

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 3, 2020

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония	
<i>А.Ф. Ванин</i>	421
Связь хиральных иерархических структур белков с их функциями	
<i>Е.В. Малышко, О.Е. Багрова, В.А. Твердислов</i>	439
Визуально-дифференциальный анализ структурных особенностей внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок	
<i>С.В. Филиппов, В.С. Быстров</i>	445
Комплексы включения кверцетина с β -циклодекстринами: ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия, квантово-химическое моделирование	
<i>Т.В. Ильич, Е.А. Лапшина, А.А. Маскевич, А.Г. Вейко, А.В. Лавыш, Б. Палеч, А. Степняк, В.У. Буко, И.Б. Заводник</i>	453
Многофункциональные белки	
<i>А.Б. Узденский</i>	464
Влияние переменного магнитного поля и наночастиц серебра на спектральные характеристики водного раствора человеческого сывороточного альбумина	
<i>Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Е.Н. Тумаев, Г.П. Ильченко</i>	479
Исследование молекулярных механизмов взаимодействия терагерцового излучения с биополимерами на примере бычьего сывороточного альбумина	
<i>Е.Ф. Немова, О.П. Черкасова, Н.А. Николаев, Г.Г. Дульцева</i>	486
Магнитно-изотопные эффекты магния и цинка в ферментативных реакциях гидролиза АТФ, катализируемых молекулярными моторами	
<i>В.К. Кольтовер, Р.Д. Лабынцева, В.К. Карандашев</i>	493
Ультразвуковое расщепление ДНК: анализ структурно-динамических характеристик регуляторных участков генома и ошибок секвенирования	
<i>И.А. Ильичева, М.В. Ходыков, Л.А. Панченко, Р.В. Полозов, Ю.Д. Нечипуренко</i>	504

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Влияние природы растворителя и освещения на изомеризацию и окислительную деструкцию астаксантина	
<i>Е.А. Куликов, И.С. Куликова, Р.Г. Васильев, А.А. Селищева,</i>	512
Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах	
<i>В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко</i>	524
Уравнение Аррениуса в анализе механизма гемолиза эритроцитов	
<i>Е.М. Соколова, Н.И. Нешев</i>	530
Метгемоглобин, активность каталазы и супероксиддисмутазы в ядерных эритроцитах <i>Scorpaena porcus</i> (Linnaeus, 1758) в условиях экспериментальной гипоксии (<i>in vitro</i>)	
<i>А.А. Солдатов, А.Ю. Андреева, Т.А. Кухарева, Т.И. Андреев,</i>	534

Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины

В.А. Тронов, Е.И. Некрасова

543

Формирование микрочастиц льда в овариальной жидкости и гомогенате неоплодотворенных яйцеклеток русского осетра при охлаждении до -196°C

Е.Н. Пономарева, А.В. Фирсова, А.М. Тихомиров, А. А. Андреев

552

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Фенотипическое приспособление у морских ежей, выращенных в условиях геометрических ограничений

Р. Лиу, Ш. Педлар, А. Од, С. МакДоналд, Дж. Стоун

557

Восприятие и специфичность реагирования медоносных пчел, бумажных ос и рыжих лесных муравьев на низкочастотное электрическое поле

Е.К. Еськов

565

Кинетика внутриклеточного кальция и потенциал действия в миокарде желудочков спонтанно-гипертензивных крыс линии ISIAH

А.А. Балакин, О.Н. Лукин, Д.А. Кузнецов, Ю.Л. Проценко

574

Применение фрактального анализа для оценки артериальной системы мозга крысы

В.С. Копылова, С.Е. Бороновский, Я.Р. Нарциссов

583

Модификация болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования

Е.Н. Чуян, Э.Р. Джелдубаева, Н.С. Трибрат

594

Спектрально-селективные преобразования солнечного излучения фотоприемниками сетчатки при управлении циркадианным ритмом организма человека в 11-летнем цикле солнечной активности

А.В. Леонидов

605

ДИСКУССИИ

Перколяционная решетка естественного отбора как коммутатор детерминированных и случайных процессов в потоке мутаций

А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, Н.Т. Левашова, В.А. Твердислов

614

Contents

Vol. 65, No. 3, 2020

Molecular Biophysics

Free Radical Nature of Nitric Oxide Molecules as a Determinant of Their Transformation into Nitrosonium Cations in Living Systems <i>A.F. Vanin</i>	421
The Relationship between Protein Chiral Hierarchical Structures and Functions <i>E.V. Malyshko, O.E. Bagrova, and V.A. Tverdislov</i>	439
Visual-Differential Analysis of Structural Features of Internal Cavities of Two Chiral Forms of Diphenylalanine Nanotubes <i>S.V. Filippov and V.S. Bystrov</i>	445
Inclusion Complexes of Quercetin with β -Cyclodextrins: Ultraviolet and Infrared Spectroscopy, Quantum-Chemical Modeling <i>T.V. Ilyich, E.A. Lapshina, A.A. Maskevich, A.G. Veiko, A.V. Lavysh, B. Palecz, A. Stepniak, V.U. Buko, and I.B. Zavodnik</i>	453
Multifunctional Proteins <i>A.B. Uzdensky</i>	464
The Influence of an Alternating Magnetic Field and Silver Nanoparticles on the Spectral Characteristics of an Aqueous Solution of Human Serum Albumin <i>E.E. Tekutskaya, M.G. Baryshev, E.N. Tumaev, and G.P. Ilchenko</i>	479
Investigation of the Molecular Mechanisms of the Interaction between Terahertz Radiation and Biopolymers: A Case Study on Bovine Serum Albumin <i>E.F. Nemova, O.P. Cherkasova, N.A. Nikolaev, and G.G. Dultseva</i>	486
Magnetic-Isotope Effects of Magnesium and Zinc in the Enzymatic ATP Hydrolysis Reactions Driven by the Molecular Motors <i>V.K. Koltover, R.D. Labyntseva, and V.K. Karandashev</i>	493
Ultrasonic DNA Cleavage: Analysis of Conformational-Dynamic Features of Regulatory Regions in the Genome and Sequencing Errors <i>I.A. Il'icheva, M. V. Khodikov, L.A. Panchenko, R.V. Polozov, and Yu.D. Nechipurenko</i>	504

Cell Biophysics

Effects of Solvent Nature and Light on Isomerization and Oxidative Destruction of Astaxanthin <i>E.A. Kulikov, I.S. Kulikova, R.G. Vasilov, and A.A. Selishcheva</i>	512
The Effect of Weak Static Magnetic Field Ranging from 0.01 μ T (a "Zero" Magnetic Field Level) to 100 μ T on the Production of Reactive Oxygen Species in Nonactivated Neutrophils <i>V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko</i>	524
Arrhenius Equation in Analysis of the Mechanism of Erythrocyte Hemolysis <i>E.M. Sokolova and N.I. Neshev</i>	530
Methemoglobin, Catalase-Like and Superoxide Dismutase-Like Activity in Erythrocytes of <i>Scorpaena porcus</i> (Linnaeus, 1758) under Experimental Hypoxia Conditions (in vitro) <i>A.A. Soldatov, A.Y. Andreeva, T.A. Kukhareva, and T.I. Andreyenko</i>	534
DNA Damage and p53 Restrict Proliferation of Muller Cells in Mouse Retina in Response to the Influence of N-Methyl-N-Nitrosourea <i>V.A. Tronov and E.I. Nekrasova</i>	543

Formation of Ice Microparticles in Ovarian Fluid and Homogenate of Unfertilized Eggs of Russian Sturgeon during Cooling to -196°C

E.N. Ponomareva, A.V. Firsova, A.M. Tikhomirov, and A.A. Andreev

552

Complex Systems Biophysics

Phenotypic Accommodation in Sea Urchins Grown under Geometric Constraints

R. Liu, Sh. Pedlar, A. Oad, S. McDonald, and J. Stone

557

Perception and Specificity of Behavioral Effects observed in Honey Bees, Paper Wasp, and Red Wood Ants in Response to Low Frequency Electric Field

E.K. Eskov

565

The Kinetics of Intracellular Calcium and Action Potential in The Ventricular Myocardium of Spontaneously Hypertensive ISIAH Rats

A.A. Balakin, O.N. Lookin, D.A. Kuznetsov, and Yu.L. Protsenko

574

Application of Fractal Analysis to Estimation of the Rat Brain Arterial System

V.S. Kopylova, S.E. Boronovskiy, and Ya.R. Nartsissov

583

Changes of Pain Sensitivity in Rats after Exposure to Low-Intensity Millimeter-Wave Radiation with the Use of Electromagnetic Shielding

E.N. Chuyan, E.R. Dzheldubaeva, and N.S. Tribat

594

Spectral-Selective Transformations of Solar Radiation by Retinal Photoreceivers while Controlling the Circadian Rhythm of the Human Body in an 11-Year Cycle of Solar Activity

A.V. Leonidov

605

Discussions

A Percolation Natural Selection Grid as a Deterministic and Random Processes Switch in the Mutation Flow

A.Ya. Garaeva, A.E. Sidorova, N.T. Levashova, and V.A. Tverdislov

614

СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНАЯ ПРИРОДА МОЛЕКУЛ МОНООКСИДА АЗОТА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ИХ ПРЕВРАЩЕНИЕ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ В ИОНЫ НИТРОЗОНИЯ

© 2020 г. А.Ф. Ванин

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

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

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.

После доработки 13.03.2020 г.

Принята к публикации 16.03.2020 г.

Получены новые результаты, подтверждающие наши предыдущие данные о способности биядерной формы биологически активных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами (глутатионом или N-ацетил-L-цистеином) выступать в качестве доноров катионов нитрозония, обеспечивающих образование S-нитрозотиолов при распаде этих комплексов в кислой среде как в аэробных, так и анаэробных условиях. Появление катионов нитрозония в составе биядерных динитрозильных комплексов железа определяется реакцией диспропорционирования свободно-радикальных молекул монооксида азота при их связывании в ходе синтеза этих комплексов с катионами Fe^{2+} (по две на один катион). При окислении тиолсодержащих лигандов в динитрозильных комплексах железа или их блокаде тиолспецифическими реагентами выделяющиеся при распаде этих комплексов катионы нитрозония при нейтральных значениях pH подвергаются гидролизу, превращаясь в анионы нитрита. Аналогичное превращение имеет место при распаде при нейтральных значениях pH монойдерной формы динитрозильных комплексов железа с лигандами нетиоловой природы. Установлено, что образование S-нитрозотиолов при распаде биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами при кислотных значениях pH может блокироваться при двух-трехкратном избытке свободных тиолов (не включенных в состав комплексов) по отношению к содержанию самих комплексов. Эта блокада обусловлена восстановлением катионов нитрозония тиолами при участии ионов железа как катализаторов до нейтральных молекул NO, высвобождающихся из биядерных динитрозильных комплексов железа. Таким образом обе формы динитрозильных комплексов, возникающие в живых организмах, могут функционировать в них не только как доноры одного из универсальных регуляторов метаболических процессов монооксида азота, но и как доноры катионов нитрозония, инициирующих процесс S-нитрозирирования низкомолекулярных и высокомолекулярных (белковых) тиолов.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, S-нитрозотиолы, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302920030011

В настоящее время установлено, что во всех представителях живого мира — животных и человеке, растениях и бактериях — ферментативным путем непрерывно вырабатывается простейшее химическое соединение — монооксид азота (или, как сейчас его принято называть в биологических

публикациях, — оксид азота — NO), функционирующее в живых организмах в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов [1]. Его биологическое действие не опосредовано клеточными рецепторами: оксид азота легко проникает через клеточные мембраны и, связываясь с гемовой группой разнообразных гемсодержащих ферментов, например, с гуанилатциклазы, активирует (или ингибирует) эти ферменты.

Наряду с биологической активностью NO не менее важным представляется биологическое действие ионизированной формы этого агента — катиона нитрозония (NO^+), связывание которого с

Сокращения: М-ДНКЖ — монойдерные динитрозильные комплексы железа, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, Б-ДНКЖ — биядерные динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-GSH — динитрозильные комплексы железа с глутатионом, GS-NO — S-нитрозоглутатион, NAC — N-ацетил-L-цистеин, ДНКЖ-NAC — динитрозильные комплексы железа с N-ацетил-L-цистеином, ЭДТА — этилендиаминтетраацетат, МНКЖ — мононитрозильные комплексы железа.

тиоловыми группами белков приводит к образованию соответствующих S-нитрозотиолов (RS-NO), резко изменяющих реактивность этих белков [2–4].

В связи с активной ролью катиона NO^+ в биологических процессах встает вопрос, каким образом в живых организмах может достигаться ионизация (одноэлектронное окисление) молекул NO до NO^+ ? Большинство исследователей связывает это с окислением NO кислородом до NO_2 . В образующемся аддукте — триоксиде азота ($\text{NO}-\text{NO}_2$) — взаимное одноэлектронное окисление-восстановление свободно-радикальных молекул NO и NO_2 (реакция их диспропорционирования) приводит к трансформации триоксида азота в аддукт $\text{NO}^+-\text{NO}_2^-$. В отсутствие тиолов ион нитрозония в этом аддукте должен гидролизироваться, превращаясь при связывании с ионами гидроксила и сохранении нейтральных значений pH (в буферном растворе), в анион нитрита [2–7]. В присутствии тиолов, характеризующихся существенно более высоким, чем анион гидроксила, сродством к ионам нитрозония, последние, связываясь с тиолами, образуют S-нитрозотиолы. В кислой среде оба компонента аддукта $\text{NO}^+-\text{NO}_2^-$ превращаются в отсутствие тиолов в молекулы азотистой кислоты (HNO_2), тогда как в присутствии тиолов — в молекулы S-нитрозотиолов [5, 6].

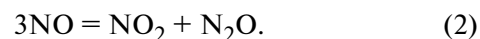
Такого рода превращения, продемонстрированные автором в работе [8] для чисто химических систем, как оказалось, не имеют отношения к процессам образования S-нитрозотиолов в живых организмах. Проведенные на клеточных культурах и микроорганизмах исследования показали, что генерация в них NO действительно приводит к появлению в этих клетках как низкомолекулярных, так белковых S-нитрозотиолов. Однако этот процесс равноэффективно идет как в присутствии, так и в отсутствие кислорода [9, 10]. Это означает, что образование S-нитрозотиолов, т.е. необходимое для этого окисление NO до NO^+ , может происходить в живых организмах и в анаэробных условиях — в отсутствие кислорода.

Возможно ли это? Да, если принять во внимание свободнорадикальную природу оксида азота — агента, выбранного Природой в качестве одного из универсальных регуляторов метаболических процессов у всех представителей живого мира. Дело в том, что для свободных радикалов характерна реакция диспропорционирования, т.е. реакция взаимного одноэлектронного окисления-восстановления, реализующаяся при взаимодействии двух молекул свободных радикалов. Именно эта реакция может обеспечивать превращение одной молекулы NO в катион нитрозония,

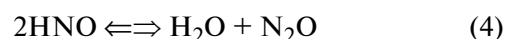
а другой — в анион нитроксила (NO^-) (по реакции 1):



Как было показано нами в работе [8], существование такой реакции в газообразном NO следует из факта превращения этого газа в NO_2 и N_2O в соответствии с реакцией 2, характерной для этого газа при давлении несколько десятков атмосфер (11, 12):



Как показано в работе [8], уравнение, характеризующее реакцию 1, превращается в уравнение, характеризующее реакцию 2, после умножения обеих его частей на 2 и добавления к ним двух молекул воды, обеспечивающих гидролиз ионов NO^+ и NO^- с образованием соответственно молекул азотистой кислоты (HNO_2) и молекул нитроксила (HNO). Последующее диспропорционирование этих молекул в соответствии с реакциями 3 и 4



приводит соответственно к их превращению в диоксид, монооксид (оксид) и закись азота и тем самым (после удаления из обеих частей модифицированного уравнения одной молекулы воды и одной молекулы NO) к превращению этого уравнения в уравнение 2. Таким образом, при высоких давлениях оксид азота может вести себя как кислотный ангидрид, обеспечивающий образование азотистой кислоты.

Такое поведение молекул NO не обнаруживается при давлении в одну атмосферу и ниже, т.е. при концентрации этого агента, продуцируемого в живых организмах. Очевидно, в этом случае концентрация аддуктов (NO^+-NO^-) недостаточна для образования в реакции гидролиза заметного количества азотистой кислоты, так что молекулы NO не проявляют себя в этих условиях в качестве кислотного ангидрида. Тем не менее, как было предположено автором в работах [8, 13], диспропорционирование молекул NO может идти и в этих условиях при наличии в растворе ионов Fe^{2+} , характеризующихся высоким сродством к молекулам NO [14]. Связывание двух молекул NO с ионом Fe^{2+} с образованием железодинитрозильного $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -фрагмента — так называемого железодинитрозильного $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -мотива, с включением в его молекулярные орбитали π -орбиталей NO и d -орбиталей железа, обеспечивает перенос неспаренного электрона в этом мотиве с одной молекулы NO на другую, т.е. их реакцию дис-

пропорционирования — реакцию 1. Последующее протонирование появляющегося в этом мотиве иона нитроксила приводит к выходу этого иона, как это показано на схеме 1, из ли-

гандного окружения железа с последующим диспропорционированием молекул нитроксила (HNO) и появлением вместо них в соответствии с уравнением 4 закиси азота и воды:

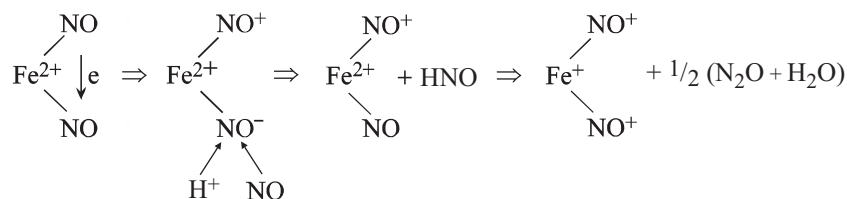


Схема 1. Предполагаемый механизм образования $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -мотива в реакции молекул NO с ионом Fe^{2+} [8, 13, 15–19].

Вместо иона нитроксила в окружение железа включается третья молекула NO , в результате железо в железодинитрозильном мотиве приобретает d^7 -электронную конфигурацию с соответствующей резонансной структурой железодинитрозильного мотива — $[\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$.

Очевидно, что наличие в этом мотиве легко гидролизующихся NO^+ -лигандов делает указанную резонансную структуру неустойчивой. Эту неустойчивость можно устранить введением в координационную сферу железодинитрозильного мотива тиолсодержащих (RS^-) лигандов, которые,

будучи сильными π -донорами электронной плотности, могут обеспечить перенос этой плотности на железо и нитрозильные лиганды. Происходящее в результате этого переноса снижение положительного заряда на этих лигандах ослабляет взаимодействие последних с ионами гидроксила, предотвращая тем самым гидролиз нитрозильных лигандов, в результате в соответствии со схемой 2 возникают стабильные парамагнитные моноядерные динитрозильные комплексы железа (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами (формула $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$:

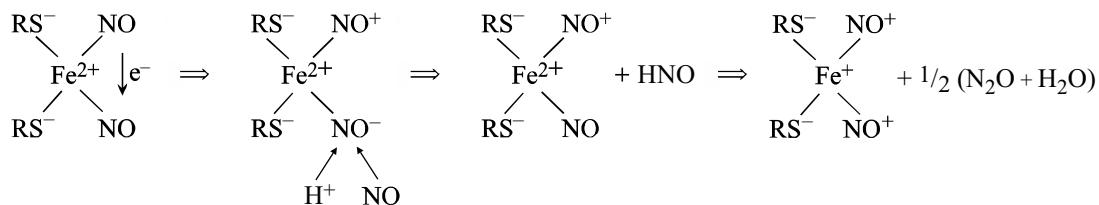


Схема 2. Предполагаемая схема образования моноядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции двухвалентного железа, тиолов и газообразного NO [8, 13, 15–19].

Именно эти комплексы впервые были обнаружены нашей группой сначала в дрожжевых клетках (1964–1965 гг.) [20, 21], а затем в тканях животных и птиц (1967 г.) [22] по характерному для этих комплексов сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) со средним значением g -фактора, равным 2.03 (сигнала 2.03), приведенному на рис. 1. В 1964 г. слабый пик при $g = 2.03$ был зарегистрирован Д. Мэллардом и М. Кентом в химически индуцированной гепатоме крыс [23], а в 1965 г. такой же сигнал (точнее, только его часть — пик при $g_{\perp} = 2.035$) был зарегистрирован Б. Коммонером с сотрудниками в печени крыс при инициировании у них гепатоканцерогенеза [24]. В 1990-е годы, когда оксид азота был признан в качестве одного из эндогенных универсальных регуляторов метаболических процессов в

живых организмах, М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами были обнаружены во многих биосистемах, способных продуцировать оксид азота [25–36].

Результаты многолетних исследований природы и биологической активности этих комплексов позволили нам в последние годы предположить, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (и не только М-ДНКЖ, но и обнаруженная позже в биосистемах биядерная форма этих комплексов — Б-ДНКЖ, формула $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}_2^+(\text{NO}^+)_4]$) могут функционировать в живых организмах в качестве «рабочей формы» оксида азота — они обеспечивают стабилизацию и доставку NO , а также его катионной формы — ионов нитрозония — к мишеням их биологического действия [18, 19].

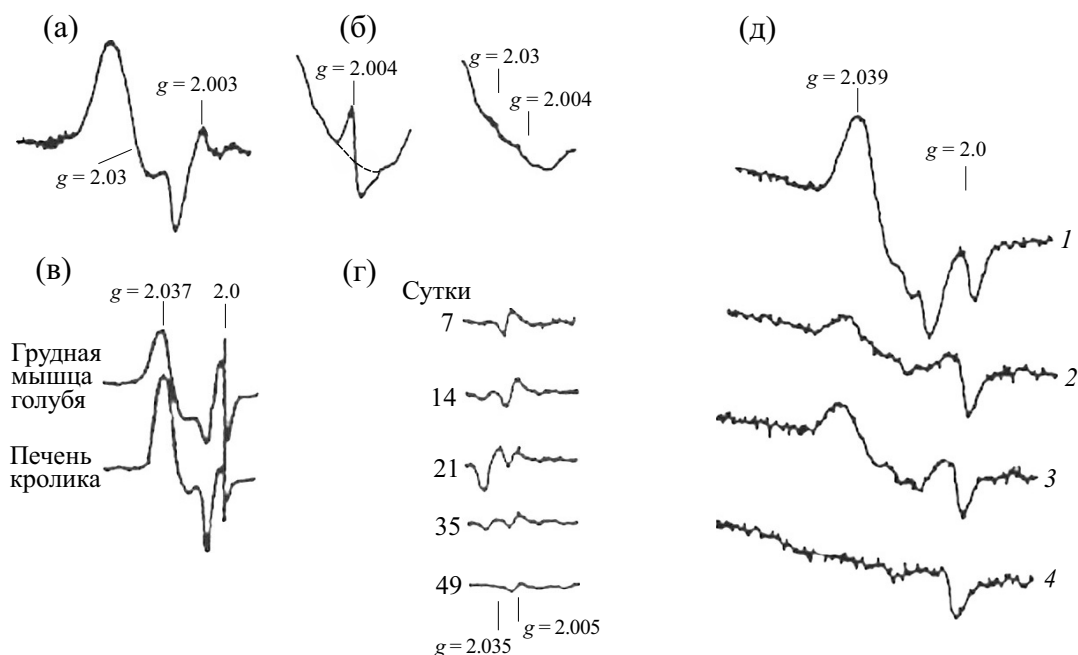


Рис. 1. Сигнал с $g = 2.03$, впервые зарегистрированный в 1960-е годы: (а) — в дрожжевых клетках [20, 21]; (б) — в химически индуцированной гепатоме крыс [23]; (в) — в тканях голубей и кроликов [22]; (г) — в печени крыс на 1–45 сутки после введения в их диету гепатоканцерогенов [24]. (д) — Сигнал с $g = 2.03$, зарегистрированный в 1990-е годы в активированных макрофагах мышей в присутствии субстрата NO-синтазы L-аргинина (1), L-аргинина и ингибитора NO-синтазы N-метил-L-аргинина (2), в отсутствие L-arg и NMMA (3) или в присутствии только NMMA (4) [25].

Цель настоящей публикации состояла в выяснении поставленного ранее в работах автора [8, 13] вопроса о способности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами выступать в качестве доноров не только нейтральных молекул NO, но и ионов нитрозония. Другими словами, могут ли эти комплексы сами по себе, как это показано на схеме 3, при их распаде в присутствии тиолов иницииро-

вать образование S-нитрозотиолов, а при блокаде тиолов соответствующими реагентами или их окислении — образование нитрита. При этом в соответствии со схемой 3 уровень S-нитрозотиолов или нитритов должен быть равен количеству высвобождающихся при этом нейтральных молекул NO.

