полиэтиленовых трубок на расстоянии 3, 30 и 50 мм друг от друга.

Измерение электрического импеданса выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса «БИА-лаб Спиро», состоящего из измерительного блока (генератора переменного электрического тока и регистрирующего устройства, представленного звуковой картой нетбука Acer Aspire One D257, моста Уитстона и электродов). Программно-аппаратный комплекс управляется в автоматическом режиме программой для ЭВМ «БИА-лаб» (Свидетельство Роспатента № 2011611135). Измерительный модуль был тестирован на стандартных сопротивлениях и эталонах емкостного сопротивления в диапазонах от 2 до 100 кОм и от 2 пФ до 1 мкФ. Максимальная сила тока 0.41 мА, максимальное напряжение 0.38 В.

Исследование влияния состава биологических жидкостей на результаты электроимпедансного анализа. Для приготовления биологических жидкостей использованы 0.9%-й раствор хлорида натрия для инфузий в стеклянных банках по 400 мл (ОАО «Красфарма», Россия) и желатин пищевой (соответствие ТУ 9219-03-51021647-11; ООО «Промагротехника», Россия).

Были приготовлены следующие биологические жидкости, отражающие по физическим, химическим и биологическим свойствам два компонента бронхиального секрета (золь и гель): физиологический раствор хлорида натрия и раствор желатина пищевого в физиологическом растворе хлорида натрия (10 г/100 мл).

Для измерения электрического импеданса сконструирована камера (рис. 1), состоящая из фторопластового корпуса и электродов из нержавеющей стали; объем камеры составил 38.151 см³.

Как следует из рис. 1, измерительная камера, состоящая из фторопластовой трубки (1), имеет фторопластовые колпачки, которые надеты на ее оба конца с целью герметизации (2 и 3) с смонтированными электродами из электротехнической стали (4 и 5), плоская поверхность которых с внутренней стороны трубки закрывает ее с торца и служит электродом. В средней части фторопластовой трубки сделано отверстие для заполнения трубки, которое в момент проведения эксперимента герметично закрывалось.

Вторая камера аналогичного устройства имела меньший диаметр — 10 мм и соответственно меньший объем — 8.164 см³.

Для измерения электрического импеданса использовали высокоточный LCR-измеритель LCR-78105G (GW-Instek, Тайвань). Перед измерением проводили калибровку LCR-измерителя. Сам измеритель подключался к персональному компьютеру по интерфейсу RS-232, измерения проводили при помощи программы для ЭВМ. Программа для ЭВМ задавала параметры измерения (дискретность, измеряемые величины — модуль импеданса и фазовый угол, уровень напряжения — 2 В, частоту — были использованы частоты переменного электрического тока 20 Гц, 98 Гц, 1 кГц, 2 кГц, 5 кГц, 10 кГц, 20 кГц, 30 кГц, 100 кГц, 150 кГц). Указанные частотные диапазоны выбраны с учетом результатов клинической практики с использованием метода электроимпедансной спирометрии у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. После этого проводили по 30 измерений на каждой частоте. Результаты записывали в файлы с расширением .csv. Было выполнено по десять серий в каждом эксперименте. На каждой частоте рассчитывали среднее значение модуля импеданса, стандартное отклонение модуля импеданса от среднего значения, среднее значение фазового угла и стандартное отклонение фазового угла от среднего значения.

Статистическую обработку данных выполняли с применением программного пакета Statistica 8.0. Признаки, имеющие неправильное распределение, представлены как *Me*, 25%, 75%, σ . В случае исследования гемодинамических параметров результаты измерения модульного значения и фазового угла электрического импеданса имели правильное распределения и представлены в виде $M \pm \sigma$. Достоверность различий между выборками независимых признаков определялась с помощью критерия Манна–Уитни (при неправильном распределении признаков) и *t*-критерия (в случае правильного распределения параметров). Корреляционный анализ выполняли с расчетом *R*-критерия Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспериментальные исследования, выполненные с ингаляторами двух типов, показали, что используемый нами зондирующий переменный электрический ток не проникает через аэрозоль 0.9%-го раствора натрия хлорида при отсутствии потока аэрозольных частиц. Движение аэрозольных частиц позволяет регистрировать электрический ток и достаточно высокое сопротивление, обратно пропорциональное силе тока в потоке аэрозольных частиц. При фиксированной произ-

водительности распыления ингалятора («Муссон-3», производительность 0.4 мл/мин) и уменьшении площади поперечного сечения трубки, пропускающей аэрозольные частицы, с 6.28 см² до 1.57 см² увеличение скорости движения аэрозольных частиц привело к уменьшению электрического импеданса (87.42 кОм (85.24, 90.10) против 112.73 кОм (107.65, 122.44) на частоте 20 кГц). Применение трубки диаметром 2 см сопровождалось снижением электрического импеданса до 51.34 кОм (50.97, 52.10).

Применение двух типов ингаляторов, различающихся по параметрам аэрозольных частиц, продемонстрировало влияние размера аэрозольных частиц на электропроводность аэрозоля и снижение электрического импеданса обратно пропорционально размерам аэрозольных частиц. При использовании ультразвукового ингалятора В. Well WN-116 U, создающего аэрозоль со средним диаметром частиц 3.8 мкм, значение модуля импеданса *Z* составило 158.24 кОм (134.12, 178.67). Аэрозоль, продуцируемый ингалятором «Муссон-3», 10% частиц которого имеют размер до 100 мкм, а 90% не более 10 мкм, характеризовался значением *Z* — 114.94 кОм (112.92, 116.99). Максимальное межэлектродное расстояние, на котором регистрируется электрический сигнал, для ингалятора «Муссон-3» составило более 50 мм.

При заполнении ячеек физиологическим раствором хлорида натрия величина модуля электрического импеданса оказалась близка к нулю. Измерен импеданс ячеек, заполненных раствором желатина. Результаты измерения в ячейке 1 представлены в табл. 1, на рис. 2 (модуль импеданса *Z*) и рис. 3 (фазовый угол φ); результаты измерения в ячейке 2 — соответственно в табл. 2 и на рис. 4 и 5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные указывают на возможность применения метода электроимпедансной спирометрии при условии наличия крупнодисперсной фракции аэрозоля натрия хлорида, обеспечивающего замыкание электрической цепи между электродом, установленным в мундштуке ингалятора и слизистой оболочкой дыхательных путей. В эксперименте допустимое расстояние регистрации электрического сигнала составило 5 см, что позволяет рассчитывать, что данный путь распространения электрического тока является значимым на отрезке цепи от мундштука ингалятора до слизистой оболочки трахеи и главных бронхов. Изменение скорости движения аэрозольных частиц на данном отрезке электрической цепи обусловлено, с одной стороны, мощностью ингалятора, с другой — силой дыхательной мускулатуры. Следовательно, увеличе-

Таблица 1. Результаты измерения параметров импеданса ячейки I , заполненной раствором желатина

Частота, Гц	Z , Ом	σ , Ом	φ , град.	σ , град.
20	134.2	0.80	-42.94	0.064
98	84.9	0.65	-37.36	0.530
1000	55.0	<0.01	-9.93	0.024
2000	53.4	<0.01	-5.76	0.006
5000	52.5	<0.01	-2.79	0.001
10000	52.1	<0.01	-1.61	<0.001
20000	51.9	<0.01	-0.91	<0.001
30000	51.8	<0.01	-0.63	<0.001
100000	51.7	<0.01	-0.09	<0.001
150000	51.7	<0.01	-0.07	<0.001

Примечание. $n = 10$; σ – среднее квадратическое отклонение, Z – модуль импеданса, φ – фазовый угол.

ние электрического импеданса при различных заболеваниях может зависеть от скорости воздушного потока на уровне верхних дыхательных путей. Снижение скорости воздушного потока является типичным признаком для вентиляционных нарушений при бронхиальной астме, а также заболеваниях паренхимы легких [14].

Проведенный эксперимент по изучению влияния состава биологической жидкости на результаты измерения электрического импеданса показал, что величина электрического импеданса раствора комплексного биологического соединения

(желатина), содержащего белки, пептиды, гликопротеины, другие сложные углеводы и минеральные вещества, отличается от минерального растворителя – физиологического раствора хлорида натрия и убывает пропорционально увеличению частоты зондирующего переменного тока. Полученные данные соответствуют известным электрическим свойствам биологических жидкостей и тканей, в том числе описанным нами ранее при изучении растворов солей, глюкозы, альбумина и иммуноглобулинов человека [15–17]. В отличие от предыдущих данных, в трубках большого диа-

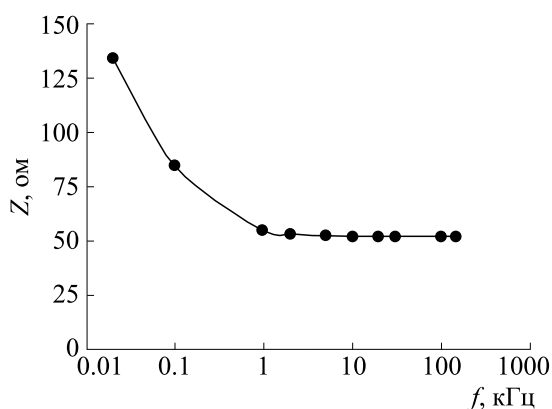


Рис. 2. График зависимости модуля импеданса ячейки I , содержащей раствор желатина в физиологическом растворе хлорида натрия, от частоты электрического тока.

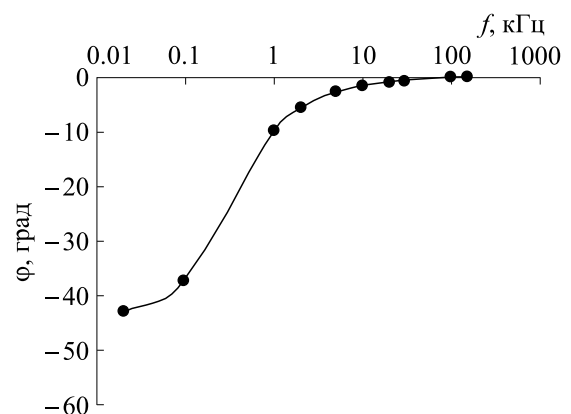


Рис. 3. График зависимости фазового угла для ячейки I , содержащей раствор желатина в физиологическом растворе хлорида натрия, от частоты электрического тока.

Таблица 2. Результаты измерения параметров импеданса ячейки 2, заполненной раствором желатина

Частота, Гц	Z, Ом	σ , Ом	φ , град.	σ , град.
20	1183.9	1.69	-20.47	0.074
98	1022.0	0.12	-10.20	0.050
1000	949.4	0.01	-1.89	0.005
2000	945.2	0.01	-1.07	0.001
5000	942.5	0.01	-0.51	0.001
10000	941.6	0.01	-0.30	<0.001
20000	941.0	0.01	-0.19	<0.001
30000	940.8	0.01	-0.15	<0.001
100000	940.5	0.01	-0.14	<0.001
150000	940.3	0.01	-0.17	0.005

Примечание. $n = 10$; σ – среднее квадратическое отклонение, Z – модуль импеданса, φ – фазовый угол.

метра, использованных в настоящем эксперименте, солевые растворы не проявили свойств электрического сопротивления, что доказывает максимальное влияние именно диаметра проводника электрического тока, содержащего биологические жидкости. Это положение продемонстрировано нами с использованием двух камер различного диаметра. Полученные результаты подтверждают гипотезу о влиянии состава бронхиального секрета на результаты электроимпедансной спирометрии, но показывают главенствующее влияние диаметра воздухоносных пу-

тей. Это обстоятельство имеет особенное значение для мелких дыхательных путей, диаметр которых менее 2 мм, а также путей, заполненных бронхиальным секретом, где движение газовой смеси становится медленным и диффузия газов определяется свойствами бронхиального секрета. Можно утверждать, что метод электроимпедансной спирометрии имеет максимальную зависимость от двух компонентов – скорости движения воздушного потока в крупных дыхательных путях и состава бронхиального секрета мелких дыхательных путей.

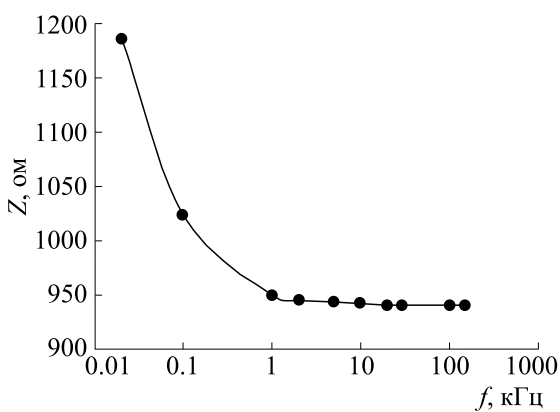


Рис. 4. График зависимости модуля импеданса ячейки 2, содержащей раствор желатина в физиологическом растворе хлорида натрия, от частоты электрического тока.

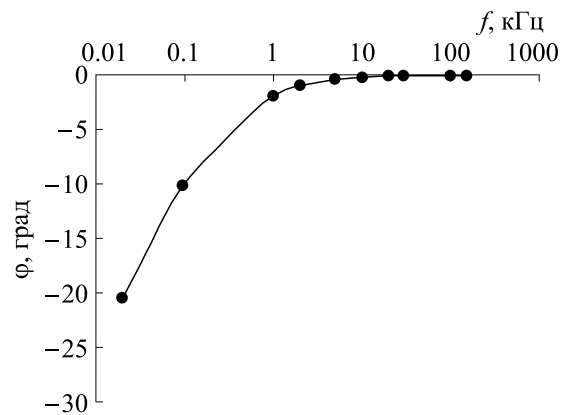


Рис. 5. График зависимости фазового угла для ячейки 2, содержащей раствор желатина в физиологическом растворе хлорида натрия, от частоты электрического тока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования получено подтверждение гипотезы, что основными факторами, влияющими на результаты электроимпедансной спирометрии, являются: скорость движения воздушного потока в крупных дыхательных путях и состав бронхиального секрета мелких дыхательных путей. Вместе с тем внедрение нового метода в клиническую практику будет более эффективным в случае реализации удаленного мониторинга пациентов с респираторными заболеваниями. Большое количество разрабатываемых сенсоров нуждаются в клинических испытаниях и сертификации в качестве медицинских изделий. Актуальными вопросами внедрения новых сенсорных систем являются точность регистрации биологических параметров, воспроизводимость результата, удобство, осуществимость, применимость методики, наличие инженерной технической поддержки производителя в процессе медицинской эксплуатации, включение в клинические рекомендации [18]. Не менее важным вопросом, влияющим на эффективность клинических испытаний и практическое использование новых технологий, на наш взгляд, является обеспечение доступности клинической информации для врача. Идеология многих производителей сенсоров направлена на конечного потребителя — пациента, который является анализатором полученной медицинской информации, что противоречит принципам оказания медицинской помощи. Нерешенными задачами являются: безопасность передачи электронной информации в офис врача в режиме реального времени, а также формирование медицинского заключения с учетом новых параметров оценки здоровья человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант р_НОЦ_Пермский край № 20-415-596008 «Концепция реабилитации больных, перенесших инфекцию Covid-19, путем ингаляционной терапии с применением природного минерального комплекса месторождений Пермского края в составе солей церия, марганца, цинка и серебра и разработка принципов мониторинга пациентов с применением системы интерактивных опросов»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В.Ю. Мишланов имеет патент РФ № 2487662 от 20.07.2013. «Способ диагностики функции внешнего дыхания с помощью импедансной спирометрии и программно-аппаратный комплекс «БИА-лаб Спиро» для его осуществления».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. B. Wilson, *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 319 (7220), 1288 (1999).
2. N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, *Essays in Biochemistry*, **60** (1), 1 (2016).
3. А. Г. Чучалин, В. А. Черешнев, В. Ю. Мишланов и др., *Биоэтика, искусственный интеллект и медицинская диагностика* (ПГМУ, Пермь, 2019).
4. М. А. Зубарев, А. А. Думлер и В. А. Русов, *А.с. СССР № 1671263* (1991).
5. В. А. Шутов, М. А. Зубарев, А. А. Думлер и А. А. Крылов, Патент РФ № 2145792 (2000).
6. *Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ)* (2010).
7. A. L. Zuev, V. Ju. Mishlanov, N. V. Shakirov, and A. I. Sudakov, *IOP J. Phys.: Conf. Series*, **1945**, 012065 (2021).
8. А. Л. Зуев, В. Ю. Мишланов, А. И. Судаков и Н. В. Шакиров, *Росс. журн. биомеханики*, **14** (3), 68 (2010).
9. А. Л. Зуев, В. Ю. Мишланов, Н. В. Шакиров и др., *Росс. журн. биомеханики*, **16** (1), 110 (2012).
10. В. Ю. Мишланов, Патент РФ № 2547961 (2015).
11. В. Ю. Мишланов, И. В. Мишланова и Я. В. Мишланов, Патент РФ № 2499553 (2013).
12. В. Ю. Мишланов, *Вестн. соврем. клинич. медицины*, **4** (4), 24 (2011).
13. В. Ю. Мишланов, А. Л. Зуев, Т. Л. Устьянцева и др., *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **99** (12), 1425 (2013).
14. *Функциональная диагностика в пульмонологии: практическое руководство*, под ред. А. Г. Чучалина (Издат. холдинг «Атмосфера», М., 2009).
15. A. L. Zuev, V. Ju. Mishlanov, N. V. Shakirov, and A. I. Sudakov, *IOP J. Phys: Conf. Series*, **1945**, 012066 (2021).
16. В. Ю. Мишланов, А. Л. Зуев, Я. В. Мишланов и др. В кн.: XIX Зимняя школа по механике сплошных сред: тез. докл. 212 (2015).
17. В. Ю. Мишланов, И. В. Мишланова, Я. В. Мишланов и С. Л. Мишланова, Патент РФ № 2548778 (2015).
18. <https://sps.honeywell.com/us/en/support/blog/siot/complete-guide-to-medical-sensors-benefits-and-applications>.

An Electric Impedance-Based Construction of Medical Sensor Systems in Pulmonary Medicine

V.Ju. Mishlanov*, A.L. Zuev**, ***, and Ya.V. Mishlanov****

* Perm State University named after academician E.A. Wagner, Ministry of Health of the Russian Federation, Petropavlovskaya ul. 26, Perm, 614990 Russia

**Institute of Continuous Media Mechanics, Perm Federal Research Center of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia

***Perm National Research Polytechnic University, Komsomolsky prosp. 29, Perm, 614990 Russia

****Perm State National Research University, ul. Bukireva 15, Perm, 614990 Russia

To receive experimental confirmation for bioelectrical impedance dependence on charged aerosol particles flow velocity as well as on bronchial secret chemical content in small airways, the electrical impedance of NaCl 0.9% spray aerosol in polyethylene tubes of different diameter was studied. Electrical impedance measurements have been performed on cylinder chambers of different diameter and volume containing NaCl 0.9% spray aerosol or gelatin solution. The experiments were conducted using different frequencies of alternating current from 20 Hz up to 150 KHz. It was shown that electrical current was not registered in the absence of aerosol flow with particles and the magnitude of electrical impedance decreased when flow rate increased. The module of electrical impedance and its phase angle are significantly dependent on the electrical media content, the module of electrical impedance increases in gelatin media, when electrical current conductor diameter decreases and will decrease if the frequency of alternating current increases. As a result, the hypothesis was confirmed that the velocity of airflow in large airways and the content of bronchial secret in small airways are the main factors affecting electrical impedance measurements.

Keywords: bioelectrical impedance, electroimpedance spirometry, aerosol, biological fluids, experimental study

ВЫСОКОДОЗОВАЯ ИНГАЛЯЦИЯ ГАЗООБРАЗНОГО ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЧЕНИИ COVID-19

© 2022 г. Е.В. Печёнкин*, А.В. Коврижкин**, А.В. Пекшев***, А.Б. Вагапов***,
Н.А. Шарапов***, А.Ф. Ванин****, #

*Ставропольский государственный медицинский университет, ул. Мира, 310, Ставрополь, 355017, Россия

**Городская клиническая больница № 3, ул. Ленина, 417, Ставрополь, 355029, Россия

***Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,

2-я Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия

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

#E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 30.09.2022 г.

Принята к публикации 05.10.2022 г.

Предложен и технически реализован метод лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 у больных, находящихся на высокопоточной оксигенации – метод высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота (NO) при спонтанном дыхании пациента. Приведены результаты лечения этого заболевания, демонстрирующие высокую эффективность нового метода. Обсуждается возможный механизм блокирующего действия высоких доз ингаляционного оксида азота на репликацию вируса SARS-CoV-2 – образование в дыхательных путях и легких больных COVID-19 динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами, выступающими в живом организме донорами NO и катионов нитрозония NO⁺, оказывающих цитотоксическое действие на вирус SARS-CoV-2.

Ключевые слова: оксид азота, ингаляция, динитрозильные комплексы железа, COVID-19, SARS-CoV-2, «ПЛАЗОН».

DOI: 10.31857/S0006302922060230, EDN: LMGLQQ

Предложение о возможности использования газообразного оксида азота (NO) для лечения COVID-19 путем ингаляционного введения в дыхательную систему пациента при его спонтанном дыхании появилось практически сразу после начала пандемии [1].

Предполагаемые механизмы действия ингаляционного NO при лечении COVID-19 следующие: дезактивация важнейших белков вируса SARS-CoV-2, необходимых для его репликации, путем S-нитрозирования в нем функционально важных тиоловых групп [1, 2]; активация Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток и макрофагов, ответственных за функционирование системы клеточного иммунитета [3], особенно у пожилых пациентов при возрастном уменьшении у них продукции эндотелиального оксида азота [4], а

также снижение вероятности тромбоза вследствие блокирующего действия оксида азота на агрегацию тромбоцитов.

В работах [5, 6] были представлены данные по лечению больных COVID-19 при их спонтанном дыхании путем ингаляции воздушной смеси, содержащей 160 ppm оксида азота, в течении 30 мин два раза в день. Весьма скромные результаты такого лечения, полученные в США, могут быть объяснены данными наших исследований процессов ингаляции газообразного оксида азота добровольцами при содержании NO во вдыхаемом воздухе в диапазоне от 100 до 2100 ppm, представленными в работе [2]. В этой работе показано, что при содержании NO во вдыхаемом воздухе менее 200 ppm подавляющая часть газообразного оксида азота поступает через легкие в кровь и связывается с гемоглобином, вследствие чего оставшейся части NO недостаточно для оказания лечебного воздействия. Исходя из результатов работы [2], мы полагаем, что для по-

Сокращения: NO-СГП – NO-содержащий газовый поток, СРБ – С-реактивный белок, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа.



Рис. 1. Аппарат «ПЛАЗОН».

лучения выраженного лечебного эффекта содержание оксида азота во вдыхаемом воздухе должно быть на уровне ~ 1000 ppm, при этом половина оксида азота, поглощенного организмом, поступит через легкие в кровь и свяжется с гемоглобином, а половина останется в дыхательной системе. Такого же мнения придерживается нобелевский лауреат, профессор Л. Игнаро (L.J. Ignarro), считающий, что содержание оксида азота в NO-содержащем газовом потоке (NO-СГП) в области ингаляции должно быть по крайней мере в 100 раз больше, чем содержание NO в известных ингаляционных газобаллонных системах (~ 10 ppm), т.е. находиться на уровне ~ 1000 ppm [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Техническое обеспечение. В работе был использован аппарат «Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКВП/NO-01 «ПЛАЗОН»» (ТУ 9444-001-96571701-2007, произведен в 2012 г. ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва, Россия), регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00583 от 21 марта 2012 г.) (рис. 1).

Аппарат «ПЛАЗОН» является единственным в мире аппаратом, реализующим способ лечения различных заболеваний воздушным потоком, содержащим оксид азота, получаемый плазмохимическим методом из атмосферного воздуха (метод NO-терапии).

Основное применение аппарата — лечение раневой патологии различного генеза, ускоряющее заживление ран, в том числе длительно незаживающих — послеоперационных, травматических, гнойных, ожоговых, трофических язв, синдрома диабетической стопы, пролежней и пр., а также лечение эрозивно-язвенных и воспалительных заболеваний внутренних полых органов (желудок, кишечник, легкие) путем подачи оксида азота на область патологии через эндоскопические приборы.

Для возможного использования аппарата «ПЛАЗОН» для лечения больных COVID-19 был разработан специальный манипулятор — генератор оксида азота, обеспечивающий безопасную высокодозовую ингаляцию NO при спонтанном дыхании пациента.

При разработке манипулятора для ингаляционной NO-терапии нами был широко использован опыт, полученный при разработке и применении для выполнения экспериментальных медико-биологических исследований плазмохимических генераторов оксида азота, представленный в работах [7, 8], а также данные, полученные при ингаляции здоровых добровольцев NO-содержащим газовым потоком [2].