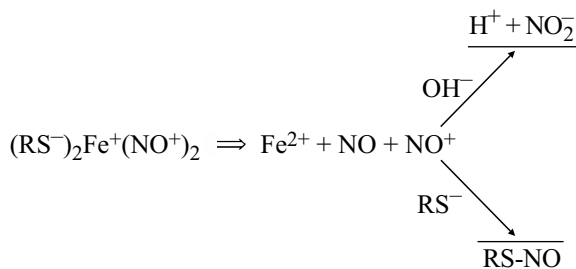


Схема 3. Предполагаемая схема распада М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, приводящего при наличии или отсутствии (блокаде) тиолов в растворе соответственно к накоплению S-нитрозотиолов или нитрита [8, 13].

Проведенные ранее на 0.5 мМ растворах Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) эксперименты, казалось бы, полностью подтвердили это предположение [8, 13]. Распад комплексов в этих работах был инициирован либо протонированием тиолсодержащих лигандов, достигавшимся прогреванием растворов Б-ДНКЖ в сильно кислой среде, окислением тиоловых групп этих ли-

гандов кислородом воздуха, либо связыванием этих групп с ртутьсодержащим агентом — пархлормеркурийбензоатом — в последних двух опытах при нейтральных значениях pH раствора. Предполагалось, что в обоих случаях Б-ДНКЖ сначала распадались на моноядерные формы, которые затем начинали распадаться на составляющие их компоненты, как это показано на схеме 3.

При этом половина высвобождающихся в кислой среде нитрозильных лигандов (как в аэробных, так и в анаэробных условиях) обнаруживалась в форме NO^+ в составе S-нитрозоглутатиона (GS-NO), тогда как при распаде ДНКЖ в растворе при нейтральных значениях pH также только половина нитрозильных лигандов превращалась в анионы нитрита (очевидно, в результате гидролиза высвобождающихся из ДНКЖ ионов нитрозония).

Что касается другой половины нитрозильных лигандов, то в соответствии со схемой 3 она должна была высвобождаться из Б-ДНКЖ в форме газообразных (летучих) молекул NO . Однако оценка уровня этого газа, высвобождавшегося в течение часа в анаэробных условиях из подкисленных 12 мМ растворов Б-ДНКЖ с глутатионом при их прогреве, показала, что оба нитрозильных лиганда, входивших в состав железо-динитрозильного мотива, переходили в форму нейтральных молекул NO . Ни GS-NO , ни нитрит в растворах распадающихся ДНКЖ в этих опытах не обнаруживались.

Для объяснения полученного несоответствия со схемой 3 было предположено, что GS-NO , который мог возникать в этих условиях, распадался при каталитическом действии на него примесной меди, уровень которой мог повышаться, например, в результате использования при синтезе Б-ДНКЖ-GSH в сравнительно высокой (12 мМ) концентрации ферросульфата (до 24 мМ) [8, 13]. Возможен был и другой путь превращения всех нитрозильных лигандов при распаде Б-ДНКЖ-GSH в нейтральные молекулы NO . Он мог реализоваться в результате одноэлектронного восстановления катионов нитрозония ионами Fe^{2+} , высвобождающимися в соответствии со схемой 3 из Б-ДНКЖ. Мог ли этот процесс эффективно реа-

лизироваться при участии только ионов Fe^{2+} или эти ионы выступали в качестве промежуточных участников — катализаторов реакции восстановления катионов нитрозония глутатионом как представителем тиолсодержащих соединений — этот вопрос в наших предыдущих работах [8, 13] не изучался.

В настоящей работе сделана попытка преодолеть этот недостаток и тем самым окончательно ответить на вопрос, действительно ли ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут функционировать в живых организмах не только в качестве доноров газообразных (нейтральных) молекул NO , но и катионов нитрозония.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах были использованы ферросульфат (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, N-ацетил-L-цистеин (NAC), неocupроин и нитрит натрия (все производства компании Sigma, США). Газообразный NO был получен в реакции ферросульфата и нитрита натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой NO от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированном сосуде [17].

Синтез Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином. При синтезе ДНКЖ с глутатионом (ДНКЖ-GSH) или N-ацетил-L-цистеином (ДНКЖ-NAC) как представителями тиолсодержащих лигандов использовалась способность S-нитрозотиолов продуцировать ДНКЖ с тиолсодержащими (RS^-) лигандами в реакции двух молекул RS-NO с ионом двухвалентного железа и двумя молекулами тиолов (схема 4):

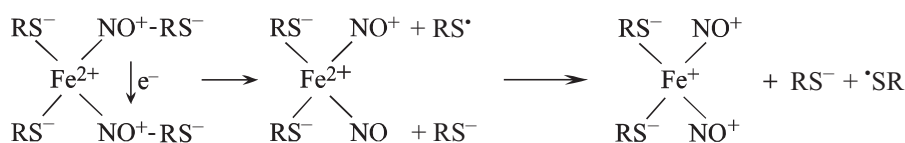


Схема 4. Предполагаемый механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции между Fe^{2+} -ионами, тиолами (RS^-) и S-нитрозотиолами (RS-NO^+) [37].

В соответствии со схемой 3 при связывании с Fe^{2+} ионом двух разных резонансных структур $\text{RS-NO}/\text{NO}^+-\text{RS}^-$ и NO^+-RS^- перенос электрона от NO^+ в первой из них на ион нитрозония в другой структуре может сразу же из-за распада S-нитрозотиольных лигандов приводить к формированию железодинитрозильного $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]$ -мотива М-ДНКЖ. Что касается по-

следующего обратимого превращения М-ДНКЖ в биядерную Б-ДНКЖ-форму, происходящего в соответствии со схемой 5, то, поскольку тиолы включаются в эти комплексы в ионизованной RS^- -форме, из-за низкого содержания последней при нейтральных значениях pH подавляющая часть М-ДНКЖ, в частности М-ДНКЖ-GSH, в этих условиях должна димеризоваться в Б-ДНКЖ:

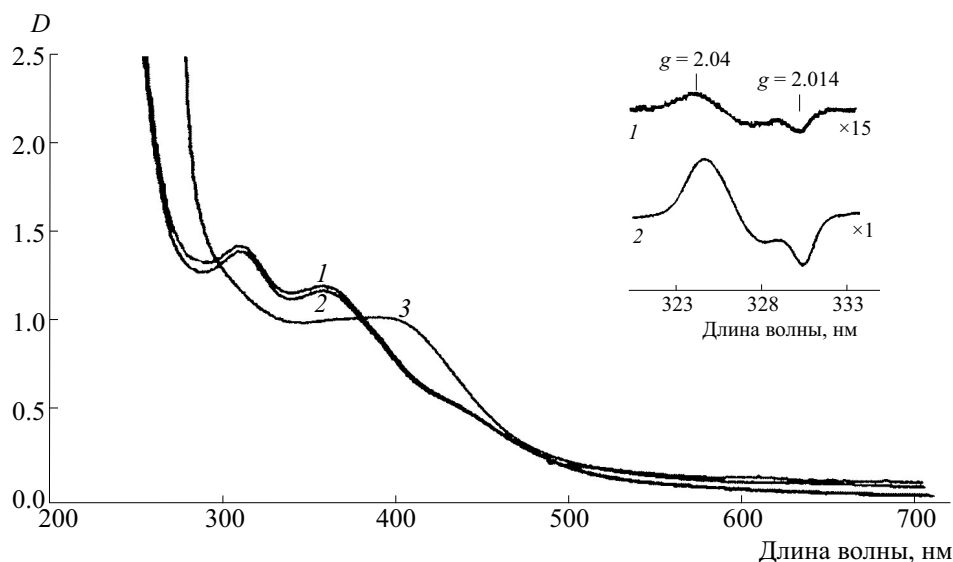


Рис. 2. Спектры оптического поглощения Б-ДНКЖ-GSH, зарегистрированные в водном растворе при pH 7.4 и 1.0 (кривые 1 и 2 соответственно). Кривая 3 — спектр поглощения М-ДНКЖ-GSH, зарегистрированный в растворе Б-ДНКЖ-GSH в присутствии трехкратного избытка глутатиона и pH 11.0. На врезке — сигналы с $g = 2.03$ (кривые 1 и 2), зарегистрированные при 77 К в растворах Б-ДНКЖ-GSH, характеризующихся спектрами оптического поглощения, представленными соответственно кривыми 1 и 3. Справа у кривых на врезке указано усиление радиоспектрометра в отн. ед. Точно такие же спектры оптического поглощения и сигнал с $g = 2.03$ характерны соответственно для Б-ДНКЖ-NAC и М-ДНКЖ-NAC.

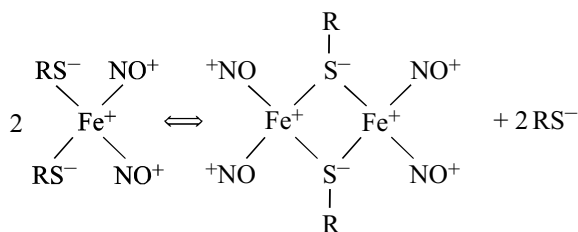


Схема 5. Обратимое взаимопревращение М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [17].

В соответствии с ранее разработанным нашей группой протоколом синтеза Б-ДНКЖ на основе схемы 4 [38], синтез Б-ДНКЖ-GSH был осуществлен следующим образом. К 10 мл 15 мМ HEPES-буфера при pH 7.4 последовательно добавлялись 20 или 15 мМ глутатиона, 10 мМ ферросульфата и 10 мМ нитрита натрия. Понижение pH раствора HEPES после добавления в него глутатиона (до pH 3.0–3.5) обеспечивало полное растворение добавляемого ферросульфата, а также полное превращение нитрита в GS-NO, образующийся в реакции протонированного нитрита с глутатионом. Об эффективности образования GS-NO можно было судить по кинетике нарастания полосы оптического поглощения этого соединения на длине волны 334 нм, а также по более слабой полосе на 546 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно $0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $0.017 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [38].

По окончании образования GS-NO, происшедшего в течение одного-полутора часов, pH

раствора был повышен до нейтральных значений (до pH 7.3–7.5) добавлением нескольких капель 100 мМ раствора NaOH, в результате чего розовая окраска раствора, характерная для GS-NO, сменялась в течение пяти-шести часов на темно-коричневую, характерную для образующегося Б-ДНКЖ-GSH.

Как следует из схемы 4, при равных концентрациях Fe^{2+} и GS-NO (10 мМ) последний полностью включался в Fe^{2+} -динитрозильный мотив Б-ДНКЖ, что существенно снижало риск загрязнения раствора нитритом, не включившимся в Б-ДНКЖ («свободным нитритом»). Что касается Fe^{2+} -ионов, то только 50% из них (5 из 10 мМ) включались при нейтральных значениях pH в образующиеся Б-ДНКЖ. Другая половина осаждалась в форме железогидроокисных комплексов, и ее можно было полностью удалить из раствора его пропусканием через бумажный фильтр. Полученные таким образом растворы Б-ДНКЖ-GSH замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при -18°C с последующим размораживанием перед использованием в экспериментах.

Что касается глутатиона, содержание которого при синтезе Б-ДНКЖ в полтора или два раза превышает содержание железа, соответствующая его часть — 10 или 5 мМ — не включалась в Б-ДНКЖ, т.е. сохранялась в свободном состоянии. Количество тиола, включившегося в эти комплексы, бы-

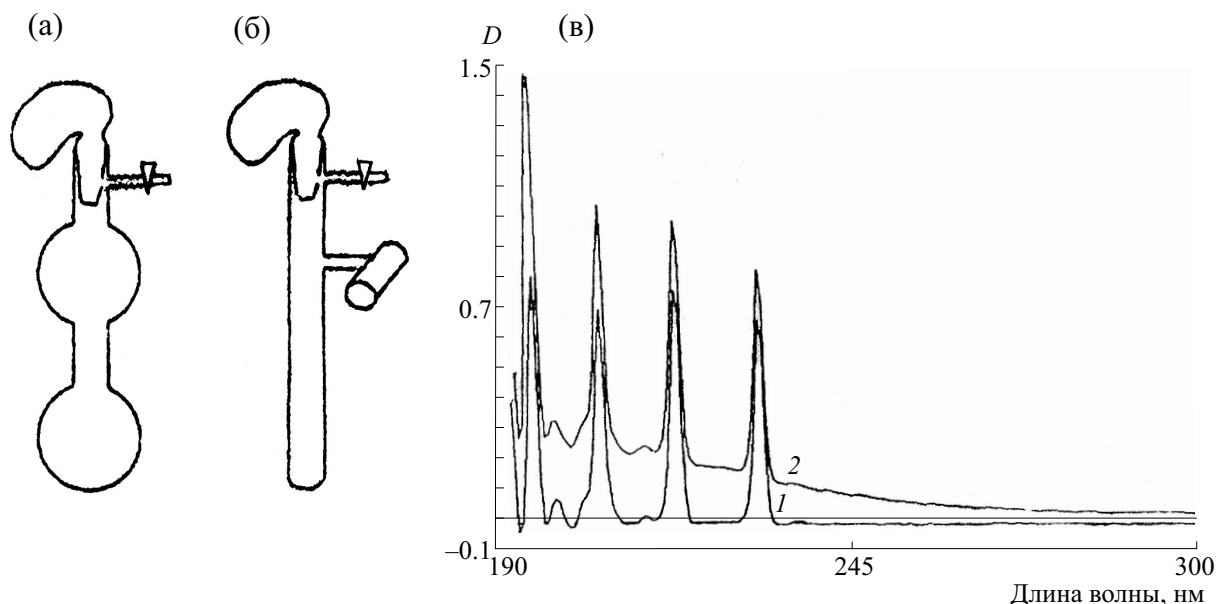


Рис. 3. Схемы модифицированных аппаратов Тунберга, использовавшихся для получения ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы (а) или для измерения оптического поглощения NO и NO₂ в газовой фазе (б); (в) — спектр оптического поглощения газообразного NO (четыре эквидистантных узких полосы, кривая 1) и суммарное оптическое поглощение газовой смеси NO + NO₂ (кривая 2).

ло равно в соответствии со схемой 4 количеству включенного в них железа.

Концентрация полученных Б-ДНКЖ-GSH была определена оптическим методом по интенсивности характерных для этих комплексов полос поглощения, приведенном на рис. 2, с коэффициентами экстинкции ϵ , равными соответственно 4600 и 3700 М⁻¹см⁻¹ (в пересчете на один атом железа) [17, 38]. Концентрация комплексов, полученных в этих условиях, составляла 4.5–5.0 мМ. Таким образом, при использовании 20 или 15 мМ глутатиона при синтезе Б-ДНКЖ-GSH отношение содержания свободного глутатиона к содержанию комплексов составляло соответственно 2 : 1 или 1 : 1.

Что касается моноядерной формы ДНКЖ-GSH, о ее наличии в растворе можно было судить по сигналу 2.03, приведенному на врезке на рис. 2, со следующими значениями g -фактора: $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$, $g_{\text{ср}} = 2.03$. Интенсивность этого сигнала при нейтральных значениях pH соответствовала включению в М-ДНКЖ не более 5% от общего содержания железа, включавшегося суммарно в обе формы ДНКЖ. При повышении до 10–11 pH раствора, в который при синтезе ДНКЖ вводили 20–30 мМ глутатиона, интенсивность сигнала 2.03 повышалась в 20–30 раз (рис. 2, врезка), так что все железо в растворе обнаруживалось в составе М-ДНКЖ. При этом

спектр поглощения раствора трансформировался и становился характерным для спектра М-ДНКЖ-GSH с полосой на 390 нм с $\epsilon = 4700 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [17].

Аналогичным образом были синтезированы Б-ДНКЖ-NAC. Различие состояло лишь в том, что синтез S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина (S-NAC), необходимого для образования этих комплексов, заканчивался через 20–25 мин после добавления в соответствующий раствор нитрита, а синтез Б-ДНКЖ-NAC, начинавшийся после подщелачивания раствора S-NAC и ферросульфата, заканчивался через три-четыре часа. Соотношение NAC и железа, использованных при синтезе Б-ДНКЖ-NAC, составляло 3 : 1 (30 и 10 мМ) или 1.5 : 1 (15 и 10 мМ). Концентрация нитрита натрия составляла 10 мМ. Отношение содержания свободного NAC к содержанию комплексов, синтезированных при 30 и 15 мМ NAC и 10 мМ железа, составляло соответственно 4 : 1 и 1 : 1.

Синтез ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы. Синтез М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы — водой, фосфатом и этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) — проводили в модифицированном аппарате Тунберга, схема которого представлена на рис. 3а, в соответствии с описанным ранее подходом [17]. Процедура синтеза состояла в следующем. В верхнюю часть аппарата помещали 0.5 мл дистиллированной воды, а в нижнюю

часть — 4.5 мл 30 мМ НЕРЕС-буфера при pH 7.3–7.5 без каких-либо добавок или содержавшего 100 мМ фосфата или ЭДТА. После пяти-десяти-минутного выдерживания этой системы в вакууме, необходимого для удаления воздуха из воды, в верхнюю часть аппарата (в дистиллят) вводили ферросульфат железа, снова откачивали воздух из аппарата и затем вводили в него газообразный NO под давлением 100–150 мм рт. ст. на установку, описанной в работе [39]. При последующем пяти-десятиминутном встряхивании аппарата раствор ферросульфата в верхней его части приобретал зеленую окраску, обусловленную образованием моногидроксильного комплекса Fe^{2+} ; далее этот раствор смешивался с раствором, помещенным в нижней части аппарата. После десятиминутного встряхивания аппарат откачивали от NO, а полученный раствор замораживали в жидком азоте для последующего изучения оптическими и ЭПР-методами.

Регистрация спектра оптического поглощения газообразного NO. Для регистрации спектра оптического поглощения газообразного NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ-GSH при его распаде, использовали модифицированный аппарат Тунберга (схема представлена на рис. 3б), содержащий припаянную к нему кювету цилиндрической формы с кварцевыми торцевыми стенками. Аппарат помещали в спектрофотометр таким образом, чтобы световой луч в нем проходил вдоль оси кюветы. Характерный спектр регистрируемого при этом оптического поглощения газообразного NO и примесного газообразного NO₂ показаны на рис. 3в. Спектр поглощения газообразного NO характеризовался четырьмя эквидистантными узкими полосами поглощения в области 190–200 нм, тогда как газообразный NO₂ давал в этой области широкую бесструктурную полосу поглощения [38, 40]. Вакуумная сублимация смеси NO + NO₂ приводила в результате удаления NO₂ к полному исчезновению бесструктурного оптического поглощения этого газа.

Для оценки количества газообразного NO, высвобождавшегося из Б-ДНКЖ-GSH, использовали стандартный образец газообразного NO при давлении, определявшемся ртутным манометром на вакуумной установке, описанной нами в работе [39].

РЕЗУЛЬТАТЫ

S-Нитрозирующее действие Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-НАС на включенные в них тиолсодержащие лиганды. Как указывалось во введении, образование GS-NO при распаде Б-ДНКЖ-GSH могло ослабляться в результате одноэлектронного восстановления катионов нитрозония молекулами глутатиона при участии ионов железа как ка-

тализаторов этого процесса. Естественно, что для проверки этой возможности необходимо было оценить эффективность образования GS-NO при прогреве подкисленных растворов Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях в зависимости от уровня свободного (не включенного в ДНКЖ) глутатиона в растворе. Ожидалось, что содержание GS-NO должно было повышаться по мере снижения этого уровня до минимального (нулевого) значения. Такая ситуация могла, очевидно, реализоваться, если при синтезе Б-ДНКЖ глутатион и железо вводили бы в равном количестве. Однако при таком соотношении глутатиона и ферросульфата оказалось невозможным синтезировать Б-ДНКЖ-GSH в концентрации, равной концентрации этих комплексов при использовании при их синтезе более высокого соотношения количества глутатиона и ферросульфата, например при соотношениях 2 : 1 или 3 : 1. Такое равенство удалось достигнуть только при соотношении глутатиона и ферросульфата при синтезе Б-ДНКЖ-GSH, равном 1.5 : 1.0, например при концентрациях глутатиона и ферросульфата, равных 15 и 10 мМ, и концентрации нитрита, равной 10 мМ. Судя по спектру оптического поглощения раствора полученных таким образом комплексов (рис. 4, кривая 2), их концентрация была близка к концентрации Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении глутатиона и ферросульфата, равном 2 : 1, (рис. 4, кривая 1). В обоих случаях растворы перед их записью на спектрофотометре разбавляли в десять раз.

При последующем прогреве при 80°C в анаэробных условиях этих двух неразбавленных подкисленных растворов Б-ДНКЖ-GSH наблюдалось полное исчезновение исходных спектров поглощения и появление спектра поглощения, характерного для GS-NO (рис. 4, кривые 3–5), с интенсивной полосой на 334 нм и слабой полосой на 543 нм, о которых было сказано в методической части. При этом, судя по интенсивности этих полос, концентрация GS-NO, образующихся в растворах Б-ДНКЖ-GSH с низким содержанием глутатиона, соответствовала (в полном соответствии со схемой 3) включению в GS-NO половины нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ (рис. 4, кривые 4 и 5), что существенно превышало уровень GS-NO, возникших в растворах Б-ДНКЖ-GSH с более высоким содержанием глутатиона (рис. 4, кривая 3). Очевидно, именно последнее, в соответствии с высказанным выше предположением, обеспечивало превращение подавляющей катионов нитрозония не в GS-NO, а в NO так, как это могло иметь в наших ранних опытах [8, 13], о которых говорилось выше. При этом следует отметить небольшой сдвиг (на несколько нм) центра поглощения основной полосы GS-NO на рис. 4 с 334 нм в коротковолновую область. Этот сдвиг был

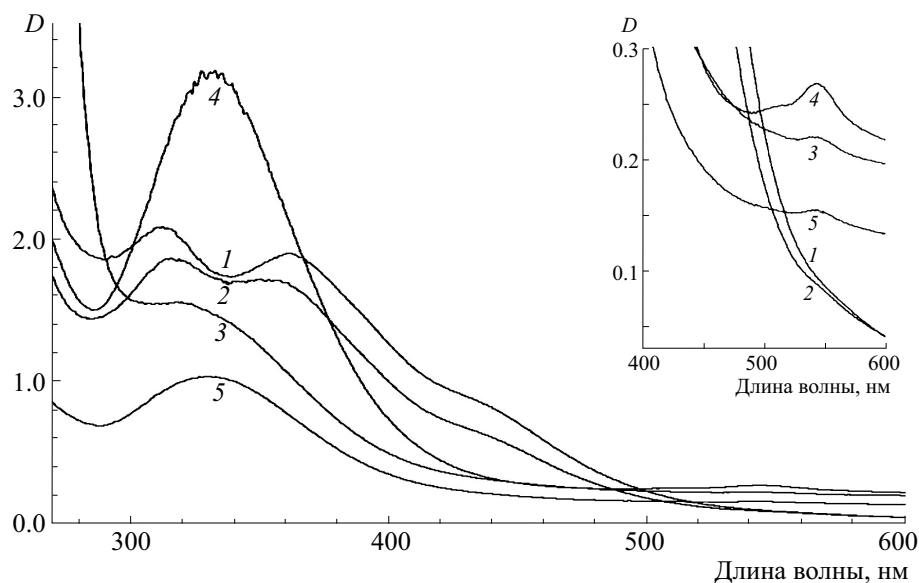


Рис. 4. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношениях концентраций глутатиона и ферросульфата (нитрита), равных 2 : 1 (20 мМ и 10 мМ, кривая 1) или 1,5 : 1 (15 мМ и 10 мМ, кривая 2). Растворы разбавлены в десять раз. Кривые 3 и 4 – характерные для GS-NO спектры поглощения растворов тех же комплексов, подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение восьми-девяти минут без разбавления растворов. Спектры характеризуются слегка сдвинутой в коротковолновую область полосой поглощения на 334 нм и слабой полосой на 543 нм. Кривая 5 – спектр поглощения раствора, характеризующегося кривой 4, после разбавления этого раствора в четыре раза. На врезке приведены спектры поглощения всех этих растворов, зарегистрированные при более высокой чувствительности спектрометра в области полосы поглощения GS-NO на 543 нм.

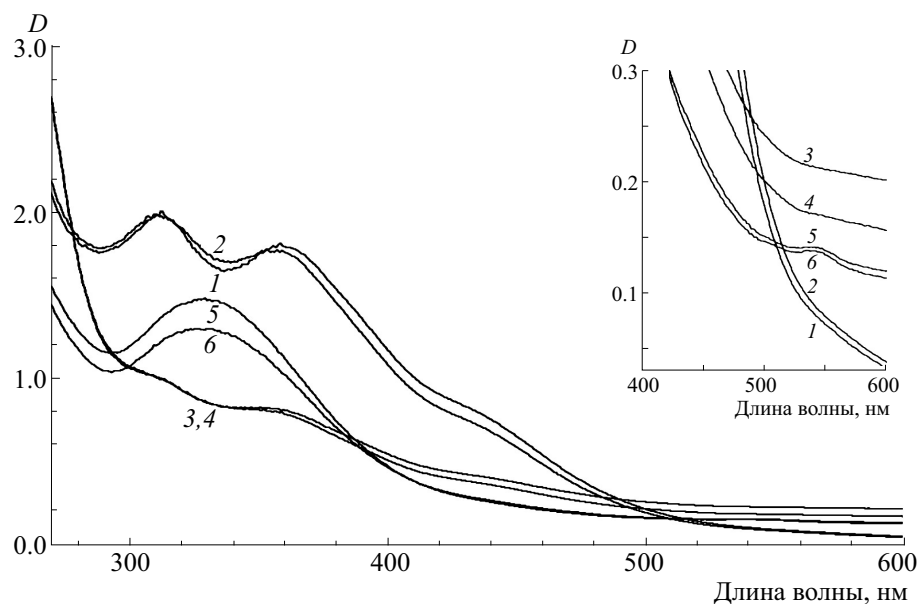


Рис. 5. Спектры поглощения растворов Б-ДНКЖ-NAC, синтезированных при соотношениях концентраций NAC и ферросульфата, равных 3 : 1 (30 мМ и 10 мМ, кривая 1) или 1,5 : 1 (15 мМ и 10 мМ, кривая 2). Растворы разбавлены в десять раз. Кривые 3, 4 и 5, 6 – соответственно спектры поглощения растворов тех же комплексов, разбавленных в два раза и подвергнутых нагреванию при 80°C в анаэробных условиях в течение семи-девяти или двух-трех минут. Спектры 5 и 6 с полосами поглощения на 334 и 543 нм обусловлены образующимся S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеином. На врезке приведены спектры поглощения всех этих растворов, зарегистрированные при более высокой чувствительности спектрометра в области полосы поглощения S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина на 543 нм.

обусловлен оптическим поглощением ионов Fe^{3+} , сохранявшихся в растворе после синтеза комплексов.

Такой же результат был получен в аналогичных опытах на растворах Б-ДНКЖ-НАС, синтезированных при соотношениях концентраций НАС : ферросульфат : нитрит натрия, равных соответственно 30 : 10 : 10 мМ и 15 : 10 : 10 мМ (рис. 5). В этих опытах прогрев раствора Б-ДНКЖ-НАС-комплексов, синтезированных при трехкратном избытке глутатиона по сравнению с концентрацией ферросульфата, приводил к восстановлению до NO всех катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-НАС при прогреве их подкисленных растворов в анаэробных условиях. Об этом свидетельствует отсутствие даже следовых количеств S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина в спектрах поглощения раствора, представленных кривыми 3 и 4.

Что касается количества S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина, образовавшегося при распаде Б-ДНКЖ-НАС, синтезированных при соотношении НАС : ферросульфат (нитрит), равным 1.5 : 1, оно составляло не более 30% от общего количества нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ-НАС. Не исключено, что образование S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина при распаде этих комплексов в анаэробных условиях частично подавлялось восстановительным действием НАС на катионы нитрозония даже при сравнительно малом содержании этого тиолсодержащего соединения. Как следует из вышеизложенного, такой эффект не обнаруживался при распаде аналогичных комплексов Б-ДНКЖ-GSH, сопровождаемом включением в GS-NO половины нитрозильных лигандов в этих комплексах. Не исключено, что это различие было обусловлено более высокой восстановительной активностью НАС по сравнению с аналогичной характеристикой глутатиона.

При прогреве подкисленных 0.5 мМ растворов всех этих комплексов при 80°C на воздухе не обнаруживалось какого-либо различия в их поведении. Все они, судя по исчезновению окраски, распадались в течение 0.5–1.0 минуты с образованием соответствующих S-нитрозотиолов в концентрации, соответствующей включению в них половины нитрозильных лигандов (или равной концентрации комплексов, рассчитанной на один атом железа), как это было описано ранее в работах [8, 13].

Что касается возможного влияния примеси меди как агента, разрушающего S-нитрозотиолы и тем самым возможно блокировавшего появление GS-NO при распаде Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях, о чем было предположено в работах [8, 13], эксперименты с добавлением в разных концентрациях сильного хелатора

ионов меди — неocupроина [41], проведенные в настоящей работе, показали, что связывание примесной меди этим хелатором не влияло на появление соответствующих S-нитрозотиолов в растворах Б-ДНКЖ при их распаде.

Таким образом, есть основание полагать, что обнаруженное ранее в работах [8, 13] высвобождение нитрозильных лигандов из Б-ДНКЖ-GSH в подкисленных растворах, прогревавшихся при 80°C в анаэробных условиях, только в форме нейтральных молекул NO было обусловлено восстановительным действием глутатиона на высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония. Этот эффект мог сниматься в результате окисления избытка глутатиона в растворах Б-ДНКЖ-GSH кислородом при выдерживании этих растворов, что, по-видимому, имело место в наших экспериментах, описанных в работах [8, 13].

В связи с этим не исключено, что упоминавшееся выше образование S-нитрозотиолов при прогреве подкисленных 0.5 мМ растворов Б-ДНКЖ при 80°C на воздухе вне зависимости от соотношения тиолов и железа в растворах этих комплексов могло быть обусловлено быстрым окислением избытка тиолов кислородом воздуха в ходе повышения температуры растворов от комнатной температуры до 80°C.

Образование нитрита при распаде Б-ДНКЖ-GSH в анаэробных условиях под действием феррицианида калия. В соответствии с предложенным на схеме 3 с механизмом распада ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, например, в результате блокады тиоловых групп соответствующими реагентами или их окисления, вместо S-нитрозотиолов в растворах Б-ДНКЖ должны были при нейтральных значениях pH накапливаться анионы нитрита, причем в количестве, равном в молярном выражении количеству высвобождающихся из Б-ДНКЖ нейтральных молекул NO. Такого рода опыты с окислением тиоловых групп в Б-ДНКЖ-GSH на воздухе показали, что действительно нитрит, появляющийся в растворе, в соответствии со схемой 3 включал в себя ровно половину нитрозильных лигандов, входивших в состав Б-ДНКЖ [8, 13]. Однако в экспериментах с блокадой тиоловых групп в этих комплексах параклормеркурийбензоатом в анаэробных условиях нитрит не обнаруживался, а оптическим методом регистрировался только газообразный NO в количестве, соответствующем включению в NO 75–80% нитрозильных лигандов Б-ДНКЖ [8, 13]. Было предположено, что нитрит в этих опытах возникал, однако подкисление растворов Б-ДНКЖ в ходе их распада приводило к его превращению в азотистую кислоту, реакция диспропорционирования которой приводила к накоплению в газовой фазе дополнительного количества NO

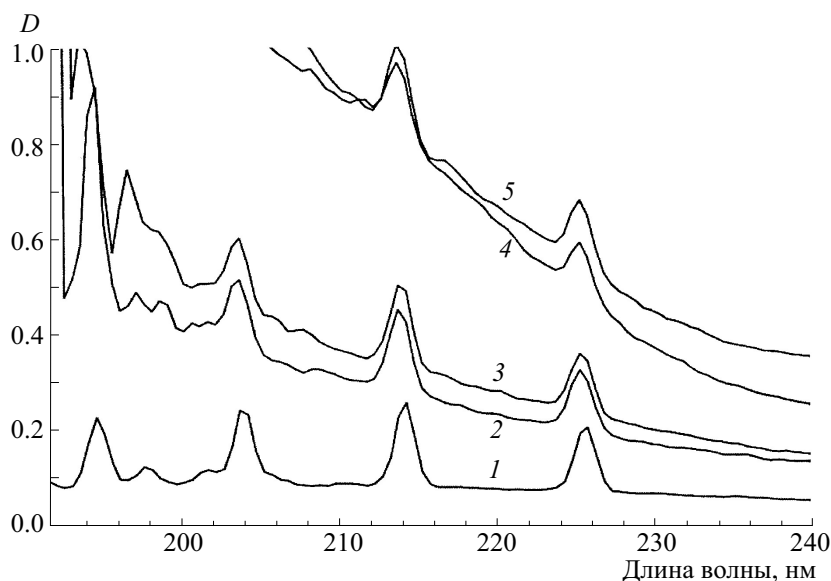


Рис. 6. Изменение оптического спектра NO в газовой фазе, зарегистрированного в модифицированном аппарате Тунберга, схема которого приведена на рис. 3б, в ходе распада 16 мл 8 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH в 200 мМ HEPES-буфере при pH 7.4, вызванного добавлением к раствору феррицианида калия (FeCN) в конечной концентрации 80 мМ с последующим подкислением раствора. Кривая 1 — спектр поглощения стандартного образца газообразного NO (125 микромолей в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга. Кривые 2 и 3 — четыре эквидистантные полосы поглощения NO, зарегистрированные через 15 и 20 мин после добавления FeCN к раствору Б-ДНКЖ-GSH при pH 7.4, нагретому до 60°C, в откачанном аппарате Тунберга. Кривые 4 и 5 — первые две (из четырех) эквидистантных полосы поглощения NO, зарегистрированные в повторно откачанном аппарате Тунберга через 15 и 20 мин после подкисления раствора серной кислотой. Дрейф нулевой линии в спектрах обусловлен загрязнением торцевых стенок цилиндрической кюветы аппарата Тунберга частицами берлинской лазури, образующейся в реакции FeCN с двухвалентным железом, высвобождающимся из Б-ДНКЖ.

(наряду с выделяющимся из распадающихся Б-ДНКЖ).

В связи с этим необходимо было показать, что распад Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в анаэробных условиях, вызванный удалением этих лигандов из координационной сферы железа, действительно при нейтральных значениях pH приводит к накоплению в растворе анионов нитрита, образующихся в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ. Такого рода результат был получен в настоящей работе при изучении распада Б-ДНКЖ-GSH, вызванного в анаэробных условиях окислением тиоловой группы в глутатионе феррицианидом калия (FeCN) (рис. 6). 16 мл 8 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH в 200 мМ HEPES-буфере при pH 7.4 помещали в модифицированный аппарат Тунберга (рис. 3б) с последующей откачкой воздуха из этого аппарата. Предполагалось, что высокая концентрация буфера в этом растворе должна была обеспечить сохранение нейтрального значения pH, которое могло снижаться в результате гидролиза катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ.

Сразу же после добавления FeCN (80 мМ) к раствору Б-ДНКЖ-GSH при 60°C в анаэробных условиях начиналось бурное выделение из рас-

творе газообразного NO, уровень которого в аппарате оценивали по его спектру поглощения, регистрируемому в цилиндрической кювете, присоединенной к аппарату. Через 20 мин этот уровень достигал плато, соответствующего высвобождению в форме NO половины нитрозильных лигандов, что было равно количеству Б-ДНКЖ-GSH в пересчете на один атом железа в этих комплексах — 128 микромолей в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга, равного свободному объему этого аппарата после введения в него 16 мл раствора Б-ДНКЖ-GSH.

После этого газообразный NO, высвободившийся из Б-ДНКЖ, откачивали вакуумным насосом, затем в верхнюю часть аппарата после его открытия на воздухе вводили несколько капель концентрированной серной кислоты, которая смешивалась с оставшимся в нижней части аппарата раствором после откачки воздуха из аппарата. Предполагалось, что нитрит, который образовался в результате гидролиза катионов нитрозония, высвободившегося из Б-ДНКЖ в количестве, равном (в соответствии со схемой 3) половине нитрозильных лигандов в исходных Б-ДНКЖ-GSH, должен был после превращения нитрита в азотистую кислоту перейти в форме NO в газовую фазу и обеспечить появление соответ-

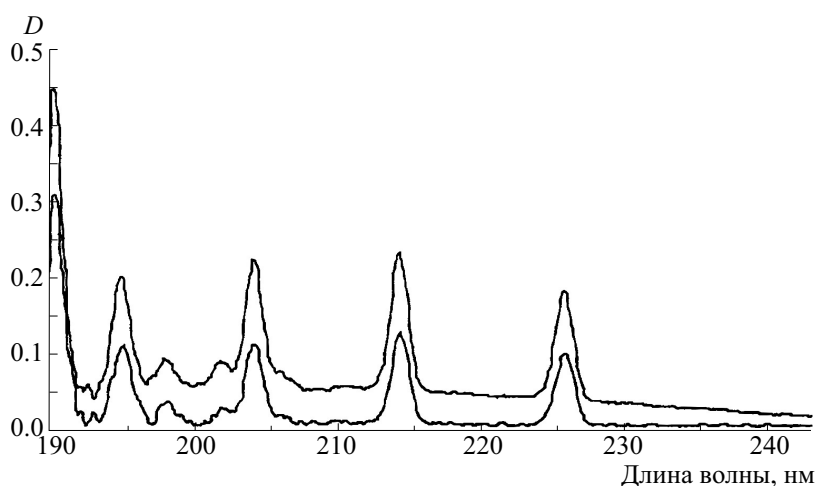


Рис. 7. Верхняя кривая — спектр поглощения газообразного NO, высвободившегося из 15 мл 10 мМ раствора нитрита в течение 1 ч при 60°C после его подкисления до pH 2.0. Нижняя кривая — спектр поглощения стандартного образца газообразного NO (75 микромолей NO в 100 мл свободного объема аппарата Тунберга).

ствующих полос поглощения. Действительно, удалось зарегистрировать две первые длинноволновые полосы, интенсивность которых через 20 мин после подкисления раствора достигала плато. Зарегистрировать остальные две коротковолновые полосы поглощения NO было невозможно из-за сдвига нулевой линии вследствие загрязнения торцевых стенок цилиндрической кюветы аппарата Тунберга попадавшими на них частицами берлинской лазури, образующейся в реакции FeCN с высвобождавшимся из Б-ДНКЖ двухвалентным железом.

Количество NO, перешедшего из подкисленного нитрита в газовую фазу, оказалось равным ~90 микромолей на 100 мл свободного объема аппарата Тунберга, что соответствовало превращению в NO 70% нитрита, предположительно образовавшегося при распаде Б-ДНКЖ-GSH, вызванном FeCN. Эксперименты, поставленные с целью проверки эффективности превращения нитрита в NO в кислой среде, результаты которых приводятся на рис. 7, показали, что действительно примерно 70% нитрита превращаются в этих условиях в NO. Из 15 мл 10 мМ раствора нитрита натрия, т.е. из 150 микромолей нитрита, в анаэробных условиях при pH 2.0 высвобождалось примерно 100 микромолей NO — ~70% от 150 микромолей.

Эту величину легко получить из следующих расчетов. Протонизация 150 микромолей нитрита приводит к его превращению в 150 микромолей азотистой кислоты, которая в результате реакции диспропорционирования (реакция 3, представленная во введении) дает по 75 микромолей NO и NO₂. Далее пары молекул NO₂ в ходе гидролиза превращаются в равном количестве (37.5 микромолей) в молекулы азотистой и азотной кислот.

Затем из 37.5 микромолей азотистой кислоты снова образуются по ~18 микромолей NO и NO₂, и далее процесс повторяется по описанному выше пути, так что в его конце в газовой фазе должно накапливаться ~100 микромолей NO, или ~70% от исходного количества нитрита.

Таким образом результаты и этих экспериментов находятся в полном соответствии с механизмом распада Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, приведенным на схеме 3. Они показывают, что действительно в ходе этого процесса из этих комплексов могут высвобождаться катионы нитрозония в количестве, равном половине нитрозильных лигандов в этих комплексах или их концентрации в пересчете на один атом железа в этих комплексах. Сохранение этих катионов в условиях устранения тиолсодержащих лигандов (в результате окисления) показывает, что ионы Fe²⁺ сами по себе без участия тиолов не способны были восстанавливать катионы нитрозония.

Двухвалентное железо катализирует в анаэробных условиях превращение молекул NO в анионы нитрита. Вывод, сделанный в предыдущем разделе, подтверждается результатами исследований распада М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы со спином $S = 1/2$, существование которых было продемонстрировано еще в 1960-е годы уже в первом ЭПР-исследовании низкоспиновых М-ДНКЖ с различными анионными лигандами [42]. Последующие исследования, проведенные в 1980-е годы нашей группой, показали, что наряду с указанными низкоспиновыми М-ДНКЖ, характеризующимися сравнительно узкими сигналами ЭПР со значениями g -фактора в диапазоне 2.05–2.014 ($g_{\text{ср}} = 2.03$), в тех же растворах, исходно содержащих ионы Fe²⁺ и лиганды нетиоловой

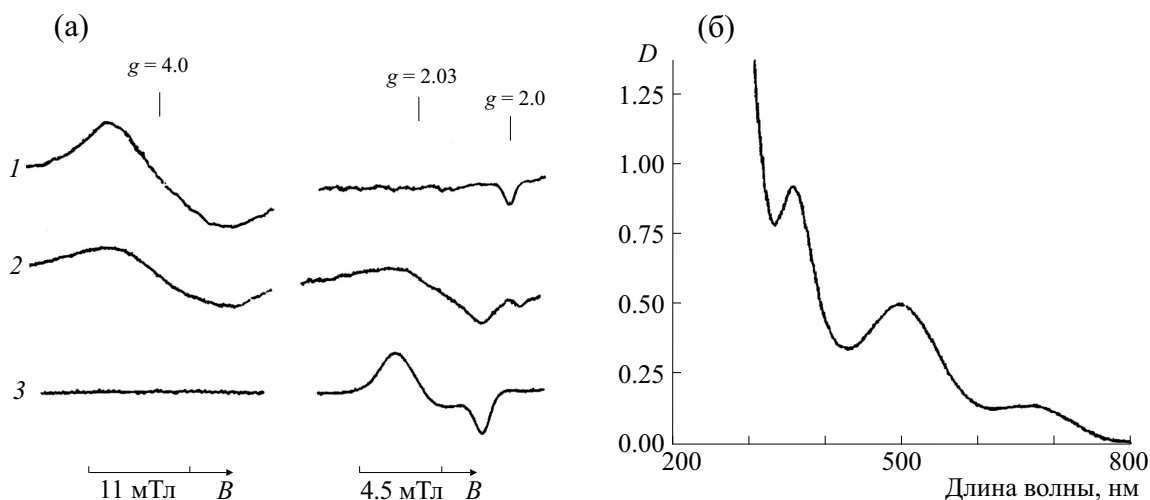


Рис. 8. (а) — Спектры ЭПР нитрозильных комплексов железа с ЭДТА (спектр 1), водой (спектр 2) и НАС (спектр 3), зарегистрированные при 77 К; (б) — спектры оптического поглощения, характерные для нитрозильных комплексов железа с ЭДТА или водой.

природы, такие как фосфат, цитрат или аскорбат, при их обработке газообразным NO возникают также высокоспиновые ($S = 3/2$) моонитрозильные комплексы железа (МНКЖ), характеризующиеся сравнительно широким сигналом ЭПР со значениями g -фактора в диапазоне 4.0–2.0 [43–45]. Такая же смесь низкоспиновых и высокоспиновых нитрозильных комплексов железа (соответственно ДНКЖ и МНКЖ) возникала при обработке оксидом азота чисто водных растворов Fe^{2+} , так что в этих комплексах в качестве лигандов выступали молекулы воды [43–45]

В настоящей работе были синтезированы нитрозильные комплексы железа с ЭДТА, водой и (для сравнения) с НАС, спектры ЭПР которых представлены на рис. 8а. На рис. 8б приведены спектры оптического поглощения, характерные для МНКЖ с лигандами нетиоловой природы, в нашем случае — для МНКЖ с ЭДТА или молекулами воды.

Синтез обоих типов нитрозильных комплексов железа — высокоспиновых МНКЖ и низкоспиновых ДНКЖ — проводили следующим образом. В нижнюю часть аппарата Тунберга, приведенного на рис. 3а, вводили в 4 мл воды ЭДТА (100 мМ) + НЕРЕС-буфер (30 мМ), только НЕРЕС-буфер (30 мМ) или 50 мМ НАС + НЕРЕС-буфер (30 мМ) — все при нейтральных значениях pH, а в верхнюю часть аппарата — 1 мл дистиллированной воды при pH 5.0–5.5. После откачки воздуха в верхнюю часть аппарата вводили сухой порошок $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, так что его концентрация при последующем смешивании растворов в нижней и верхней частях аппарата составляла 20 мМ. После вторичной откачки воздуха в аппарат вводили газообразный NO и после пятиминутного

встряхивания аппарата, когда раствор железа в дистиллированной воде приобретал зеленую окраску, смешивали его с раствором в нижней части аппарата и после последующего пятиминутного встряхивания в присутствии NO аппарат откачивали с последующим быстрым замораживанием в жидком азоте полученного раствора в ампуле для ЭПР-исследований диаметром 4 мм.

В полном соответствии с результатами нашей предыдущей работы [43] в растворах Fe^{2+} с НЕРЕС-буфером были зарегистрированы сигналы ЭПР высокоспиновых МНКЖ и низкоспиновых ДНКЖ с молекулами воды в качестве лигандов (рис. 8а, спектр 2), тогда как растворах Fe^{2+} с ЭДТА или с НАС — сигналы ЭПР соответственно только высокоспиновых МНКЖ с ЭДТА, характеризующиеся значениями $g_{\perp} = 4.0$ и $g_{\parallel} = 2.0$, или низкоспиновых М-ДНКЖ с НАС, характеризующиеся значениями $g_{\perp} = 2.04$, $g_{\parallel} = 2.014$ ($g_{\text{ср}} = 2.03$) (рис. 8а, спектры 1 и 3).

Следует отметить, что использование раствора Fe^{2+} в дистиллированной воде было обязательным для синтеза указанных комплексов, поскольку только в дистиллированной воде при pH 5.0–5.5 можно было полностью растворить соль двухвалентного железа. После контакта с NO ионы Fe^{2+} , связавшиеся с NO, могли включаться в водный раствор в нижней части аппарата, содержащий при нейтральных значениях pH ЭДТА, НЕРЕС или НАС с образованием соответствующих МНКЖ с ЭДТА или молекулами воды и М-ДНКЖ с водой или НАС.

В отличие от ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как МНКЖ, так и М-ДНКЖ с молекулами воды в качестве лигандов сохранялись в вод-

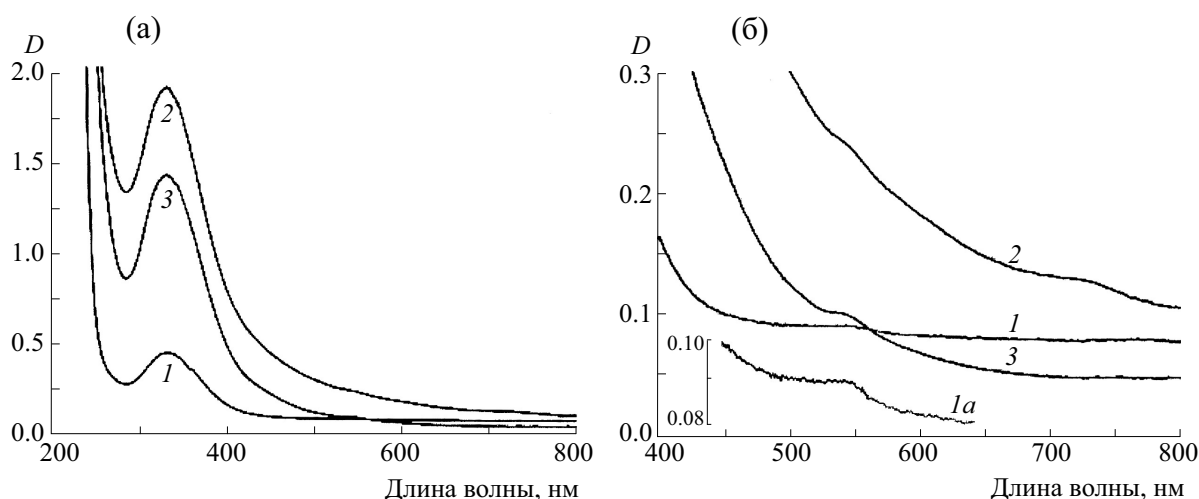


Рис. 9. Образование GS-NO как индикатора превращения оксида азота (NO) в анионы нитрита, появившегося при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды. М-ДНКЖ были синтезированы путем обработки водных 30 мМ растворов HEPES газообразным NO в присутствии 20 мМ ионов Fe^{2+} (кривые 2 и 3). Кривая 1 получена при такой же обработке растворов HEPES, но без добавления к ним ионов Fe^{2+} . Приводятся зарегистрированная в указанных растворах полоса оптического поглощения GS-NO на 334 нм (а) и зарегистрированная при большей чувствительности спектрометра полоса на 543 нм (б). На врезке (кривая 1а) — увеличенный фрагмент кривой 1.