Для реализации эффективной и безопасной лечебной технологии ингаляционного введения оксида азота в респираторную систему при спонтанном дыхании были сформулированы следующие основные требования:

1. Для комфорта пациентов и возможности обслуживать одним устройством последовательно их большое количество время ингаляции не должно превышать 10 мин.

2. Содержание оксида азота в NO-содержащем газовом потоке в области ингаляции должно находиться на уровне не менее ~ 1000 ppm.

3. Максимальное количество оксида азота NO, поступающего в дыхательную систему при ингаляции, в соответствии с рекомендациями [9], не должно превышать (в усл. ед.) 12000 ppm·мин (допустимая доза 25 ppm в течение 8 ч).

4. Максимальное количество двуокиси азота NO₂, поступающего в дыхательную систему при ингаляции, в соответствии с рекомендациями [9], не должно превышать (в усл. ед.) 1440 ppm·мин (допустимая доза 3 ppm в течение 8 ч).

5. Нельзя допускать полного захлаживания NO-содержащего газового потока до комнатной температуры, при которой происходит полная полимеризация двуокиси азота с образованием четырехокиси азота ($2\text{NO}_2 = \text{N}_2\text{O}_4$), обладающей резким неприятным запахом и являющейся высокотоксическим веществом [8, 10].

6. После завершения сеанса ингаляции концентрация метгемоглобина, образующегося в крови при поступлении в нее оксида азота и являющегося его биологическим маркером, не должна превышать 12% (в соответствии с работой [11]) или 20% (в соответствии с работой [12]).

На рис. 2 представлена схема разработанного манипулятора для высокодозовой ингаляции оксида азота, который является плазмохимическим генератором NO из атмосферного воздуха и формирователем NO-содержащего газового потока. Основными элементами конструкции манипулятора являются размещенные в цилиндрическом

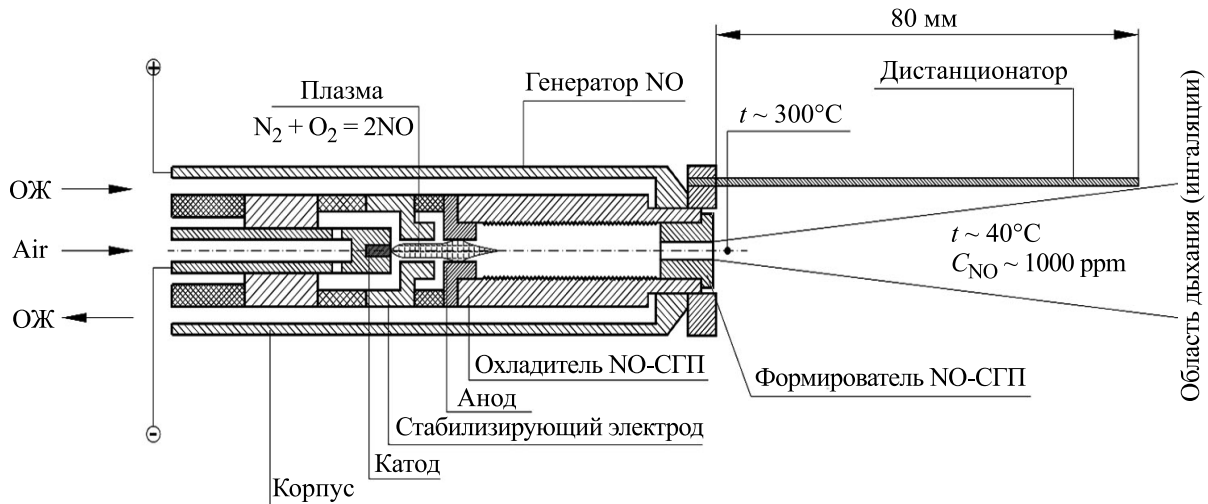


Рис. 2. Схема плазмохимической генерации оксида азота и формирования NO-СГП в ингаляционном манипуляторе: ОЖ – охлаждающая жидкость. NO-СГП – NO-содержащий газовый поток.

корпусе (внутренний диаметр 12 мм) принудительно охлаждаемые жидкостью, циркулирующей в замкнутой системе охлаждения манипулятора, катод (диаметром 1 мм), стабилизирующий электрод и анод (с внутренними диаметрами 1.1 и 1.5 мм соответственно). При работе манипулятора между катодом и анодом горит слаботочная электрическая дуга постоянного тока (~2 А), стабилизированная каналом стабилизирующего электрода. Атмосферный воздух подается в манипулятор микрокомпрессором, проходит через электрическую дугу и, переходя в плазменное состояние, нагревается до высокой температуры, достаточной для эффективного синтеза оксида азота в соответствии с плазмохимической реакцией $N_2 + O_2 = 2NO$. Полученный таким образом высокотемпературный NO-содержащий газовый поток через цилиндрический канал анода поступает в интегрированный в генератор NO омываемый жидкостью охладитель, проходит через цилиндрическую ребренную внутри камеру охлаждения (длина 35 мм, диаметр 5 мм) и через выходной канал (диаметр 1.1 мм) формирователя потока истекает в окружающее пространство в виде потока горячего воздуха, содержащего две специфические составляющие – молекулы оксида азота NO и двуокиси азота NO₂, образующейся в результате неизбежного окисления в кислородсодержащей среде части оксида азота: $2NO + O_2 = 2NO_2$. Геометрические параметры охладителя обеспечивают температуру NO-СГП на выходе канала формирователя потока на уровне ~300°C, при которой предотвращается процесс полимеризации двуокиси азота NO₂, приводящий к образованию четырехоксида азота N₂O₄ – токсического вещества с резким неприятным запахом.

На рис. 3 представлены основные физико-химические параметры на оси NO-содержащего газового потока, формируемого разработанным манипулятором для ингаляции, измеренные газоанализатором OPTIMA 7 производства MRU GmbH (Германия). Видно, что область NO-СГП, пригодная и приемлемая для комфортной ингаляции, находится на расстоянии 80–90 мм от выходного канала манипулятора, где температура потока составляет 40–44°C, содержание оксида азота находится на уровне 1000–1100 ppm, при этом содержание двуокиси азота не превышает 50–60 ppm, а отсутствие неприятного резкого запаха свидетельствует об отсутствии в потоке четырехоксида азота.

Для фиксации области NO-СГП, пригодной для ингаляции, манипулятор снабжается игольчатым дистанционером длиной 80 мм, при этом количество оксида азота и двуокиси азота, поступившее в дыхательную систему в течении десятиминутного сеанса, составляет 11000 ppm·мин и 600 ppm·мин соответственно и не превышает значений, рекомендованных в [9].

Безопасность метода. Наши исследования на здоровых добровольцах показали [2], что ингаляция оксида азота при его высоком содержании во вдыхаемом воздухе (до 2000 ppm) ни при каких условиях не оказывает гипотензивного действия и не приводит к существенному снижению системного артериального давления.

С использованием разработанного манипулятора на здоровых добровольцах пульсоксиметром RAD-57 производства компании Masimo Corp. (США) было измерено содержание в крови метгемоглобина после ингаляции оксидом азота в диапазоне изменения его содержания в области ды-

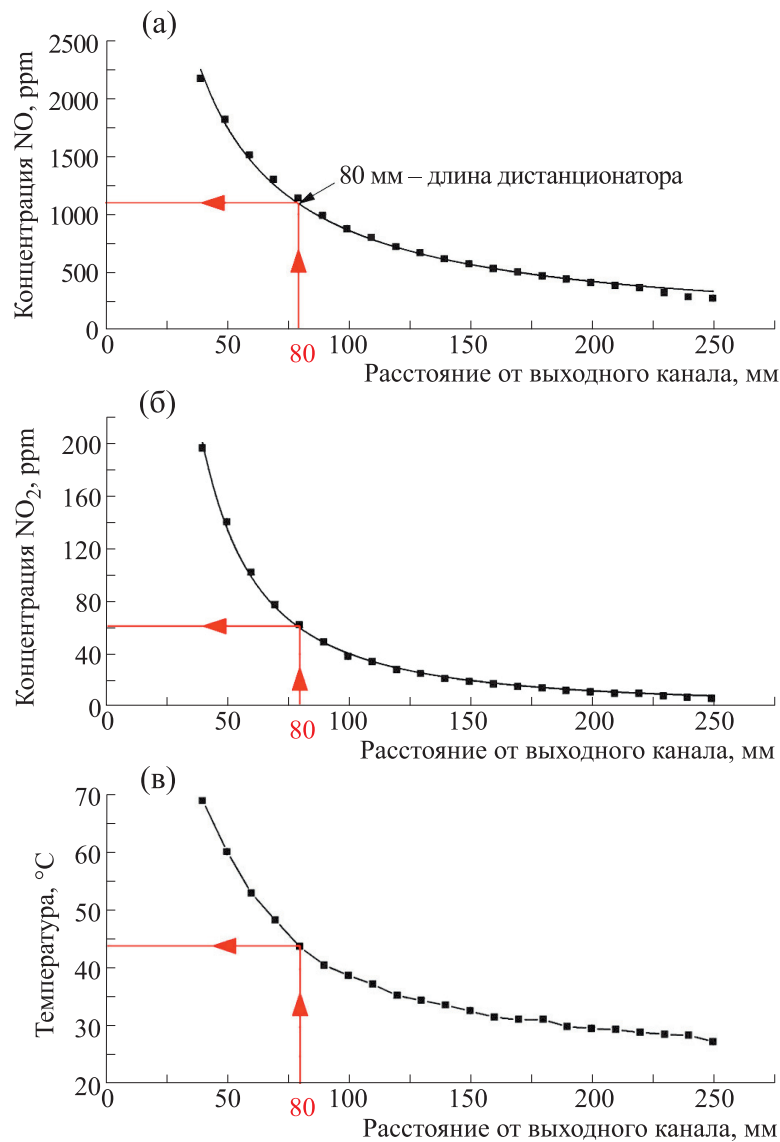


Рис. 3. Основные физико-химические параметры на оси NO-содержащего газового потока манипулятора для ингаляции при расходе воздуха ~ 3 л/мин.

хания от 160 до 1600 ppm при длительности ингаляции 5 и 10 мин (рис. 4). Получено, что при содержании в потоке оксида азота ~ 1000 ppm даже после десятиминутного сеанса содержание метгемоглобина не превышает пороговых 12%, что является безопасным для пациента.

На рис. 5 показана динамика изменения содержания в крови метгемоглобина в зависимости от времени после ингаляции оксида азота. Видно, что содержание метгемоглобина спадает до физиологического уровня в течении 3–4 часов, данные получены также с использованием пульсоксиметра RAD-57.

Разработанный новый манипулятор для высокодозовой ингаляции оксида азота предназначен

для работы в составе аппарата «ПЛАЗОН», подробный обзор клинического применения которого приведен в работе [13].

Метод использования высокодозовой ингаляции NO. Задачей предлагаемого нового метода высокодозовой ингаляции NO является создание способа эффективного лечения больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 средней и тяжелой степени тяжести, находящихся на высокопоточной оксигенации.

Предлагаемый способ лечения заключается в том, что в дополнение к стандартному протоколу лечения пациентов (этиотропная антивирусная, антикоагулянтная, противовоспалительная, антибактериальная терапия) с пневмонией, вызван-

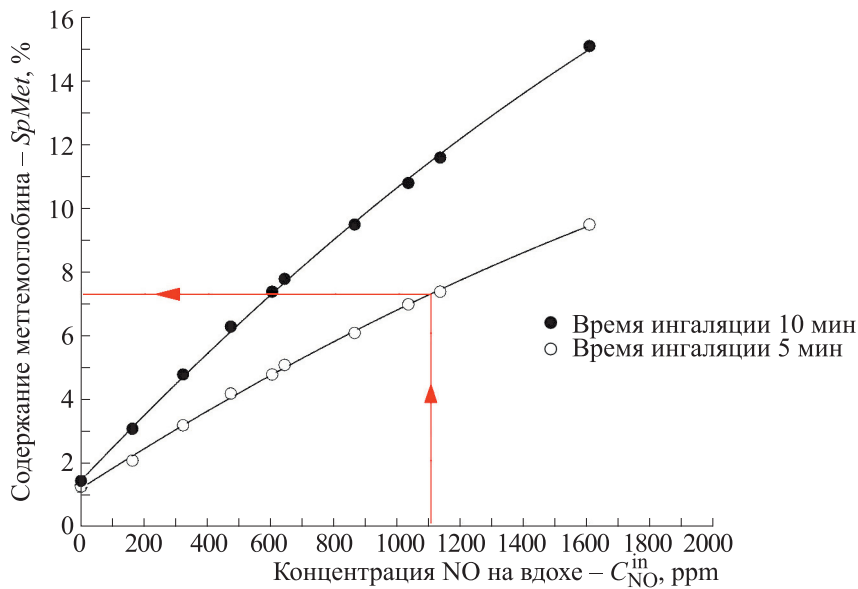


Рис. 4. Содержание в крови здорового добровольца метгемоглобина – биологического маркера оксида азота после ингаляции газообразного NO.

ной COVID-19 средней и тяжелой степени тяжести, находящихся на высокопоточной оксигенации с сохраненным спонтанным дыханием с использованием разработанного нового манипулятора в составе аппарата «ПЛАЗОН», проводили ингаляционную терапию высокими концентрациями экзогенного оксида азота.

Высокодозовую ингаляцию оксида азота проводили в обе ноздри больного при его спонтанном дыхании с расстояния ~8 см с концентрацией

оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин два-три раза в день, чередуя во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больного в положении лежа на животе обрабатывали потоками оксида азота с расстояния ~8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин два-три раза в день в течение пяти-десяти суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома.

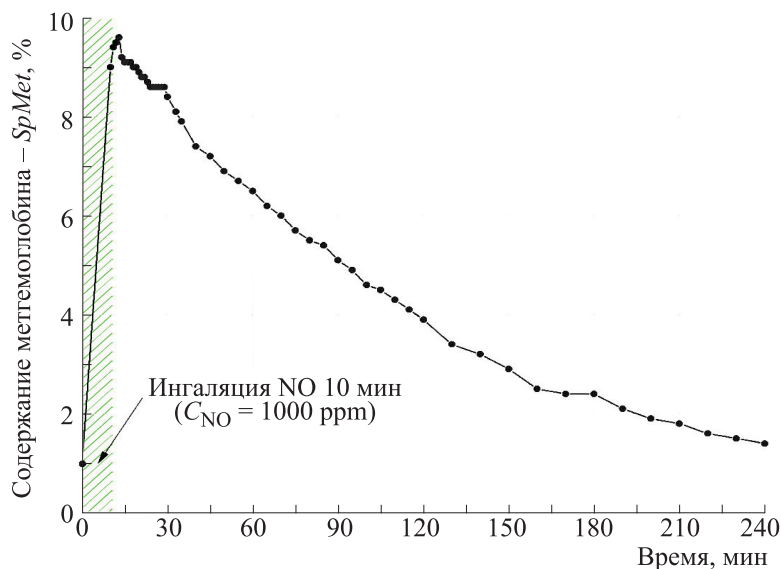


Рис. 5. Динамика изменения содержания в крови добровольца метгемоглобина в зависимости от времени после ингаляции оксида азота.

Предлагаемый новый способ лечения больных с COVID-19 высокодозовой ингаляцией NO заявлен патентом [14] и применим не только в отделениях стационарной реанимации и интенсивной терапии, но и в условиях массового поступления больных, высоко эффективен, безопасен, мобилен, полностью контролируемый, экономически мало затратен и с минимальными временными затратами на проведение процедуры на одного пациента. Клинический эффект субъективного и объективного улучшения дыхательных функций все пациенты отмечают сразу после проведения процедуры. Сразу после процедуры повышается уровень сатурации крови, восстанавливается функция дыхания, улучшаются биохимические анализы, улучшается психологическое состояние, исключаются показания к интубации и врач-реаниматологи, плавно снижая скорость высокопоточной оксигенации, переводят пациента на самостоятельное дыхание.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего лечение новым методом высокодозовой ингаляции NO по предложенной нами методике на фоне стандартного протокола лечения в ковидном отделении реанимации и интенсивной терапии ПСО ГБУЗ СК «ГКБ №3» г. Ставрополя проводилось с октября 2021 г. по февраль 2022 г. при добровольном согласии 18 пациентам с COVID-19 средней и тяжелой степенью поражения легких, бывших в крайне тяжелом состоянии, с отрицательной динамикой лечения и неблагоприятным прогнозом, находящихся при спонтанном дыхании на высокопоточной оксигенации со скоростью подачи кислорода от 25 до 80 л/мин. Все пациенты избежали перехода на искусственную вентиляцию легких, выжили и выздоровели. Летальные исходы не наблюдались. Анализируя результаты клинических примеров в отдаленном периоде после реабилитационной терапии, можно сделать вывод, что пациенты полностью восстановлены в витальных функциях. Предложенный новый метод лечения высокодозовой ингаляцией NO высокоэффективен, способен улучшить клинические исходы с отсутствием ограничений к применению, с оптимальными техническими требованиями и финансовыми затратами, способствует быстрому улучшению дыхательной функции, общего состояния, улучшению клинических результатов и значительному снижению летальных исходов.

Клинические случаи. *Пример 1.* Пациент О., 69 лет. Диагноз: новая коронавирусная инфекция COVID-19 тяжелой степени тяжести, внебольничная двухсторонняя полисегментарная пневмония с формированием фиброза КТ-3-4 (85% поражения легких), пневмомедиастинум, дыхательная недостаточность 3-й степени, токсиче-

ская анемия. Проводилось стандартное лечение по протоколу терапии COVID-19. Общее состояние крайне тяжелое. На фоне прогрессивно нарастающей дыхательной недостаточности больной переведен на высокопоточную оксигенацию с 25 до 80 л/мин, нарастало содержание С-реактивного белка (СРБ) до 45 мг/л, выраженная коагулопатия. Из-за ухудшения состояния планировался перевод на искусственную вентиляцию легких. Прогноз признан неблагоприятным. С добровольного согласия пациента проведены сеансы ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях по предложенной нами методике: в обе ноздри больного при его спонтанном дыхании с расстояния 8 см с концентрацией оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день, чередуя во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больного в положении лежа на животе обрабатывалась потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день в течение восьми суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома. Причинно-следственная связь проводимой процедуры явно выражена и очевидна, учитывая положительные отзывы самого пациента и объективного контроля сатурации легких. Сатурация увеличилась сразу во время сеанса с 72 до 88%. Уже после первого сеанса пациент отметил улучшение дыхательной функции легких, ушла боль при вдохе уже через 3 мин терапии, улучшились биохимические показатели в течении суток, СРБ снизился за сутки с 45 до 15 мг/л, нормализовались показатели коагулограммы. Лечащий врач стал снижать скорость высокопоточной оксигенации. Улучшилось отхождение мокроты. Больной быстро начал поправляться на фоне регулярных процедур ингаляции оксида азота в высоких концентрациях и воздействия NO в области легких и спины. На фоне плавного снижения скорости высокопоточной оксигенации под контролем нормализующейся сатурации до 96% был переведен на самостоятельное дыхание и на восьмые сутки после окончания курса воздействия NO по предложенной нами методике выписан из ковидного отделения с улучшением на реабилитационную терапию. Отдаленный результат здоровья благоприятный.

Пример 2. Пациент Ч., 62 года. Диагноз: новая коронавирусная инфекция COVID-19 тяжелой степени тяжести, внебольничная двухсторонняя пневмония тяжелой степени, дыхательная недостаточность 3-й степени, КТ-4 (80% поражения легких), сахарный диабет 2 типа инсулиннезависимый, эритроцитоз неуточненный. Проводилось стандартное лечение по протоколу терапии COVID-19. Состояние прогрессивно ухудшалось.

Общее состояние крайне тяжелое. На фоне прогрессивно нарастающей дыхательной недостаточности больной переведен на высокопоточную оксигенацию с 60 до 80 л/мин, нарастал СРБ до 28 мг/л, выраженная коагулопатия. Из-за ухудшения состояния планировался перевод на искусственную вентиляцию легких. Прогноз признан неблагоприятным. С добровольного согласия пациента проведены сеансы ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях по предложенной нами методике: в обе ноздри больного при его спонтанном дыхании с расстояния 8 см с концентрацией оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день, чередуя во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больного в положении лежа на животе обрабатывалась потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день в течение десяти суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома. Сатурация увеличилась сразу во время сеанса с 75 до 90%. Сразу после проведенного сеанса пациентом отмечена легкость дыхания, ушла боль при вдохе уже через 3 мин терапии, улучшилось психологическое состояние, улучшились биохимические показатели в течении суток, за двое суток снизился СРБ с 28 до 5.4 мг/л, нормализовались показатели коагулограммы. Лечащий врач стал снижать скорость высокопоточной оксигенации. Улучшилось отхождение мокроты, снизилась интенсивность кашля. Больной быстро начал поправляться на фоне регулярных процедур ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях и черезкожного воздействия NO области легких и спины. На фоне плавного снижения скорости высокопоточной оксигенации под контролем восстановившейся сатурации до 98% был переведен на самостоятельное дыхание. На десятые сутки после окончания курса воздействия NO по предложенной нами методике выписан из ковидного отделения с улучшением на реабилитационную терапию. Отдаленный результат здоровья благоприятный.

Пример 3. Пациентка Д., 67 лет. Диагноз: новая коронавирусная инфекция COVID-19 тяжелой степени тяжести, внебольничная двухсторонняя бронхопневмония тяжелой степени тяжести, КТ-3-4 (70% поражения легких), пнвмомедиастинум, дыхательная недостаточность 1-2 степени, ишемическая болезнь сердца, кардиосклероз атеросклеротический, гипертоническая болезнь 3-й степени, риск 4, НК ПА, ФК2, сахарный диабет 2 типа впервые выявленный. Проводилось стандартное лечение по протоколу терапии COVID-19. Общее состояние крайне тяжелое. На фоне прогрессивно нарастающей дыхательной недостаточности больная переведена на высоко-

поточную оксигенацию с 20 до 65 л/мин, нарастал СРБ до 52.4 мг/л, из-за ухудшения состояния планировался перевод на искусственную вентиляцию легких. Был возможен неблагоприятный прогноз. С добровольного согласия пациентки проведены сеансы ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях по предложенной нами методике: в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см с концентрацией оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин два раза в день, с чередованием во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больной в положении лежа на животе обрабатывалась потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин два раза в день в течение пяти суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома. Сатурация увеличилась сразу во время сеанса с 76 до 92%. Сразу после первого сеанса пациентка отметила значительное улучшение дыхательной функции легких, ушла боль при вдохе, улучшилось психологическое состояние, у пациентки появилась надежда на благоприятный исход, улучшились биохимические показатели в течении суток, в разы снизился СРБ – с 52.4 до 20.2 мг/л, нормализовались показатели коагулограммы. Лечащий врач стал снижать скорость высокопоточной оксигенации вплоть до отмены. Улучшилось отхождение мокроты, снизилась интенсивность кашля, появился аппетит. Больная быстро начала поправляться на фоне регулярных процедур ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях и воздействия NO области легких и спины. На фоне плавного снижения скорости высокопоточной оксигенации под контролем нормализующейся сатурации до 96% была переведена на самостоятельное дыхание и на пятые сутки после окончания курса воздействия NO по предложенной нами методике выписана из ковидного отделения с улучшением на реабилитационную терапию. Отдаленный результат здоровья благоприятный.