ных растворах при нейтральных значениях pH только в присутствии газообразного NO. При откачке последнего через 10–20 мин эти комплексы полностью распадались, при этом высвобождавшиеся из них ионы Fe^{2+} выпадали из раствора в форме нерастворимых в воде гидроокисных комплексов, резко повышавших мутность раствора. Последнее устранялось подкислением получившихся суспензий до pH 1–2. Если после этого в полученные таким образом растворы сразу после их подкисления вводили тиолы, например глутатион в концентрации 50 мМ, в спектре оптического поглощения растворов появлялись полосы на 334 и 543 нм, характерные для GS-NO (рис. 9). Характерно, что при этом по мере растворения гидроокисных осадков железа из-за ослабления интенсивности светорассеяния растворов базовая линия снижалась практически до нуля (рис. 9, кривые 2 и 3).

Появление полос поглощения GS-NO, очевидно, было обусловлено S-нитрозированием глутатиона молекулами азотистой кислоты, образующейся при подкислении нитрита, который в соответствии со схемой 3 должен был возникать при распаде М-ДНКЖ с молекулами воды, как лигандами нетиоловой природы. Что касается возможности S-нитрозирования глутатиона высокоспиновыми МНКЖ с молекулами воды, одна из резонансных структур которых описывается как Fe^+NO^+ и могла бы выступать в качестве донора катиона нитрозония, такая возможность для указанных комплексов не реализуется. В пользу этого свидетельствует факт отсутствия S-нитрозирующей активности у нитрозильных комплек-

сов железа с ЭДТА. Эти комплексы существуют только в форме высокоспиновых МНКЖ, не образуя (как это следует из рис. 8) их динитрозильных аналогов

Образование GS-NO в водных растворах, обработанных газообразным NO, наблюдалось и в отсутствие экзогенных ионов Fe^{2+} в этих растворах (рис. 9, кривая 1). Этот процесс был обусловлен наличием в газообразном NO примеси NO_2 . Его уровень существенно снижался при очистке NO от примеси NO_2 методом низкотемпературной сублимации в вакуумированном сосуде.

Эксперименты, проведенные на растворах нитрозильных комплексов железа с фосфатом, представленных, как и ДНКЖ с молекулами воды, высокоспиновыми МНКЖ и низкоспиновыми М-ДНКЖ, показали, что распад последних также (в соответствии со схемой 3) сопровождается высвобождением нитрита, образующим GS-NO при подкислении растворов нитрита с последующим добавлением к ним глутатиона (данные не приводятся).

Таким образом, включение молекул NO в М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы в качестве нитрозильных лигандов может обеспечивать превращение половины из них в катионы нитрозония. Высвобождаясь из комплексов, эти катионы превращаются в результате гидролиза при нейтральных значениях pH в анионы нитрита.

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами высвобождать при распаде нейтральные молекулы NO и катионы нитрозония делает возможной их регенерацию по двум путям, приводимым на схеме 6 — в реакции Fe^{2+} , газообразного NO и тиолов (реакции 1) и реакции Fe^{2+} , S-нитрозотиолов (RS-NO) и тиолов (реакции 2). Эти реакции, в соответствии с их механизмами, указанными на схемах 2 и 4, необратимы из-за превращения NO и тиолов соответственно в закись азота и дисульфиды. Это превращение можно рассматривать в качестве «сгорания» основных «топливных компонентов системы», показанной на схеме 6 — NO и тиолов, обеспечивающих при

воспроизводстве этих агентов существование указанной системы как самоподдерживающейся, саморегулирующейся системы реакций 1 и 2, реакций химического равновесия, устанавливающихся между М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ, а также между ними и составляющими их компонентами. Так, в зависимости от соотношения уровней NO и RS-NO в этой системе может попеременно доминировать либо реакция 1, либо реакция 2. По мере расходования NO в реакции 1 и накопления RS-NO синтез М-ДНКЖ начинает протекать по реакции 2 и, наоборот, по мере расходования RS-NO и накопления NO снова начинает доминировать реакция 1.

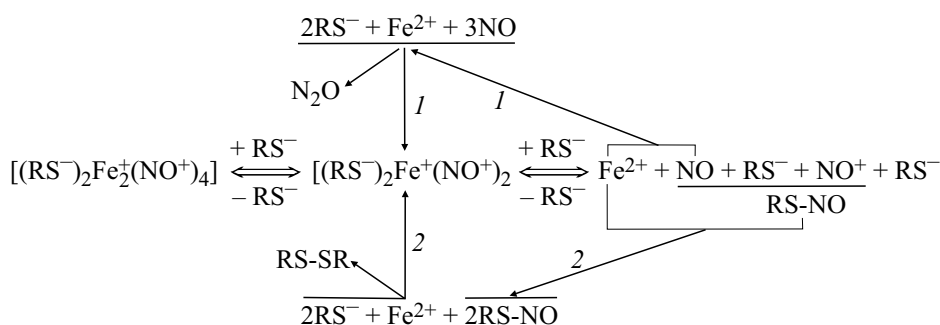


Схема 6. Саморегулирующаяся система реакций химического равновесия, устанавливающихся между М- и Б-ДНКЖ, а также между ними и составляющими их компонентами.

Таким образом, для этой системы не исключается колебательный режим ее существования и более того появление автоволн, о чем свидетельствуют результаты наших исследований, опубликованных в работах [19, 46].

Самоподдерживающийся, саморегулирующийся режим существования системы, приведенной на схеме 6, вполне возможен в живых организмах, в которых может поддерживаться на стационарном уровне концентрация «топливных» компонентов указанной системы — NO и тиолов. В отсутствие такого воспроизводства эта система перестает функционировать, но может снова начать работать при возобновлении ее снабжения NO или тиолами, причем этот процесс может развиваться по следующим сценариям. При блокаде поставки NO указанная система должна сразу же останавливаться, и ее последующая реконструкция, а именно возобновление в ней соответствующих реакций, может начаться сразу после начала снабжения системы газообразным NO. При замедлении снабжения системы тиолами, вызванном, например, их окислением или блокадой тиоловыми реагентами, катионы нитрозония должны вместо реакции S-нитрозирования включаться в реакцию гидролиза, приводящую к превращению катионов нитрозония при ней-

тральных значениях pH в нитрит-анионы — конечный продукт распада рассматриваемой системы, что и наблюдалось в эксперименте (рис. 6). При нейтральных значениях pH этот процесс был необратимым, поскольку при этих pH нитрит сам по себе не мог инициировать образования ДНКЖ. В этом случае рассматриваемую систему можно было реконструировать только при добавлении в нее тиолов с последующим их превращением в S-нитрозотиолы в реакции с нитритом в кислой среде. Последующее повышение pH до нейтральных значений в присутствии ионов Fe^{2+} должно было (по реакции 2 на схеме 6) обеспечить образование М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ.

Как показали наши предыдущие исследования [8, 13] и исследования, изложенные в настоящей работе, распад химической системы, приведенной на схеме 6, можно было инициировать протонированием тиолсодержащих лигандов в Б-ДНКЖ, обеспечивающим разрыв связи между ионами железа и атомами тиоловой серы в этих комплексах. Этот процесс усиливался при подогреве их кислотных растворов. Высвобождающиеся при этом протонированные тиолы могли связываться с катионами нитрозония и образовывать с ними S-нитрозотиолы, что наблюдалось

как в прошлых исследованиях [8, 13], так и в настоящей работе (рис. 5 и 6). Вместе с тем, как показал эксперимент, протонированные тиолы были не способны связываться с ионами Fe^{2+} и тем самым обеспечивать при участии S-нитрозотиолов образование в кислой среде соответствующих ДНКЖ. Это и приводило к обнаруживаемому накоплению в этой среде S-нитрозотиолов в количестве, равном половине нитрозильных лигандов, имевшихся в исходных Б-ДНКЖ.

Предложенный механизм образования М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами основывается на предположении о возможности реакции диспропорционирования молекул NO при их связывании с ионами Fe^{2+} (схемы 1 и 2). Такая возможность обсуждается и другими авторами [47–49], но в отличие от механизма, описанного в данной работе, они объясняют, исходя этого предположения, образование при распаде ДНКЖ только диоксида и закиси азота (NO_2 и N_2O) как результата гидролиза образующихся при диспропорционировании двух молекул NO — катиона нитрозония и аниона нитроксила. Что касается направления наших исследований, они касаются изучения возможности образования в ходе этих процессов S-нитрозотиолов, т.е. реакции, способной успешно конкурировать с реакцией гидролиза катионов нитрозония. В этом отношении основной результат настоящей работы состоит в том, что образование S-нитрозотиолов при распаде М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может существенно затрудняться из-за восстановления катионов нитрозония тиолами при посредстве ионов железа как катализаторов этого процесса.

Следует отметить, что предположение о роли реакции диспропорционирования молекул NO в процессе образования ДНКЖ восходит (в соответствии с информацией, приводимой в работах [50, 51]) еще к пионерским работам Джозефа Пристли — великого английского ученого, открывшего в XVIII веке не только азот, но и монооксид азота, а также реакцию последнего с железом, приводящей как к образованию железонитрозильных комплексов, так и к реализации реакции диспропорционирования молекул NO до закиси и диоксида азота.

В последнее время был предложен другой механизм образования М и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в водных растворах в ходе реакции ионов Fe^{2+} , тиолов и газообразного NO [52, 53]. Авторы этих работ полагают, что парамагнетизм возникающих при этом М-ДНКЖ на первой стадии их образования обеспечивается одноэлектронным восстановлением мононитрозильной ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO} \leftrightarrow \text{Fe}^+\text{-NO}^+$) группы одним из тиолсодержащих соединений, участвующих в об-

разовании указанных комплексов. В результате электронная конфигурация железа в этой группе переходит из d^7 - в d^8 -конфигурацию, а при последующем связывании с железом второй молекулы NO и тиолсодержащей молекулы, приводящем к окончательному образованию М-ДНКЖ, железодинитрозильная группа в этих комплексах начинает характеризоваться d^9 -электронной конфигурацией железа или, как представлено в работе [54], структурой $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$. В качестве экспериментального факта, подтверждающего вышеизложенное предположение о механизме образования парамагнитных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, авторы работы [53] указывают на обнаруженное ими появление в растворе синтезируемых комплексов тиольного радикала ($\text{RS}^\cdot$), образующегося в результате одноэлектронного окисления тиола железомононитрозильной (Fe-NO) группой.

Вывод о локализации на d -орбиталях железодинитрозильной группы в М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами девяти электронов находится в полном соответствии с представлениями многих исследователей этих комплексов, основанными на результатах рентгеноструктурных кристаллографических исследований М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [55–60]. Поскольку, согласно этим исследованиям, железодинитрозильная группа, включая атомы тиоловой серы, характеризуется в кристаллическом состоянии тетраэдрической пространственной структурой, то парамагнетизм монойдерной формы ДНКЖ с $S = \frac{1}{2}$ может обеспечиваться локализацией на верхних t_{2g} (d_{xz} , d_{yz} и d_{xy}) орбиталях пяти электронов (девять электронов суммарно на всех d -орбиталях). При этом предполагается, что при растворении ДНКЖ указанная тетраэдрическая пространственная структура этих комплексов и соответствующая ей электронная структура полностью сохраняется, что полностью согласуется с выводами авторов работы [53] о d^9 -электронной конфигурации железа в ДНКЖ, синтезируемых в растворе.

Таким образом в настоящее время существуют два взаимоисключающих представления об электронной структуре ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, характеризующейся либо d^9 -, либо d^7 -электронной конфигурацией железа в железодинитрозильных фрагментах этих комплексов. Вопрос о справедливости какого-либо из этих представлений остается открытым. Единственное, что позволяет, по мнению автора настоящей работы, отдать предпочтение d^7 -конфигурации — это то, что в ее рамках легко объяснить на основе схемы 3 способность М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ выступать в качестве доноров не только нейтраль-

ных, газовых молекул NO, но и катионов нитро-
зония, превращающихся либо в S-нитрозотиолы,
либо в анионы нитрита.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность В.Д. Микояну
за регистрацию спектров ЭПР (рис. 8), Р.Р. Боро-
дулину — за регистрацию спектров оптического
поглощения (рис. 6 и 7) и Н.А. Ткачеву — за ком-
пьютерную обработку рис. 4, 5 и 9.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного
задания Российского Федерального Агенства для
научных организаций (00008202014-00016,
№ АААА-А17-117040610310-6, 0082-2014-0008 и
№ АААА-А17-1170403100008-5, спонсирована
Российским академическим проектом «5-100», а
также финансирована в рамках гранта Россий-
ского фонда фундаментальных исследований
№ 18-04-00059а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта инте-
ресов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания ка-
ких-либо исследований с использованием людей
и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide Biology and Pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. N. Hogg, *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1478 (2000).
3. B. M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, et al., *Mol. Inter-
vention* **3**, 253 (2003).
4. D. Seth, D. T. Hess, A. Hausladen, et al., *Mol. Cell* **89**,
451 (2018).
5. D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshir, et al., *Chem.
Res. Toxicol.* **7**, 525 (1994).
6. V. G. Khatitonov, A. R. Sandquist, and V. S. Sharma, *J.
Biol. Chem.* **270**, 28158 (1995).
7. N. S. Bryan, T. Rassaf, R. E. Maloney, et al., *Proc.
Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 438 (2004).
8. A. F. Vanin, Austin J. *Analyt. Pharmac. Chem.* **5** (4),
id1109 (2018).
9. C.A. Bosworth, J.C. Toledo, J.W. Zmiewski et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 4671 (2009).
10. M. V. Foster, L. Liu, M. Zeng, et al., *Biochem.* **48**, 792
(2009).
11. T. P. Melia, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **27**, 95 (1965).
12. S. F. Agnew, B. I. Spansou, L. H. Jones, et al., *J. Phys.
Chem.* **89**, 1678 (1985).
13. A. F. Vanin, *Cell. Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
14. Q. Liu, K. Yu, P. Yi, et al., *Environment. Sci. Pollution
Res.* **28**, 19540 (2019).
15. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1 (2009).
16. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.* **14**, 818836
(2011).
17. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Ni-
tric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136 (2010).
18. A. F. Vanin, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15 (2018).
19. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working
Form" of Nitric Oxide in Living Organisms*, (Cambridge
Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
20. Р. М. Налбандян, А. Ф. Ванин и Л. А. Блюмен-
фельд, в сб. *Тезисы конференции «Свободноради-
кальные процессы в биологических системах»* (1964),
с. 18.
21. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика* **10**, 167
(1965).
22. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвери-
ков, *Биофизика* **12**, 829 (1967).
23. J. R. Mallard and M. Kent, *Nature* **204**, 1192 (1964).
24. A. J. Vithaythil, B. Ternberg, and B. Commoner, *Na-
ture* **207**, 1246 (1965).
25. J. R. Lancaster and J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci.
USA* **87**, 1223 (1990).
26. C. Pellat, Y. Henry, and J.-C. Drapier, *Biochim. Bio-
phys. Res. Comm.* **166**, 119 (1990).
27. J.-C. Drapier, C. Pellat, and Y. Henry, *J. Biol. Chem.*
266, 10162 (1991).
28. M. Lepoivre, J.-M. Flavan, and Y. Henry, *J. Biol.
Chem.* **267**, 22294 (1992).
29. A. F. Vanin, P. I. Mordvintsev, S. Hauschildt, et al.,
Biochem. Biophys. Acta **1177**, 37 (1993).
30. J. Stadler, H. A. Bergonia, M. DiSilvio, et al., *Arch.
Biochim. Biophys.* **302**, 4 (1993).
31. A. K. Nussler, D. A. Geller, M. A. Sweetland, et al.,
Biochim. Biophys. Res. Comm. **194**, 826 (1993).
32. Y.-L. Geng, A.-D. Petersson, A. Wennmalm, et al.,
Exp. Cell Res. **214**, 418 (1994).
33. N. R. Bastian, C.-Y. Yim, J. B. Hibbs, et al., *J. Biol.
Chem.* **269**, 5127 (1994).
34. K. Odoi, T. Akaike, H. Horie, et al., *Cancer* **77**, 1598
(1996).
35. B. Muller, A. Kleschyov, and J.-C. Stoclet, *Br. J. Phar-
macol.* **119**, 1281 (1996).
36. R. N. Watts, C. Hawkins, P. Ponka, et al., *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA* **103**, 7670 (2006).

37. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 1991 (1997).
38. R. R. Borodulin, L.N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **29**, 4 (2013).
39. A. F. Vanin, R. R. Borodulin, and V. D. Mikoyan, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **66**, 1 (2017).
40. J. Lique and D. R. Grosley, *J. Chem. Phys.* **111**, 7405 (1999).
41. A. P. Dicks, P. Herves Beloso, D. Lyn, and H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1429 (1997).
42. C. C. MacDonald, W. D. Philips, and H. F. Mower, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3319 (1965).
43. A. F. Vanin and D. I. Aliev, *Studia Biophysica* **93**, 63 (1983).
44. A. Wanat, T. Schnepfensieper, G. Stochel, et al., *Inorg. Chem.* **41**, 4 (2002).
45. A. In-lam, M. Wolf, C. Wilfer, et al., *Chem. Eur.* **25**, 1304 (2019).
46. A. F. Vanin, V. D. Mikoyan, N. M. Rubtsov, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 175 (2010).
47. P. C. Ford and I. M. Lorcovic, *Chem. Rev.* **102**, 993 (2002).
48. S. Stojanovic, D. Stanic, M. Nicolic, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **11**, 256 (2004).
49. C. K. Brozek, J. T. Miller, S. A. Stoian, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7495 (2015).
50. E. W. Ainscough and A. M. Brodie, *J. Chem. Educ.* **72**, 686 (1995).
51. D. Michael and P. Mingos, *Struct. Bond.* **153**, 1 (2014).
52. J. C. M. Pereira, A. V. Iretskii, R.-M. Han, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 328 (2015).
53. D. R. Truzzi, O. Augusto, P. C. Ford, *Chem. Comm.* **55**, 9156 (2019).
54. J. H. Enemark and R. D. Feltham, *Coordination Chem. Rev.* **13**, 339 (1974).
55. T. C. Harrop, Z. J. Tonzetch, E. Reisner, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15602 (2008).
56. A. F. Shestakov, Yu. M. Shul'ga, N. S. Emel'yanova, et al., *Rus. Chem. Bull.* **56**, 1289 (2009).
57. R. Polukkody and M. Y. Darensbourg, *Acc. Chem. Res.* **48**, 2049 (2015).
58. J. Fitzpatrick and E. Kim, *Acc. Chem. Res.* **48**, 2453 (2015).
59. T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, et al., *Inorg. Chem.* **57**, 12425 (2018).
60. S.-L. Cho, C.-J. Liao, and T.-T. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, 495 (2019).

Free Radical Nature of Nitric Oxide Molecules as a Determinant of Their Transformation into Nitrosonium Cations in Living Systems

A.F. Vanin

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

Institute of Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia

The paper presents novel results that confirm our previous conclusion that the binuclear form of biologically active dinitrosyl iron complexes (B-DNIC) with thiol-containing ligands (glutathione or N-acetyl-L-cysteine) may act as a donor of nitrosonium cations which are responsible for S-nitrosothiol formation during B-DNIC decomposition in acid solutions under aerobic/anaerobic conditions. The presence of nitrosonium cations within the composition of B-DNIC is determined by a disproportionation reaction between free radical NO molecules while binding to Fe²⁺ cations (two molecules for one ion) during B-DNIC synthesis. When thiol-containing ligands are oxidized in DNIC or inhibited by thiol-specific reagents released during decomposition of these DNIC at neutral pH values, nitrosonium cations undergo hydrolysis followed by transformation into nitrite anions. Similar transformation occurs when mononuclear DNIC (M-DNIC) with non-thiol ligands are decomposed at neutral pH values. It was found that S-nitrosothiol formation in the decomposition process of B-DNIC with thiol-containing ligands at acid pH values can be prevented in the presence of free thiol molecules (not present within the composition of B-DNIC) in two-threefold excess with regard to the content of B-DNIC. This inhibition is due to reduction of nitrosonium cations to NO molecules induced by free thiol molecules with participation of iron ions as catalytic agents. Therefore, both forms of DNIC (M- and B-DNIC) which form in living systems can act not only as the donors of nitric oxide recognized now as one of universal regulators of metabolic processes but also as the donors of nitrosonium cations that initiate the S-nitrosation process of low- and high-molecular (protein-bound) thiols.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, NO, S-nitrosothiols, EPR

СВЯЗЬ ХИРАЛЬНЫХ ИЕРАРХИЧЕСКИХ СТРУКТУР БЕЛКОВ С ИХ ФУНКЦИЯМИ

© 2020 г. Е.В. Малышко, О.Е. Багрова, В.А. Твердислов

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

E-mail: katyamalyshko@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2019 г.

После доработки 28.12.2019 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Впервые исследованы особенности распределения вторичных структур и суперспиралей coiled coil с учетом знака хиральности в полипептидных цепях белков, входящих в восемь функциональных классов: белки вирусов, шапероны, оксидоредуктазы, гидролазы, структурные белки, белки экзо- и эндоцитоза и белки транспорта электронов. Выявлены общие для всех исследуемых классов закономерности, а также характерные для каждого класса особенности строения.

Ключевые слова: хиральность, белки, вторичная структура, α -спираль, β -лист, суперспираль.

DOI: 10.31857/S0006302920030023

Выяснение физических принципов формирования уникальных структур биомакромолекул и механизмов их функционирования на протяжении десятилетий остается актуальной проблемой молекулярной биофизики. Фундаментальные вопросы относительно механизмов внутримолекулярного и надмолекулярного структурообразования, работы макромолекул как молекулярных машин остаются в значительной степени невыясненными.

Настоящая работа посвящена выявлению закономерностей в распределении вторичных структур, образующих динамичный каркас белковых молекул. Исследования по выявлению закономерностей и соответствий между «хиральным» строением белка и его функциями могут позволить глубже понять тонкие механизмы конформационных подвижек в глобулах белков при их функционировании, в частности, посредством анализа структуры их полипептидной цепи. В основе данной работы лежит анализ знака хиральности исследуемых структур. А само явление хиральности, как мы считаем, играет одну из ключевых ролей в фолдинге белка, т.е. в сворачивании полипептидной цепи.

Попытки прогнозирования вторичных структур белков по известной первичной структуре проводились еще во второй половине прошлого столетия. В частности, в 1970-х годах П. Чоу и Г. Фасман сумели разработать метод прогнозирования

вторичных структур с точностью в пределах от 50 до 60% [1]. Анализ наличия вторичных структур в белках встречается в значимой работе Н.Г. Есиповой и соавт. [2]. Однако в предыдущих исследованиях не было получено распределение структур по цепи, а только их количественное содержание в белке в целом. Кроме того, не учитывался знак хиральности вторичных структур белков. В работах А.А. Замятина было замечено, что многие молекулы олигопептидов равной длины выполняют одинаковую функцию [3]. Возможно, что для более высоких, нежели первичные, структурных уровней организации белков «хиральные» закономерности их строения будут более явно отражать их функции.

Ранее нами было выдвинуто и обосновано положение относительно закономерной регулярности хиральных соответствий во внутри- и надмолекулярных структурах, а также в сетях биосинтеза и метаболизма. Показано, что система хиральных соответствий молекулярных структур составляет своего рода периодическую таблицу молекулярной биологии. В макромолекулярных системах впервые были выделены как хиральные инварианты знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» ассиметричного атома углерода в sp^3 -гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур [4–7]. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур стартует с лево-

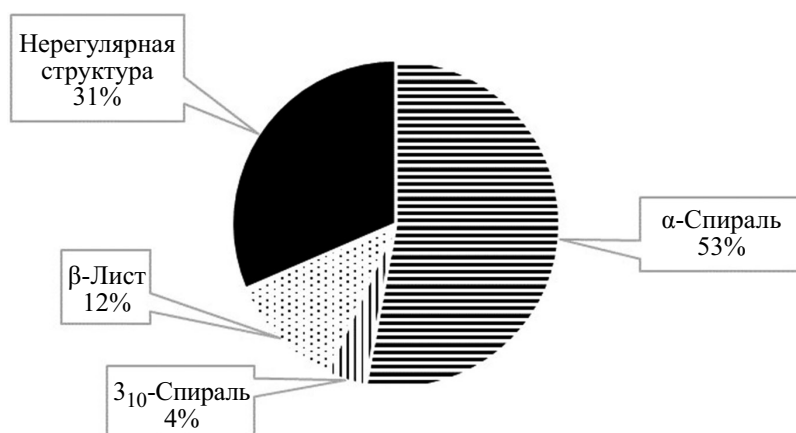


Рис. 1. Количественное содержание вторичных структур в исследованных белках.