Пример 4. Пациентка С., 77 лет. Диагноз: новая коронавирусная инфекция COVID-19 тяжелой степени тяжести, ишемический инсульт (лакунарный подтип по шкале TOAST) в зоне кровоснабжения левой средней мозговой артерии с развитием выраженной сенсомоторной афазии, правостороннего прозопареза, ранний восстановительный период, левосторонняя нижнедолевая пневмония средней тяжести, дыхательная недостаточность 1-2 степени, ишемическая болезнь сердца, кардиосклероз атеросклеротический, недостаточность митрального и аортального клапанов, дисфункция трикуспидального клапана и клапана легочной артерии, признаки аневризмы межпредсердной перегородки, гипертоническая

болезнь 3-й степени, риск 4, сахарный диабет 2 типа впервые выявленный, атеросклероз БЦА, двусторонняя извитость обеих ВСА с гемодинамическим сдвигом справа до 48%, железодефицитная анемия легкой степени тяжести. Проводилось стандартное лечение по протоколу терапии COVID-19. Общее состояние тяжелое. На фоне прогрессивно нарастающей дыхательной недостаточности больная переведена на высокопоточную оксигенацию с 20 до 35 л/мин. Был возможен неблагоприятный прогноз с учетом всех сопутствующих заболеваний и возраста. С добровольного согласия пациентки проведены сеансы ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях по предложенной нами методике: в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см с концентрацией оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин два раза в день, чередуя во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больной в положении лежа на животе обрабатывалась потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин два раза в день в течение пяти суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома. Причинно-следственная связь проводимой процедуры очевидна, учитывая положительные отзывы самой пациентки и объективного контроля сатурации легких. Сатурация увеличилась сразу во время сеанса с 77 до 95%. Сразу после первого сеанса пациентка отметила значительное улучшение дыхательной функции легких, ушла боль при вдохе, улучшилось психологическое состояние, улучшились биохимические показатели в течении суток и коагулограммы, в разы снизились показатели воспаления в крови, быстро стали восстанавливаться когнитивные и двигательные функции. Лечащий врач стал снижать скорость высокопоточной оксигенации вплоть до отмены. Улучшилось отхождение мокроты, снизилась интенсивность кашля. Больная быстро начала поправляться на фоне регулярных процедур ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях и воздействия NO области легких и спины. На фоне плавного снижения скорости высокопоточной оксигенации под контролем нормализующейся сатурации до 96% на четвертые сутки была переведена на самостоятельное дыхание и на пятые сутки после окончания курса воздействия NO по предложенной нами методике в удовлетворительном состоянии переведена из реанимационного ковидного отделения с улучшением на реабилитационную терапию. В дальнейшем благополучно выписана из стационара и хорошо себя чувствовала. Учитывая тяжесть состояния пациентки, сопутствующие заболевания и возраст к большому удивлению лечащих врачей произошедшее

быстрое выздоровление пациентки после проведенной ингаляционной NO-терапии по предложенной методике на фоне стандартного лечения представляется высокоэффективным и достаточно быстрым.

Пример 5. Пациент М., 57 лет. Диагноз: новая коронавирусная инфекция COVID-19 тяжелой степени тяжести, внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония тяжелой степени, КТ-3-4 (70% поражения легких), дыхательная недостаточность 3-й степени. Проводилось стандартное лечение по протоколу терапии COVID-19. Состояние прогрессивно ухудшалось. Общее состояние крайне тяжелое. На фоне прогрессивно нарастающей дыхательной недостаточности больной переведен на высокопоточную оксигенацию с 25 до 60 л/мин, ухудшались биохимические показатели. С добровольного согласия пациента проведены сеансы ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях по предложенной нами методике: в обе ноздри больного при его спонтанном дыхании с расстояния 8 см с концентрацией оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день, чередуя во время сеанса лечения по индивидуальной потребности ингаляции оксида азота с высокопоточной оксигенацией, при этом дополнительно кожная поверхность всей спины больного в положении лежа на животе обрабатывалась потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин три раза в день в течение семи суток до купирования признаков острого респираторного дистресс-синдрома. Сатурация увеличилась сразу во время сеанса с 78 до 91%. Сразу после проведенного сеанса пациентом отмечена легкость дыхания, ушла боль при вдохе, улучшилось психологическое состояние, улучшились биохимические показатели крови в течение суток. Лечащий врач стал снижать скорость высокопоточной оксигенации. Улучшилось отхождение мокроты, снизилась интенсивность кашля. Больной быстро начал поправляться на фоне регулярных процедур ингаляционного оксида азота в высоких концентрациях и черезкожного воздействия NO области легких и спины. На фоне плавного снижения скорости высокопоточной оксигенации под контролем восстановившейся сатурации до 95% был переведен на самостоятельное дыхание. На седьмые сутки после окончания курса воздействия NO по предложенной нами методике выписан из ковидного отделения с улучшением на реабилитационную терапию. Отдаленный результат здоровья благоприятный.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из вышеизложенного, использование высокодозовой ингаляции оксида азота (не менее 1000 ppm) у пациентов с разной степенью

сложности заболевания COVID-19 показало высокую эффективность этого подхода при их лечении. Все пациенты, даже исходно в крайне тяжелом состоянии с неблагоприятным прогнозом, находившиеся при спонтанном дыхании на высокопоточной оксигенации (18 пациентов), выжили и полностью выздоровели, причем без побочных постковидных осложнений. Насколько нам известно, такого результата до сих пор не было получено при использовании низкодозовой ингаляции газообразным NO (не более 160 ppm) при лечении схожих больных. Встает вопрос — чем могло быть обусловлено резкое повышение эффективности такого способа лечения пациентов, инфицированных коронавирусом SARS-Cov-2, при переходе от низко- к высокодозовой NO-ингаляции этих больных. Ответить на этот вопрос сейчас невозможно. Можно лишь предположить некоторые вероятные механизмы этого повышения, которые могли состоять в следующем.

Во-первых, при поступлении в дыхательные пути и легкие большого количества молекул NO значительная его часть могла при связывании с анионами супероксида превратиться в высокоцитотоксичный пероксинитрит, воздействующий на коронавирус. Реализации этого процесса могло способствовать высокое содержание в дыхательных путях и легких кислорода, поступающего в эти ткани с воздухом при атмосферном давлении. Последующий при нейтральных («физиологических») значениях pH распад пероксинитрита, образующегося при связывании анионов супероксида и оксида азота, должен был приводить к появлению в тканях чрезвычайно сильного окислителя — гидроксильного радикала, который мог бы заблокировать репликацию коронавируса. Вместе с тем этот радикал мог бы, как неспецифический агент, реагирующий практически со всеми внутриклеточными компонентами, нарушить тем самым протекание множества метаболических процессов и вызвать в результате этого разнообразные патологические явления. Поскольку последние не обнаруживались у пациентов при действии на них высокодозовой NO-ингаляции, механизм ее лечебного действия на пациентов с COVID-19 через пероксинитрит представляется маловероятным.

Во-вторых, при высоком (атмосферном) содержании кислорода в дыхательных путях и легких NO мог окисляться до двуоксида азота (NO_2), связывающейся с NO с образованием триоксида азота (N_2O_3), способного как донора катиона нитрозония (NO^+) S-нитрозировать разнообразные тиолсодержащие белки, в том числе необходимые для реализации ковидной инфекции, например, протеазы хозяина и вируса. Однако вероятность проявления S-нитрозирующей активности триоксида азота в клетках не могла быть до-

статочно высокой из-за низкой устойчивости этого соединения, обусловленной его быстрым гидролизом при нейтральных («физиологических») значениях pH до нитрита. Другими словами, триоксид азота не способен был донести гидролизующийся катион нитрозония до тиоловых групп, характеризующихся более высоким сродством к катионам нитрозония по сравнению с его сродством к анионам гидроксила в молекулах воды. Таким образом и этот, второй механизм ингибирующего влияния газообразного NO на COVID-19 вряд ли мог быть в значительной степени вероятным.

Наконец, третий механизм такого влияния может определяться способностью молекулярного оксида азота образовывать в организме животных и человека так называемые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами, как низкомолекулярными, так и белковыми [15]. В согласии с современными представлениями об этих комплексах они могли выступать в живых организмах в качестве как доноров NO, так и катионов нитрозония [16]. При этом из-за достаточно высокой устойчивости ДНКЖ, в особенности, ДНКЖ белковой природы, эти комплексы могли сохранять молекулы NO и катионы нитрозония во внутриклеточном пространстве как своеобразное депо этих агентов, избирательно передавая их при столкновении внутри клеток на соответствующие мишени — гем- и тиолсодержащие белки, характеризующиеся более высоким сродством к указанным компонентам ДНКЖ, чем сами эти комплексы.

Впервые блокирующее действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на вирусную инфекцию было продемонстрировано группой немецких исследователей, обнаруживших подавление активности протеазы 2A вируса Coxsackie B под действием моноядерных динитрозильных комплексов железа (M-ДНКЖ) с цистеином и особенно M-ДНКЖ, включавших в качестве лиганда цистеиновый остаток тетрапептида Leu-Ser-Tre-Cis, избирательно связывающегося с протеазой A [17]. Блокирование этого фермента под действием этих комплексов обнаруживалось как на изолированном белке, так и в опытах на культуре клеток миокарда, инфицированных вирусом Coxsackie B [17]. В обоих случаях блокада была обусловлена обратимым S-нитрозированием одной из тиоловых групп протеазы A. Эта трансформация в опытах на животных приводила к значительному ослаблению их инфекции указанным вирусом [18].

Обнаруженное S-нитрозирование протеазы A под действием ДНКЖ с цистеином, очевидно, было обусловлено катионами нитрозония, высвобождавшимися из ДНКЖ. Аналогичный вы-

вод о механизме цитотоксического действия на опухолевые клетки Jurkat М-ДНКЖ с тиосульфатом был позднее сделан и в работе группы немецких и российских исследователей [19]. Оказалось, что этот эффект не ослаблялся, а даже усиливался при совместном действии на эти клетки М-ДНКЖ с тиосульфатом и одного из производных дитиокарбамата — N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата.

Это усиление было обусловлено способностью производных дитиокарбамата перетягивать на себя железо-мононитрозильную ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$) группу из железо-динитрозильного фрагмента моноядерных и биядерных ДНКЖ с образованием устойчивых биологически неактивных мононитрозильных комплексов железа с производными дитиокарбамата и высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония [20] (схема 1):

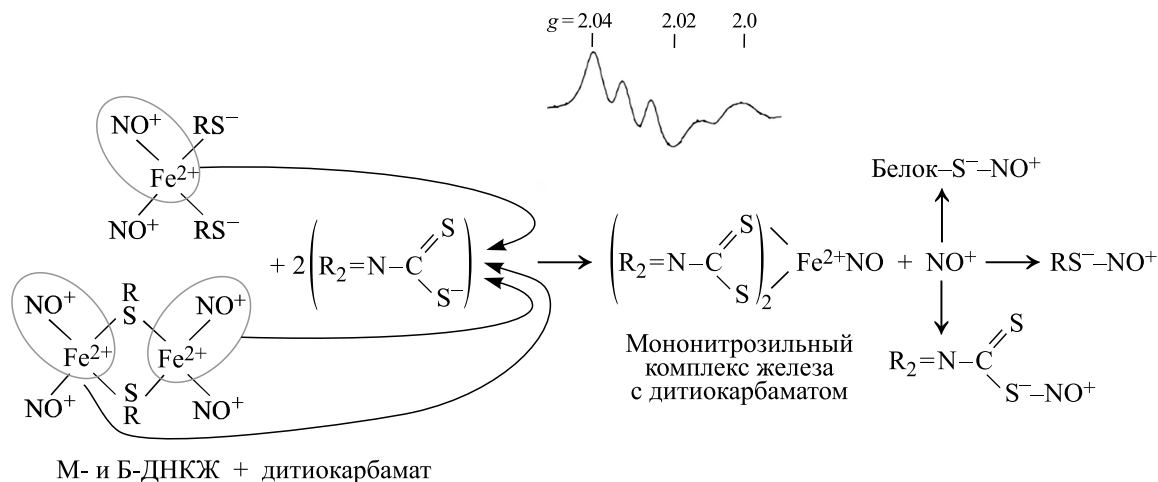


Схема 1. Механизм превращения М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ с производными дитиокарбамата. Высвобождающиеся при этом катионы нитрозония могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе дитиокарбамата. Наверху приводится зарегистрированный при 77 К сигнал ЭПР со значениями $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.02$ и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом.

Эти катионы, очевидно, и были ответственны за цитотоксическое действие ДНКЖ с тиосульфатом на клетки Jurkat.

Этот подход, а именно использование комбинации биядерных ДНКЖ с глутатионом и производного дитиокарбамата — диэтилдитиокарбамата при последовательной (биядерные ДНКЖ + диэтилдитиокарбамат) аэрозольной обработке растворами этих агентов сирийских хомячков, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2, позволил практически полностью заблокировать эту инфекцию у животных [21].

В связи с этим не исключается возможность того, что обнаруженное в нашей работе антиковидное действие на пациентов высокодозовой NO-ингаляции было обусловлено образованием в дыхательных путях и легких этих больных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Образованию этих комплексов могла способствовать гипоксия этих органов, возникающая в них при их контакте с высоким количеством газообразного NO, связывание которого с кислородом и приводила к гипоксии. Последняя могла повышать в тканях дыхательных путей и легких уровень ком-

понента ДНКЖ — слабосвязанного (свободного) железа, что могло обеспечить появление в этих тканях значительного количества ДНКЖ. Последующий распад этих комплексов, обеспечивающий аккумуляцию в тканях катионов нитрозония, подавляющих COVID-19, мог инициироваться анионами супероксида, разрушающими ДНКЖ.

Этот — третий из приведенных возможных механизмов антиковидного действия высоких (более 1000 ppm) доз газообразного NO — представляется сейчас наиболее вероятным. Для доказательства этого необходимо только одно — проверить, действительно ли в организме животных и человека при их высокодозовой NO-ингаляции, в частности в легких, могут возникать ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в инициативном порядке.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры, выполненные в работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, Br. J. Pharmacol., **177**, 3848 (2020).
2. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика, **66**, 183 (2021).
3. S. B. Wiegand, L. Traeger, H. K. Nguyen, et al., Redox Biol., **39**, 101826 (2021).
4. B. Ozdemir and A. Yazici, Med. Hypotheses, **144**, 109970 (2020).
5. S. B. Wiegand, B. S. Fakhr, R. W. Carroll, et al., Crit. Care Explor., **2**, e0277 (2020).
6. B. S. Fakhr, S. B. Wiegand, R. Pinciroli, et al., Obstet. Gynecol., **136** (2020).

7. A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, A. B. Vagapov, et al., Eur J. Pharmaceut. Sci., **128**, 193 (2019).
8. A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, A. B. Vagapov, et al., Clin. Plasma Med., **19–20**, 100101 (2020).
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), MMWR Morbid Mortal Wkly Rep. **37**, 1 (1988).
10. В. И. Агрошенко и С. И. Каргин, *Технология азотной кислоты* (Госхимиздат, М., 1949).
11. J. N. Justice, L. C. Johnson, A. E. DeVan, et al., Aging, **7** (11), 1004 (2015).
12. H. U. Rehman, West J. Med., **175**, 193 (2001).
13. A. V. Butenko, A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, et al., Clin. Plasma Med., **19–20**, 100112 (2020).
14. Е. В. Печёнкин, А. В. Пекшев и А. Б. Вагапов, заявка на изобретение № 2022113140 от 13.05.2022.
15. А. Ф. Ванин, *Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физхимия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
16. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
17. C. Badorff, B. Fichtschere, A. Mulsch, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **6**, 305 (2002).
18. C. Badorff, B. Fichtschere, R. E. Rhoads, et al., Circulation, **102**, 162 (2000).
19. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., Nitric Oxide Biol. Chem., **40**, 1340 (2006).
20. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
21. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., Биофизика, **67** (5), 1 (2022).

High Dose Inhalation with Gaseous Nitric Oxide Flow in COVID-19 Treatment

E.V. Pechyonkin*, A.V. Kovrizhkin**, A.V. Pekshev***, A.B. Vagapov***, N.A. Sharapov***, and A.F. Vanin****

*Stavropol State Medical University, ul. Mira 310, Stavropol, 355017 Russia

**City Clinical Hospital №3, ul. Lenina 417, Stavropol, 355029 Russia,

***N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

****N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The approach has been proposed and technically realized to manage the COVID-19 patients treated with high flow oxygen therapy, a method of high-dose inhaled gaseous nitric oxide for the treatment of spontaneously breathing patient. The results obtained demonstrate high efficiency of the new method. This paper provides a discussion of a possible mechanism of the inhibiting effect of high-doses inhaled nitric oxide on the replication of SARS-Cov-2, leading to the formation of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in the respiratory system and lungs of patients with COVID-19. These complexes as NO and nitrosonium cation donors exert cytotoxic effects on SARS-Cov-2.

Keywords: nitric oxide, inhalation, dinitrosyl iron complexes, COVID-19, SARS-CoV-2, PLASON

К ТЕОРИИ ЯВЛЕНИЯ СУПЕРКОМПЕНСАЦИИ НА ОСНОВЕ МОДЕЛИ НЕЛИНЕЙНОГО ПЕРЕТОРМОЖЕННОГО ОСЦИЛЛЯТОРА

© 2022 г. А.А. Зайцев^{*,#}, С.В. Сазонов^{**}, ^{***}, ^{****}, ^{##}

^{*}Калининградский государственный технический университет,
Советский просп., 1, Калининград, 236000, Россия

[#]E-mail: aaz039@yandex.ru

^{**}Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182, Москва, пл. академика Курчатова, 1, Россия

^{***}Московский авиационный институт (Национальный исследовательский университет),
Волоколамское шоссе, 4, Москва, 125993, Россия

^{****}Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 191991, Россия

^{##}E-mail: sazonov.sergey@gmail.com

Поступила в редакцию 19.10.2021 г.

После доработки 19.10.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Предложен аналитический подход к описанию явления суперкомпенсации на основе уравнения нелинейного переторможенного осциллятора Дюффинга. Получено выражение для порогового значения функционального сдвига живого организма. Найдено и проанализировано приближенное решение, которое описывает временную динамику функционального сдвига, включая фазу суперкомпенсации первого порядка.

Ключевые слова: суперкомпенсация, функциональный сдвиг, нелинейность, нелинейный переторможенный осциллятор.

DOI: 10.31857/S0006302922060242, EDN: LMNDEM

Процессы восстановления живых организмов после интенсивных физических нагрузок часто происходят через фазу суперкомпенсации [1–6]. Данный эффект, как правило, способствует увеличению функциональных способностей организма.

Суть явления состоит в следующем. Пусть Q – один из динамических параметров, характеризующих состояние организма. Например, это может быть мгновенное значение пульса или, другими словами, частоты сердечных сокращений. В состоянии равновесия $Q = Q_{\text{eq}}$. При внешних воздействиях на организм значение Q изменяется, в результате чего данный динамический параметр начинает зависеть от времени t : $Q = Q(t)$. Определим функциональный сдвиг $P(t)$ данного параметра равенством $P(t) = Q_{\text{eq}} - Q(t)$. Очевидно, что если организм находится в равновесном состоянии, то $P = 0$. Реакция организма на внешнюю физическую нагрузку проявляется в том, что параметр Q отклоняется от равновесного значения. Пусть, например, при этом $Q > Q_{\text{eq}}$, тогда $P < 0$. При небольших внешних нагрузках после их пре-

ращения происходит плавная релаксация функционального сдвига к нулевому значению. Однако если сразу после действия интенсивной нагрузки величина сдвига превышает некоторое пороговое значение P_{th} , то релаксация сдвига к нулевому значению имеет квазиосциллирующий характер. В таком случае говорят о явлении суперкомпенсации (или о сверхвосстановлении). При релаксации P к нулевому значению посредством одной квазиосцилляции (одного экстремума в зависимости $P(t)$) имеем суперкомпенсацию первого порядка (рис. 1а). Если процесс релаксации включает две квазиосцилляции (два экстремума в зависимости $P(t)$), говорят о суперкомпенсации второго порядка (рис. 1б) и т.д.

В основе эффекта суперкомпенсации лежат процессы пластического характера в утомленных органах и тканях живого организма [7].

В работе [8] было предложено описывать явление суперкомпенсации на основе уравнения затухающего осциллятора с кубической нелинейностью для функционального сдвига

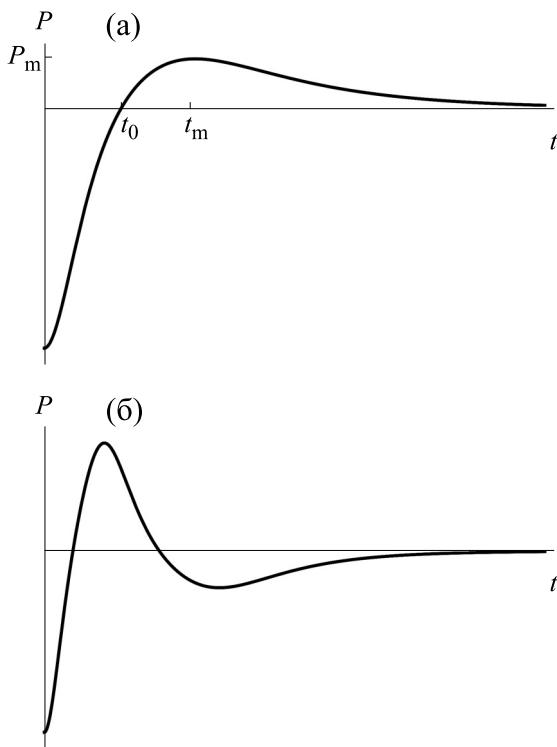


Рис. 1. Эффекты суперкомпенсации первого (а) и второго (б) порядков; t_0 и t_m – соответственно времена начала и максимума фазы суперкомпенсации первого порядка, $P_m = P(t_m)$ – максимальное значение функционального сдвига в фазе суперкомпенсации первого порядка.

$$\ddot{P} + 2\gamma\dot{P} + \omega_0^2 P + \beta P^3 = 0. \quad (1)$$

где γ и ω_0 – постоянные параметры, характеризующие соответственно вязкую и упругую сопротивляемости организма по отношению к выводу его из равновесного состояния, при котором $P = 0$, β – нелинейный коэффициент упругой сопротивляемости, точка сверху означает производную по времени.

Условие переторможенности $\gamma > \omega_0$ наряду с жесткой ($\beta > 0$) нелинейностью обеспечивает пороговый по начальному сдвигу ($|P(0)| > P_{th}$) характер эффекта [8]. Для реализации эффекта суперкомпенсации в случае здорового организма переторможенность должна быть относительно слабой, такой, что (см. работу [8])

$$1 \leq \gamma/\omega_0 \leq 1.1. \quad (2)$$

Численные эксперименты, проведенные в работе [8], показали, что уравнение (1) наряду с условием слабой переторможенности (2) достаточно корректно описывает эффект суперкомпенсации и его пороговый характер. Однако с помощью численных экспериментов затруднительно сделать прогнозные оценки в появлении

данного эффекта и характере его протекания во времени в зависимости от величины нагрузки на организм, а также от соотношения между параметрами γ и ω_0 . Здесь необходимо использовать приближенные аналитические методы решения уравнения (1).

Заметим, что в случае, когда $\gamma/\omega_0 \ll 1$, разработан ряд аналитических методов для нахождения приближенных аналитических решений уравнения (1). Можно выделить методы Ван-дер-Поля, Крылова–Боголюбова–Митропольского, Линштедта–Пуанкаре, метод многих масштабов и др. [9]. В другом, противоположном случае ($\gamma/\omega_0 \gg 1$) хорошо зарекомендовал себя метод пограничного слоя [9]. Этим двум взаимно противоположным условиям не удовлетворяют значения отношения γ/ω_0 из интервала (2).

Следует отметить, что при $\gamma/\omega_0 = 3/\sqrt{8} \approx 1.06$ имеется одно точное решение уравнения (1) [10, 11]. Важно, что данное значение параметра γ попадает в интервал, определенный двойным неравенством (2). В работе [12] был предложен приближенный подход для нахождения приближенного решения уравнения (1) при $\gamma/\omega_0 = 1$, основанный на асимптотическом методе Вентцеля–Крамерса–Бриллюэна. В то же время при слабой переторможенности отсутствуют методы поиска приближенных аналитических решений уравнения (1), справедливые для всех отношений γ/ω_0 из интервала значений (2).

Настоящая работа посвящена представлению и развитию оригинального приближенного метода решения нелинейного уравнения Дюффинга (1) при условии слабой переторможенности (2) и анализу на этой основе явления суперкомпенсации.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ, ПРИБЛИЖЕННОЕ РЕШЕНИЕ И ЕГО АНАЛИЗ

После масштабных преобразований

$$P = \frac{\omega_0}{\sqrt{\beta}} R, \quad t = \frac{\tau}{\omega_0}, \quad \Gamma = \frac{\gamma}{\omega_0} \quad (3)$$

уравнение (1) и условие слабой переторможенности (2) примут соответственно вид

$$\frac{d^2 R}{d\tau^2} + 2\Gamma \frac{dR}{d\tau} + R + R^3 = 0, \quad (1a)$$

$$1 \leq \Gamma \leq 1.1. \quad (2a)$$

Будем считать, что действие внешней нагрузки на организм соответствует отрицательным временам. При $t = \tau = 0$ действие нагрузки прекращается и начинается восстановление организма. В соответствии с этим для обезразмеренного функци-

Таблица 1. Подобранные значения параметров

Γ	1.00	1.05	1.10
I_{\min}	0.0008	0.0012	0.0018
σ	0.800	0.745	0.690

онального сдвига R при $\tau = 0$ имеем следующие начальные условия:

$$R(0) = R_0, \left(\frac{dR}{d\tau}\right)_{\tau=0} = 0. \quad (4)$$

При этом величина R_0 связана с начальным значением P_0 функционального сдвига очевидным соотношением $P_0 = \omega_0 R_0 / \sqrt{\beta}$ (см. первое выражение (3)).

Для аналитического исследования, следуя работе [12], нелинейное слагаемое в уравнении (1а) перепишем в приближенном виде:

$$R^3 \approx R_i^2(\tau)R, \quad (5)$$

где $R_i(\tau)$ – решение линеаризованной задачи (1а), (2а):

$$R_i(\tau) = R_0 e^{-\Gamma\tau} \left[\operatorname{ch}(\sqrt{\Gamma^2 - 1}\tau) + \frac{\Gamma}{\sqrt{\Gamma^2 - 1}} \operatorname{sh}(\sqrt{\Gamma^2 - 1}\tau) \right]. \quad (6)$$

Тогда уравнение (1а) примет вид

$$\ddot{R} + 2\Gamma\dot{R} + R + R_i^2(\tau)R = 0. \quad (7)$$

Представляя R как

$$R = e^{-\Gamma\tau}\psi(\tau) \quad (8)$$

и подставляя данное выражение в уравнение (7), приходим к уравнению

$$\frac{d^2\psi}{d\tau^2} + R_i^2(\tau)\psi = (\Gamma^2 - 1)\psi. \quad (9)$$

Уравнение (9) формально совпадает со стационарным уравнением Шредингера из квантовой механики [13] для частицы с энергией $E = -(\Gamma^2 - 1)/2$, движущейся в потенциальной яме

$$U(\tau) = -\frac{R_i^2}{2}. \quad (10)$$

где роль координаты играет безразмерное время τ .

Аппроксимируем $U(\tau)$ модифицированным потенциалом Пешля–Теллера [14]:

$$U(\tau) \approx U_{PT}(\tau) = -\frac{R_0^2}{2} \operatorname{sech}^2(\alpha\tau), \quad (11)$$

где α – подлежащая определению постоянная.

Для определения α воспользуемся методом наименьших квадратов [15], согласно которому минимизируется интеграл

$$I \equiv \int_0^{\infty} (U(\tau) - U_{PT}(\tau))^2 d\tau.$$

В результате найдем α как функцию декремента затухания Γ (см. уравнения (6) и (10)). Сначала запишем $\alpha = \Gamma\sigma$. Затем простым перебором для разных Γ найдем те значения σ , при которых интеграл I принимает минимальные значения I_{\min} . Соответствующие данные сведены в табл. 1.

Нетрудно видеть, что эти данные в промежутке $1 \leq \Gamma \leq 1.1$ удовлетворяют следующей зависимости: $\sigma = 0.8 - 1.1(\Gamma - 1.0) = 0.8[1.0 - 1.375(\Gamma - 1.0)]$. Так как параметр σ принимает только положительные значения, предположим, что выражение в квадратных скобках представляет собой первые два члена разложения экспоненты в ряд Тейлора. Таким образом, $\sigma = 0.8 \exp[-1.375(\Gamma - 1.0)]$. Следовательно, имеем:

$$\alpha = \frac{4}{5} \Gamma e^{-11(\Gamma-1)/8}. \quad (12)$$

Формальная проверка показывает, что данное выражение с хорошей точностью выполняется вплоть до $\Gamma = 1.5$.

На рис. 2 показаны профили кривых (10), (6) и (11) при равенстве (12). Заметно удовлетворительное совпадение обеих кривых.

Теперь совершим формальный прием: продлим четным образом зависимость $U(\tau)$ в область отрицательных значений τ . В этом случае мы можем использовать результаты квантовой механики задачи для потенциала Пешля–Теллера на всем интервале значений τ от $-\infty$ до $+\infty$. Также четным образом продлим в область отрицательных времен зависимость $R(\tau)$. Это соответствует начальным условиям (4). Тогда число связанных состояний $n + 1$ в потенциальной яме Пешля–Теллера соответствует порядку суперкомпенсации n при том, что основному связанному состоянию соответствует $n = 0$. Действительно, согласно теории одномерного движения в квантовой механике волновая функция основного состояния нигде не пересекает ось абсцисс, а одно связанное состояние существует при любой, сколь угодно малой глубине потенциальной ямы. Значит, наличие только одного связанного состояния не приводит к эффекту суперкомпенсации. Для проявления же эффекта суперкомпенсации глубина потенциальной ямы должна быть таковой, чтобы в ней содержалось не менее двух связанных состояний. Ниже ограничимся рассмотрением суперкомпенсации первого порядка ($n = 1$), что соответствует двум связанным состояниям в рассматриваемой потенциальной яме.

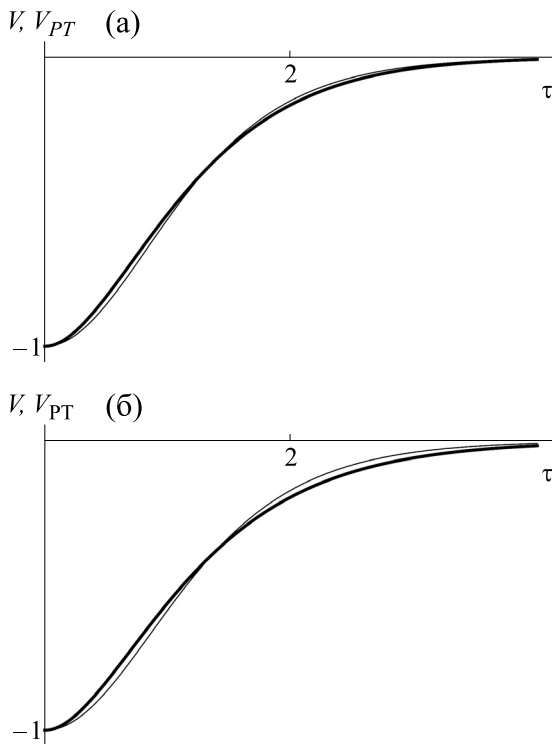


Рис. 2. Зависимости «потенциалов» $V = 2U/R_0^2$ (жирные кривые) и $V_{PT} = 2U_{PT}/R_0^2$ (тонкие кривые) от безразмерного времени τ при $\Gamma = 1.0$ (а) и $\Gamma = 1.1$ (б).

Приняв во внимание уравнение (11), запишем с учетом замены $R_0 \rightarrow R_{th}$ выражение для собственных значений энергии связанных состояний в следующем виде [13]:

$$E = -\frac{\alpha^2}{8} \left[\sqrt{1 + \frac{4R_{th}^2}{\alpha^2}} - (1 + 2n) \right]^2.$$

С другой стороны, как было отмечено выше, $E = -(\Gamma^2 - 1)/2$. Приравнивая друг другу правые части данных выражений и полагая в уравнении (15) $n = 1$, будем иметь

$$R_{th} = \left[(\alpha + \sqrt{\Gamma^2 - 1})(2\alpha + \sqrt{\Gamma^2 - 1}) \right]^{1/2}. \quad (13)$$

При этом α определяется выражением (12), а $P_{th} = \omega_0 R_{th} / \sqrt{\beta}$.

Величиной R_{th} определяется наименьшее (критическое) начальное значение обезразмеренного функционального сдвига, при превышении которого возникает явление суперкомпенсации первого порядка.

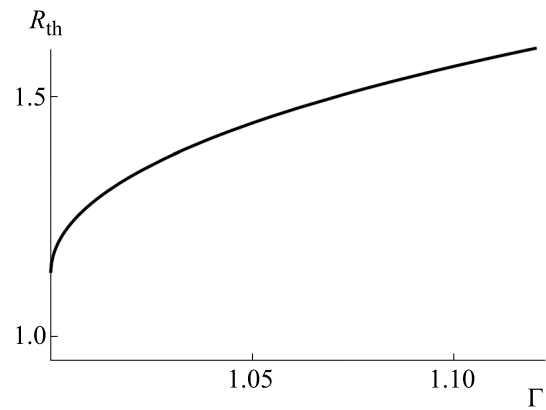


Рис. 3. Зависимость безразмерного порогового значения R_{th} функционального сдвига от параметра Γ .

В работе [11] было найдено точное решение задачи (1а), (4) при $\Gamma = 3/\sqrt{8} \approx 1.06$. Поэтому для тестирования формул (12) и (13) удобно рассмотреть именно этот случай. Подставив в уравнения (12) и (13) $\Gamma = 1.06$, найдем $R_{th} = 1.47$. Это практически совпадает с результатом, полученным в работе [11] точными математическими методами. Данное обстоятельство является серьезным аргументом в пользу корректности формул (12) и (13).

Преимущество используемого приближенного подхода в сравнении с точным подходом, проведенным в работе [11], состоит в том, что полученные здесь основные выражения (12) и (13) справедливы не только при $\Gamma = 1.06$, но и при других значениях Γ из допустимого интервала (2а). Полагая, например, $\Gamma = 1.0$, будем иметь $R_{th} = 1.13$. В работе [12], где для приближенного решения задачи (1), (2) был использован метод Вентцеля–Крамерса–Бриллюэна, было получено значение $R_{th} = 1.15$, что очень близко к 1.13. Однако хорошее совпадение нашего результата с результатом, найденным в работе [11] с помощью точного решения, дает нам основания утверждать, что $R_{th} = 1.13$ при $\Gamma = 1.0$ уточняет соответствующий результат, полученный в работе [12].

На рис. 3 изображена зависимость $R_{th}(\Gamma)$, построенная на основе уравнений (12) и (13) в интервале $1.0 \leq \Gamma \leq 1.1$. Как и следовало ожидать, R_{th} монотонно возрастает с увеличением диссипативного параметра Γ .

Общее решение уравнения (9) может быть представлено в виде линейной комбинации четной и нечетной собственных функций [14]:

$$\psi = \text{ch}^\lambda \alpha \tau \left[AF \left(a, b, \frac{1}{2}; -\text{sh}^2 \alpha \tau \right) + B \text{sh} \alpha \tau F \left(a + \frac{1}{2}, b + \frac{1}{2}, \frac{3}{2}; -\text{sh}^2 \alpha \tau \right) \right], \quad (14)$$

где $F(a, b, c; x)$ – гипергеометрическая функция аргумента x [15]; A и B – постоянные, определяемые из начальных условий;

$$\lambda = \frac{1}{2} \left(\sqrt{1 + \frac{4R_0^2}{\alpha^2}} - 1 \right), \quad a = \frac{1}{2} \left(\lambda - \frac{\sqrt{\Gamma^2 - 1}}{\alpha} \right), \quad b = \frac{1}{2} \left(\lambda + \frac{\sqrt{\Gamma^2 - 1}}{\alpha} \right). \quad (15)$$

Приняв во внимание выражения (8) и (4), запишем интересующее нас решение в виде

$$R = R_0 e^{-\Gamma \tau} \operatorname{ch} \lambda \alpha \tau \left[F \left(a, b, \frac{1}{2}; -\operatorname{sh}^2 \alpha \tau \right) + \frac{\Gamma}{\alpha} \operatorname{sh} \alpha \tau F \left(a + \frac{1}{2}, b + \frac{1}{2}, \frac{3}{2}; -\operatorname{sh}^2 \alpha \tau \right) \right]. \quad (16)$$

Данное выражение содержит в себе решение (6) линейной задачи как частный случай $R_0 \rightarrow 0$. Действительно, как видно из выражений (15), в этом случае $\lambda = 0$, $a = -b = -\sqrt{\Gamma^2 - 1} / (2\alpha)$. Учитывая также, что $F(-b, b, 1/2; -\operatorname{sh}^2 \alpha \tau) = \operatorname{ch}^2 \alpha \tau$, $F(-b + 1/2, b + 1/2, 3/2; -\operatorname{sh}^2 \alpha \tau) = \operatorname{sh}(2b\alpha\tau) / (2b\operatorname{sh}\alpha\tau)$, из решения (16) приходим к решению (6). Данное обстоятельство является существенным аргументом в пользу решения (15), (16).

На рис. 4 изображены кривые, построенные на основе выражений (12), (15), (16) и на основе численного решения задачи (1а), (4) при $\Gamma = 1.5$ и $R_0 = 3.0$. В этом случае вычисление по формуле (13) дает для порогового значения безразмерного функционального сдвига $R_{\text{th}} = 1.44$. Налицо вполне удовлетворительное согласие между численным экспериментом и аналитическим решением (16), где постоянные параметры определяются по формулам (12) и (15).

Приравняв правую часть уравнения (16) к нулю, можно найти τ_0 – безразмерное время начала

фазы суперкомпенсации. В свою очередь, приравняв к нулю производную по τ той же правой части, можно в принципе найти безразмерное время τ_m экстремальной (развитой) стадии фазы суперкомпенсации. Затем с помощью второй формулы (3) можно найти соответствующие размерные времена τ_0 и τ_m (см. рис. 1). Соответствующие уравнения являются трансцендентными, содержащими гипергеометрические функции. Поэтому они не очень удобны для анализа. С другой стороны, нетрудно заметить, что при заметном превышении начальным значением функционального сдвига пороговой величины R_{th} справедлива оценка $\tau_0 \sim 1/\Gamma$. Отсюда, а также из формул (3) имеем $t_0 \sim 1/\gamma$. Для оценки интервала $t_m - t_0$ заметим, что в фазе суперкомпенсации значения $R_m = \sqrt{\beta P_m / \omega_0}$ относительно невелики (см. рис. 1). Следовательно, здесь можно пренебречь нелинейностью и рассматривать линейное решение (6) с заменами $\tau \rightarrow \tau - \tau_m$ и $R_0 \rightarrow R_m$ [12]. Таким образом, имеем

$$R_i(\tau) \approx R_m e^{-\Gamma(\tau - \tau_m)} \left[\operatorname{ch} \left(\sqrt{\Gamma^2 - 1} (\tau - \tau_m) \right) + \frac{\Gamma}{\sqrt{\Gamma^2 - 1}} \operatorname{sh} \left(\sqrt{\Gamma^2 - 1} (\tau - \tau_m) \right) \right].$$

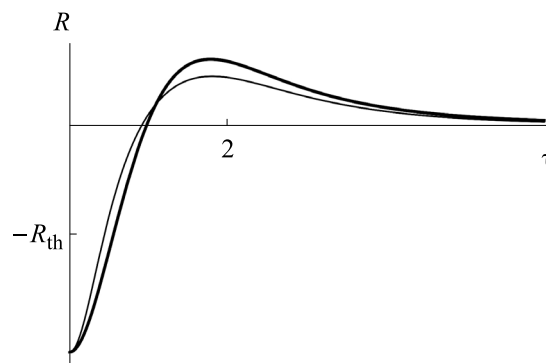


Рис. 4. Временные зависимости функционального сдвига одного и того же организма, построенные на основе аналитического решения (12), (15) и (16) (жирная кривая) и на основе численного решения уравнения (1а) при начальных условиях (4) (тонкая кривая).

Так как при $\tau = \tau_0$ сдвиг R обращается в ноль, отсюда находим $\text{th}\left(\sqrt{\Gamma^2 - 1}(\tau_0 - \tau_m)\right) \approx \sqrt{\Gamma^2 - 1} / \Gamma$. Так как, согласно условию (2а), значение Γ очень близко к единице, обе части последнего равенства малы. Приближенно заменяя в этих условиях гиперболический тангенс его аргументом, получим $\tau_m - \tau_0 \approx 1/\Gamma$. Отсюда и из формул (3) находим для размерных времен

$$t_m - t_0 \approx 1/\gamma. \quad (17)$$

Из рис. 1 и 4 видно, что фаза суперкомпенсации несимметрична относительно времени t_m , соответствующего слабо выраженному локальному максимуму. Продолжительность данной фазы после t_m примерно в три раза превышает промежуток $t_m - t_0$. Отмерив интервал, равный примерно $3(t_m - t_0) \approx 3/\gamma$ от значения t_m , приходим к практическому окончанию фазы суперкомпенсации.

Таким образом, можно сказать, что спустя время, равное $t_0 \approx 1/\gamma$ после начала процесса восстановления наступает фаза суперкомпенсации. Далее, при $t = t_m \approx 2/\gamma$, наступает развитая стадия фазы суперкомпенсации, а при $t \approx 5/\gamma$ следует практическое окончание данной фазы. В результате для интервала времени Δt , где организм пребывает в фазе суперкомпенсации, справедлива приближенная оценка $\Delta t \approx 4/\gamma$.

Приведем пример на использование полученных здесь результатов. Пусть у тренированного спортсмена пульс в покое равен $Q_{\text{eq}} = 60$ ударов в минуту. При этом параметры его организма следующие: $\gamma = 1.33 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, $\omega_0 = 1.27 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, $\beta = 1.5 \cdot 10^{-4}$ [12]. Тогда после использования масштабных преобразований (3) получим $\Gamma = 1.047$. Подставляя данное значение в формулы (12) и (13), найдем $R_{\text{th}} = 1.435$. Используя далее формулы (3), получим $\omega_0 R_{\text{th}} / \sqrt{\beta} = 1.49 \text{ с}^{-1} \approx 89 \text{ уд/мин}$. Таким образом, для наступления фазы суперкомпенсации пульс спортсмена сразу после снятия интенсивной нагрузки должен превышать значение $Q_{\text{th}} = Q_{\text{eq}} + P_{\text{th}} = 149 \text{ уд/мин}$. При этом стадия суперкомпенсации наступит примерно через $t_0 \approx 1/\gamma = 75 \text{ с}$ и продлится порядка пяти минут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный в настоящей работе подход основан на приближенном представлении кубически нелинейного слагаемого в виде (5). Это позволило эффективно линеаризовать уравнение (1а) и найти приближенное решение (16) уравнения (1а). В результате удается проследить наступление фазы суперкомпенсации или ее отсутствие. Для реализации данной фазы абсолютное началь-

ное значение функционального сдвига организма (сразу после действия внешней нагрузки) должно превышать пороговую величину, вычисляемую по формуле (13), где параметр α определяется с помощью выражения (12). Пожалуй, это является основным результатом данной работы.

Подчеркнем, что использованный здесь приближенный подход позволяет определять основные параметры, характеризующие явление суперкомпенсации только первого порядка. Попытка его использования для описания суперкомпенсации высших порядков не привела к успеху. Здесь, по-видимому, необходимо развивать другие подходы. Понятно, что пороговые значения функционального сдвига для суперкомпенсации высших порядков должны значительно превышать соответствующие пороговые значения в случае эффекта первого порядка. Таким образом, при высших порядках суперкомпенсации возрастает роль нелинейности. В этой связи следует заметить, что использованная в уравнениях (1) и (1а) только кубическая нелинейность скорее всего пригодна лишь для описания эффекта суперкомпенсации первого порядка. Каковой должна быть нелинейность при описании суперкомпенсации высших порядков, должны показать будущие исследования с обязательным анализом экспериментальных данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Розенблат, *Проблема утомления* (Медицина, М., 1975).
2. В. Н. Платонов, *Подготовка квалифицированных спортсменов* (Физкультура и спорт, М., 1986).
3. В. П. Луговцев, *Восстановительные процессы после мышечной деятельности* (СГИФК, Смоленск, 1988).
4. Ю. В. Верхошанский, *Основы специальной физической подготовки спортсменов* (Физкультура и спорт, М., 1988).
5. В. С. Мищенко, В. А. Мироненко, А. И. Павлик и др., Теория и практика физической культуры, № 5, 17 (1990).
6. В. Э. Ээпик и А. А. Виру, Теория и практика физической культуры, № 5, 24 (1990).

7. Н. А. Фомин и Ю. Н. Вавилов, *Физиологические основы двигательной активности* (Физкультура и спорт, М., 1991).
8. А. А. Зайцев и С. В. Сазонов, *Биофизика*, **42** (2), 521 (1997).
9. А. Найфэ, *Введение в методы возмущений* (Мир, М., 1984).
10. Ю. В. Брежнев, А. А. Зайцев и С. В. Сазонов, *Биофизика*, **56** (2), 342 (2011).
11. Ю. В. Брежнев и С. В. Сазонов, *Журн. эксперим. и теорет. физики*, **146** (5), 1106 (2014).
12. А. А. Зайцев и С. В. Сазонов, *Биофизика*, **52** (4), 727 (2007).
13. Л. Д. Ландау и Е. М. Лифшиц, *Теоретическая физика. Т. 3. Квантовая механика: нерелятивистская теория* (Наука, М., 1989).
14. З. Флюгге, *Задачи по квантовой механике* (Мир, М., 1974), т. 1.
15. А. Анго, *Математика для электро- и радиоинженеров* (Наука, М., 1967).

To the Theory of the Supercompensation Phenomenon Based on a Model of a Nonlinear Overdamped Oscillator

A.A. Zaitsev* and S.V. Sazonov**, ***, ****

*Kaliningrad State Technical University, Sovetskii prosp. 1, Kaliningrad, 236000, Russia

**National Research Centre "Kurchatov Institute", pl. akademika Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

***Moscow Aviation Institute (National Research University), Volokolamskoe shosse 4, Moscow, 125993 Russia

****Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 191991 Russia

In this paper, an analytical approach to the description of the supercompensation phenomenon based on a nonlinear overdamped Duffing oscillator equation is proposed. An expression for the threshold value of a functional shift of the living body is obtained. An approximate solution is found and analyzed, this solution describes the temporal dynamics of the functional shift, including a first-order supercompensation phase.

Keywords: supercompensation, functional shift, nonlinearity, nonlinear overdamped oscillator

МОДЕЛЬ ЭФФЕКТА БРОКА–ЗУЛЬЦЕРА

© 2022 г. С.И. Ляпунов*, #, И.И. Шошина**, ***, ##

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, Москва, 119991, Россия

#E-mail: dc.cetsil@gmail.com

**Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7-9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

##E-mail: shoshinaii@mail.ru

***Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 82/1, Красноярск, 660041, Россия

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

После доработки 07.02.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

Феномен Брока–Зульцера – один из аспектов проблемы субъективной деформации реального мира, загадки сознания. Эффект Брока–Зульцера проявляется в превышении субъективной яркости при коротких длительностях стимула. Несмотря на долгую историю изучения, эффект не имеет удовлетворительной теории механизма его возникновения. В работе предложена модель формирования эффекта Брока–Зульцера, основанная на теории треморного модуляционного сигнала в зрительной системе. Также демонстрируется возможность использования эффекта Брока–Зульцера в качестве маркера и инструмента для оценки функционального состояния, адаптации и дезадаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Понимание природы явления имеет исключительное теоретическое и практическое значение для различных областей знаний.

Ключевые слова: эффект Брока–Зульцера, модель треморного модуляционного сигнала, яркость, яркость адаптации, теория двух путей, маркер функционального состояния.

DOI: 10.31857/S0006302922060254, EDN: LMRCZK

Феномен Брока–Зульцера – один из аспектов проблемы субъективной деформации реального мира, загадки сознания [1–10]. А. Брока и Д. Зульцер [1] сообщили об этом эффекте в 1902 г. Авторы решали задачу уравнивания кажущейся яркости (светлоты) световой вспышки заданной длительности (тестовое поле) с кажущейся яркостью световой вспышки продолжительностью 1–2 с (поле сравнения) в условиях темновой адаптации. Эффект состоит в превышении кажущейся яркости тестового поля над полем сравнения (рис. 1).

За более чем столетний период существования с момента открытия эффект Брока–Зульцера неоднократно исследовался и подтверждался как в классических, так и в измененных условиях яркости адаптации, угловых размеров, цвета и формы полей сравнения [2]. Результаты, полученные Брока и Зульцером [1], показаны в табл. 1 для следующих условий эксперимента: яркость адаптации – темнота; искусственный зрачок – 2.5 мм; угловой размер тестового поля – 180 угл. мин; яр-

кость тестового поля – 0.8, 5.3, 11.2, 22.4, 32.6 и 40.7 кд/м²; длительность постоянного поля сравнения 2.0 с. При яркости тестового поля менее

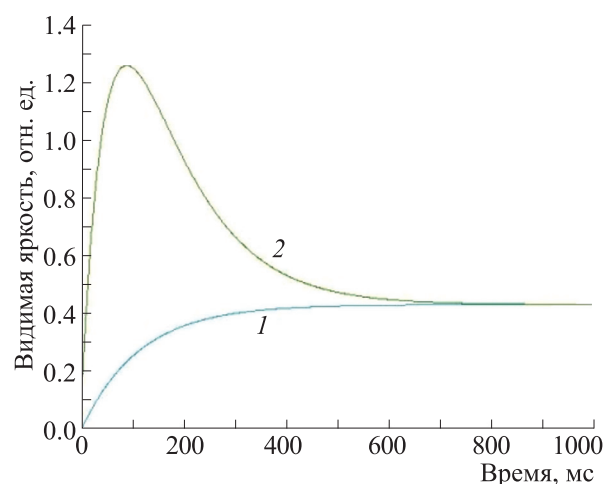


Рис. 1. Восприятие импульсных световых полей в соответствии с законом Блонделя–Рэя (кривая 1) и эффектом Брока–Зульцера (кривая 2).