го энантиомера: L–D–L–D. Белки, как известно, — линейные полимеры, сложенные из остатков L-аминокислот [8]. Образуя вторичную структуру, полипептидная цепь может укладываться в правую α-спираль или в складчатый β-слой. Встречаются и другие регулярные структуры, но значительно реже. Элемент третичной структуры белков — суперспираль coiled coil — представлен взаимодействующими α-спиралями. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдается внутримолекулярное тесное перекрывание α-спиралей, выявлена однозначная тенденция их свивания в левую суперспираль. Четвертичная структура белков представлена надмолекулярными структурами, сформированными преимущественно при правой укладке левых суперспиралей.

Тот факт, что цепи белка построены из L-аминокислот, не означает полное отсутствие D-аминокислот в биологических системах. L-аминокислоты отбираются транспортной РНК для синтеза первичной цепи белка в рибосомах. В то же время D-аминокислоты, как известно, отвечают за регуляторные — гормональные, морфогенетические и другие — процессы [9].

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ПО ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКОВ

На данном этапе исследования мы проводили анализ распределения вторичных структур в полипептидных цепях. Подборку белков проводили с использованием электронной базы данных Protein Data Bank (PDB) [10]. Структура молекул в электронном ресурсе представлена в виде текстового файла определенного формата (.pdb). Для обработки этих файлов был разработан специальный алгоритм и реализован в виде программы на языке C++.

В настоящей работе были рассмотрены восемь функциональных классов белков в соответствии с классификацией PDB: белки вирусов (всего исследовано 109 белковых цепей, из которых уникальных — 26), шапероны (40 цепей, уникальных — 15), изомеразы (39 цепей, уникальных — 17), оксидоредуктазы (141 цепь, уникальных — 42), гидролазы (90 цепей, уникальных — 41), структурные (29 цепей, уникальных — 22), белки экзо- и эндоцитоза (9 цепей, уникальных — 6) и белки транспорта электронов (8 цепей, уникальных — 5). Таким образом, суммарно проанализированы 174 уникальные белковые структуры, рассмотрено 465 цепей, состоящих из более 145 тысяч аминокислотных остатков.

В результате анализа было выявлено, что 31% аминокислотных остатков не образует регулярные вторичные структуры, 57% остатков входят в спираль, 53% из которых приходится на α-спираль и 4% — на спираль 3₁₀, 12% остатков образуют β-листы. Полученное распределение приведено на рис. 1.

Данный результат можно сравнить со значениями из исследований П. Чоу и Г. Фасмана [1]. Согласно результатам их работы, на α-спирали должно приходиться 38% аминокислотных остатков, 20% — на β-структуры и 42% — на так называемые спонтанные кольца. В работе [11] указано, что от 32 до 38% всех аминокислотных остатков глобулярных белков входят в состав α-спиралей. Заметные расхождения можно объяснить выбором белков. В нашей работе результаты основаны на анализе выбранных восьми функциональных классов белков, а количественное содержание тех или иных вторичных структур связано с функцией белка.

Также следует отметить, что все исследованные спирали были правозакрученными, что в очередной раз подтверждает концепцию о зако-

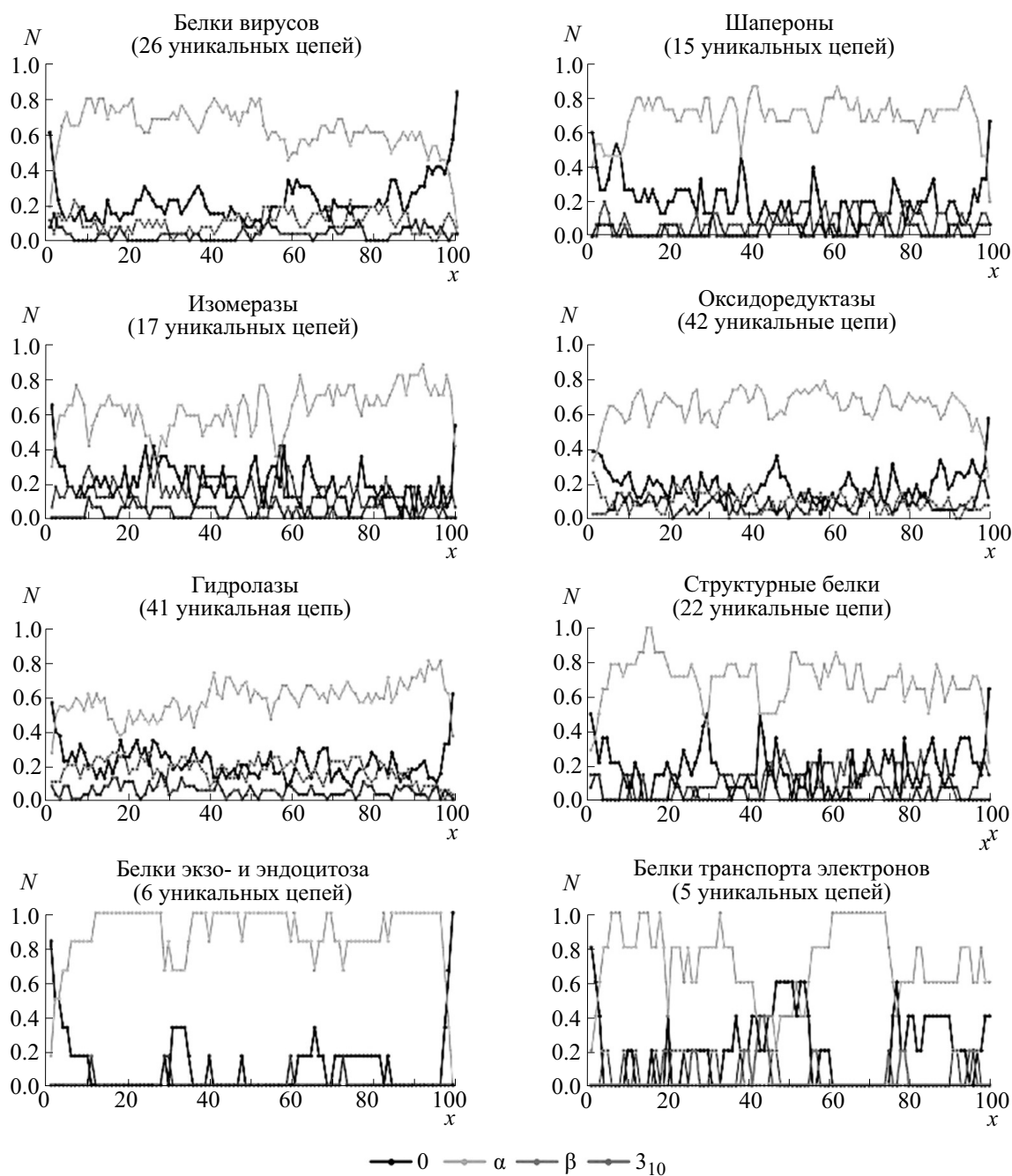


Рис. 2. Распределения вторичных структур по полипептидной цепи. По оси абсцисс отложены нормированные координаты, по оси ординат — количество структур, нормированное на общее число цепей.

номерной смене знака хиральности. Однако в работе [2] было показано, что в исследованных группой образцах в состав правозакрученных спиралей входят лишь 55.7% аминокислотных остатков. В первую очередь, это можно объяснить наличием в рассмотренных исследователями белках левых спиралей типа полипролин II, характерных для исследованных функциональных классов.

Результаты анализа представлены в виде графиков распределения вторичных структур по цепям (рис. 2).

Общая длина каждой цепи нормирована и представляет собой горизонтальную ось длиной в 100 ячеек-координат (x). Вертикальная ось отражает общее количество вторичных структур, нормированных на общее число рассматриваемых цепей, приходящееся на данную координату (N).

На основе представленных диаграмм выявлено общее свойство, замеченное у белков исследованных групп: преобладание нерегулярных участков в начале и в конце цепей, что согласуется с упрощенным представлением о белковой глобуле как о гидрофобном ядре в гидрофильной оболочке.

Обнаружены закономерности для структур каждого из рассмотренных классов. У *вирусных белков* обнаружено высокое содержание α -спиралей на протяжении всей первичной цепи белка. Исследованные белки являются молекулами, имеющими палочкообразную форму. Обилие распределенных по первичной цепи α -спиралей может объяснять палочковидную структуру многих молекул, что обуславливает их прочность для формирования жесткого капсида.

В начале цепей *шаперонов* отмечено высокое содержание нерегулярных структур, которое позже постепенно уменьшается, но в то же время есть несколько заметных максимумов на протяжении всей цепи. Интересно, что в исследованных цепях присутствует не слишком большое количество β -листов, что абсолютно не характерно для данного класса. Это связано с тем, что в базе данных хранится информация о субъединице, которая не образует характерную для данного класса структуру «бочонка».

В исследованных *изомеразах* выявлено высокое содержание и α -спиралей, и β -листов. При этом во второй половине цепи α -спиралей становится еще больше по сравнению с первой. Возможно, скопление α -спиралей в последней четверти соответствует формированию активного центра: жесткие спирали могут образовать структуру, которая будет избирательно специфична к субстрату, определяя четкую комплементарность.

В *оксидоредуктазах* вероятно появление как регулярных вторичных структур, таких как α -спирали, β -листы, спирали 3_{10} , так и нерегулярных структур вдоль всей цепи. Четких тенденций в распределении не обнаружено, за исключением наличия заметного максимума скопления нерегулярных структур в середине цепи. Возможно, отсутствие четких закономерностей связано со специфичностью взаимодействия фермента и субстрата, когда включается кофермент. Возможно, что для специфики данного типа ферментов, связанных с переносом электрона или протона, важна не столько локальная жесткая структура, сколько химический набор аминокислотных остатков молекулы в определенных местах цепи.

В *гидролазах*, так же как и в оксидоредуктазах, не выявлены закономерности в распределении вторичных структур по цепи. Однако содержание α -спиралей постепенно увеличивается от одного конца молекулы к другому. Соображения о

специфике результата могут быть подобны предыдущим.

В *структурных белках* выявлено низкое содержание β -листов, спиралей 3_{10} и нерегулярных структур. Здесь содержание α -спиралей имеет несколько минимумов, естественно, совпадающих с максимумами содержания нерегулярных структур. Большое количество спиралей обеспечивает жесткую структуру всей молекулы, что, безусловно, важно для структурных белков, отвечающих за механическую прочность клетки. Несколько максимумов по нерегулярным структурам могут обеспечивать механическую подвижность молекулы в определенных местах — каркасные функции.

В белках экзо- и эндоцитоза отмечено полное отсутствие β -листов. Спираль 3_{10} располагается у концов α -спиралей, а α -спирали образуют целые плато. Такое распределение структур может обеспечивать локальную жесткость молекул как элементов механических конструкций, необходимую для формирования везикул.

У белков транспорта электронов β -листы присутствуют только в цепи одного белка (*sulerythrin, a rubrerythrin-like protein*, PDB ID: 1J30). Максимумам содержания α -спиралей соответствует нулевое содержание других структур. Как и в белках экзо- и эндоцитоза, здесь можно заметить плато α -спиралей, но нерегулярных структур становится больше, что, возможно, делает молекулу не такой жесткой.

Необходимо заметить, что во всех исследованных классах максимумы вероятности появления спиралей 3_{10} на данном участке полипептидной цепи совпадают с минимумами вероятностей появления α -спиралей. Это наблюдение согласуется с литературными данными [11], согласно которым спирали 3_{10} часто располагаются на концах α -спиралей.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУПЕРСПИРАЛЕЙ COILED COIL ПО ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКОВ

Подборку белков для анализа распределения суперспиралей coiled coil по полипептидной цепи проводили с использованием электронной базы данных Protein Data Bank и CC+database [12]. Результаты представлены на рис. 3.

В *вирусных белках* отмечено высокое содержание суперспиралей coiled coil вдоль всей цепи. В образовании суперспиралей участвуют α -спирали, расположенные на разных полипептидных цепях. Большое количество α -спиралей и суперспиралей coiled coil может отражать особенности взаимодействия с инфицированной клеткой. В *шаперонах* суперспирали coiled coil распределены доменами на протяжении всей цепи, что может

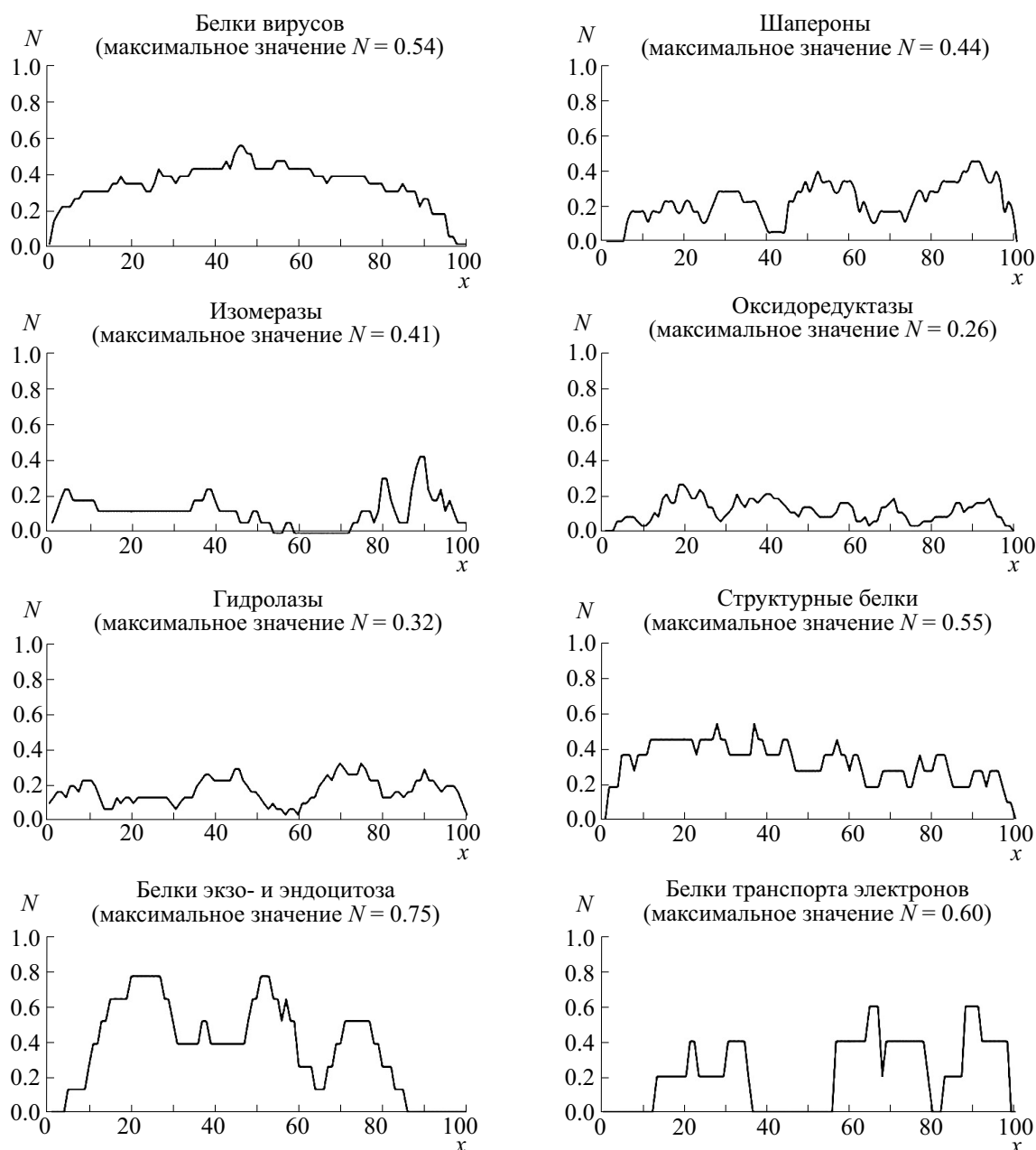


Рис. 3. Распределения суперспиралей coiled coil по полипептидной цепи. По оси абсцисс отложены нормированные координаты, по оси ординат — количество структур, нормированное на общее число рассматриваемых цепей.

обеспечивать фрагментарную локальную жесткость молекул, по существу, имеющих функции и особенности «конструкций-трансформеров». Суперспирали в *изомеразах* в первой половине распределены равномерно, затем наблюдается продолжительный минимум, точнее, полное отсутствие в каждой из рассматриваемых цепей. В месте заметного скопления α -спиралей выявлены максимумы вероятности появления суперспиралей coiled coil, что может указывать на их привязку к активному центру у одного из концов. У *оксидоредуктаз*, как мы уже говорили, ма-

лое количество суперспиралей coiled coil может свидетельствовать о том, что оксидоредуктазам важнее обладать определенным химическим составом для ферментативной активности, чем иметь особую, характерную для всего класса, геометрию. В *гидролазах* суперспирали coiled coil распределены доменами на протяжении всей цепи, что пока нам сложно охарактеризовать каким-то специфическим качеством. Для *структурных белков* характерно равномерное распределение суперспиралей coiled coil по всей цепи, однако вероятность появления такой структуры

постепенно снижается ближе к одному из концов. Coiled coil у белков экзо- и эндоцитоза расположены тремя крупными доменами и вовсе отсутствуют у обоих концов молекул. В белках транспорта электронов суперспиралей мало по обоим концам, но в середине располагается заметный максимум.

Таким образом, в настоящей работе выявлены некоторые закономерности и особенности в распределении вторичных структур и суперспиралей coiled coil по полипептидным цепям белков выбранных функциональных классов: белки вирусов, шапероны, оксидоредуктазы, гидролазы, структурные белки, белки экзо- и эндоцитоза и белки транспорта электронов. Полученные данные относительно распределения в белковых глобулах упомянутых выше жестких молекулярных конструкций, по всей вероятности, могут непосредственно коснуться развития концепции «белок—машина», причем не только в представлениях о «рычагах», «шарнирах» и «балках», но и в новых соображениях о машинах как о хиральных образованиях и о вентильных спиральных конструкциях в них [7]. В целом речь идет о тех самых «выделенных механических степенях свободы» в молекулярных машинах, которые были постулированы в работах Л.А. Блюменфельда, Д.С. Чернавского и их коллег и которые изменяют физический смысл термодинамических систем, преобразующих энергию и вещество: с ними происходит переход от молекулярных статистических систем к макроскопическим конструкциям [13, 14]. Заметим, что наши обсуждения, касающиеся специфики отдельных классов белков, имеют сугубо предварительный характер и будут, несомненно, уточняться.

В заключение мы хотели бы также отметить, что выявление закономерностей и соответствий между строением белка и его функциями в будущем может способствовать созданию новых бионических материалов, а также разработке более эффективных лекарственных препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00082).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Y. Chou and G. D. Fasman, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **47**, 45 (1978).
2. A. A. Adzhubei, F. Eisenmenger, V. G. Tumanyan, et al., J. Biomol. Structure & Dynamics **5** (3), 689 (1987).
3. А. А. Замятин, *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **3** (1), 225 (2018).
4. V. A. Tverdislov, *arXiv*:1211.4272 (2012).
5. В.А. Твердислов, *Биофизика* **58** (1), 159 (2013).
6. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко, С. А. Ильченко и др., *Биофизика* **62** (3), 421 (2017).
7. В. А. Твердислов и Е. В. Малышко, *Успехи физ. наук* **189**, 375 (2019).
8. А. В. Финкельштейн и О. Б. Птицын, *Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. 3е изд., испр. и доп.* (КДУ, М., 2012).
9. В. А. Твердислов, А. Э. Сидорова и Л. В. Яковенко, *Биофизика* **57** (1), 146 (2012).
10. RCSB PDB: <http://www.rcsb.org>.
11. А. С. Иванов, *Биомед. химия* **57** (1), 31 (2011).
12. CC+ database: <http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus>.
13. Ю. И. Хургин, Д. С. Чернавский и С. Э. Шноль, *Молекуляр. биология* **1**, 419 (1967).
14. Л. А. Блюменфельд, *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (Едиториал УРСС, М., 2002).

The Relationship between Protein Chiral Hierarchical Structures and Functions

E.V. Malyshko, O.E. Bagrova, and V.A. Tverdislov

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

For the first time, the particular characteristics of distributions of secondary structures and coiled-coil superhelix structures were explored while taking into account the sign of chirality in polypeptide chains of proteins belonging to eight functional classes: viral proteins, chaperones, oxidoreductases, hydrolases, structural proteins, proteins involved in exocytosis and endocytosis and electron transport proteins. The protein structure patterns, which are common for all studied classes and typical of each class, are identified.

Keywords: chirality, proteins, secondary structure, α -helix, β -sheet, superhelix

ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ ДВУХ ХИРАЛЬНЫХ ФОРМ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ НАНОТРУБОК

© 2020 г. С.В. Филиппов, В.С. Быстров

*Институт математических проблем биологии РАН — филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. проф. Виткевича, 1*

E-mail: fsv141@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2019 г.

После доработки 16.02.2020 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Методом визуально-дифференциального анализа конформационных особенностей (био)макромолекулярных структур проведено теоретическое исследование различий в структурной организации дифенилаланиновых нанотрубок D- и L-хиральных форм. Отмечены общие черты пространственной организации внутренних поверхностей каналов нанотрубок: зеркальность расположения гидрофильных атомов и равные площади их проекций, свидетельствующие о схожем характере гидратации внутренних полостей каналов дифенилаланиновых нанотрубок D- и L-хиральностей. Выявлены различия меньшего порядка: больший размер полости канала у нанотрубок L-формы, а также большая однородность укладки дифенилаланиновых слоев у D-формы. Полученные результаты коррелируют с экспериментальными данными.

Ключевые слова: нанотрубки, дифенилаланин, Blender, ImageJ, гинсометрические проекции.

DOI: 10.31857/S0006302920030035

Самоорганизация и самосборка сложных биомолекулярных структур являются одними из важнейших биологических явлений. Пептидные нанотрубки на основе аминокислоты фенилаланина и дифенилаланина [1] — характерный пример самоорганизующихся молекулярных структур. Самосборка таких нанотрубок в водных средах происходит достаточно быстро при определенных условиях, которые влияют на скорость их роста, на форму самоорганизующихся структур (их толщину и длину) и другие физические свойства [1]. Благодаря широкому спектру свойств эти структуры являются перспективными для различных применений в нанотехнологиях, нанoeлектронике и биомедицине. Так, нанотрубки на основе дифенилаланина (ФФ-НТ) исследуются для использования их как основы систем доставки лекарств. Помимо полной биосовместимости они крайне удобны для введения в них химических и функциональных модификаторов. Например, показана их пригодность для доставки лекарств, когда моделью доставляемого лекарства послужил краситель родамин Б [2]. Если же их химически присоединить к фолиевой кисло-

те/магнитным наночастицам, ФФ-НТ становятся системами доставки противораковых и противовоспалительных препаратов [3, 4].

В то же время известно, что в зависимости от конформации и типа стереоизомера («левой» (L) или «правой» (D) хиральности) первичной структуры аминокислоты свойства любого материала, собранного на их основе, также изменяются. При этом важным моментом является тот факт, что жизнь всегда использует только один из энантиомеров. С точки зрения хиральности все макромолекулы белков и ферментов во всех живых организмах состоят в основном только из L-аминокислот. Усложнение этих макромолекул в возрастающей иерархии структур белков и ферментов приводит к закономерной смене и чередованию знака хиральности [5]. При этом биологическая активность лекарственных препаратов, имеющих также различную хиральность, может быть совершенно различной. «Правые» и «левые» лекарства, взаимодействуя с хиральными молекулами в организме, могут действовать по-разному. Поэтому возникает необходимость в чистых энантиомерах, так как часто только один из них обладает требуемым терапевтическим эффектом, тогда как второй антипод может в лучшем случае быть бесполезным, а в худшем — вызвать нежела-

Сокращение: ФФ НТ — нанотрубки на основе дифенилаланина.