Сокращения: ТМС – треморный модуляционный сигнал, ГК – ганглиозные клетки.

Таблица 1. Результаты, полученные Брока и Зульцером

Эффект/Яркость тестового поля, кд/м ²	0.8	5.3	11.2	22.4	32.6	40.7
Коэффициент превышения видимой яркости над установившимся значением	1.2	1.9	2.0	4.6	4.9	5.5
Длительность импульса тестового поля, соответствующая максимальному превышению, мс	125	100	62	45	40	32

0.2 кд/м² эффект Брока–Зульцера отсутствует, а воспринимаемая яркость подчиняется закону Блонделя–Рэя [2].

Эффект Брока–Зульцера позволяет отметить ряд особенностей зрительного восприятия:

– действие суммы нескольких световых импульсов не равно действию одного импульса суммарной длительности, что характеризует нелинейность эффекта;

– воспринимаемая яркость тестового стимула всегда определяется ощущением, которое возникает в конце действия стимула, а не эффективным значением за время действия стимула или за время инерции;

– продолжительность превышения видимой яркости над установленным значением может составлять до 2–4 с.

Несмотря на долгую историю изучения, феномен не имеет удовлетворительной теории механизма его возникновения.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА БРОКА–ЗУЛЬЦЕРА

Проведем моделирование эффекта Брока–Зульцера с позиций модели контрастной чувствительности зрительной системы, основанной на треморном модуляционном сигнале (далее модель ТМС), подробно изложенной в нескольких предыдущих работах [11–14]. В основу модели ТМС положен факт исчезновения восприятия при остановке изображения на сетчатке, полученный и подробно описанный А.Л. Ярбусом [5]. Из всех движений, совершаемых глазом, в качестве основных движений в модели ТМС приняты тремор и дрейф. Есть две причины этого выбора. Во-первых, из всех движений, осуществляемых глазом, тремор и дрейф являются самыми низкоскоростными (угловая скорость до 0.4 град/с) и не ухудшают пространственное разрешение и контрастную чувствительность зрительной системы. Это означает, что на данных угловых скоростях зрительная система накапливает отношение сигнал/шум без потерь. Во-вторых, тремор и дрейф составляют пару ортогональных движений и име-

ют соизмеримую угловую скорость, что обеспечивает двухкоординатную модуляцию сигнала.

В качестве меры треморного модуляционного сигнала принята нормированная разность концентрации фотореагента в фоторецепторе в крайних точках тремора. Из этого следует, что источником ТМС являются перепады и градиенты яркости. Постоянная яркость или малые ее изменения в пределах шума спонтанной генерации импульсов действия (спайков) ганглиозной клетки или порога возбуждения нейрона дают нулевое значение сигнала. На перепаде или градиенте яркости ТМС может существовать бесконечно долго. В модели полагается, что именно длительный ТМС является основанием для автоформирования линий возбуждения, которые впоследствии повторяются в высших отделах зрительной системы. Адекватность модели подтверждена для центрального и периферического зрения в большом диапазоне внешних условий – яркости адаптации (10^{-3} – 10^3 кд/м²), угловых размеров (1–300 угловых минут) и формы тестовых стимулов (диски, кольца Ландольта, миры Фуко, синусоидальные решетки, времени их предъявления (10^{-5} –5 с). Модель не содержит поправочных коэффициентов и функций во всем диапазоне внешних условий при восприятии различных тестовых стимулов в пороговых и надпороговых условиях.

Временные показатели эффекта Брока–Зульцера определяются показателями фотохимических процессов в рецепторе. Скорость уменьшения концентрации (разложения) фотореагента пропорциональна освещенности E и текущей концентрации c :

$$\frac{dc}{dt} = -K_1 E c. \quad (1)$$

Скорость увеличения концентрации (восстановления) фотореагента пропорциональна концентрации в неактивной фазе $(1 - c)$:

$$\frac{dc}{dt} = K_2 (1 - c). \quad (2)$$

Суммарный процесс, описывающий текущую концентрацию фотореагента как балансное со-

стояние конкурирующих процессов распада и восстановления, имеет следующий вид:

$$\frac{dc}{dt} = -(K_1E + K_2)c + K_2. \quad (3)$$

Числовые значения коэффициентов фотохимической реакции вычисляются для круглого стимула с размером, равным одной угловой минуте, и постоянны во всех внешних условиях вос-

приятия. Решение уравнения (3) имеет следующий вид:

$$c(t) = c_0 + (c_1 - c_0)\exp(-(K_2 + K_1E_1)t), \quad (4)$$

где концентрация c определяется по формуле

$$c = \frac{K_2}{K_1E + K_2} \quad (5)$$

Нормированное приращение концентрации должно быть больше порога нейронного возбуждения F :

$$\frac{(c_0 - c(t))}{c_0} = (c_0 - c_1) \frac{(1 - \exp(-(K_2 + K_1E)t))}{c_0} \geq F = \text{const.} \quad (6)$$

Переход от начального значения c_0 к значению c_1 не происходит мгновенно и требует определенного времени для достижения балансного состояния конкурирующих процессов распада и восстановления. При этом время распада фотореагента в необратимое состояние характеризуется значением порядка одной миллисекунды и переходные процессы в основном определяются временем восстановления фотореагента.

Если соотнести приращение концентрации для бесконечно большого и текущего времени, можно получить выражение для относительного порога восприятия от времени предъявления стимула. Для сравнения представлены выражение (7), полученное согласно модели ТМС, и выражение (8) для закона Блонделя–Рэя и Блоха–Шарпантье:

$$K_u = \frac{1}{(1 - \exp(-(K_2 + K_1E)t))}, \quad (7)$$

$$K_u = \frac{t_p}{(t_p + 0,21)}, \quad (8)$$

где t_p – время предъявления стимула.

Значение освещенности E в плоскости сетчатки, создаваемой яркостью L , находим по следующей зависимости:

$$E = \pi t L D_p^2 / 4 f^2, \quad (9)$$

где D_p – диаметр зрачка глаза, определяемый по формуле Крауфорда:

$$D_p = 5 - 3 \text{th}(0.4 \lg L_a). \quad (10)$$

Результаты расчета зависимости относительного порога восприятия от времени предъявления стимула представлены на рис. 2.

Выражение (6) имеет важную физическую и физиологическую трактовку. Физическая трактовка проливает свет на формирование отношения сигнал/шум в зрительной системе. Преобразуем выражение следующим образом:

$$dc(t)/c_0 = dc(\infty)/c_0(1 - \exp(-(K_2 + K_1E)t)), \quad (11)$$

$$TMC(t) = TMC_{\max}(1 - \exp(-(K_2 + K_1E)t)), \quad (12)$$

$$SN(t) = 1 - \exp(-(K_2 + K_1E)t). \quad (13)$$

Максимальное, предельное значение ТМС соответствует перепаду яркости физического стимула в крайних точках тремора, преобразованному в пространство концентрации фотореагента, а функция $SN(t)$ описывает временную динамику накопления отношения «сигнал/шум» в зрительной системе. Данная гипотеза, принятая в модели, была убедительно подтверждена при описании порогового восприятия разнообразных стимулов при неограниченном времени наблюдения. Однако при рассмотрении реальных и модельных переходных процессов обнаруживается некоторое расхождение, которое позволяет связать их между собой и, возможно, поможет соединить биофизические экспериментальные данные

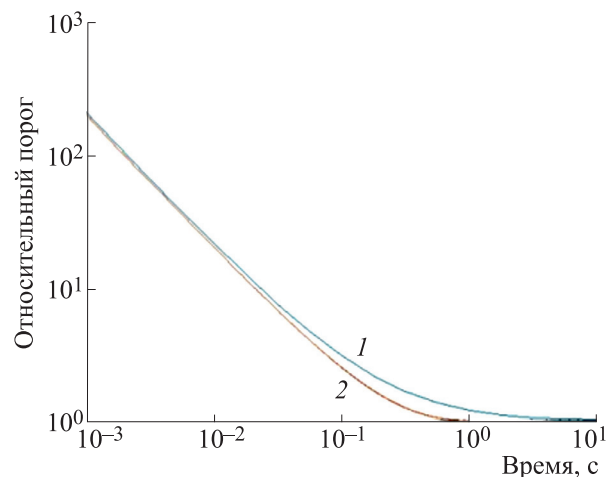


Рис. 2. Зависимость относительного порога восприятия от времени предъявления стимула: кривая 1 – закон Блонделя–Рэя и Блоха–Шарпантье; кривая 2 – результаты расчета по уравнению (7).

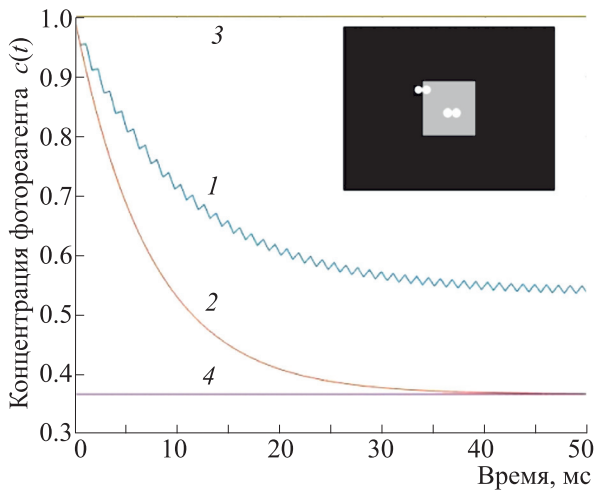


Рис. 3. Временная динамика концентрации фотореагента на частоте тремора: 1 – при треморной модуляции на границе стимула, 2 – при треморной модуляции в поле стимула, 3 – уровень концентрации адаптации, 4 – уровень концентрации стимула.

и модели протекающих в сетчатке процессов с контрастной чувствительностью зрительной системы.

На рис. 3 представлены переходные процессы концентрации фотореагента на границе и в поле стимула при треморной модуляции сигнала. Положения фоторецептора на яркостном тесте в крайних точках тремора показаны парами кругов.

На рис. 4 представлены результаты дифференцирования данных предыдущего графика с временным шагом 0.1 мс, для наглядности усиленные в 1000 раз.

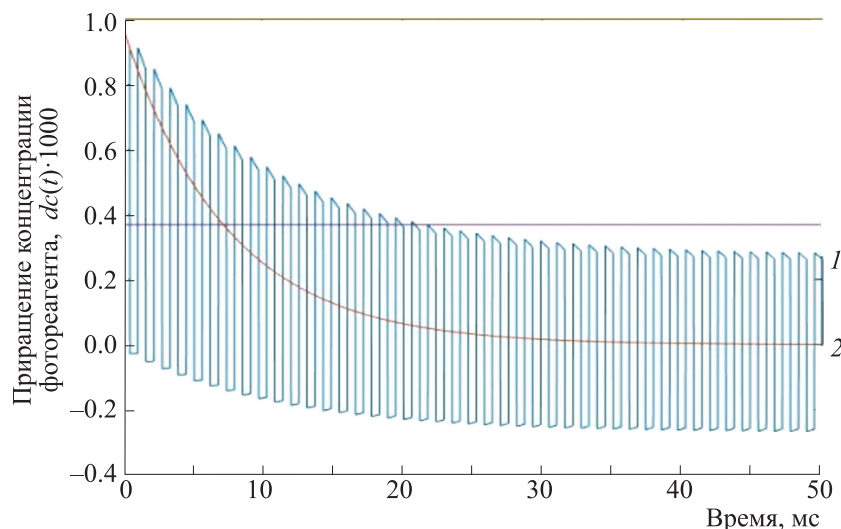


Рис. 4. Временная динамика приращения концентрации фотореагента: 1 – при треморной модуляции на границе стимула, 2 – при треморной модуляции в поле стимула.

Представленные зависимости и иллюстрации модели ТМС позволяют описать большое количество экспериментальных данных на уровне «фоторецептор – ганглиозная клетка» и перейти к моделированию эффекта Брока–Зульцера.

Рассмотрим основные выражения модели ТМС для условий экспериментов Брока–Зульцера. Концентрации c_0 соответствует яркости адаптации L_{ad} . Концентрация c_1 соответствует яркости тестирующего поля L_1 . Согласно модели ТМС сигнал формируется на границе стимула, поле суммирования сигнала равно размеру тестового поля N , выраженному в угловых минутах, время накопления сигнала t_{au} определяется частотой тремора. Выражение для ТМС имеет следующий вид:

$$P_p(t) = (c_0 - c_1)N(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t)). \quad (14)$$

Поскольку при постоянной яркости ТМС равен нулю, то выражение для ТМС в тестовом поле пропорционально площади $(N - 2)^2$ и также равно нулю:

$$P_s(t) = (c_0 - c_1)(N - 2)^2(1 - \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t)). \quad (15)$$

Но в тестовом поле есть временной сигнал, обусловленный переходным процессом от уровня c_0 к уровню c_1 (далее сигнал переходного процесса). Логично предположить, что глаз не в состоянии определить источник сигнала и суммирует все временные изменения. Сигнал переходного процесса равен производной от переходного процесса умноженной на временной интервал t_{au} и пропорционален площади тестового поля $(N - 2)^2$. Согласно формуле (12) выражение для сигнала переходного процесса с учетом функции $SN(t)$ имеет вид:

$$P_t(t) = (c_0 - c_1)(N - 2)^2 \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t) (K_2 + K_1 E_1) t_{au} (1 - \exp(-(K_2 + K_1 E_1)t)). \quad (16)$$

Поскольку сравнение сигналов должно происходить на равном временном интервале, то данный интервал принимается равным периоду треморных колебаний, что для нормальной частоты тремора 87 Гц составляет 11.5 мс:

$$t_{au} = 1/f_{tr}. \quad (17)$$

На рис. 5 представлены результаты расчетов эффекта Брока–Зульцера на основе модели ТМС по формулам (14–17). Эффект Брока–Зульцера также можно наблюдать для темных тестовых полей на светлом фоне (рис. 5в). Его экспериментально наблюдал Г. Дж. Бартон с коллегами [15] в 1977 г., но не нашел объяснения данному эффекту. В этих условиях эффект характеризуется меньшими значениями видимого снижения яркости и незначительным смещением вправо от минимума.

Таким образом, с точки зрения модели ТМС эффект Брока–Зульцера определяется соотношением треморного модуляционного сигнала P_p , сформированного на контурах тестового поля и площадного сигнала переходного процесса поля сравнения P_t .

Такой взгляд значительно проясняет и упрощает физическую природу процессов, происходящих в зрительной системе при формировании эффекта Брока–Зульцера, и может внести свой вклад в теорию зрительного восприятия. Проанализируем результаты моделирования. Интенсивность эффекта Брока–Зульцера определяется весом составляющей временной области P_t (со-

гласно формуле (16)). Первым фактором, определяющим вес P_t , является разница в концентрациях фотореагента, соответствующая яркости адаптации и яркости тестового поля. Следует отметить, что это не разница в яркости, а именно разница в концентрации, так как установившееся значение концентрации в диапазоне яркости 0.001–1.0 кд/м² практически не меняется. Следовательно, согласно модели ТМС, глубина адаптации к темноте не является значимым фактором. Зависимость концентрации флотационного агента от яркости адаптации с учетом функции зрачка глаза показана на рис. 6. Границы существования эффекта лежат в диапазоне яркости 1.0–1000.0 кд/м².

Второй фактор – угловой размер тестового поля и поля сравнения. Результаты моделирования зависимости эффекта Брока–Зульцера от углового размера тестового поля показаны на рис. 7. При уменьшении размеров тестового поля наблюдается уменьшение коэффициента превышения видимой яркости, при этом максимум кривой смещается вправо. Для яркости тестового поля 40.7 кд/м² значительное увеличение эффекта начинается при угловых размерах тестового поля, начиная с 60–90 угловых минут. По результатам моделирования для получения выраженного эффекта Брока–Зульцера следует использовать тестовые поля с угловым размером 120–180 угловых минут.

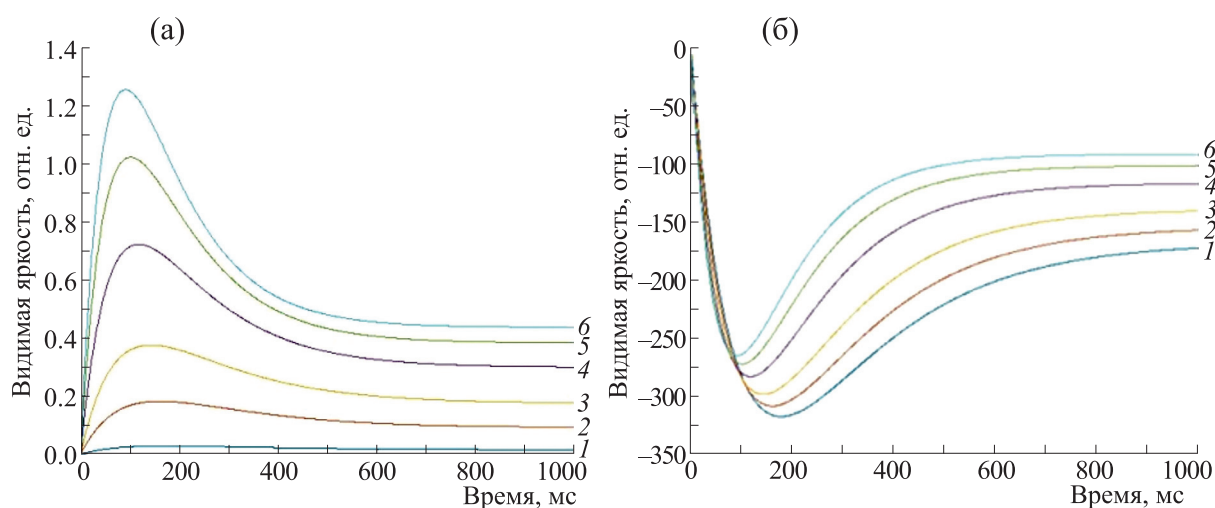


Рис. 5. Результаты моделирования эффекта Брока–Зульцера на основе модели ТМС. Зависимость эффекта Брока–Зульцера от яркости тестового поля: (а) – яркость адаптации 0.001 кд/м², (б) – яркость адаптации 1000 кд/м². Яркость тестового поля по табл. 1: кривая 1 – 0.8 кд/м², кривая 2 – 5.3 кд/м², кривая 3 – 11.2 кд/м², кривая 4 – 22.4 кд/м², кривая 5 – 32.6 кд/м², кривая 6 – 40.7 кд/м².

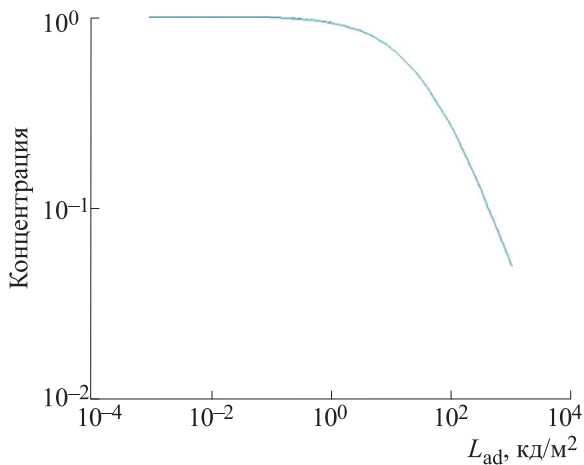


Рис. 6. Зависимость концентрации флотационного агента от яркости адаптации с учетом функции зрачка глаза.

ЭФФЕКТ БРОКА–ЗУЛЬЦЕРА КАК МАРКЕР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Зависимость эффекта Брока–Зульцера от яркости, длительности, размера и пространственной локализации тестового поля при центральной и периферической стимуляции представляет интерес для обоснования результатов исследований механизмов зрительного восприятия с позиций теории двух потоков [16, 17]. Теория основана на представлении о структурно-функциональной организации сетчатки и классификации ганглиозных клеток (ГК). Подавляющее большинство ГК сетчатки дает начало двум основным потокам передачи информации из каудальных во фронтальные зоны коры [18]. Речь идет о магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной системах, нейроны которых формируют соответственно дорсальную (теменную) и вентральную (височную) систему передачи информации. Примерно 70% всей популяции ГК сетчатки составляют нейроны парвоцеллюлярной системы (Р-системы) и 10% – магноклеточной системы (М-системы). Свойства ГК, которые образуют эти системы, согласуются с факторами, определяющими возникновение эффекта Брока–Зульцера. Поэтому представляет интерес использование эффекта Брока–Зульцера для изучения свойств и функций этих систем. О свойствах нейронов в рассматриваемых системах известно следующее.

Магноцеллюлярная система берет начало от крупных ГК сетчатки (аналогов фазических Y-клеток) с большими рецептивными полями, высокой чувствительностью к контрасту (ниже 16%) и специфичностью для высоких временных и низких пространственных частот [19], которые передают широкополосный, в основном ахроматический сигнал на М-слои латерального колленчатого ядра таламуса (LGN) и далее до слоев 4Ca и 6 области V1 зрительной коры [18–22]. Клетки этого пути реагируют на включение стимула, мерцание и доминируют на периферии сетчатки, тем самым обеспечивая периферическое зрение.

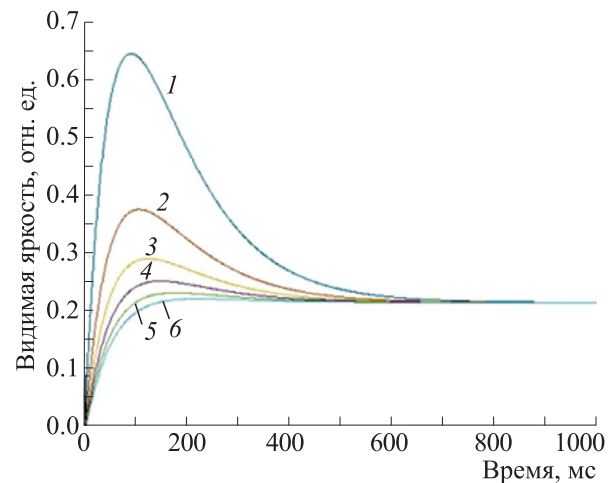


Рис. 7. Зависимость эффекта Брока–Зульцера от углового размера тестового поля. Обозначения: яркость тестового поля 40.7 кд/м²; размер поля от 30 до 180 угловых минут: кривая 1 – 180 угловых минут, кривая 2 – 150, кривая 3 – 120, кривая 4 – 90, кривая 5 – 60, кривая 6 – 30 угловых минут.

Парвоцеллюлярная система берет начало от малых ГК сетчатки – Р-клеток, аналогов тонических X-клеток, наиболее плотно расположенных в центральной ямке, с небольшими рецептивными полями, низкой скоростью аксональной проводимости, несущих информацию о красно-зеленой части спектра к Р-слоям латерального колленчатого ядра таламуса (LGN), которые, в свою очередь, проецируются на 4Cb и 6 слой V1 области зрительной коры [18, 20–22]. Клетки Р-пути имеют низкую чувствительность к контрасту (они реагируют при насыщении контраста более 16%), при этом они специфичны к восприятию высоких пространственных (выше 7,0 цикл/градус) и низких временных частот [18–21].

Отростки нейронов магноцеллюлярной системы из первичной зрительной коры дают проекции в основном в область V5/MT экстрастриарной коры, которая специфична к восприятию движения. Проекции нейронов Р-системы направлены в область V4 нижней височной коры, детекторные нейроны которой обеспечивают восприятие деталей и объектное зрение. Нейроны магносистемы, отростки которых направляются преимущественно к дорсальному потоку, обрабатывают информацию о стереопсисе, контуре, положении в пространстве, движении и его направлении [23], обеспечивают пространственное зрение [24, 25] и глобальное описание изоб-

ражения [20, 24]. Нейроны парвоцеллюлярной системы, которые формируют вентральный путь, играют ведущую роль в передаче информации о цвете, процессах различения отдельных предметов и деталей объектов, то есть локальном анализе поля зрения [23, 24]. Подводя итог, важно отметить, что системы обеспечивают разный уровень детализации и скорости передачи информации [25]: М-система – менее 100 мс, Р-система – более 100 мс.

Экспериментальные данные показывают, что М- и Р-системы не являются полностью независимыми [26, 27], поэтому согласованность взаимодействия этих систем имеет фундаментальное значение [28]. Эффект Брока–Зульцера может стать инструментом, который позволит не только изучать функциональное состояние этих систем в разных условиях, но также, что немаловажно, служить маркером дисбаланса в их взаимодействии. На сегодняшний день контрастная чувствительность нейронов этих систем в разном диапазоне пространственных частот наиболее активно используется для оценки состояния магно- и парвоцеллюлярной системы.

Результаты исследований контрастной чувствительности при адаптации к экстремальным воздействиям [29] и на моделях психопатологии [28, 30–31] указывают на изменение характера взаимодействия магно- и парвоцеллюлярной систем. Взаимодействие магно- и парвоклеточной систем обеспечивает целостность восприятия, как неотъемлемое условие построения мозгом объективной внутренней картины внешнего мира, определяющей поведение. При адаптации к экстремальным воздействиям и срыве адаптации в условиях первого психотического эпизода контрастная чувствительность зрительной системы изменяется в диапазоне низких пространственных частот, к восприятию которых более специфичны нейроны магноклеточной системы, формирующей дорзальный путь. Анализ полученных данных с позиций теории треморно-модуляционного сигнала (ТМС), которая также раскрывает природу эффекта Брока–Зульцера, позволяет предположить, что смещение баланса в сторону активности магноклеточной системы приводит к увеличению поля суммирования сигнала и увеличению коэффициента превышения видимой яркости, т. е. увеличению эффекта Брока–Зульцера. Другими словами, чем более выражен сдвиг в сторону активности магноклеточной системы, тем выше и влево будет смещен график, отражающий эффект Брока–Зульцера. Таким образом, полученные физиологические данные [28] интерпретируются нами с позиций модели треморно-модуляционного сигнала, что позволяет объяснить движение точки максимальной контрастной чувствительности в экстремальных условиях функционирования и продемонстрировать воз-

можность использования эффекта Брока–Зульцера в качестве маркера и инструмента для оценки функционального состояния и степени рассогласования между магно- и парвоцеллюлярной системами.

ВЫВОДЫ

Нами предложена модель формирования эффекта Брока–Зульцера, основанная на теории треморного модуляционного сигнала в зрительной системе. Этот взгляд значительно проясняет и упрощает представления о физической природе процессов, происходящих в зрительной системе при формировании эффекта Брока–Зульцера. Показана возможность использования эффекта Брока–Зульцера в качестве маркера и инструмента оценки функционального состояния, адаптации организма к изменяющимся условиям окружающей среды. Понимание природы этого явления имеет исключительное теоретическое и практическое значение для различных областей знаний физики, философии, психологии, медицины и др.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Это исследование не получало какого-либо специального гранта от финансирующих агентств в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Broca and D. Sulzer, *J. Physiol. Pathol. Générale*, **4**, 632 (1902).
2. Р. М. Мешерский, *Эффект Брока–Зульцера* (Наука, М., 1985).
3. S. M. Berman and A. L. Stewart, *Biol. Cybernetics*, **34**, 171 (1979).
4. D. M. Eagleman, J. E. Jacobson, and T. J. Sejnowski, *Nature*, **428** (6985), 854 (2004).
5. А. Л. Ярбус, *Роль движений глаз в процессе зрения* (Наука, М., 1965).
6. R. Knight, C. Mazzi, and S. Savazzi, *Exp. Brain Res.*, **233** (12), 3527 (2015).
7. T. Jaeger and C. Kraemer, *Perceptual Motor Skills*, **51** (3), 945 (1980).
8. A. Gorea and C. W. Tyler, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **110** (15), 1330 (2013).
9. H. Rieiro, S. Martinez-Conde, A. P. Danielson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109** (48), 19828 (2012).

10. V. Kalnysh and A. Shvets, *Ukr. J. Occupational Health*, **3** (48), 10 (2016).
11. S. I. Lyapunov, *J. Optical Technol.*, **85** (2), 100 (2018).
12. S. I. Lyapunov, *J. Optical Technol.*, **84** (1), 16 (2017).
13. S. I. Lyapunov, **84** (9), 613 (2017a).
14. S. I. Lyapunov, *J. Optical Technol.*, **81** (6), 349 (2014).
15. G. J. Barton, S. Nagshineh, K.H. Ruddock, *Biol. Cybern.* **27** (4), 189 (1977).
16. L. G. Ungerleider and M. Mishkin, In *Analysis of Visual Behavior*, Ed. by D. J. Ingle, M. A. Goodale, and R. J. W. Mansfield (MIT Press, Cambridge, 1982), pp. 549–586.
17. M. A. Goodale and A. D. Milner, *Trends Neurosci.*, **15** (1), 20 (1992).
18. J. J. Nassi and E. M. Callaway, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10** (5), 360 (2009).
19. A. M. Derrington and P. Lennie, *J. Physiol.*, **3** (57), 219 (1984).
20. D. H. Hubel and T. N. Wiesel, *J. Comp. Neurol.*, **146** (4), 421 (1972).
21. E. Kaplan and R. M. Shapley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2755 (1986).
22. W. H. Merigan and J. H. R. Maunsell, *Ann. Rev. Neurosci.*, **16**, 369 (1993).
23. M. S. Livingstone and D. H. Hubel, *Science*. **240**, 740 (1988).
24. D. J. Calderone, M. J. Hoptman, A. Martinez, et al., *Cereb. Cortex*, **23**, 1849 (2013).
25. E. Kaplan and E. Benardete, *Progr. Brain Res.*, **134**, 17 (2001).
26. E. H. F. de Haan, S. R. Jackson, and T. Schenk, *Cortex*, **98**, 1 (2018).
27. E. Freud, M. Behrmann, and J. C. Snow, *Open Mind: Discoveries in Cognitive Science*. **4**, 40 (2020).
28. И. И. Шошина и Ю. Е. Шелепин, *Механизмы глобального и локального анализа зрительной информации при шизофрении* (ВВМ, СПб., 2016).
29. I. I. Shoshina, I. S. Sosnina, K. A. Zelenskiy, et al., *Biophysics*, **65** (4), 681 (2020).
30. I. I. Shoshina, Y. E. Shelepin, E. A. Vershinina, and K. O. Novikova, *Human Physiol.*, **41** (3), 251 (2015).
31. I. I. Shoshina, Y. E. Shelepin, S. A. Konkina, et al., *Neurosci. Behav. Physiol.*, **44**, 244 (2014).

A Model of the Broca–Sulzer Effect

S.I. Lyapunov* and I.I. Shoshina**. ***

*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

**Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7-9, St. Petersburg, 199034 Russia

***Siberian Federal University, Svobodny prosp. 82/1, Krasnoyarsk, 660041 Russia

The Broca–Sulzer phenomenon is one of the aspects of the problem of individual differences in the perception of visual world, the mystery of consciousness. The Broca–Sulzer effect occurs when brightness enhancement is observed under the stimulus condition over a short period. Although this effect has been studied for a long time, there is no satisfactory theory of the occurrence mechanism. In this paper, a model for the formation of the Broca–Sulzer effect based on the theory of the tremor signal modulation in the visual system is proposed. Also, this paper demonstrates the possibility of applying the Broca–Sulzer effect as a marker and a tool for assessing the functional state, adaptation and maladaptation to changing environmental conditions. Understanding the nature of the phenomenon has exceptional theoretical and practical significance for various fields of knowledge.

Keywords: Broca–Sulzer effect, model of tremor modulation signal, brightness, brightness of adaptation, theory of two pathways, marker of functional state

УДК 577.3

ФОРМАЛЬНОЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ИНТЕЛЛЕКТА В МОДЕЛЬНОЙ ЗАДАЧЕ О ВЛИЯНИИ НАБЛЮДЕНИЙ НА КВАНТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ

© 2022 г. Л.Ю. Щурова*., #, В.А. Намиот**

*Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Ленинский просп., 53, Москва, 119991, Россия

#E-mail: ljusia@gmail.com

**Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 08.07.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

Попытка математически формализовать задачу, касающуюся интеллекта, вызывает затруднения уже потому, что не имеется единого принятого всеми психологами определения понятия интеллекта. В этой работе мы подходим к задаче следующим образом: выделяем существенные особенности неформальных определений интеллекта, которые были даны психологами-экспертами, и затем на основании этих особенностей предлагаем абстрактное математическое описание понятия интеллекта. Мы находим аналогии между задачей об интеллекте и проблемой квантово-механических измерений, а затем решаем модельную задачу влияния наблюдений на процесс проникновения квантовой частицы сквозь потенциальный барьер. В рамках квантово-механического подхода с неэрмитовым гамильтонианом мы формулируем систему дифференциальных уравнений, формально отражающих концепцию интеллекта, и представляем ее аналитическое решение. На основе полученного решения модельной задачи мы обсуждаем вопрос о том, какие явления и процессы могут сопровождать процесс реализации интеллекта.

Ключевые слова: определения понятия интеллекта, математическая трактовка концепции интеллекта, влияние наблюдений на биосистемы, барьерный анти-Зенон-эффект.

DOI: 10.31857/S0006302922060266, EDN: LMTDUO

Владимир Абрамович Намиот, выдающийся ученый и замечательный человек, покинул этот мир в начале этого года. Данная статья является частью работы, которой мы с В. Намиотом занимались в последнее время, но не успели вместе подготовить материал для публикации.

Я выражаю искреннюю благодарность Владимиру Абрамовичу Намиоту за долгие годы плодотворной совместной работы.

Л. Щурова

Интеллект — часто употребляемый термин, однако определить понятие интеллекта с научной точки зрения не так просто. Может ли способность к быстрому обучению иметь определяющее значение для интеллекта? Или важнее общая сумма знаний? А как насчет склонности к абстрактному мышлению или склонности к решению задач новым неординарным способом? Или способности к выживанию в сложных жизненных обстоятельствах? Понятие интеллекта включает в

себя множество взаимосвязанных концепций, каждую из которых довольно сложно определить.

Вопрос о едином определении интеллекта, которое было бы принято сообществом психологов, до сих пор остается открытым: “*there seem to be almost as many definitions of intelligence as there were experts asked to define it*” [1] («*по-видимому, определений интеллекта почти столько же, сколько экспертов попросили дать его определение*»). Вопрос усложняется, когда мы ставим задачу абстрактно-

го математического описания понятия интеллекта.

В этой работе мы поступаем следующим образом: выделяем ключевые идеи неформальных определений интеллекта, предложенных психологами-экспертами, и на основе этих идей предлагаем формальную математическую трактовку концепции интеллекта. Мы нашли аналогии между задачей об интеллекте и задачей о влиянии наблюдений на протекание процессов в квантовых системах, и рассматриваем модельную задачу о влиянии наблюдений на процесс проникновения квантовой частицы сквозь высокий потенциальный барьер. Некоторые аспекты взаимосвязи проблемы интеллекта с проблемой наблюдений в квантовой физике рассматривались на качественном уровне в наших недавних работах [2, 3]. Здесь мы обсуждаем возможности использования различных физико-математических подходов для описания необратимых по времени процессов, имеющих принципиальное значение в эффектах, проявляющихся при наблюдении за квантовыми системами. С целью описания подобных процессов в рассматриваемой модельной задаче, мы используем квантово-механический подход с неэрмитовым гамильтонианом, в рамках этого подхода формулируем систему дифференциальных уравнений и представляем ее аналитическое решение. Мы полагаем, что уравнения и полученное решение модельной задачи формально отражают концепцию интеллекта, и, исходя из этого, выдвигаем некоторые предположения о том, какие явления и процессы могут сопровождать процесс реализации интеллекта.

НЕФОРМАЛЬНЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕЛЛЕКТА

Психологи сталкиваются с проблемой определения интеллекта с тех пор, как люди начали изучать природу ума. Многие определения были даны психологами на протяжении многих лет, и, хотя эти определения различаются, тем не менее, они имеют и повторяющиеся существенные особенности. В качестве одной из важнейших особенностей авторы указывают на способность адаптироваться к окружающей реальности. Так, еще в 1905 г. А. Бине и Т. Саймон отметили, что интеллект обладает *“a fundamental faculty of adapting oneself to circumstances”* [4] (*«фундаментальной способностью приспосабливаться к обстоятельствам»*). В работах современных психологов также имеется сильный акцент на адаптацию. Так, в обзоре ведущего специалиста в области интеллекта Р.Д. Стернберга [5] приводится точка зрения Р. Пинтнера на интеллект как *“ability to adapt oneself adequately to relatively new situations in life”* [5, с. 8] (*«способность адекватно приспосабливаться к относительно новым жизненным ситуациям»*). В

работе [5] также цитируется утверждение С.С. Колвина: *“a person possesses intelligence insofar as he has learned, or can learn, to adjust himself to his environment”* [5, с. 8] (*«человек обладает интеллектом, поскольку он научился или может научиться приспосабливаться к окружению»*). Известный современный психолог и социолог Л. Готтфредсон понимает интеллект человека как *“the ability to deal with cognitive complexity”* (*«способность справляться с когнитивной сложностью»*) при взаимодействии с изменяющейся окружающей средой [6]. В обзорной работе [7], посвященной фундаментальным проблемам интеллекта, Д. Слетер отмечает, что *“intelligence is part of the internal environment that shows through at the interface between person and external environment as a function of cognitive task demands”* (*«интеллект является частью внутренней среды, которая проявляется на границе между человеком и внешней реальностью как функция требований когнитивных задач»*). Также Д. Симонтон определяет интеллект как *“a cluster of cognitive abilities that lead to successful adaptation to a wide range of environments”* [8] (*«совокупность когнитивных способностей, которые приводят к успешной адаптации к широкому кругу сред»*).

Интеллект чаще всего изучается на людях, но наблюдается также и у животных (различный интеллект животных связывают с отличающимися способностями их восприятия и когнитивного развития), и их интеллект, посредством механизмов адаптации, влияет на эволюцию животных. При этом в контексте интеллекта адаптация к окружающей реальности вовсе не означает выживание или общее количество потомков. Действительно, если бы выживание было мерой успеха адаптации, то бактерии могли бы быть самыми разумными существами на земле.

Таким образом, основной общей чертой определений понятия интеллекта является то, что интеллект рассматривается как свойство индивида, взаимодействующего с внешней средой. Другая общая черта заключается в том, интеллект связан со способностью индивида преуспевать в результате адаптации к внешней среде.

Понятие успеха подразумевает достижение какой-то цели посредством адаптации. При этом цели разных существ могут различаться, поэтому не уточняется, какова эта цель. Важно, чтобы каждый индивид был бы способен выбирать свои действия таким образом, чтобы цель была достигнута. Чем выше способность достигать успеха в отношении различных целей, тем выше интеллект индивида.

Авторы работы [9] на основании ключевых характеристик интеллекта, которые являются общими для интеллекта человека и нечеловеческих особей (и даже для искусственного интеллекта), предложили определение интеллекта в его наиболее

лее общей форме: *“Intelligence measures an agent’s ability to achieve goals in a wide range of environments”* («интеллект измеряет способность агента достигать целей в результате успешной адаптации к широкому диапазону окружающих сред»).

Для того чтобы математически формализовать степень интеллекта, авторы работы [9] предложили рассматривать модельную систему, включающую в себя агента и окружающую среду. Компонента «агент» описывает индивида, который обладает интеллектом и добивается желаемой цели посредством адаптации. В процессе активного взаимодействия с окружающей средой среда наблюдает за интеллектом агента, при этом изменения в процессе адаптации к окружению происходят в наблюдаемой системе, которой является агент.

О ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДАХ К ЗАДАЧЕ ОПИСАНИЯ ИНТЕЛЛЕКТА

Встает вопрос, в рамках какого физико-математического формализма может быть описана ситуация, в которой окружающая среда, наблюдающая агента, может оказывать влияние на процессы изменения наблюдаемой системы (на процессы изменения агента)?

В рамках классической физики считается очевидным, что наблюдение никаким образом не может повлиять на процессы в наблюдаемой системе. Тем не менее, ответ на этот вопрос не столь прост. Еще со времен Древней Греции, задолго до появления классической физики, философы (философы в те времена были и физиками) задумывались над этим вопросом и давали на него нетривиальный ответ. В пятом веке до нашей эры, древнегреческий философ Зенон Элейский приводил в своих апориях рассуждения, согласно которым внешнее наблюдение за процессом может оказывать влияние на реализацию этого процесса. Хорошо известны парадоксы Зенона: «стрела, на которую смотрят, никогда не долетит до цели», «горшок, за которым наблюдают, никогда не закипит».

Несмотря на нереальность парадоксов Зенона (их легко опровергнуть экспериментально), логический способ их опровержения найден лишь в XVII веке, после того, как И. Ньютон и Г. Лейбниц изложили идею дифференциального исчисления, которое оперирует с понятием бесконечно малых величин.

Однако несмотря на то, что парадокс Зенона отвергнут в классической физике, он все же имеет право на существование в рамках квантовой физики. Действительно, характер течения квантовых процессов существенным образом зависит от присутствия или отсутствия наблюдателя. Так, в

хорошо известном двухщелевом эксперименте с электронами частицы не образуют на экране интерференционную картину, если наблюдать, через какую щель они проходят. Но интерференционная картина на экране сохраняется, если за ходом эксперимента никто не наблюдает.

В 1977 году Б. Мизра и Д. Сударшан теоретически в рамках квантовой механики рассматривали вопрос о влиянии наблюдений на ядерный распад и показали, что непрерывное наблюдение за процессом радиоактивного распада приводит к невозможности распада [10]. Это явление, в котором наблюдение за процессом уменьшает вероятность реализации процесса, а в пределе непрерывных наблюдений делает невозможным осуществление процесса, они назвали квантовым эффектом Зенона. В настоящее время, после серии экспериментальных демонстраций (см., например, работы [11–13] и ссылки в этих работах), квантовый эффект Зенона считается реальным явлением. Заметим, что квантовый эффект Зенона представляет интерес не только для теории, но и с точки зрения его практического применения. Например, в работе [14] отмечается возможное применение этого эффекта в медицине: при нейтронной томографии квантовый эффект Зенона позволяет уменьшить интенсивность облучения и тем самым уменьшить повреждения, спровоцированные поглощенным излучением.

Однако в некоторых ситуациях возможен эффект, противоположный эффекту Зенона, то есть, когда наблюдение не уменьшает, а увеличивает вероятность наблюдаемого процесса. Этот эффект называют анти-Зенон-эффектом [15–17]. В нашей работе [18] рассмотрен барьерный анти-Зенон-эффект, который в ряде случаев позволяет существенно увеличить вероятность прохождения частицы через потенциальный барьер.

Эффект увеличения вероятности прохождения частиц через барьер за счет наблюдений представляет особенный интерес в связи с вопросом о парадоксально высокой вероятности слияния ядер в экспериментах по холодному ядерному синтезу. Хорошо известно, что в условиях холодного синтеза, оценки вероятности слияния ядер в результате «обычного» туннелирования (то есть, туннелирования в отсутствие наблюдений) дают фантастически малые величины. В связи с этим многими физиками делается вывод, что холодный ядерный синтез при нормальных температурах твердого тела невозможен, и рассматривать хоть что-либо, относящееся к нему, априори не имеет смысла.

Тем не менее имеется довольно много экспериментальных работ, выполненных разными авторами и в разных лабораториях, что позволяет рассматривать их как независимые, результаты которых свидетельствуют о существовании син-

теза новых элементов (холодного синтеза) как в твердых телах, так и в биосистемах (см., например, работы [19, 20]). Результаты этих экспериментов нельзя объяснить химическими или другими неядерными процессами, а также обычными туннельными процессами.

В работах [2, 18] показано, что значительное увеличение вероятности слияния ядер в веществе вследствие барьерного анти-Зенон-эффекта может потенциально объяснить результаты экспериментов по холодному ядерному синтезу в твердом теле, а также экспериментов по трансмутации элементов в биологических системах.

Обратимся вновь к проблеме интеллекта. Определение интеллекта требует, чтобы у агента наличествовала цель – решение новой сложной для себя задачи, а агент активно действовал, преследуя желаемую цель, взаимодействуя с наблюдающей его окружающей средой. При этом интеллект агента изменяется, достигая вследствие адаптации агента к окружающей среде уровня, необходимого для решения поставленной задачи. Промежуток времени, который требуется агенту для его целенаправленных изменений, может служить мерой интеллекта.

Действительно, возможность решить задачу немедленно – это вопрос опыта, а не интеллекта. И для того, чтобы справиться с задачей в долгосрочной перспективе, вообще не требуется большого интеллекта, например, просто перебор и использование огромного числа возможных решений могут в конечном итоге привести к желаемой цели. В принципе, за бесконечное время может быть решена любая задача. Но только никакой живой особи не дано бесконечное время пребывания на Земле. Интеллект характеризует возможность добиться цели за какое-то разумное время. Так, интеллект – это способность адаптироваться к наблюдающей его окружающей среде как можно быстрее (с учетом ограничений, налагаемых сложностью новой конкретной задачи). В этой перспективе, интеллект имеет аналогии с анти-Зенон-эффектом.

Обратим внимание, что для успешного достижения желаемой цели агент должен выделить и сохранить те изменения, которые произошли с ним в процессе взаимодействия с наблюдающим его окружением и способствовали достижению цели. Это означает, что процесс адаптации к окружающей среде представляет собой необратимый временной процесс.

Ввиду соответствия интеллекта с анти-Зенон-эффектом кажется естественным, что для абстрактной математической трактовки интеллекта следует построить формализм в рамках квантово-механической теории. Однако здесь возникают некоторые трудности. Дело в том, что возможности описания временных процессов в рамках

квантовой механики ограничены. Основным оператором квантовой механики является оператор полной энергии квантовой системы – гамильтониан: выбирая конкретный вид гамильтониана, мы тем самым формулируем на математическом языке все особенности квантовой системы. И одна из основных аксиом квантовой механики требует, чтобы гамильтониан был эрмитовым оператором, которому соответствует действительные (не комплексные) значения энергии. Очевидно, что формальное комплексное сопряжение вещественной величины не может изменить ее значение. В связи с этим квантовая механика в рамках своих основных аксиом описывает только обратимые (симметричные по времени) временные процессы [21].

Чтобы включить в рассмотрение необратимые временные процессы в квантовой системе, требуется расширение квантово-механической теории. Задача описания необратимых процессов в квантовых системах до сих пор является одной из нерешенных до конца проблем квантовой теории. В.Л. Гинзбург в работе [22] о проблемах физики на рубеже XX и XXI веков, выделил три «великие проблемы» физики, одна из которых – проблема «стрелы времени» (несимметричности по времени) в квантовой механике.

Тем не менее, поскольку все реальные процессы необратимы, в литературе имеются подходы к описанию временной необратимости в квантовых системах.

В области ядерной физики принципиально новым и существенно полезным оказался подход, в свое время предложенный Г. Гамовым для вычисления необратимого процесса альфа-распада ядра путем туннелирования через кулоновский барьер [23]. Это решение проблемы альфа-распада было, согласно Х. Бете, “*was the first successful application of quantum theory to nuclear phenomena*” [24] («первым и весьма успешным применением квантовой теории к ядерным явлениям»). В 1928 г. Гамов нашел свою знаменитую формулу – экспоненциальную временную зависимость вероятности альфа-распада ядра, используя комплексные собственные значения энергии, что, в принципе, находится в явном противоречии с основополагающими принципами квантовой теории – с требованием эрмитовости оператора Гамильтона. Тем не менее, подход Гамова оказался столь существенным, что Л. Розенфельд, один из ведущих физиков-ядерщиков двадцатого века, считал, что “*nuclear physics starts precisely with the appearance of the Gamow approach*” [25] («ядерная физика начинается именно с появления подхода Гамова»).

К настоящему времени необходимым условием реализации квантовой системы с неэрмитовым гамильтонианом является открытость квантовой системы (т.е. квантовая система должна об-

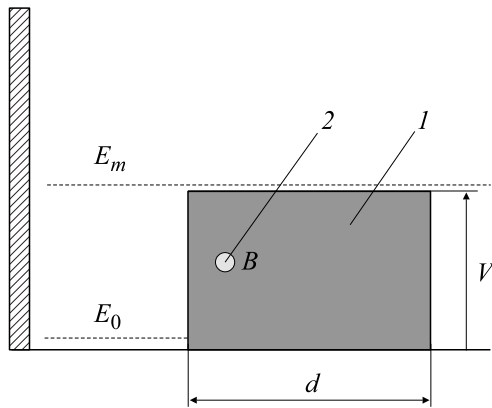


Рис. 1. Одномерная потенциальная яма для частицы A ; 1 – потенциальный барьер с шириной d и высотой V ; 2 – двухуровневая система B ; E_0 – энергия начального состояния частицы A , E_m – энергия конечного состояния частицы A .