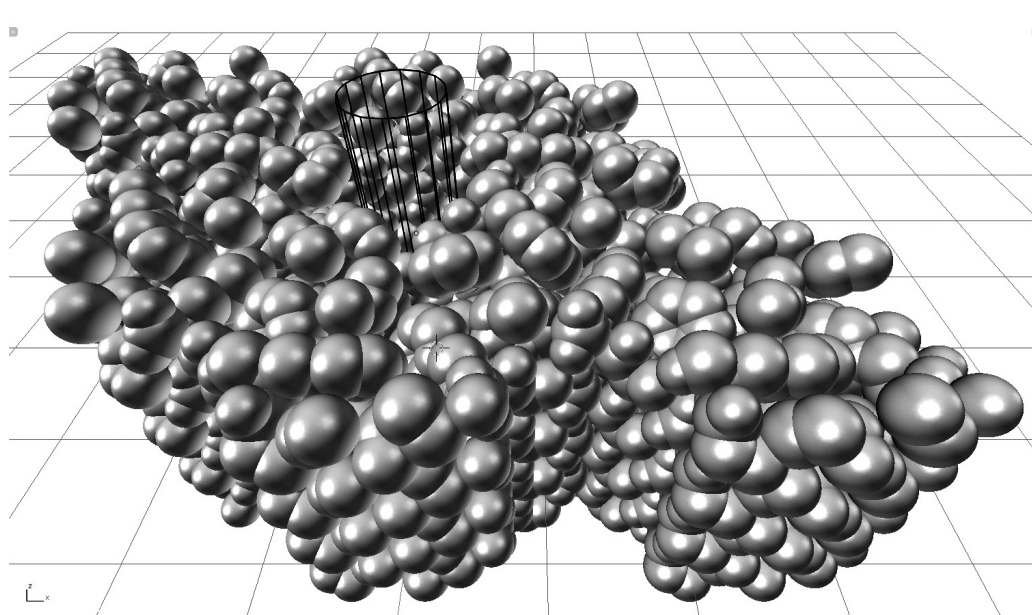


Рис. 1. Перспективное отображение 3D-модели четырех слоев D-формы ФФ-НТ в видовом окне Blender, использованной для построения цилиндрических проекций. В виде проволочного каркаса показан проекционный цилиндр, вставленный внутрь канала нанотрубки.

тельные побочные эффекты или даже быть смертельно токсичным [6].

С учетом всего вышесказанного становится ясно, что исследования конформационных особенностей ФФ-НТ крайне важны. Однако трехмерные методы анализа 3D-моделей таких наноструктур не всегда удобны и информативны. В особенности это касается разных хиральных форм ФФ-НТ, для которых, казалось бы, очевидные различия в пространственной организации двух форм крайне сложно однозначно определить, систематизировать и зафиксировать [1, 7, 8].

Одним из наиболее наглядных и информативных методов, способных выявить нюансы структурной организации разных изомерных форм одного соединения, является предлагаемый нами метод построения «гипсометрических» карт (био)макромолекул [9]. Особенно естественным выглядит применение данного метода к объектам, имеющим цилиндрическую форму (идеально «подходящую» для цилиндрического проецирования их внутренних и внешних поверхностей) — таким как ФФ-НТ.

МЕТОДЫ

В среде открытого 3D-редактора Blender v.2.79b при помощи разработанного нами программного обеспечения [9–11] были построены 3D-модели (рис. 1) L- и D-форм ФФ-НТ (на основе данных рентгеновских структур этих нанотрубок, взятых из баз данных, приведенных в работах [7, 8]). Таким образом, нами были получены две структуры ФФ-НТ L- и D-форм.

3D-модели использовались для построения цилиндрических проекций внутренней полости канала ФФ-НТ у соответствующих L- и D-форм.

Для целей этой работы мы генерировали два типа проекций: «гипсометрическую» [9], содержащую информацию о пространственном расположении видимых изнутри канала атомов, а также «идентификационную» [12], связывающую каждый пиксель проекции с его описанием в исходном PDB-файле и списком расстояний от центра каждого атома до оси проекционного цилиндра, рассчитанных при построении 3D-модели (рис. 2). Список расстояний и идентифицирующих каждый из спроецированных атомов цветов представляет собой таблицу, записанную в виде текстового файла, генерируемого при построении 3D-модели. В табл. 1 приведен фрагмент такого файла в качестве примера.

«Гипсометрические» проекции использовались для сравнительного визуального анализа структурных особенностей двух разных хиральностей. «Идентифицирующие» проекции использовались для сравнительного количественного анализа внутренней поверхности канала ФФ-НТ с точки зрения возможностей его гидратации. Данный метод можно рассматривать как грубый аналог метода расчета доступных растворителю поверхностей [13].

Для получения количественных оценок был задействован программный пакет ImageJ v.1.52a [14]. С помощью разделения RGB-каналов и применения инструмента Threshold на «идентифици-

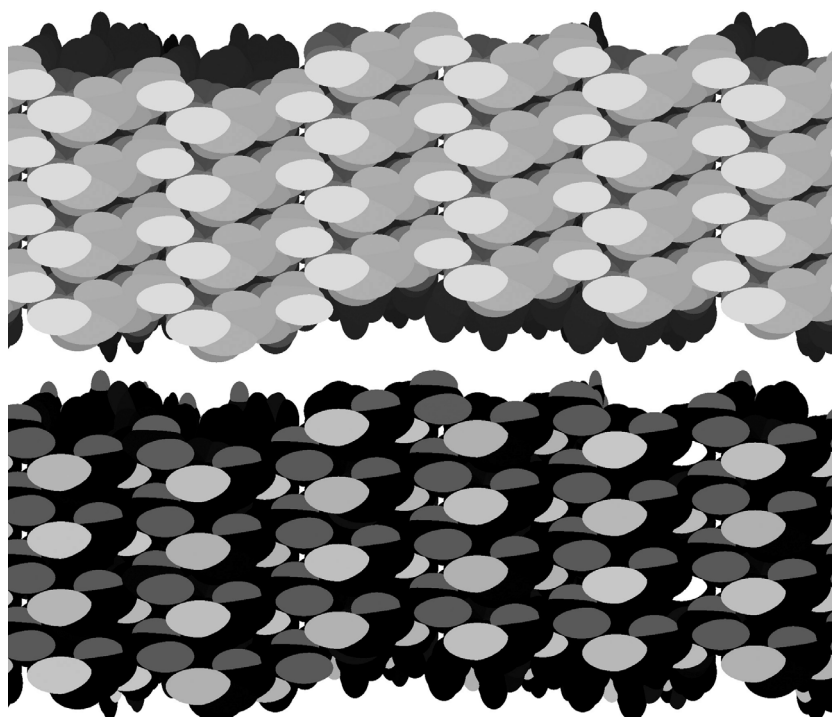


Рис. 2. Вид проекции внутренней поверхности канала D-формы ФФ-НТ, полученной с помощью 3D-модели, построенной из экспериментальных данных. Вверху — проекция, подобная «гипсометрической» карте. Светлые области обозначают большую высоту, т.е. близость к оси проекционного цилиндра и, следовательно, к центральной оси нанотрубки; темные области — максимальную удаленность от оси цилиндра/нанотрубки. Внизу — приведенная к монохромному виду проекция, идентифицирующая типы атомов. Черные области соответствуют атомам углерода, темно-серые — атомам кислорода, светло-серые — атомам азота.

Таблица 1. Фрагмент текстового файла, содержащего информацию, идентифицирующую атомы на проекциях посредством кодовых RGBA-цветов, а также значения расстояний от центра каждого атома до оси проекционного цилиндра

Красный (R)	Зеленый (G)	Синий (B)	Альфа (A)	Группа	Атом	Остаток	Расстояние, Å
0	0	16	255	grp: _17	atm: C_17	unt:	dst: 14.947566
0	0	17	255	grp: _18	atm: C_18	unt:	dst: 17.278604
0	64	224	255	grp: _19	atm: N_19	unt:	dst: 18.094639
0	64	225	255	grp: _20	atm: N_20	unt:	dst: 17.188943
192	0	0	255	grp: _21	atm: C_21	unt:	dst: 17.360572
192	0	1	255	grp: _22	atm: C_22	unt:	dst: 19.632428

Примечание. Комбинированное обозначение Residue name, Chain identifier, Residue sequence number в терминах спецификации Protein Data Bank Contents Guide v.3.30.

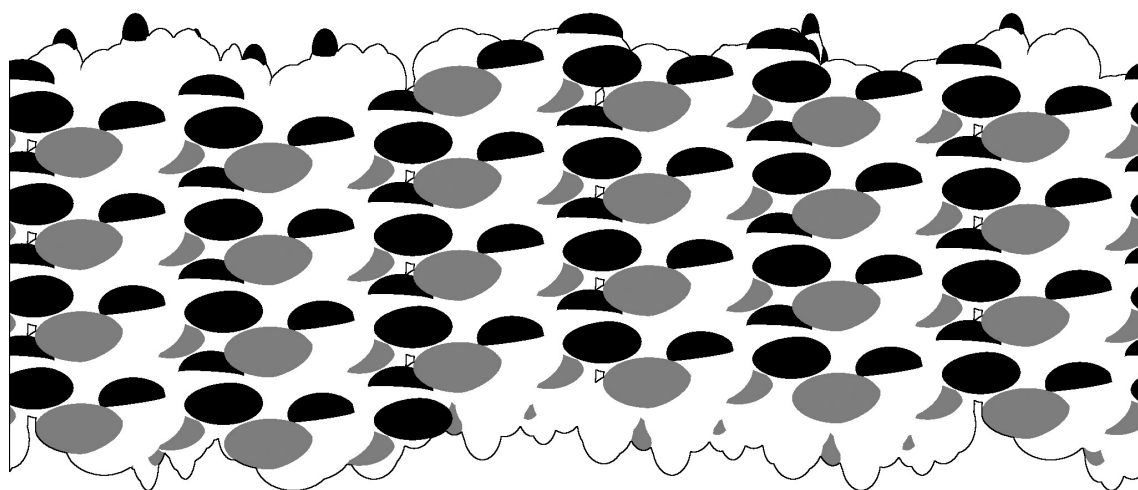


Рис. 3. Комбинированное отображение четырех масок D-формы ФФ-НТ, полученной из экспериментальных данных: проекции внутренней поверхности канала и промежутков между слоями (обозначены контурной линией), проекции атомов азота (обозначено серым цветом), проекции атомов кислорода (отображено черным).

рующей» проекции выделялись группы атомов азота и кислорода. Полученные с помощью такой декомпозиции изображения (рис. 3) использовались как графические файлы — маски в последующей композиции слоев, выполняемой в графическом редакторе Madichance PhotoReactor [15], а также для количественного анализа в программном пакете ImageJ.

Инструментом Analyze Particles подсчитывалась площадь (в квадратных пикселях) поверхности на проекции, занимаемая гидрофильными атомами (кислорода и азота). Для оценки промежутков между молекулярными группами использовался зеленый канал с выделением фоновых пикселей инструментом Threshold и подсчет «частиц» инструментом Analyze Particles с критерием 0–10000 пикс².

Для ряда таких вспомогательных операций, как, например, циклический сдвиг пикселей проекции вдоль осей X и Y , был задействован программный пакет G'MIC v.2.7.5 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный анализ «гипсометрических» проекций, полученных на основе экспериментальных данных, определенно характеризует канал D-формы ФФ-НТ как более узкий, поскольку его гидрофильные атомы отображаются на проекции данного типа светло-серыми тонами, а на цветных проекциях — преобладанием в кодирующей расцветке красных оттенков у D-формы. Следовательно, эти атомы располагаются ближе к оси цилиндра/нанотрубки, а значит, сильнее «выпячиваются» во внутреннюю полость канала (рис. 4).

Канал ФФ-НТ L-формы напротив, более широкий, о чем свидетельствует преобладание зеленых оттенков на цветной проекции гидрофильных атомов и, соответственно, темно-серых тонов при монохромном представлении (рис. 4).

Вышеприведенные наблюдения подтверждаются расчетными данными. Так, внешний диаметр нанотрубки D-FF меньше на $2 \cdot (13.4062_{R(L-FF)} - 12.9915_{R(D-FF)}) \approx 0.83 \text{ \AA}$. Особый же интерес представляет характер распределения расстояний всех атомов у ФФ-НТ D- и L-форм, показанный на рис. 5.

Все вышеописанные наблюдения хорошо согласуются с результатами экспериментов и модельных расчетов, полученными в работах [7, 8] и свидетельствующими о более плотной упаковке самособранных D-FF-нанотрубок [1].

При этом нельзя не отметить очевидную симметрию в строении каналов обеих хиральных форм. Для наглядного подтверждения этого наблюдения мы совместили контурные изображения проекций гидрофильных атомов D- и L-форм ФФ-НТ, предварительно выполнив зеркальное отражение вокруг вертикальной оси у L-проекций и циклически сдвинув их на 17% относительно ширины изображения (рис. 6). Получившаяся иллюстрация наглядно демонстрирует структурное подобие каналов нанотрубок обеих хиральностей, но в то же время отчетливо свидетельствует и о наличии различий меньшего порядка в их геометрии.

Эти различия можно увидеть и на «гипсометрических» проекциях: в сравнении с проекцией D-формы L-проекцию поверхности внутренней полости канала ФФ-НТ можно охарактеризовать как более «рыхлую» и менее однородную, что проявляется в разнородном тонировании (а сле-

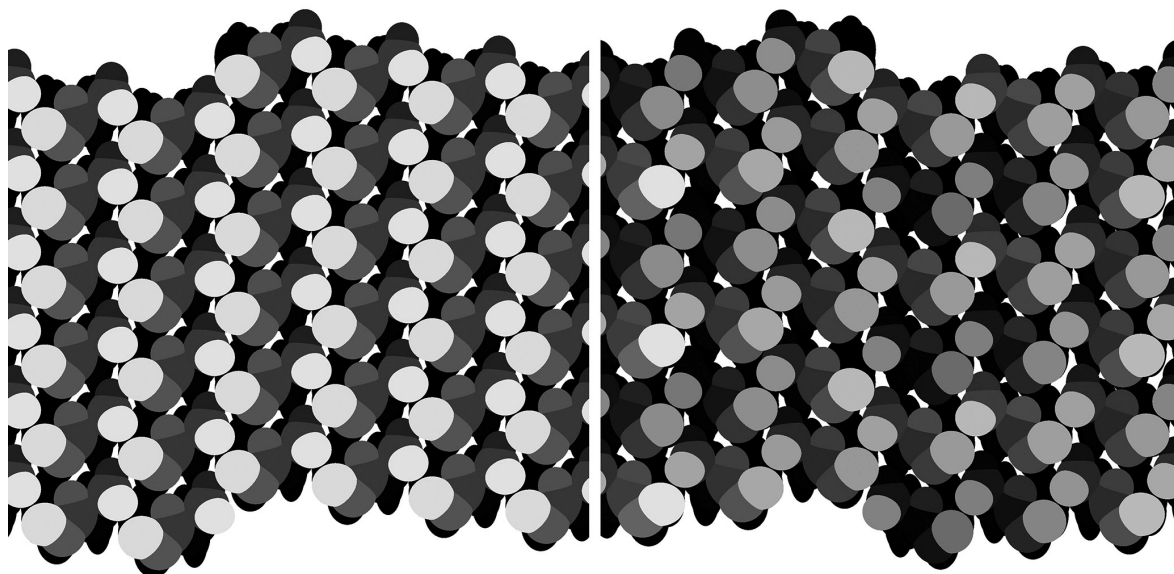


Рис. 4. «Гипсометрическое» представление проекций D-формы (слева) и L-формы (справа) ФФ-НТ.

довательно, и «разновысотности») гидрофильных атомов, направленных внутрь канала L-ФФ-НТ.

Для более формализованного описания как подобия, так и различий в структурах внутренней поверхности каналов D- и L-форм ФФ-НТ мы провели количественную оценку их проекций (табл. 2).

В соответствии с данными, приведенными в этой таблице, внутренние поверхности каналов ФФ-НТ обоих типов имеют практически одинаковые площади. При этом площади поверхностей, занимаемые проекциями гидрофильных атомов у каналов обеих структур, практически со-

поставимы — 53.773% у D-формы и 53.022% у L-формы. Одинаковым является и количество видимых на проекции гидрофильных атомов для каждой из хиральностей.

Несмотря на сопоставимую площадь «межатомных промежутков» на проекциях для D- и L-форм ФФ-НТ, количество их незначительно разнится. Но наибольшее внимание обращает на себя явно различающаяся геометрическая форма проекцией этих пустот и распределение их размеров (площадей) (рис. 7).

Совершенно очевидно, что площади промежутков между проекциями атомов внутренней

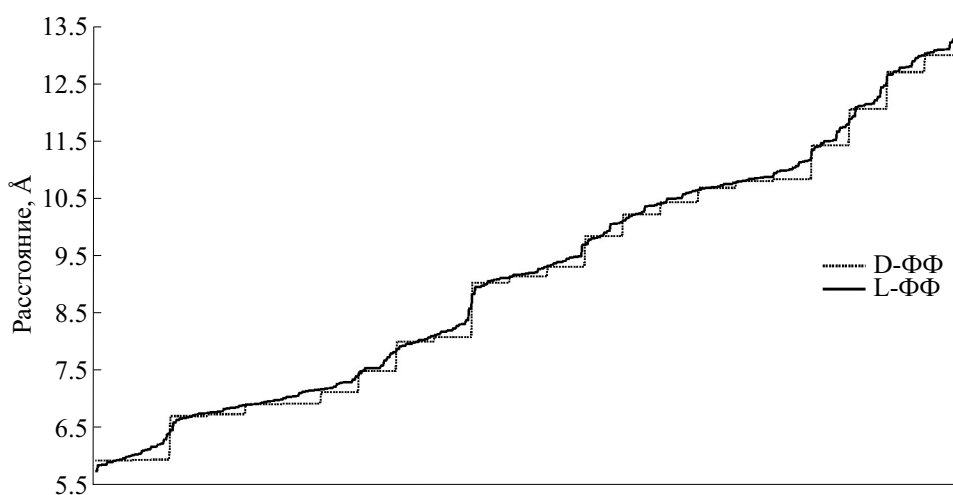


Рис. 5. Графическое представление распределения кратчайших расстояний от каждого атома до оси проекционного цилиндра. Пунктирная линия соответствует распределению у D-ФФ-НТ, сплошная — у L-ФФ-НТ.

Таблица 2. Результаты измерений проекций D-FF и L-FF

Форма ФФ-НТ	Поверхность канала		Кислород			Азот			«Просветы»		
	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{атм}}$	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{атм}}$	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{пустот}}$	S , пикс ²	S , %
D-FF	3356647	80.029	108	978921	23.339 29.164	72	826052	19.695 24.609	90	88866	2.119 2.647
L-FF	3361090	80.135	108	963908	22.981 28.678	72	818226	19.508 24.344	88	91510	2.182 2.722

Примечание. В ячейках « S , %» первое значение – площадь, занимаемая проекциями объектов одного и того же типа (атомами или «промежутками»), выраженная в процентах от всей площади проекции (4194304 пикс²). Второе значение (выделено жирным шрифтом) – площадь на проекции, занимаемая объектами одного и того же типа (атомами или «промежутками»), выраженная в процентах от площади всей поверхности соответствующего канала. n – Количество видимых на проекции атомов.

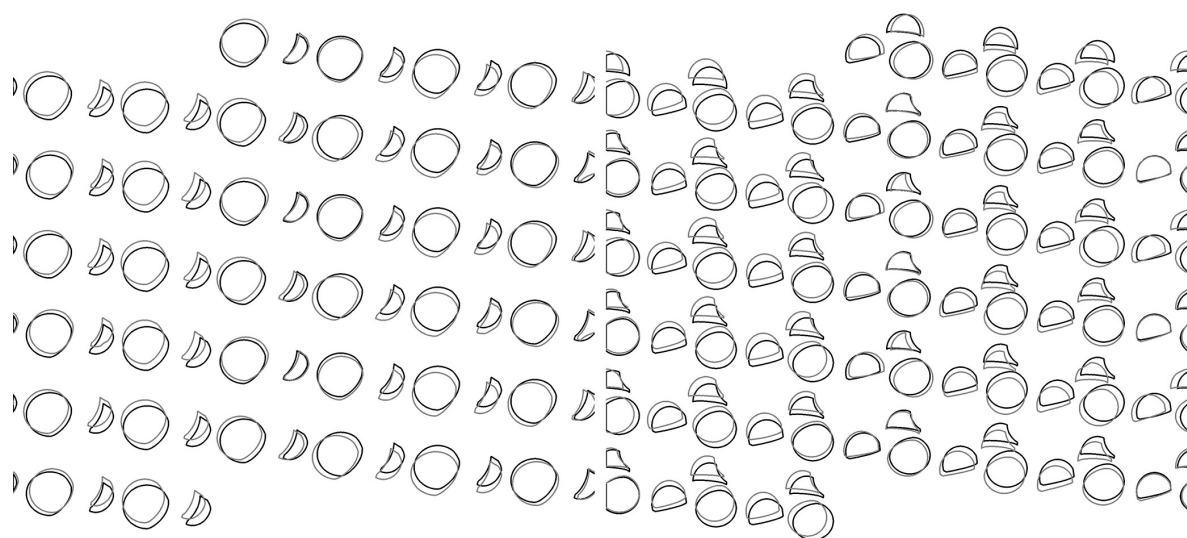


Рис. 6. Совмещенные контуры проекций атомов азота (слева) и кислорода (справа), локализованных на внутренних поверхностях каналов D-ФФ-НТ (показано черным цветом) и зеркально отраженной с циклическим сдвигом L-ФФ-НТ (показано серым цветом).

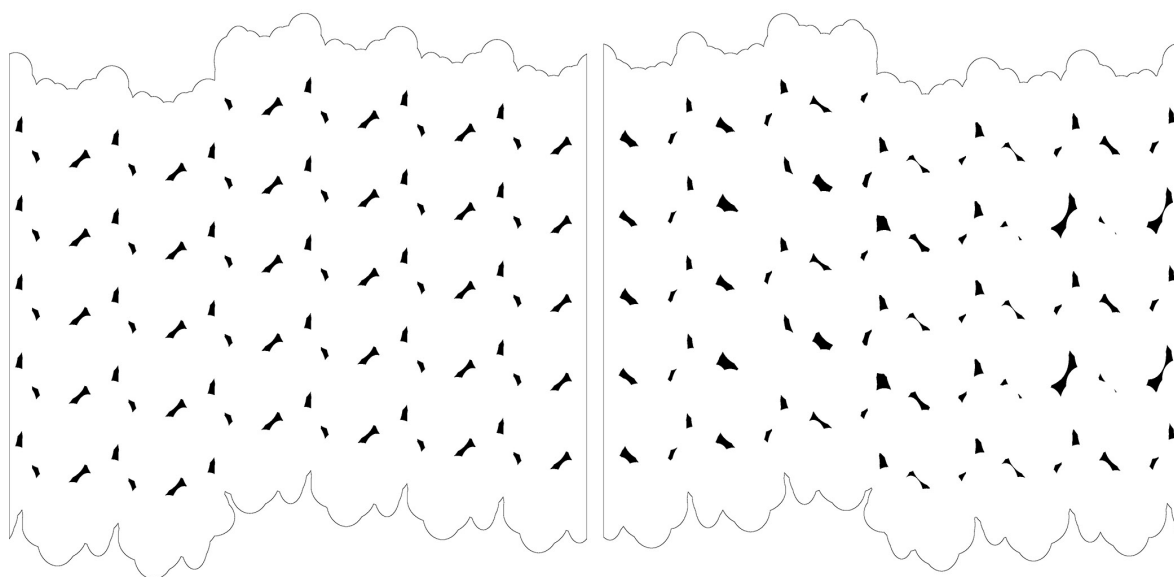


Рис. 7. Сравнительное отображение форм и размеров межатомных промежутков на проекциях внутренней поверхности каналов D-ФФ-НТ (слева) и L-ФФ-НТ (справа).

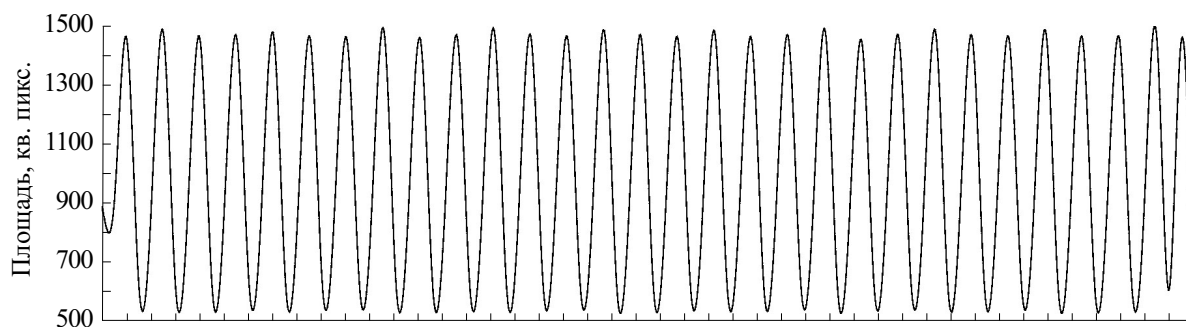


Рис. 8. Графическое представление распределения площадей промежутков между проекциями атомов внутренней поверхности канала ФФ-НТ у D-формы.