меняться энергией и/или веществом с окружением). При этом оказалось, что можно рассматривать только интересующую нас часть всей открытой системы, а именно, взаимодействующую с окружением квантовую систему, а оставшуюся часть (окружение) – учитывать эффективно. При таком рассмотрении, динамика квантовых систем оказывается неэрмитовой. Теоретическое обоснование неэрмитового гамильтониана уже в 1930 г. нашли В. Вайскопф и Ю. Вигнер [26]. Они получили решения, из которых следует экспоненциальное затухание необратимых квантовых процессов. Показано, что в моделях с неэрмитовым гамильтонианом имеется предположение, согласно которому квантовая система изменяется при взаимодействии с окружением, а изменение самого окружения, включающего очень большое (в пределе бесконечное) число частиц, изменяется пренебрежимо мало. В настоящее время приближение неэрмитового гамильтониана (при этом весьма точное приближение) рассматривается как более широкая версия квантовой механики [27, 28]. Неэрмитовы гамильтонианы широко используются не только в контексте ядерной физики, но и в других разделах физики для описания процессов в открытых квантовых системах, в том числе необратимых туннельных процессов в твердотельных гетероструктурах [29].

В литературе, имеются также другие подходы к описанию необратимых процессов в квантовых системах. Отметим метод неравновесных функций Грина–Келдыша [30], в рамках которого влияние взаимодействий с окружением учитывается, возможно, наиболее четким образом, однако вычисления в рамках этого метода довольно сложные.

Мы в этой работе используем физически прозрачный и достаточно простой для непосредственных вычислений подход неэрмитового гамильтониана как наиболее подходящий для описания квантовых необратимых процессов в рассматриваемой модельной задаче.

ФОРМАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИНТЕЛЛЕКТА НА ПРИМЕРЕ КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ О ВЛИЯНИИ НАБЛЮДЕНИЙ НА ПРОЦЕСС ПРОХОЖДЕНИЯ ЧАСТИЦЫ ЧЕРЕЗ ВЫСОКИЙ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БАРЬЕР

Для того чтобы математически формализовать понятие интеллекта, рассмотрим систему, включающую в себя агента и окружающую его среду. Интеллект проявляется в ситуации, когда агент имеет цель, которую он активно преследует, и достигает желаемой цели в результате адаптации к наблюдающей его окружающей среде. Агент и среда должны иметь возможность взаимодействовать друг с другом: в процессе адаптации агент должен отправлять сигналы в среду, а также принимать сигналы, отправляемые из среды. Аналогичным образом среда должна иметь возможность принимать и отправлять сигналы агенту. Насколько высока цель агента и насколько быстро он сможет адаптироваться к окружению, настолько высок интеллект агента.

Проблема интеллекта имеет аналогии с квантово-механической задачей о влиянии наблюдений за частицей на увеличение вероятности ее проникновения сквозь высокий потенциальный барьер (с задачей о барьерном анти-Зенон-эффекте). Рассмотрим модельную задачу, которая формально демонстрирует влияние наблюдающей окружающей среды на процесс адаптации агента, обладающего интеллектом. Пусть агента представляет туннелирующая сквозь барьер частица A плюс взаимодействующая с частицей A двухуровневая система B . Окружающая среда наблюдает за состоянием двухуровневой системы B .

Допустим, что имеется прямоугольный потенциальный барьер высоты V и ширины d и пусть имеется частица A , которая первоначально (в момент времени $t = 0$) находится в состоянии $E_0 \ll V$ в широкой квантовой яме слева от барьера (рис. 1). Кроме того, имеется двухуровневая система B , находящаяся в начальный момент времени на уровне E_1 , а в результате взаимодействия с туннелирующей частицей A система B переходит в состояние $E_2 < E_1$, причем энергия такого перехода $\Delta E = E_2 - E_1$ удовлетворяет условию

$$\Delta E \ll V. \tag{1}$$

Обратим внимание, что если бы выполнялось противоположное неравенство ($\Delta E > V$), то имела

бы место тривиальная ситуации, когда частица A в результате взаимодействий с системой B , даже при отсутствии каких либо наблюдений, оказалась бы в надбарьерном состоянии и свободно пролетела бы через барьер.

Мы рассматриваем ситуацию, когда окружающая система наблюдает, перешла ли система B в состояние E_2 или все еще находится в состоянии E_1 . При таком наблюдении можно получить информацию, что происходит с частицей A , которая взаимодействует с системой B . Наша цель – показать, что даже при выполнении условия (1), когда энергии ΔE заведомо недостаточно для перехода частицы A в надбарьерное состояние, наблюдение за системой B увеличивает вероятность перехода частицы A сквозь потенциальный барьер.

Перейдем к вычислению вероятности процесса, в результате которого частица A из-за взаимодействий с системой B , за состоянием которой происходит наблюдение, окажется в состоянии с энергией E_m , превышающей высоту барьера V .

Временные зависимости в системе взаимодействующих квантовых состояний описываются нестационарным уравнением Шредингера:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi_i(r,t)}{\partial t} = H \Psi_i(r,t), \quad (2)$$

где гамильтониан $H = H_0 + H'$ содержит невозмущенную часть H_0 , а также гамильтониан возмущения H' , описывающий взаимодействия, в результате которых со временем изменяется как состояние двухуровневая системы B , так и состояние частицы A .

Будем полагать, что в уравнении (2) $\Psi_i(r,t) = \Phi_i(r)\varphi_i(t)$, где $\Phi_i(r)$ – пространственная часть волновой функции, соответствующая невозмущенному гамильтониану H_0 . Временная эволюция рассматриваемой системы может быть выражена вектором $\varphi(t) = (\varphi_{01}(t), \varphi_{m2}(t))$. Здесь $\varphi_{01}(t)$ – амплитуда вероятности нахождения в момент времени t частицы A на уровне E_0 и системы B на уровне E_1 . Пусть конечное состояние E_2 системы B представляет собой состояние квази непрерывного спектра (аналогичное квазинепрерывным состояниям в широких квантовых ямах [29]): со-

стояние E_2 включает плотную систему дискретных уровней $E_2^{(j)}$: $E_2 = (E_2^{(1)}, \dots, E_2^{(j)}, \dots, E_2^{(n)})$; $\varphi_{m2}(t)$ – амплитуда вероятности нахождения частицы A в момент времени t в надбарьерном состоянии на уровне E_m и системы B на одном из уровней $E_2^{(j)}$.

Временная зависимость функции $\varphi(t)$ задается системой уравнений

$$\begin{cases} i\hbar \frac{d\varphi_{01}(t)}{dt} = (E_0 + E_1)\varphi_{01}(t) + \Omega_{12}^{(j)}\varphi_{m2}(t), \\ i\hbar \frac{d\varphi_{m2}(t)}{dt} = (E_m + E_2^{(j)})\varphi_{m2}(t) + \sum_j \Omega_{21}^{(j)}\varphi_{01}(t). \end{cases} \quad (3)$$

В системе уравнений (3) $\Omega_{12}^{(j)} = \Omega_{12}(E_2^{(j)})$ – матричный элемент перехода системы B из состояния E_1 на один из квазиуровней $E_2^{(j)}$ в результате взаимодействия с частицей A ; $\Omega_{12}^{(j)} = \Omega_{21}^{(j)} = \Omega_B$. Конкретный вид оператора Ω_B мы фиксировать не будем (подобно тому, как это было сделано в работе [18]).

С целью приведения системы дифференциальных уравнений (3) к алгебраическому виду мы используем следующие преобразования

$$\tilde{\varphi}(E) = \int_0^\infty \exp\left(i\frac{E}{\hbar}t\right)\varphi(t)dt, \quad (4)$$

где E – комплексная переменная, $\tilde{\varphi}(E)$ представляют изображения оригиналов функций $\varphi(t)$. При использовании преобразований (4) система (3) сводится к системе алгебраических уравнений для изображений $\tilde{\varphi}(E)$. При начальных условиях $\varphi_{01}(t=0) = \varphi_{01}(0) = 1$ и $\varphi_{m2}(0) = 0$ система уравнений для $\tilde{\varphi}(E)$ принимает вид

$$\begin{cases} i\hbar = (E - E_0 - E_1)\tilde{\varphi}_{01}(E) - \Omega_B\tilde{\varphi}_{m2}(E), \\ 0 = (E - E_m - E_2^{(j)})\tilde{\varphi}_{m2}(E) - \sum_j \Omega_B\tilde{\varphi}_{01}(E). \end{cases} \quad (5)$$

Из второго уравнения системы (5) следует $\tilde{\varphi}_{m2}(E) = \tilde{\varphi}_{01}(E) \sum_j \frac{\Omega_B}{E - E_m - E_2^{(j)}}$. Тогда первое уравнение системы (5) сводится к уравнению

$$i\hbar = (E - E_0 - E_1)\tilde{\varphi}_{01}(E) - \tilde{\varphi}_{01}(E) \sum_j \frac{\Omega_B^2}{E - E_m - E_2^{(j)}}. \quad (6)$$

Поскольку конечные состояния частицы B есть квази непрерывного спектра, заменим сумму по j -м состояниям интегралом $\sum_j \rightarrow \int \rho_B dE_2$,

где ρ_B – плотность конечных состояний системы B , и перепишем последнее слагаемое в правой части уравнения (6) в виде

$$\tilde{\phi}_{01}(E) \sum_j \frac{\Omega_B^2}{E - E_m - E_2^{(j)}} \approx \tilde{\phi}_{01}(E) \int dE_2 \rho_B \frac{\Omega_B^2}{E - E_m - E_2}.$$

Будем полагать, что Ω_B и ρ_B имеет слабую зависимость от энергии, тогда

$$\int dE_2 \rho_B \frac{\Omega_B^2}{E - E_m - E_2} = \rho_B \Omega_B^2 \int dE_2 \frac{1}{E - E_m - E_2}. \quad (7)$$

Интеграл по E_2 удобно вычислять, рассматривая его как контурный интеграл в комплексной плоскости. Путь интегрирования проходит в основном вдоль вещественной оси, и контур интегрирования замыкаем бесконечной полуокружностью в верхней полуплоскости. Поскольку в уравнении (7) подынтегральная функция (ее аналитическое продолжение) имеет только один полюс $E_2 = E - E_m$ на вещественной оси, который дает вклад в интеграл, получаем

$$\rho_B \Omega_B^2 \int dE_2 \frac{1}{E - E_m - E_2} = \Delta + i\pi \rho_B \Omega_B^2 \approx -i \frac{\Gamma_B}{2}. \quad (8)$$

Здесь действительная часть Δ описывает энергетический сдвиг уровней, причем $\Delta \ll E_2, E_1$, и величина Δ может быть просто включена в значения уровней. (Энергия Δ поглощается путем переопределения энергетических уровней, и будем

полагать, что $\Delta \rightarrow 0$.) Сингулярная часть $i\pi \rho_B \Omega_B^2$, согласно «золотому правилу Ферми», есть $i\pi \rho_B \Omega_B^2 \approx -i \frac{\Gamma_B}{2}$, где $\Gamma_B = \hbar/\tau_B$, τ_B – характерное время перехода системы B из начального в конечное состояние в результате взаимодействий с частицей A .

С учетом уравнения (8) уравнение (6) преобразуется к виду

$$i\hbar = \left(E - E_0 - E_1 + i \frac{\Gamma_B}{2} \right) \tilde{\phi}_{01}(E). \quad (9)$$

Подставляя выражение для $\tilde{\phi}_{01}(E)$, которое следует из уравнения (9), во второе уравнение системы (5), получаем

$$\tilde{\phi}_{m2}(E) = \frac{i\hbar \Omega_B}{(E - E_0 - E_1 + i\Gamma_B/2)(E - E_m - E_2)}.$$

Используя преобразование, обратное преобразованию (4),

$$f(t) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int \tilde{f}(E) \exp(-iEt) dE,$$

получаем

$$\phi_{m2}(t) = \frac{\Omega_B}{(E_m + E_2) - (E_0 + E_1) + i\Gamma_B/2} \left(e^{-i(E_m+E_2)t/\hbar} - e^{-i(E_0+E_1)t/\hbar - \Gamma_B t/2\hbar} \right). \quad (10)$$

Тогда вероятность того, что в момент времени t (после начала наблюдения при $t = 0$) частица A на-

ходится выше барьера на уровне E_m , а система B – на одном из уровней $E_2^{(j)}$ состояния E_2 , имеет вид

$$p_{m2}(t) = \phi_{m2}(t) \phi_{m2}^*(t) = \frac{\Omega_B^2}{(E_m - E_0 + \Delta E)^2 + \Gamma^2/4} \left[1 - 2 \cos\left(\frac{E_m - E_0 + \Delta E}{\hbar} t \right) e^{-\Gamma_B t/2\hbar} + e^{-\Gamma_B t/\hbar} \right], \quad (11)$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$ – энергия перехода системы B .

Пусть за время наблюдения Δt , прошедшее с начала наблюдения, был зарегистрирован сигнал, фиксирующий переход в системе B . Очевидно, что интервал времени Δt значительно превышает величину $\tau_B = \hbar/\Gamma_B \sim \hbar/\Delta E$, и, кроме того, энергия $E_m \gg E_0, \Delta E, \Gamma$. В этом случае выражение (11) упрощается, и вероятность того, что за время наблюдения $\tau = \Delta t \gg \tau_B$ система B будет обнаружена на уровне $E_2^{(j)}$, в то время как частица A окажется в состоянии выше барьера, которому соответствует энергия E_m , может быть представлена в виде

$$p_{2m} \approx \frac{\Omega_B^2}{E_m^2}, \quad (12)$$

где значение E_m близко к величине высоты барьера V . Как следует из выражения (12), величина p_{2m} быстро убывает с увеличением высоты барьера, поэтому, казалось бы, даже при наличии наблюдений вероятность появления частицы A состояний $E_m \geq V$ всегда будет мала. Однако сравним величину p_{2m} , которая следует из выражения (12), с вероятностью p_d того, что частица, за которой не наблюдают (то есть без участия системы B , взаимодействующей с частицей A , и в отсутствие на-

блюдений за системой B), протуннелирует сквозь барьер высоты V и окажется в области справа от барьера. Тогда в случае барьера прямоугольной формы и ширины d вероятность того, что частица с энергией, величина которой много меньше высоты барьера V , в результате туннелирования окажется в области справа от барьера, дается выражением

$$p_d \approx \exp(-2d\sqrt{2mV} / \hbar). \quad (13)$$

Вероятность p_d в выражении (13) экспоненциально быстро убывает с ростом V и d , и для высоких значений V величина вероятности p_{2m} в выражении (12), убывающая степенным образом как $p_{2m} \sim V^{-2}$, может значительно превосходить вероятность $p_d \sim \exp(-d\sqrt{V})$ (возможно, даже на много порядков величины). Кроме того, вероятность p_{2m} в выражении (12) вообще не зависит от ширины барьера. Дело в том, что p_{2m} описывает вероятность попадания частицы A в область за барьером в условиях, когда за частицей A и системой B ведется наблюдение. Обычно влияние наблюдения проявляется в том, что волновая функция, описывающая наблюдаемую систему, испытывает коллапс. В результате этого коллапса (стягивания волновой функции) частица A приобретает свойства классической частицы. Существенно, что если в результате наблюдений частица A зарегистрирована в состоянии с энергией E_m , превосходящей высоту барьера V , то такая частица уже не попадет в барьер (как классически запрещенную область энергий) и туннелировать не будет. Оказавшись в надбарьерном состоянии, в дальнейшем частица уже имеет шанс свободно пролететь над барьером и с вероятностью p_{2m} попасть в область справа от барьера. При этом если частица попала в надбарьерное состояние, то вероятность того, что она проникнет и в область за барьером оказывается существенно больше, чем вероятность p_d проникнуть в эту же область за счет туннелирования, при котором частица проходит всю область барьера в подбарьерном состоянии. В этом и состоит суть барьерного анти-Зенон-эффекта: когда вероятность туннелирования частиц весьма мала, наблюдение за частицами может значительно увеличить вероятность прохождения барьера.

Особенный интерес представляет ситуация, когда из-за малой вероятности «обычного» туннелирования проникновение частицы сквозь барьер оказывается практически неосуществимым за разумные времена, но переход через барьер вследствие анти-Зенон-эффекта вполне возможен. Так, в работах [2, 18], уже рассмотрение барьерного анти-Зенон-эффекта на качественном уровне, позволило показать, что этот эффект мо-

жет иметь непосредственное отношение к явлению холодного ядерного синтеза. В этой работе получено аналитическое выражение для временной зависимости вероятности перехода частицы вследствие барьерного анти-Зенон-эффекта (формула (11)).

Обсудим вопрос о том, каким образом при регистрации внешним устройством кванта с энергией $\Delta E \ll E_m$, соответствующей энергии перехода в системе B , оказалось возможным появление состояний частицы A с энергией $E_m \gg \Delta E$.

Если частицу A вместе с системой B рассматривать как подсистему, изолированную от внешнего окружения, то в ней, в силу закона сохранения энергии для изолированных подсистем, никогда не появятся состояния с энергией E_m , так как энергии системы B для подобного перехода просто недостаточно. Но в рассмотренной здесь задаче за состоянием частицы A и системой B производится наблюдение внешним устройством, имеющее целью установить, на каком уровне находится система B (и частица A). Это означает, что частица A и система B никоим образом не могут считаться изолированными от внешнего окружения, и сохраняется только полная энергия, включающая в себя также и энергию окружающей реальности. В процессе наблюдения изменяется не только наблюдаемая система, но и сама наблюдающая окружающая реальность. А поскольку окружающая среда всегда находится по каким-то параметрам в неустойчивом состоянии (если бы среда была полностью устойчивой, то никакие измерения в ней были бы невозможны), то даже малые воздействия могут вызвать ее существенное изменение. Таким образом, источником высокой энергии E_m служат объекты, относящиеся к окружающей среде и обладающие, в принципе, сколь угодно большими запасами энергии. Однако неизвестно, даже в принципе, каким образом описывать конкретные процессы, происходящие в наблюдающей внешней среде.

В рамках подхода неэрмитового гамильтониана окружение учитывается эффективно, что позволяет в рассмотренной задаче при описании процессов, происходящих с частицей A и системой B , учитывать энергию, поступающую из внешней среды, наблюдающей эти процессы, но в то же время — не включать в описание процессы, происходящие в самой наблюдающей системе. Обсудим на качественном уровне, какие объекты окружающей среды могут являться источниками высокой энергии в рассматриваемой задаче.

В задаче о влиянии наблюдений на вероятность прохождения частицей барьера в твердом теле, источником высокой энергии служит объект внешней среды — устройство, которое регистрирует сигнал, вызванный квантом излучения при переходе системы B на более низкий уровень

энергии (при этом мы получаем информацию о переходе частицы A в надбарьерное состояние). Поскольку энергия взаимодействия каждого отдельного кванта с регистрирующим устройством слишком мала, то, чтобы его можно было заметить непосредственно, в подобных устройствах всегда используются всевозможные усилители сигнала. При регистрации даже слабый сигнал, будучи соответствующим образом усилен, вызывает в наблюдающей системе (которая есть объект внешней среды) заведомо регистрируемые и, следовательно, достаточно большие изменения.

Цель любого наблюдения состоит в том, чтобы получить информацию о наблюдаемой системе, но невозможно получить информацию о квантовой системе и совершенно не повлиять на нее. Анти-Зенон-эффект потому и возникает, что когда произошла регистрация и связанные с регистрацией изменения в наблюдающей системе, одновременно и с неизбежностью осуществляется и воздействие на наблюдаемую квантовую систему, изменяющее состояние как системы B , так и состояние взаимодействующей с ней частицы A . Это особенность квантовой механики. В результате такого воздействия наблюдающего окружения частица A получает энергию E_m , превосходящую высоту барьера. При этом происходит коллапс волновой функции, и с вероятностью, даваемой формулой (12), частица может проникнуть в область справа от барьера. Важно, что если мы исключаем возможность наблюдения за квантовой системой, то мы тем самым исключаем и возможность появления состояний с высокими значениями E_m и коллапса волновой функции, а также всего того, что с этим коллапсом связано, в том числе возможности преодоления высокого барьера.

Обратимся вновь к проблеме интеллекта (будем иметь в виду интеллект человека). Пусть цель индивида, которую ставит перед собой индивид, представляет собой задачу на самом высоком, но преодолимом уровне возможностей — как возможностей его адаптации к окружению, так и возможностей наблюдающей индивида окружающей среды. Имея в виду аналогии с изложенной выше задачей о проникновении частицы сквозь потенциальный барьер, индивиду на пути к достижению цели требуется преодолеть высокий «потенциальный барьер», «энергия» которого значительно превышает первоначальный «уровень» индивида. Такую энергию индивид может получить только из наблюдающей его окружающей среды в процессе адаптации к окружению.

Возникает вопрос: какие объекты окружающей среды могут служить источником высокой энергии, необходимой для достижения индивидом цели?

Очевидно, что индивид не может получить столь высокую энергию от окружения «себе подобных», имеющих уровень, сравнимый с уровнем его первоначального состояния. Значит, для того чтобы индивид смог бы достичь своей цели, какие-то другие объекты и среды окружающей реальности должны обеспечить ему требуемую энергию.

Гипотеза о возможных источниках высокой энергии выглядит на первый взгляд достаточно необычно. Мы полагаем, что такими источниками могут быть свет далеких звезд (космические лучи) или даже вакуум.

Галактические космические лучи — потоки заряженных частиц, которые постоянно прилетают к Земле из-за пределов Солнечной системы, словно никогда не прекращающийся дождь, — имеют энергию в широком диапазоне, вплоть до сверхвысоких энергий порядка $\sim 10^{14}$ МэВ. При этом в интегральном потоке наиболее представлены космические лучи с энергиями в диапазоне 300–500 МэВ/нуклон. Известно, что при воздействии космических лучей с подобной энергией возможны генетические нарушения, а также изменения когнитивной эффективности, сохраняющиеся на длительное время [31].

Что касается вакуума, то с точки зрения квантовой физики вакуум не является пустым пространством, а содержит постоянно появляющиеся, взаимодействующие и исчезающие виртуальные частицы (флуктуации вакуума). Вакуум представляет собой квантовое состояние с минимально возможной энергией, однако энергия квантовых флуктуаций вакуума — виртуальных частиц — совсем не мала. Виртуальные частицы, существующие в течение очень короткого интервала времени δt_V , могут иметь весьма высокую энергию $\delta E_V = \hbar/\delta t_V$. Давно известно, что флуктуации вакуума приводят к экспериментально наблюдаемым эффектам, таким как лэмбовский сдвиг уровней энергии водородоподобных атомов, обусловленный взаимодействием атома с вакуумными флуктуациями, и эффект Казимира, заключающийся во взаимном притяжении тел под действием вакуумных флуктуаций. Отметим, что согласно современным космологическим моделям, именно благодаря высокоэнергетическим вакуумным флуктуациям сформировались галактики во Вселенной [32].

Мы живем в окружающей нас реальности, где из всех типов взаимодействий лидером является электромагнитное взаимодействие. При этом все электромагнитные взаимодействия между физическими объектами, а также взаимодействия между электромагнитным полем и реальными объектами опосредуют кванты электромагнитного поля — виртуальные фотоны вакуума [33]. Более того, именно виртуальные фотоны обуслав-

ливают квантовые свойства реальных физических объектов. Это связано с характерной особенностью виртуальных фотонов всегда, независимо от их энергии $\Delta E_V = h\omega_{ph}$, переносить и передавать реальным объектам одну и ту же величину количества действия $S = h\omega_{ph}\delta t_{ph}$ (где $h = 2\pi\hbar$, δt_{ph} – время жизни виртуального фотона). Воздействие виртуальных фотонов на реальные физические объекты приводит к возникновению неопределенностей их динамических переменных, которые описываются квантовыми соотношениями неопределенностей и обуславливают квантовые свойства реальных физических объектов. При этом неопределенности квантовых величин физических объектов, вызванные воздействием виртуальных фотонов различных энергий $h\omega_{ph}$, различны и соответствуют энергии и временным параметрам виртуальных фотонов. Воздействие высокочастотных виртуальных фотонов ведет к значительным отклонениям энергии реальных объектов от величины их первоначальной энергии, но длительность δt_{ph} процесса изменения энергии в этом случае весьма мала. (В нашей недавней работе [34] имеется детальное обсуждение того факта, что виртуальные фотоны придают квантовые свойства взаимодействующим с ними физическим объектам.)

Таким образом, в проблеме интеллекта в качестве источника высокой энергии, необходимой для осуществления процесса адаптации индивида, могут служить различные объекты и среды, относящиеся ко всей окружающей реальности, чьи суммарные запасы энергии, в принципе, безграничны. Однако, поскольку барьерный анти-Зенон-эффект проявляется только в квантовых системах, роль виртуальных фотонов вакуума, которые обуславливают квантовые свойства физическим объектам и могут при воздействии передавать достаточно большую энергию, представляется особенно важной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы живем в физическом мире, где процессы, касающиеся понятия интеллекта, должны подчиняться тем же законам физики, как и все во Вселенной.