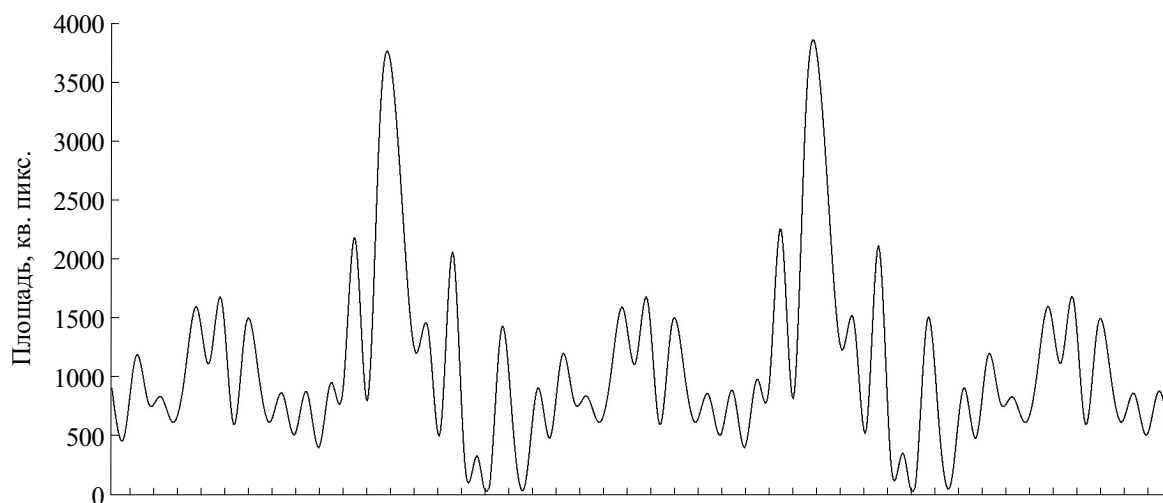


Рис. 9. Графическое представление распределения площадей промежутков между проекциями атомов внутренней поверхности канала ФФ-НТ у L-формы.

поверхности канала D-ФФ-НТ различаются гораздо меньше, чем те же объекты у L-ФФ-НТ. Закономерность распределения площадей таких промежутков при сканировании проекции в направлении «сверху-вниз» представлена на рис. 8 и 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные методом визуально-дифференциального анализа данные об особенностях структурной организации внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок хорошо согласуются с данными, полученными рядом более консервативных методов, что подтверждает состоятельность предлагаемого нами метода анализа структурных особенностей ряда макромолекулярных структур.

Кроме того, при помощи нашего метода был получен ряд дополнительных данных, а также выявлен ряд закономерностей в структурной орга-

низации формально очень похожих структур, нуждающихся в дополнительных исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Теоретическая часть исследования была выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации № 0017-2019-0009 (Институт прикладной математики им. М.В.Келдыша РАН) и № 01201373458. Апробация и реализация подхода были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований, проекты 18-07-00354-а (С.В. Филиппов) и № 19-01-00519-а (В.С. Быстров).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, S. Kopyl, et al., *Crystal Growth & Design* **19**, 6414 (2019). DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00884.
2. R. F. Silva, D. R. Araújo, E. R. Silva, et al., *Langmuir* **29** (32), 10205 (2013).
3. A. Bonetti, S. Pellegrino, P. Das, et al., *Org. Lett.* **17** (18), 4468 (2015).
4. G. Emtiazi, T. Zohrabi, L. Y. Lee, et al., *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **41**, 90 (2017).
5. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко, С. А. Ильченко и др., *Биофизика* **62** (3), 421 (2017).
6. В. И. Тишков, *Вестник МГУ. Сер. 2. Химия* **43** (6), 381 (2002).
7. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *J. Mol. Model.* **25**, Art. numb. 199 (2019). DOI: 10.1007/s00894-019-4080-x
8. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *Math. Biol. Bioinform.* **14** (1), 94 (2019). DOI: 10.17537/2019.14
9. С. В. Филиппов, Р. В. Полозов и В. С. Сивожелезов, *Визуализация пространственных структур (био)макромолекул в виде подобных гипсометрическим карт* (Препринт № 61, ИПМ им. М.В. Келдыша, М., 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-61. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_61.pdf.
10. С. В. Филиппов, *Программная платформа Blender как среда моделирования объектов и процессов естественно-научных дисциплин* (Препринт № 230, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2018). DOI: 10.20948/prepr-2018-230. URL: http://keldysh.ru/papers/2018/prep2018_230.pdf.
11. С. В. Филиппов и В. С. Сивожелезов, в сб. *Докл. междунар. конф. «Математическая биология и биоинформатика»*, под ред. В. Д. Лахно (ИМПБ РАН, Пушкино, 2018), т. 7, статья № е45. DOI: 10.17537/icmbb18.23
12. С. В. Филиппов, Метод идентификации атомов макромолекул, визуализируемых в 3D редакторах (Препринты № 97, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-97. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_97.pdf.
13. B. Lee and F. Richards, *J. Mol. Biol.* **55**, 379 (1971). DOI: 10.1016/0022-2836(71)90324-X
14. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **9** (7), 671 (2012).
15. Photo Reactor — Nodal Image Processor. URL: <https://www.mediachance.com/reactor/index.html>.
16. G'MIC is a full-featured open-source framework for digital image processing. URL: <https://gmic.eu> (дата обращения: 28.11.2019).

Visual-Differential Analysis of Structural Features of Internal Cavities of Two Chiral Forms of Diphenylalanine Nanotubes

S.V. Filippov and V.S. Bystrov

Institute of Mathematical Problems of Biology RAS – the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, ul. prof. Vitkevicha 1, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

With an original method for visual-differential analysis of the conformational features of (bio)macromolecular structures, a theoretical study concerned with the differences in the structural organization of diphenylalanine nanotubes of D- and L-chiral forms was carried out. The general features of spatial organization of the inner surface of nanotube channels are described: the mirror images of hydrophilic atoms and equal areas of their projections indicate that hydration of the internal cavities of the channels of diphenylalanine nanotubes of D- and L-chiralities is of similar nature. Minor differences were revealed: the large size of the channel cavity in L-shaped nanotubes, as well as the greater uniformity in the stacking of diphenylalanine layers in the D-shaped. The obtained results correlate with experimental data.

Keywords: nanotubes, diphenylalanine, Blender, ImageJ, hypsometric projections

КОМПЛЕКСЫ ВКЛЮЧЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ: УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ И ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ, КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

© 2020 г. Т.В. Ильич*, Е.А. Лапшина*, А.А. Маскевич**, А.Г. Вейко*, А.В. Лавыш**,
Б. Палеч***, А. Степняк***, В.У. Буко****, И.Б. Заводник*

*Кафедра биохимии Гродненского государственного университета имени Янки Купалы,
230030, Гродно, бульв. Ленинского Комсомола, 50, Беларусь

**Кафедра общей физики Гродненского государственного университета имени Янки Купалы,
230023, Гродно, ул. Ожешко, 22, Беларусь

***Химический факультет Университета г. Лодзь, ул. Поморска, 165, Лодзь, 90-236 Польша

****Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси,
230030, Гродно, бульв. Ленинского Комсомола, 50, Беларусь

E-mail: zavodnik_il@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2019 г.

После доработки 24.02.2020 г.

Принята к публикации 04.03.2020 г.

С использованием методов ультрафиолетовой и инфракрасной спектроскопии и квантово-химического моделирования оценены параметры формирования супрамолекулярного комплекса включения флавоноида кверцетина и молекулярного контейнера гидроксипропил- β -циклодекстрина. Растворимость кверцетина, включаемого в супрамолекулярный комплекс, возрастала более чем в 50 раз (в присутствии 16 мМ гидроксипропил- β -циклодекстрина), что указывает на повышение биодоступности кверцетина. Рассчитанная по методу Хигучи–Коннора константа ассоциации комплекса кверцетин–гидроксипропил- β -циклодекстрин (1 : 1) равна $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$. Формирование комплекса включения приводит к существенному изменению колебательных спектров компонентов по сравнению со спектром их физической смеси в результате изменения структуры компонентов, в том числе за счет формирования водородных связей. Молекулярное моделирование комплекса включения демонстрирует, что размещение молекулы кверцетина («гостя») во внутренней полости молекулы β -циклодекстрина («хозяина») приводит к изменению геометрии и свойств компонентов. Торсионный угол между кольцами планарной молекулы кверцетина равен 149.5° в комплексе с β -циклодекстрином и 138.7° — в комплексе с гидроксипропил- β -циклодекстрином.

Ключевые слова: кверцетин, β -циклодекстрин, УФ- и ИК-спектроскопия, квантово-химическое моделирование, константа ассоциации.

DOI: 10.31857/S0006302920030047

Полифенолы, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, демонстрируют многочисленные благоприятные эффекты как *in vivo*, так и *in vitro*. Одним из наиболее изученных полифенолов является флавоноид кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) (рис. 1а) — представитель семейства флавоноидов, обладающий 3-гидроксифлавоновым скелетом [1]. Кверцетин, один из компонентов диеты человека, присутствует в значительных количествах в цитрусовых, яблоках, луке, зеленом и черном чае и др. [2], повсеместно используется в

пищевой и фармацевтической промышленности, обладает противовоспалительной, антиаллергенной, антиоксидантной и противоопухолевой активностями, высоким терапевтическим потенциалом [3]. Предполагают, что антиоксидантные свойства растительных полифенолов обеспечивают благоприятное протекание важнейших физиологических процессов, определяют эффекты этих компонентов диеты при сердечно-сосудистых заболеваниях, старении, воспалительных процессах [4].

Фармакологическое применение кверцетина ограничено его плохой растворимостью в воде (около 1 мкг/мл) [5] и низкой биодоступностью (усваивается только около 20% введенного квер-

Сокращения: CD — циклодекстрины, HP- β -CD — 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

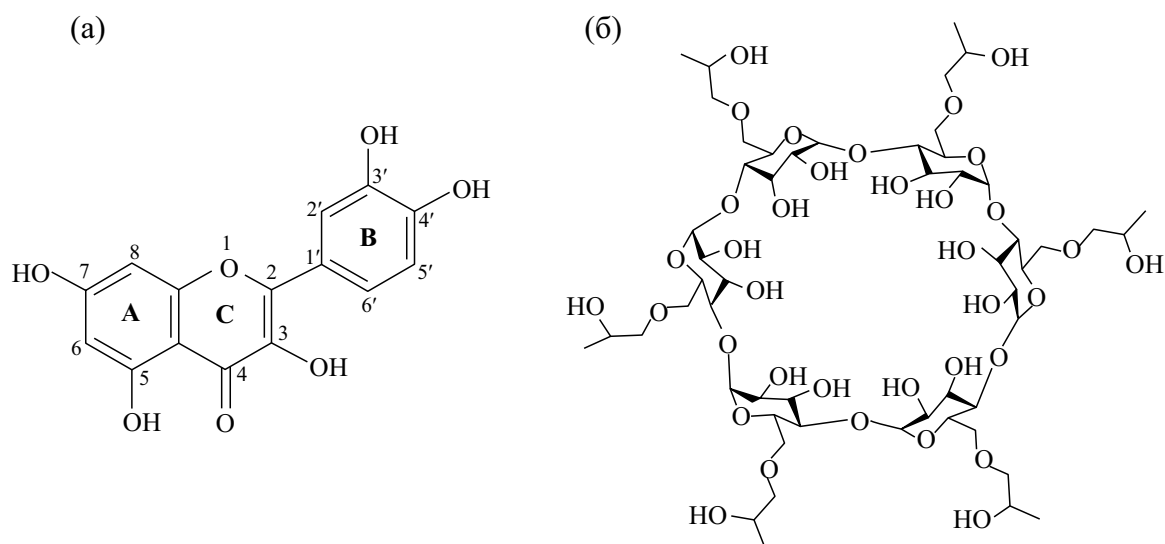


Рис. 1. Структурная формула кверцетина (а) и (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина (б).

цетина [6]). Для специфической и безопасной доставки лекарственных средств (биоактивных молекул) к тканям и клеткам-мишеням, снижения токсичности, повышения стабильности, предотвращения деструкции разрабатываются и тестируются разнообразные транспортные системы (пищевые и непивные). В качестве одного из наиболее перспективных пищевых инкапсулирующих полисахаридов в настоящее время рассматриваются β-циклодекстрины, которые широко используются при разработке способов направленной доставки, создании функциональных продуктов питания, детоксикации организма [7]. Циклодекстрины (CD) представляют собой циклические водорастворимые углеводы, состоящие из 6, 7 или 8 единиц глюкопиранозы (α-, β- и γ-циклодекстрины, соответственно) (рис. 1б). Использование циклодекстринов как молекулярных контейнеров доставки биологически активных веществ направлено, в первую очередь, на увеличение биологической активности включаемых молекул, повышение биодоступности и функциональности. CD обладают гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной поверхностью и способны формировать супрамолекулярные комплексы включения с разнообразными органическими соединениями по типу «гость—хозяин». Они широко используются в медицинской, фармацевтической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и других областях. В литературе широко представлены данные о механизмах комплексообразования кверцетина и β-CD, стехиометрии, константах стабильности комплексов включения, физико-химических и биохимических свойствах [8–10]. В тоже время β-CD имеет ограниченную растворимость в воде (0.0185 г/мл), проявляет нефротоксичность [11], в

связи с этим мы использовали модифицированный циклодекстрин (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин (HP-β-CD), который значительно менее токсичен и характеризуется высокой растворимостью в воде (>0.45 мг/мл) [12]. Целью настоящей работы было выяснить физико-химические параметры супрамолекулярного комплекса включения флавоноида кверцетина с β-циклодекстринами, формируемого с целью повышения биодоступности и фармакологической эффективности инкапсулируемого соединения, используя методы УФ- и ИК-спектроскопии и квантово-химического моделирования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали кверцетин (Sigma-Aldrich GmbH, Германия), β-циклодекстрин, гидроксипропил-β-циклодекстрин (CycloLab Ltd, Венгрия), остальные реактивы соответствовали квалификации «х.ч.» («Реахим», Россия). Комплекс включения кверцетина-HP-β-CD был получен согласно методу, предложенному в работе [13] — суспензированием кверцетина (50 мг) и HP-β-CD (250 мг) в 96%-м этаноле (50 мл). Суспензию перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 ч при 60 об/мин и 20°C. Для предотвращения реакции фотодеградации кверцетина колбу закрывали алюминиевой фольгой. Физическую смесь кверцетина и HP-β-CD готовили простым смешиванием в соотношении 1:1 в этаноле. После получения комплексов (или смеси) растворитель выпаривали при 60°C, используя вакуумный ротаторный испаритель [1]. Для приготовления растворов использовали воду, которую очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

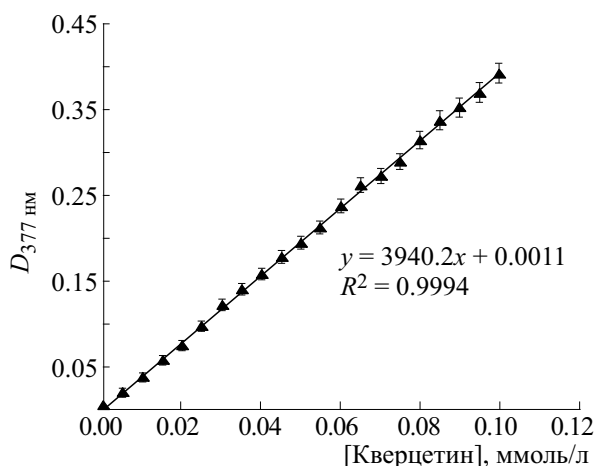


Рис. 2. Зависимость оптической плотности водного раствора кверцетина от его концентрации.

Исследование фазовой растворимости полифенолов в суспензии циклодекстринов проводили по методу, описанному в работе [14]. Одинаковое количество полифенола добавляли к водному раствору, содержащему β -CD или HP- β -CD в диапазоне концентраций 0–16 мМ, pH 6.8; $T = 298$ К. Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 72 ч для достижения равновесия, фильтровали через бумажный фильтр, затем фильтрат центрифугировали при 13500 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Количество растворенного полифенола определяли спектрофотометрически, используя ранее построенную калибровочную кривую. Константу ассоциации (K_s) комплекса включения рассчитывали по следующей формуле:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S^0(1 - \text{slope})}, \quad (1)$$

где S^0 — растворимость кверцетина в отсутствие циклодекстрина при 25°C, slope — угол наклона фазовой диаграммы растворимости, представляющей зависимость концентрации кверцетина от концентрации HP- β -CD или β -CD.

Инфракрасные спектры образцов (кверцетин, HP- β -CD, комплекс включения «кверцетин—HP- β -CD», физическая смесь компонентов) регистрировали в диапазоне волновых чисел 4000–400 см^{-1} с разрешением 0.5 см^{-1} в порошкообразном состоянии с помощью ИК-Фурье-спектрометра Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, США), используя алмазную призму нарушенного полного внутреннего отражения.

Теоретические расчеты: в настоящей работе для оценки геометрии комплекса и возможных механизмов его формирования мы теоретически рассмотрели структуры молекул кверцетина и комплекса «кверцетин— β -циклодекстрин», их

электронные свойства. Были использованы полуэмпирический метод молекулярных орбиталей и расчеты *ab initio*.

Преоптимизация структуры молекулы была проведена методом молекулярной механики MM+ [15]. Полная оптимизация структуры проведена в рамках модели Остина (Austin model 1, AM1) (полуэмпирический метод с использованием неограниченного формализма Хартри—Фока (unrestricted Hartree-Fock, UHF, formalism) (метод самосогласованного поля). Электронную структуру систем рассчитывали, используя неэмпирический метод *ab initio*. Расчеты проводили, используя пакет HyperChem 8.0 и базис 6-31G.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического критерия Колмогорова—Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка параметров комплексообразования кверцетина и β -циклодекстринов методом УФ-спектроскопии. На начальном этапе оценки параметров комплексообразования кверцетина и циклодекстринов мы определили молярный коэффициент экстинкции (ϵ) кверцетина в водном растворе (рис. 2), измеряя зависимость оптической плотности водных растворов кверцетина от его концентрации ($0 - 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) при $\lambda_{\text{max}} = 377$ нм. Зависимость, представленная на рис. 2, описывается уравнением $y = 3940x + 0.0011$ ($R^2 = 0.999$), что соответствует молярному коэффициенту экстинкции флавоноида $\epsilon = 3940 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ при $\lambda_{\text{max}} = 377$ нм.

Далее мы оценили растворимость кверцетина в присутствии различных концентраций β -CD (0–16 мМ) (рис. 3) и его модифицированной формы HP- β -CD (0–16 мМ) (рис. 4). Зависимость концентрации растворенного лиганда (кверцетина) от концентрации внесенного циклодекстрина (фазовая диаграмма растворимости) описывается линейным уравнением $y = 0.0002x \pm 8 \cdot 10^{-7}$ ($R^2 = 0.9931$) в случае β -CD (рис. 3) и $y = 0.008x \pm 7 \cdot 10^{-7}$ ($R^2 = 0.9928$) в случае HP- β -CD (рис. 4).

Растворимость кверцетина увеличивалась более чем в 5 раз в случае β -CD (16 мМ) (рис. 3) и более чем в 50 раз (рис. 4) в случае HP- β -CD (16 мМ). Диаграмма фазовой растворимости кверцетина в соответствии с концепцией авторов работы [14] может быть классифицирована как диаграмма A_L -типа, что предполагает возрастание растворимости лиганда в результате образования комплекса включения 1:1. Рассчитанные нами с помощью метода, предложенного в

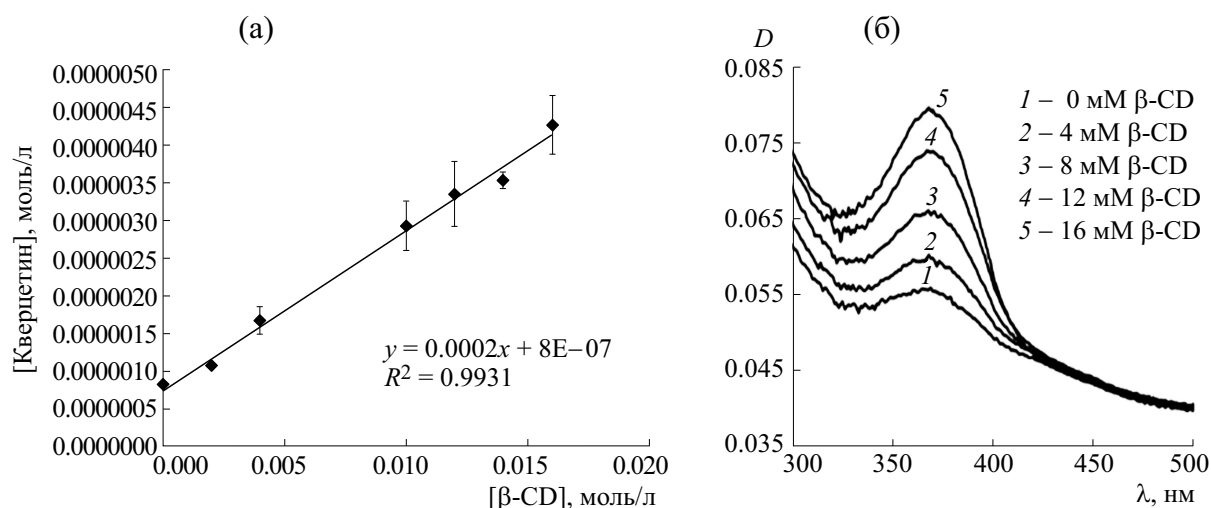


Рис. 3. Зависимости растворимости кверцетина от концентрации β -CD: (а) — диаграмма фазовой растворимости кверцетина в водных растворах β -CD; (б) — спектры поглощения при 298 К в диапазоне 300–500 нм кверцетина, инкубируемого в отсутствие (1) и в присутствии (2–5) β -CD (0–16 мМ).

работе [14], константы ассоциации K_s равны в случае β -CD $301 \pm 47 \text{ M}^{-1}$ и в случае HP- β -CD — $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$.

ИК-спектроскопия комплекса включения кверцетина и HP- β -CD. Формирование комплекса включения может быть подтверждено характерными изменениями колебательных спектров кверцетина и HP- β -CD, которые мы регистрировали методом Фурье-ИК-спектроскопии.

На рис. 5 представлены ИК-спектры кверцетина, HP- β -CD и комплекса включения «кверцетин–HP- β -CD». HP- β -CD был выбран нами в качестве объекта исследования в связи со значи-

тельно более высокой константой устойчивости комплекса включения с кверцетином по сравнению с немодифицированным β -CD.

Колебательные спектры свободного кверцетина исследованы рядом авторов [16–22], которые провели отнесение основных колебательных полос спектра. Так широкая полоса в спектре кверцетина с максимумами 3315 и 3399 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям (О–Н) групп, которые, вероятно, участвуют в формировании меж- и внутримолекулярных водородных связей [16–23]. Авторы работ [16, 17], основываясь на данных ИК- и ЯМР-спектроскопии, отнесли полюсу средней интенсивности при 1664 cm^{-1} к ва-

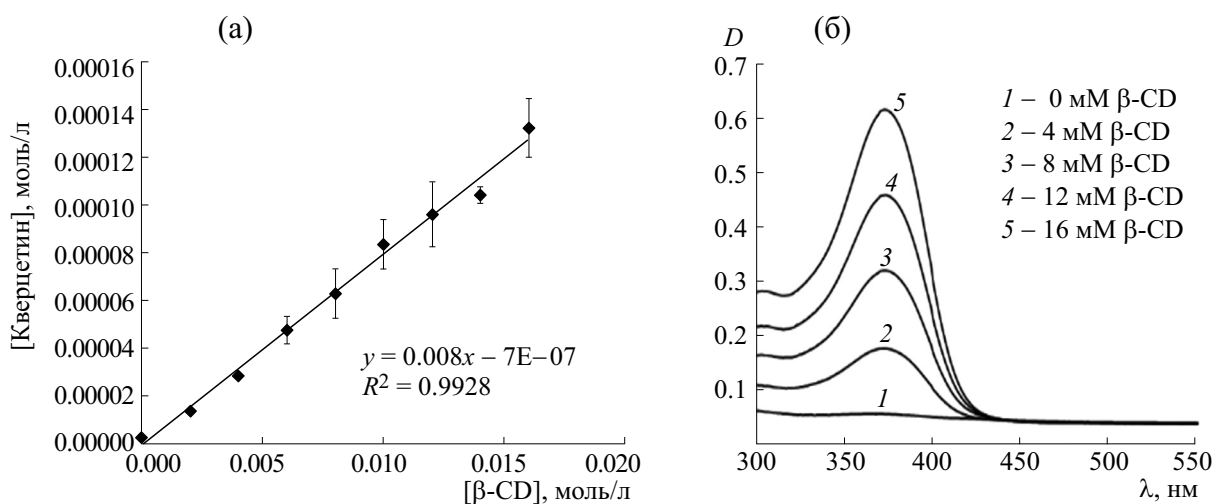


Рис. 4. Зависимости растворимости кверцетина от концентрации HP- β -CD: (а) — диаграмма фазовой растворимости кверцетина в водном растворе HP- β -CD; (б) — спектры поглощения при 298 К в диапазоне 300–550 нм кверцетина, инкубируемого в отсутствие (1) и в присутствии (2–5) HP- β -CD (0–16 мМ).