В этой работе мы ставили цель формальной математической трактовки концепции интеллекта. Для этого мы рассмотрели имеющиеся в литературе неформальные определения интеллекта, которые были даны экспертами-психологами, и выяснили, что ключевой характеристикой интеллекта индивида является его способность к адаптации к окружающей среде. Ввиду того, что процесс адаптации предполагает активное взаимодействие индивида с наблюдающей его внешней средой, мы нашли аналогии проблемы интеллек-

та с задачей квантово-механических измерений. Мы показали, что формальное описание концепции интеллекта может быть продемонстрировано в модельной квантовой задаче о влиянии наблюдений на увеличении вероятности прохождения частицы сквозь высокий потенциальный барьер (барьерный анти-Зенон-эффект). В рамках квантово-механического подхода с неэрмитовым гамильтонианом мы сформулировали систему дифференциальных уравнений, формально отражающих процесс реализации интеллекта, и представили ее аналитическое решение. На основе полученного здесь решения модельной квантово-механической задачи, мы обсуждаем вопрос о том, какие явления и процессы, сопровождающие целенаправленные действия индивида, могут иметь, с точки зрения интеллекта, определяющее значение. Мы выделяем как наиболее существенные те процессы, которые обусловлены вакуумными виртуальными фотонами.

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. R. L. Gregory, *The Oxford Companion to the Mind* (Oxford University Press, Oxford, UK, 1998).
2. В. А. Намиот и Л. Ю. Щурова, *Биофизика*, **63** (5), 2027 (2018).
3. V. Namiot and L. Shchurova, *NeuroQuantology*, **17** (9), 1 (2017).
4. A. Binet and T. Simon, *L'Annee Psychologique*, **11**, 191 (1905).
5. R. J. Sternberg, In *Handbook of Intelligence*, Ed. by R. J. Sternberg (Cambridge University Press, Cambridge, 2000), pp. 3–15.
6. L. S. Gottfredson, *J. Cognitive Educat. Psychol.*, **4** (1), 23 (2004).
7. J. Slatter, *Assessment of Children Cognitive Foundations and Applications* (Jermone M. Satler Publ., San Diego, 2018).
8. D. K. Simonton, In *Human intelligence: Historical influences, current controversies, teaching resources*, Ed. by J. A. Plucker (2003); https://intelltheory.com/simonton_interview.shtml.
9. S. Legg and M. Hutter, *Minds and Machines*, **17** (4), 391 (2007).
10. B. Misra and E. C. G. Sudarshan, *J. Math. Phys.*, **18** (4), 756 (1977).

11. R. J. Cook, *Phys. Scr. T*, **21**, 49 (1988).
12. W. M. Itano, D. J. Heinzen, J. J. Bollinger, and D. J. Wineland, *Phys. Rev. A*, **41** (5), 2295 (1990).
13. O. Hosten, M. T. Rakher, J. T. Barreiro, et al., *Nature (London)*, **439**, 949 (2006).
14. P. Facchi, Z. Hradil, G. Krenn, et al., *Phys. Rev., A* **66** (1), 012110 (2002).
15. B. Kaulakys and V. Gontis, *Phys. Rev. A*, **56** (2), 1131 (1997).
16. A.G. Kofman and G. Kurizki, *Nature (London)*, **405**, 546 (2000).
17. K. Koshino and A. Shimizu, *Phys. Rep.*, **412** (4), 191 (2005).
18. V. A. Namiot and L. Y. Shchurova, *Int. J. Mod. Phys. B* **31** (11), 1750069 (2017).
19. S. Lipinski and H. Lipinski, *Hydrogen-Lithium Fusion Device* (Int. Patent WO 2014/189799 A9, 2014).
20. В. И. Высотский и А. А. Корнилова, *Ядерный синтез и трансмутация элементов в биологических системах* (Мир, М., 2003).
21. I. Prigogine and I. Stengers, *Order out of chaos: Man's new dialogue with nature* (Heinemann, London, 1984).
22. В. Л. Гинзбург, *Успехи физ. наук*, **177** (4), 346 (2007).
23. G. Gamow, *Z. Phys.*, **51**, 204 (1928).
24. H. A. Bethe, *Rev. Mod. Phys.*, **9** (2), 161 (1937).
25. L. Rosenfeld, *Cosmology, Fusion and Other Matters: George Gamow Memorial Volume* (Colorado Associated University Press, Boulder, 1972).
26. V. F. Weisskopf and E. P. Wigner, *Z. Phys.*, **63**, 54 (1930).
27. P. Exner, *Open Quantum Systems and Feynman Integrals* (Springer, Dordrecht, 1985).
28. C. M. Bender, *Rep. Prog. Phys.*, **70** (6), 947 (2007).
29. L. Yu. Shchurova and V. N. Murzin, *J. Russ. Laser Res.* **42** (6), 632 (2021).
30. Л. В. Келдыш, *Журн. эксперим. и теорет. физики*, **47** (4), 1515 (1964).
31. J. A. Chowen and L. M. Garcia-Segura, *Prog. Neurobiol.*, **184**, 101720 (2020).
32. V. F. Mukhanov, *Physical foundations of cosmology* (Cambridge University Press, Cambridge/New York, 2005).
33. Р. Фейнман, *Квантовая электродинамика* (URSS, Москва, 2009).
34. V. N. Murzin and L. Yu. Shchurova, *J. Russ. Laser Res.* **41** (6), 597 (2020).

Formal Mathematical Description of Intelligence Concept in a Model Problem on the Influence of Observations on Quantum Processes

L.Yu. Shchurova* and V.A. Namiot**

*Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 53, Moscow, 119991 Russia

**Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

An attempt to mathematically formalize the problem of intelligence causes difficulties, if only because there is no single definition for intelligence adopted by all psychologists. In this work, this problem is addressed in the following way: through highlighting the essential features of the informal definitions of human intelligence that have been given by expert psychologists, it is conducive to put forward an abstract mathematical description of intelligence. Analogies between the problem of intelligence and the problem of quantum mechanical measurements are found, and then the solution to a model problem on the influence of observations on a process of quantum tunneling of particles through a potential barrier is given. Within the framework of the quantum mechanical approach with a non-Hermitian Hamiltonian, a system of differential equations, which formally reflect the concept of intelligence, is formulated, and its analytical solution is presented. On the basis of the obtained solution of the model problem, this paper discusses the question of what phenomena and processes can accompany a process of the realization of intelligence.

Keywords: definitions of intelligence, mathematical description of intelligence, influence of observation on biological systems, barrier anti-Zeno effect

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ СКОРОСТИ СТАРЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2022 г. В.И. Донцов^{*,#}, В.Н. Крутько^{*}, Н.А. Ермакова^{**}

^{*}Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН,
ул. Вавилова, 44/2, Москва, 119333, Россия

^{**}Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ
(Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991, Россия

[#]E-mail: dontsovvi@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 13.09.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

Сущностью старения является снижение общей жизнеспособности с возрастом, являющейся основной характеристикой личностного потенциала человека. Жизнеспособность (ν) определяется как вероятность остаться живым в течение года, смертность (m) определяется как вероятность умереть в течение года и является соответственно противоположным по значению, но адекватным по смыслу показателем, определяющим степень постарения организма. Для количественного анализа старения давно и широко используется формула Гомпертца–Мейкхама (традиционный подход), достаточно хорошо описывающая феномен экспоненциального роста смертности с возрастом. Другим подходом к оценке процесса старения является вычисление скорости прироста интенсивности смертности с возрастом ($d(m)$), характеризующей скорость старения. Целью работы является сравнение информативности, точности и удобства этих подходов для решения задачи оценки скорости старения человека на основе анализа возрастной смертности человеческой популяции. Показано, что показатель $d(m)$ является наиболее точным, простым для вычисления, математически и биологически адекватным показателем скорости старения. Его использование позволяет оценить исторические изменения характеристик старения человеческой популяции: постоянство скорости старения в истории и снижение с середины XX века для средних и старших возрастов, а также сохранение пониженной скорости старения для долгожителей.

Ключевые слова: старение, скорость старения, формула Гомпертца–Мейкхама, приращение интенсивности смертности, старение в истории.

DOI: 10.31857/S0006302922060278, EDN: LNACXH

Увеличение доли пожилых в популяции во всех развитых странах мира является важнейшей демографической особенностью настоящего времени и определяет повышение интереса к проблеме старения [1–4]. При этом одним из важных вопросов является количественное измерение скорости старения.

Сущностью старения является снижение общей жизнеспособности с возрастом, являющейся основной характеристикой личностного потенциала человека.

Жизнеспособность (ν) определяется как вероятность остаться живым в течение года, смертность (m) определяется как вероятность умереть в течение года и является, соответственно, противоположным по значению, но адекватным по смыслу показателем определяющим степень постарения организма. Другим подходом к оценке

процесса старения является вычисление скорости прироста уровня смертности с возрастом — $d(m)$, непосредственно характеризующей скорость старения.

Почти 200 лет назад Б. Гомпертц (B. Gompertz) показал, что изменение смертности с возрастом хорошо описывается экспоненциальной функцией [5], и с тех пор до настоящего времени формула Гомпертца с поправкой Мейкхама (W. M. Makeham) характеризующей смертность от внешних причин, широко используется для описания возрастной динамики смертности. Формула Гомпертца–Мейкхама, математически моделирующая изменение смертности с возрастом, имеет следующий вид:

$$m(t) = R_0 \cdot \exp(k \cdot t) + A,$$

где $m(t)$ — интенсивность смертности для возраста t , k — показатель экспоненты; A и R_0 — константы, не зависящие от возраста. Константе R_0 часто придают значение «начального уровня старения» [6].

Целью работы было сравнение двух вышеупомянутых методов оценки скорости старения и их соответствия сущности процесса старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В геронтологии принято измерять в качестве показателя старения интенсивность смертности, для чего существуют таблицы выживаемости стандартной когорты с уже вычисленными статистическими показателями, среди которых есть и величина интенсивности смертности — m , которая характеризует уровень (степень) постарения членов когорты данного возраста [6, 7]. На основе таких таблиц можно простейшим способом оценить скорость старения $d(m)$ — вычислением разности соседних значений m , деленной на шаг по возрасту, с которым составлены таблицы (обычно это один год).

Для сравнения методов оценки скорости старения использовали таблицы выживаемости стандартной когорты (The Human Mortality Database, <http://www.mortality.org>) с уже вычисленными статистическими показателями, среди которых — величина интенсивности смертности — m [8]; для вычисления значений формулы Гомпертца—Мейкхама использовали общепринятый метод, описанный в работе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ математических особенностей формул, описывающих старение, показывает следующее.

В формуле Гомпертца—Мейкхама вычисляют *абсолютные* значения интенсивности смертности m для определенного возраста, поэтому для сравнения *скорости* старения различных популяций, усредненной по периоду жизни человека, приходится прибегать к сравнению *наклонов* кривых зависимостей m от возраста, что, в частности, предполагает равномерность изменения показателя в течение всего периода жизни. О скорости старения отдельной популяции часто судят просто по общему виду данного графика.

Также для вычисления биологической (определяющейся внутренними процессами старения организма) компоненты старения по формуле Гомпертца—Мейкхама используют показатель $m - A$ — разность между общей интенсивностью смертности и внешнесредовой компонентой смертности, которая, как полагают, не зависит от возраста, а только от внешних условий жизни, и принимает-

ся за константу (что не так даже теоретически). Прямую оценку скорости старения можно получить через вычисление приращения интенсивности смертности — $d(m)$ по таблицам выживаемости стандартных когорт.

Проведем далее теоретическое сравнение удобства, точности, надежности и биологической сущности обоих методов оценки скорости старения.

1. Вычисление $d(m)$ на практике гораздо проще и точнее, чем вычисление коэффициентов формулы Гомпертца—Мейкхама.

2. Показатель $d(m)$ отражает скорость старения для конкретного возраста, а не средние значения для широкого возрастного диапазона, которые дает формула Гомпертца—Мейкхама, так как является по существу вычисления именно параметром скорости.

3. Показатель $d(m)$ непосредственно дает оценку *скорости* старения, тогда как график Гомпертца—Мейкхама показывает *абсолютные* значения m , прямо не указывающие на скорость старения, и требует проведения линий наклона графика.

4. Показатель $d(m)$ имеет единственный биологический смысл — скорость старения. Формула Гомпертца—Мейкхама включает параметры, прямо не связанные с процессом старения — не зависящий от старения «внешнесредовой» параметр A и коэффициент R_0 с не вполне понятным биологическим смыслом, который туманно называют «начальным уровнем старения». Единственный коэффициент, прямо отражающий процесс старения — это коэффициент экспоненты k , однако небольшие изменения этого коэффициента ведут к существенным изменениям скорости старения с возрастом, что в свою очередь приводит к низкой точности экспериментальной оценки различий в скорости старения, например, для разных стран. Наличие коэффициента A в формуле Гомпертца—Мейкхама ведет к резкому изменению формы графика при больших значениях A особенно в молодом возрасте (рис. 1а), что ведет к отклонению графика от прямой в полулогарифмических координатах для младших возрастов. Для возрастов долгожителей, ввиду очень высокой смертности в этих возрастах, практически целиком зависимой от процесса старения, значения $(m - A)$ и m практически совпадают. Все эти вышеупомянутые эффекты искажают основной закон старения (экспоненциальный рост смертности) в молодых и старческих возрастах и адекватно отражают его лишь для средних возрастов. Между тем, показатель $d(m)$ сохраняет линейность на гораздо большем возрастном периоде, фактически, в течение всего периода старения, следующего за периодом роста и развития организма человека.

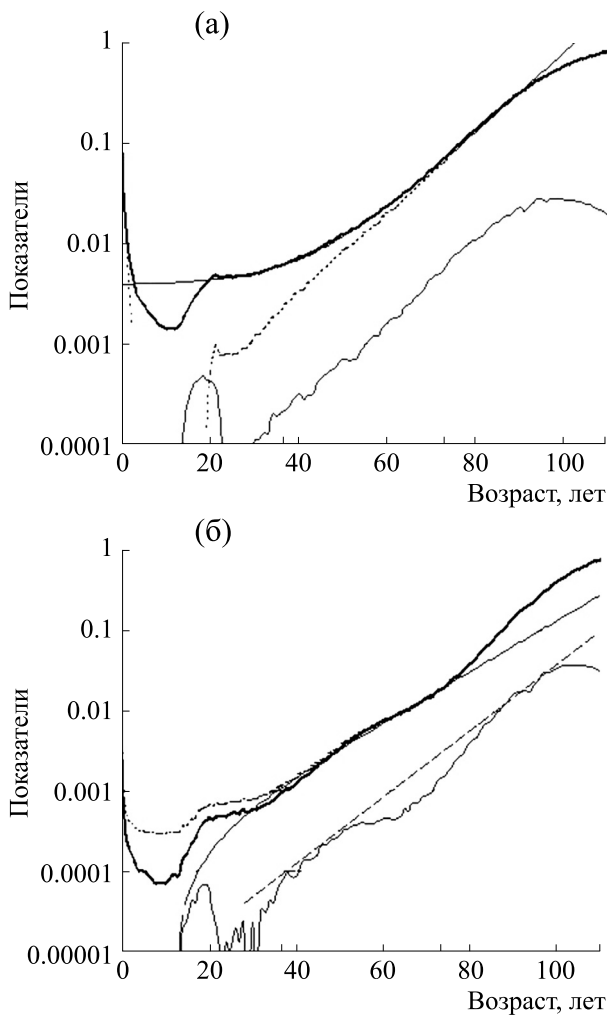


Рис. 1. Показатели интенсивности смертности и скорости старения на примере Франции: (а) — по данным 1930 г., (б) — по данным 2010 г. По оси абсцисс — возраст, по оси ординат — показатели (логарифмическая шкала). Представлены графики истинной интенсивности смертности m (жирная линия), модельной кривой по формуле Гомпертца–Мейкхама (тонкая линия), истинной смертности без внешнего компонента $(m-A)$ (точечная линия), приращения интенсивности смертности $d(m)$ за один год (сглажено по трем точкам, нижняя линия). Пунктир на рис. (б) — теоретическая прямая для наглядного отображения отклонения (снижения) скорости старения от прямой в средне-старших возрастах. Расчет показателей формулы Гомпертца–Мейкхама — по Гаврилову и др. [6].

5. Наличие нескольких коэффициентов в формуле Гомпертца–Мейкхама ведет к тому, что при вычислении они оказываются связаны между собой, что резко затрудняет сравнение скорости старения нескольких популяций или в разные исторические периоды.

6. Если показатель $d(m)$ отражает скорость старения для каждого возраста, то формула Гомпертца–Мейкхама основана на усредненных значениях. Это ведет к тому, что модельный график, построенный по вычисленным коэффициентам Гомпертца–Мейкхама, не совпадает с реальным графиком m в начальной и конечной областях возрастов.

7. Из общих соображений достаточно ясно, что принимаемый за константу коэффициент A формулы Гомпертца–Мейкхама будет не одинаков для разных возрастов, так как факторы среды обитания для молодых и пожилых очевидно различаются, также, как и реакция организма на эти факторы, так как сущность процесса старения — это существенное повышение уязвимости организма ко всем воздействиям с возрастом. Для показателя $d(m)$ постоянная A для *ближайших* значений возраста практически одинакова, поэтому значение параметра A действительно не влияет на величину скорости старения.

8. Показатель $d(m)$ меньше по абсолютной величине и размаху, чем m (на порядок и более), что делает его более точным, а график более четким, чувствительным и наглядным, отражающим небольшие изменения скорости старения в разные возрастные периоды и при сравнении разных популяций и исторических эпох. Следствием этого, однако, является чувствительность этого показателя к случайному шуму, что делает график $d(m)$ не гладким, как график m , а зубчатым, если использовать расчеты для каждого года. Этого, впрочем, легко избежать, делая шаг в три-пять лет или путем сглаживания графика по трем-пяти точкам.

9. Как можно видеть (рис. 1б), показатель $d(m)$ выражено и наглядно показывает изменения скорости старения в среднем возрасте, тогда как для графиков m и $(m-A)$ это не улавливаемые на глаз изменения. Также график $d(m)$ показывает сохранение феномена снижения скорости старения для долгожителей с середины прошлого века до настоящего времени, тогда как для m и $(m-A)$ мы видим реверсию этого процесса — кажущееся ускорение старения для долгожителей. Эту реверсию можно объяснить быстрым увеличением средней продолжительности жизни, что чисто статистически перемещает в область долгожителей все большее число лиц с обычной скоростью старения.

10. Наконец, если сравнить угол наклона для графиков m и $(m-A)$, для прошлого (50–70 лет назад) и настоящего времени, то часто оказывается, что *наклон* кривых увеличился в настоящем времени, что формально говорит об увеличении скорости старения! Однако все геронтологические исследования показывают, что 70-летние люди в настоящее время по всем физиологическим показателям, социальной активности, общему виду, самочувствию и статистике смертно-

сти соответствуют 50–60-летним в более ранние исторические периоды, то есть, имеет место несомненное сравнительное омоложение лиц среднего и старшего возраста, что, в свою очередь, может быть достигнуто только за счет снижения скорости старения. Изменение угла наклона графиков m и $(m - A)$ оказывается неизбежным при очень значительных изменениях средней продолжительности жизни в истории и очень незначительном изменении максимальной продолжительности жизни – возраста полного вымирания стандартной когорты. Это не удивительно, так как на конечных этапах жизни смертность растет так быстро, что изменения скорости старения на более ранних возрастных периодах почти не отражаются на скорости старения конечных этапов жизни – конечные точки графика не могут сдвигаться значительно ввиду очень высокого уровня смертности пожилых. И наоборот, резкие изменения смертности в молодом и среднем возрастах существенно снижают начальные значения графика, давая видимость резкого изменения наклона графика. К тому же, как отмечалось выше, метод определения наклона графика предполагает его линейность в течение всего возрастного периода, что явно не так. Всего этого лишен график показателя $d(m)$, который адекватно показывает скорость старения и его изменения именно для данного возраста и не зависит от средних значений и константных коэффициентов, как в формуле Гомпертца–Мейкхама.

Использование показателя $d(m)$ позволяет наглядно и строго описывать особенности старения, в частности исторические изменения скорости старения – скорости старения в истории и снижение скорости старения с середины XX века для средне-старших возрастов, а также сохранение пониженной скорости старения для долгожителей [4, 7].

Формула $d(m)$ является, по существу вычисления (разность значений, деленная на время), именно параметром скорости, поэтому адекватна именно скорости старения, основная роль ее – анализ уже имеющегося статистического материала. Предсказательная сила показателя не присутствует, хотя она может быть экстраполирована из имеющихся ранее значений $d(m)$; вычислять же скорость старения по данным формулы Гомпертца–Мейкхама не представляется результативным, так как график Гомпертца–Мейкхама уже сглажен, и все особенности скорости старения в возрастном аспекте уже удалены.

Данная статья является, по существу, «письмом в редакцию» и написана в ответ на пожелание рецензента нашей предыдущей работы [7] подробнее сравнить и пояснить два метода вычисления скорости старения. Подробный анализ и сравнение методов на примере нескольких де-

сятков стран и в течение нескольких веков был дан нами ранее [7] и не является темой статьи; все особенности изменений скорости старения для разных стран, в разное время, в разном возрасте и их вероятные причины – темы обширных статей, написанных нами ранее [4, 7], там же подробно обсуждены особенности поведения отдельных компонентов показателей старения в разном возрасте в разные исторические эпохи [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты сравнительного анализа двух подходов к количественному описанию скорости старения на популяционном уровне – с помощью уравнения Гомпертца–Мейкхама для интенсивности смертности m (традиционный подход) и с помощью вычисления скорости старения по данным разности интенсивности смертности для близлежащих возрастов – $d(m)$ по таблицам дожития. Показано, что показатель $d(m)$ является более точным, простым для вычисления, математически и биологически более адекватным показателем скорости старения, отражающим скорость старения в конкретном возрасте и позволяющим исследовать исторические закономерности изменения скорости старения человеческой популяции. Использование этого показателя позволило обнаружить постоянство скорости старения в истории и снижение с середины XX века для средних и старших возрастов, а также сохранение пониженной скорости старения для долгожителей [4].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-01046 «Разработка базы знаний, моделей и методов для оценки и управления здоровьем и трудоспособностью как важнейшими составляющими индивидуального личностного потенциала», а также при частичной финансовой поддержке НТИ ДК «Хелснет» в рамках научного проекта «Интеллектуальная цифровая платформа персонализированного управления качеством жизни «Health Neuristics»».

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. L. A. Gavrilov, V. N. Krut'ko, and N. S. Gavrilova, *Gerontology*, **63**, 524 (2017). DOI: 10.1159/000477965
2. K. G. Kinsella, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **53**, 299 (2005). DOI: 10.1111/j.1532-5415.2005.53494.x
3. OECD Ageing and Employment Policies, <http://www.oecd.org/employment/ageingandemploymentpolicies.htm>. Available 01.03.2020.
4. V. I. Dontsov, *Biol. Bull.*, **48**, 103 (2021). DOI: 10.1134/S1062359021020047
5. B. Gompertz, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, **115**, 513 (1825). DOI: 10.1098/rstl.1825.0026
6. L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova, *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach* (Harwood Academic Publisher, NY, 1991).
7. V. N. Krut'ko and V. I. Dontsov, *Biophysics*, **65**, 165 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920010108
8. The Human Mortality Database, <http://www.mortality.org>. Last modified: Jun-2013 Year. Available 25.01.2022.

Comparative Analysis of Methods for Estimating the Rate of Population Aging

V.I. Dontsov*, V.N. Krut'ko*, and N.A. Yermakova**

**Federal Research Center "Computer Science and Control", Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 44/2, Moscow, 119333 Russia*

***Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University),
Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia*

The essence of aging is a decline in total vitality with age, being basic personal characteristics of human potential. Viability v is defined as the probability of surviving through one year. Mortality m is defined as the probability of dying within a year and therefore has an opposite meaning to the term viability, but can be an adequate index to estimate the degree of aging of the organism. For the quantitative analysis of aging, a Gompertz–Makeham model (a traditional approach) has been widely used for a long time in describing the phenomenon of exponential increase in mortality rate with age rather well. The other approach to assessing the aging process is to calculate the rate of increment to the mortality rate with age ($d(m)$), which characterizes the rate of the aging process. The aim of this work is to compare the informativeness, accuracy and convenience of these approaches to solve the problem of estimating the rate of human aging based on the analysis of age-specific mortality rate in age group in human population. It is shown that the indicator $d(m)$ is the most accurate, easy to calculate, mathematically and biologically adequate indicator of the aging rate. This indicator is seen as important to estimate historical changes in the characteristics of the aging of the human population: constancy in the aging rate in history and decline in the aging rate since the middle of the XX century for middle and older ages, as well as the preservation of a reduced aging rate for centenarians.

Keywords: aging, aging rate, Gompertz–Makeham model, increment to mortality intensity, aging in history