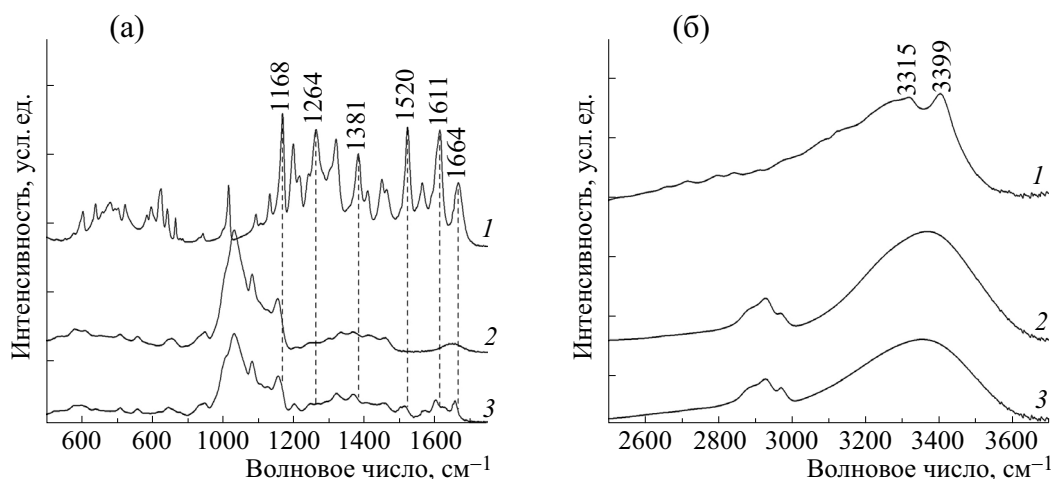


Рис. 5. ИК-Фурье-спектры кверцетина (1); HP- β -CD (2) и комплекса «кверцетин–HP- β -CD» (3) в низкочастотной (а) и высокочастотной (б) области.

лентным $\text{C}=\text{O}$ колебаниям растяжения негидратированной формы кверцетина. Аналогичное отнесение данной полосы выполнено также рядом других авторов [17, 20–22]. Интенсивную полосу при 1611 cm^{-1} авторы работ [16–18, 20–23] соотносят с колебаниями $\text{C}=\text{C}$ -групп ароматических колец молекулы, конъюгированных с карбонильной группой ($\text{C}=\text{O}$). Авторы работы [21] предполагают, что интенсивная полоса 1520 cm^{-1} , вероятнее всего, также соответствует колебаниям $\text{C}=\text{C}$ -групп ароматических колец кверцетина.

Ряд авторов полагает, что колебательная полоса при 1381 cm^{-1} образована плоскостными валентными $\text{C}-\text{OH}$ -колебаниями в молекуле кверцетина [17–23]. Отметим также полосу 1264 cm^{-1} ,

которую ряд авторов относит к валентным колебаниям группы $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, и полосу 1168 cm^{-1} , связанную с деформационными колебаниями $\text{C}-\text{OH}$ -связи [17–19, 23].

Как видно из рис. 6, колебательный спектр физической смеси представляет собой суперпозицию индивидуальных спектров компонентов. В колебательном спектре комплекса сохраняются основные полосы, характерные для кверцетина и HP- β -CD (рис. 5 и 6). Изменения в спектральных областях колебаний функциональных групп позволяют проследить структурные изменения кверцетина и образование новых связей при включении в комплекс с HP- β -CD. В комплексе включения полоса кверцетина при 1664 cm^{-1} смещается

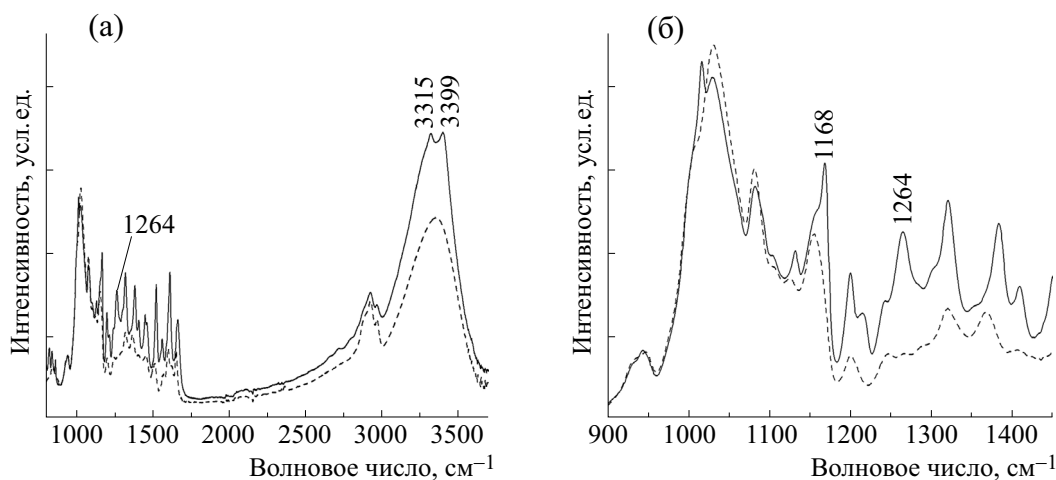


Рис. 6. ИК-Фурье-спектры физической смеси кверцетина и HP- β -CD (сплошная линия) и комплекса включения «кверцетин–HP- β -CD» (прерывистая линия).

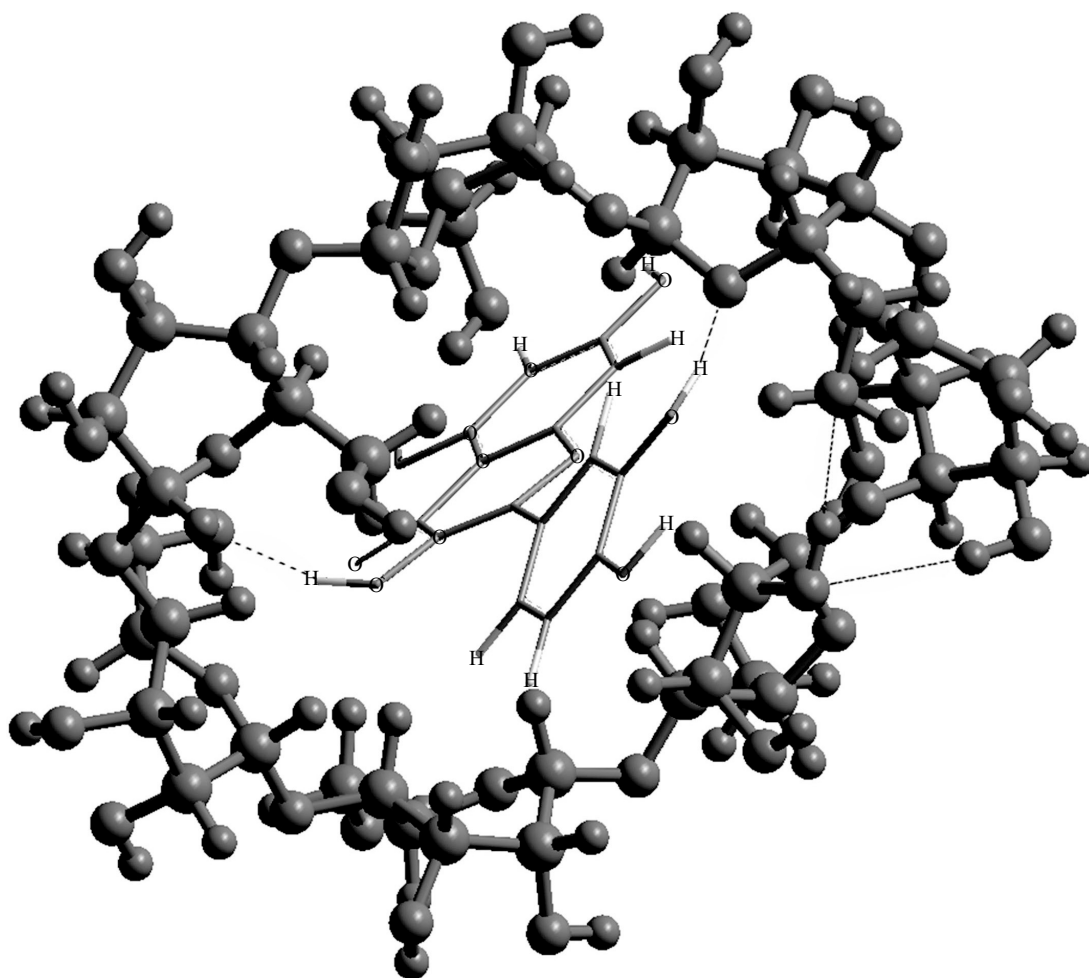


Рис. 7. Оптимизированная структура комплекса «кверцетин-β-CD». Показаны водородные связи, образуемые в комплексе.

в низкочастотную область на ~ 10 см^{-1} (1654 см^{-1}) за счет образования водородных связей с О-Н-группами в молекуле НР-β-CD, еще больший низкочастотный сдвиг (~ 13 см^{-1}) претерпевают полосы валентных С=С-колебаний. В колебательном спектре комплекса полоса 1264 см^{-1} практически не проявляется, что может быть следствием изменения геометрии молекулы при встраивании кверцетина в полость НР-β-CD. Колебательная полоса при 1381 см^{-1} (рис. 6) испытывает значительный низкочастотный сдвиг (~ 12 см^{-1}), что также указывает на образование комплекса включения (рис. 5).

Включение молекулы кверцетина в полость НР-β-CD приводит к изменению ИК-спектра в высокочастотной области (3000 – 3600 см^{-1}): колебательные полосы ОН-групп испытывают дополнительное уширение, колебательная структура

полосы кверцетина в области 3300 – 3400 см^{-1} исчезает. Спектральные изменения, очевидно, являются результатом взаимодействия функциональных групп НР-β-CD и кверцетина и структурных изменений молекул при формировании комплекса.

Структура и электронные свойства молекул кверцетина, β-циклодекстрина, гидроксипропил-β-циклодекстрина и их комплексов включения. Мы рассчитали некоторые молекулярные параметры кверцетина, β-циклодекстрина, гидроксипропил-β-циклодекстрина, их комплексов включения и кверцетина после удаления из комплексов, используя полуэмпирическую теорию молекулярных орбиталей [15]. Полученная нами оптимизированная структура (метод AM1) комплекса включения «кверцетин-β-циклодекстрин» представлена на рис. 7. Молекула кверцетина комплементарна внутренней полости молекул β-цикло-

декстринов. При включении наблюдаем определенную «подгонку» структур молекул кверцетина и циклодекстринов. Так, оцененный нами линейный размер внутренней полости молекулы β -CD равен 5.5 Å, молекулы HP- β -CD – 8.3 Å, линейные размеры полости увеличиваются после включения кверцетина. Молекула кверцетина практически планарна, оптимизация геометрии молекулы демонстрирует, что торсионный угол между кольцами АС и В равен 180°, внутри полости молекулы хозяина происходит «скручивание» молекулы кверцетина, торсионный угол между кольцами становится равен 149.5° в случае β -CD и 138.7° – в случае HP- β -CD. Данные представлены в таблице. Дипольный момент кверцетина, рассчитанный нами методом AM1, равен $\mu = 3.01$ Дебая, что отражает достаточно высокую полярность молекулы. После включения в комплекс с β -CD молекула кверцетина становится еще более полярна, а в комплексе с HP- β -CD – менее полярна (см. таблицу). Ранее авторы работы [15] получили значения дипольного момента μ кверцетина и семихинон-радикала кверцетина (локализованного в положении С4' кольца В), составляющие 3.013 и 4.963 Дебая соответственно. Одновременно происходит увеличение площади поверхности и объема молекулы кверцетина при встраивании в полость молекулы β -CD (см. таблицу).

ДИСКУССИЯ

В настоящей работе мы рассмотрели стехиометрию, константы ассоциации, геометрию, молекулярные свойства и спектральные параметры комплексов включения кверцетин- β -CD и кверцетин-HP- β -CD, получаемых методом длительного перемешивания в растворе и со-выпаривания. Ранее нами было проведено сравнение антиоксидантной и регуляторной активности кверцетина и комплекса его включения с гидроксипропил- β -циклодекстрином, рассчитана оптимальная структура молекул кверцетина и его окисленных форм, их молекулярные и электронные свойства, определены реакционные центры молекулы и наиболее стабильные продукты [24]. В настоящей работе методами квантовой химии мы показали, что формирование комплекса включения изменяет геометрию молекул «гостя» и «хозяина», увеличивает размеры внутренней полости β -CD и HP- β -CD, расположение колец в молекуле кверцетина и ее полярность. Полярность молекулы кверцетина определяется, во-многом, расположением гидроксильных групп, которое, вероятно, различно в комплексе «кверцетин-HP- β -CD» и «кверцетин- β -CD». Оптимизированная структура комплекса «кверцетин- β -CD» представлена на рис. 7, молекула кверцетина размещается во внутренней полости.

При этом несколько изменяются параметры, характеризующие сродство кверцетина к электрону и потенциал ионизации (параметры НОМО, LUMO), уменьшается стабильность молекулы кверцетина (незначительно уменьшается теплота образования, изменяется дипольный момент молекулы) (см. таблицу). Стабилизация комплекса происходит за счет образования нескольких межмолекулярных водородных связей (рис. 7), что регистрирует метод ИК-спектроскопии и демонстрирует квантово-химический расчет. Нами обнаружены различия в геометрии молекулы кверцетина во внутренней полости HP- β -CD и β -CD. Согласно нашей оценке размер внутренней полости комплекса «кверцетин-HP- β -CD» превышает размер полости комплекса «кверцетин- β -CD»). Известно, что гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль в формировании комплекса включения с β -циклодекстринами. При этом энтропийный (за счет удаления из гидрофобной полости циклодекстринов и реорганизация молекул воды) и энтальпийный (за счет прямого взаимодействия молекул «гостя» и «хозяина», в том числе за счет формирования водородных связей) эффекты вносят вклад в спонтанный процесс формирования комплекса [25].

Представленные нами ИК-Фурье-спектры кверцетина соответствуют полученным ранее [16–22]. Колебательные спектры молекулы флавоноида можно представить как результат слабого сопряжения бензопиранового (хромонового) и фенильного колец молекулы, при этом полагают, что полосы в области 1600 см^{-1} не могут быть отнесены к колебаниям С=О-группы. Колебания гидроксильных групп сопряжены с колебаниями колец флавоноида [26]. Формирование комплекса включения кверцетина и HP- β -CD приводит к существенным изменениям колебательных спектров компонентов по сравнению со спектром физической смеси. Изменения интенсивности и частот колебаний функциональных групп компонентов позволяют проследить структурные изменения кверцетина и образование новых связей в комплексе включения. Вероятно, карбонильная группа кверцетина участвует в формировании водородных связей с молекулой HP- β -CD. Включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс сопровождается длинноволновым сдвигом его УФ-спектра поглощения, вероятно, за счет разрушения ассоциатов молекул кверцетина при включении в комплекс (рис. 3 и 4). При этом, вероятно, не все группировки кверцетина погружены в полость циклодекстринов. Полярность молекулы кверцетина и его конформация различны в полости двух циклодекстринов.

Обнаруженное нами значительное увеличение растворимости кверцетина, включаемого в супрамолекулярный комплекс, по сравнению с на-

Рассчитанные молекулярные параметры кверцетина, β -циклодекстринов, комплексов «кверцетин- β -CD» и «кверцетин-HP- β -CD», а также кверцетина в структуре комплекса

	Кверцетин	β -CD	Комплекс включения «кверцетин- β -CD»	Кверцетин в структуре комплекса с β -CD	HP- β -CD	Комплекс включения «кверцетин- HP- β -CD»	Кверцетин в структуре комплекса с HP- β -CD
AM1							
Общая энергия, ккал/моль	-99165.11	-405061.73	-504212.81	-99155.97	-532187.24	-631342.68	-99161.99
Энергия связывания, ккал/моль	-3717.94	-14512.35	-18216.26	-3708.80	-21064.15	-24772.42	-3714.82
Теплота образования, ккал/моль	-216.659	-1603.265	-1805.892	-207.522	-1961.187	-2168.171	-213.542
E(HOMO), eV	-8.7458	-10.3033	-8.9054	-8.6285	-10.1299	-8.7635	-8.7788
E(LUMO), eV	-1.1319	1.2447	-1.0744	-0.7871	-11.4331	-7.3241	-7.74
$\Delta E = E(\text{HOMO}) - E(\text{LUMO}), \text{eV}$	-7.6138	-11.5480	-7.8309	-7.8414	-11.4331	-7.3241	-7.74
Дипольный момент, D	3.011	7.497	13.619	5.303	7.616	9.163	2.691
QSAR properties							
Объем, Å ³	751.12	2337.23	2711.59	764.29	3397.81	3776.27	761.53
Масса, а.е.м	302.24	1135	1437.24	302.24	1541.56	1843.80	302.24
Преломляющая способность	75.43	226.89	290.48	72.33	335.12	413.76	75.43
Поляризуемость	28.54	93.95	123.76	29.81	136.94	165.48	28.54
Энергия гидратации, ккал/моль	-32.67	-62.3	—	-30.52	-60.10	—	-33.16
Торсионный угол (C3 C2 B1' B2')	180			149.5			138.7

Примечание. Оптимизация структуры проведена в рамках полуэмпирического метода AM1 (The Austin Model 1) с использованием неограниченного метода Хартри-Фока.

тивным флавоноидом (растворимость возрастала более чем в 5 раз в случае 16 мМ β -CD и более чем в 50 раз — в случае 16 мМ HP- β -CD) указывает на повышенную биодоступность. Наши данные согласуются с данными работы [18], авторы которой обнаружили повышение водорастворимости кверцетина в 4,6 раза при концентрации 18 мМ β -CD. Подобным же образом в работе [27] было продемонстрировано, что формирование комплекса «кверцетин–метил- β -циклодекстрин» увеличивает растворимость комплекса (в 254 раза) и его антиоксидантную активность (на 10%).

Ранее разными авторами были описаны биохимические и фармакологические эффекты включения полифенолов в супрамолекулярные комплексы с циклодекстринами. В работе [28] было показано, что комплекс включения кверцетин-HP- β -CD сохраняет параметры электрохимического окисления флавоноида и способность хелатировать ионы железа, что связано с высвобождением флавоноида из полости молекулы «хозяина». Авторы работы [29] продемонстрировали, что комплексообразование кверцетина с β -CD (и лецитином) существенно улучшает водорастворимость флавоноида (растворимость кверцетина в воде в комплексе с β -CD возрастала в 24,9 раза) и его антиоксидантную активность и радикал-скевенжерные свойства.

Оцененная нами методом, описанным в работе [14], константа ассоциации комплекса включения «кверцетин– β -CD» (1:1) равна $K_s = 301 \pm 47 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует об относительно слабом взаимодействии между молекулами. Полученное нами значение кажущейся константы стабильности комплекса «кверцетин– β -CD» соответствует значениям, полученным ранее: авторы работ [30–32] продемонстрировали следующие значения: $K_s = 129 \text{ M}^{-1}$, 396 M^{-1} и 402 M^{-1} соответственно. С другой стороны, оно значительно ниже значений, представленных в работах [33–35] и составляющих $K_s = 602 \text{ M}^{-1}$, 709 M^{-1} и 1028 M^{-1} соответственно. Эти различия могут отражать влияние ионизации молекулы кверцетина при различных pH среды. Ионизированная форма кверцетина обычно формирует менее стабильные комплексы, чем неионизированная форма. Это объясняется повышенной гидрофильностью вещества при ионизации, что снижает взаимодействие между флавоноидом и гидрофобной полостью циклодекстрина (например, гидрофобные и вандер-ваальсовы взаимодействия).

Константа ассоциации комплекса значительно возрастает в случае HP- β -CD и равна $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$. Известно, что размер внутренней полости в молекуле HP- β -CD превышает размер полости в молекуле β -CD. Различия в значении констант комплексообразования в случае β -CD и

HP- β -CD можно объяснить вовлечением гидроксипропильных радикалов на поверхности молекулы HP- β -CD в формирование дополнительных связей между кверцетином и циклодекстрином и различиями в размерах внутренней полости β -CD и HP- β -CD. Ранее также было показано, что константа связывания и растворимость кверцетина в комплексе с β -циклодекстринами существенно выше в случае HP- β -CD по сравнению с β -CD, возрастая с увеличением числа групп заместителей, участвующих во взаимодействии с молекулой кверцетина, и гидрофобности молекул циклодекстринов [33].

ВЫВОДЫ

В настоящей работе мы рассмотрели стехиометрию, константы ассоциации и спектральные параметры комплекса включения «кверцетин–HP- β -CD», получаемого методом перемешивания в растворе и совыпаривания. Достоверное знание структуры, физико-химических параметров и биохимических эффектов платформ-носителей (β -CD) и их комплексов включения — необходимое условие успешного конструирования эффективных и безопасных переносчиков лекарственных средств. Кверцетин образует комплекс включения по типу «гость–хозяин» с β -циклодекстринами в молярном соотношении 1 : 1. Образование комплекса сопровождается увеличением растворимости кверцетина с ростом концентрации циклодекстрина (растворимость возрастала более чем в 5 раз в случае β -CD и более чем в 50 раз — в случае HP- β -CD), что указывает на повышенную биодоступность кверцетина в структуре комплекса. Оцененная нами методом построения фазовых диаграмм растворимости константа ассоциации комплекса с HP- β -CD равна $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует о высоком сродстве внутренней полости молекулы HP- β -CD к кверцетину. В ИК-Фурье-спектре кверцетина можно выделить полосы с максимумами 3315 и 3399 cm^{-1} (валентные колебания O–H-групп), полосу средней интенсивности 1664 cm^{-1} (валентные колебания свободной кетонной группы C=O) и полосу 1381 cm^{-1} (C–OH-колебания). Изменения интенсивности и частот колебаний функциональных групп компонентов при включении в комплекс свидетельствует о структурных изменениях кверцетина и образовании водородных связей, в которые вовлекаются карбонильная и гидроксильные группы молекул кверцетина и циклодекстринов. Квантово-химическое моделирование комплекса включения демонстрирует размещение молекулы кверцетина во внутренней

полости β -циклодекстринов, участие определенных группировок кверцетина и β -циклодекстринов в формировании комплекса, что приводит к изменению геометрии («скручиванию») и молекулярных свойств (дипольный момент, теплота образования) кверцетина, увеличению размеров полости, формированию водородных связей. Полученные результаты свидетельствуют о большем размере внутренней полости молекулы HP- β -CD по сравнению с β -CD, определенных различиях в геометрии и молекулярных свойствах молекулы кверцетина во внутренней полости HP- β -CD и β -CD, о формировании дополнительных связей, что объясняет значительно большее сродство кверцетина в случае HP- β -CD.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. D'Andrea, *Fitoterapia* **106**, 265 (2015).
- D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, et al., *Antioxidants & Redox Signaling* **18** (14), 1818 (2013).
- M. T. Mercader-Ros, C. Lucas-Abellán, M. I. Fortea, et al., in *Quercetin: Dietary sources, functions and health benefits* (Nova Science Pub Inc., 2012), pp. 179–198.
- C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933 (1996).
- X. Cai, Z. Fang, J. Dou, et al., *Curr. Med. Chem.* **20**, 2572 (2013).
- X. Chen, O. Q. Yin, Z. Zuo, and M. S. Chow, *Pharm. Res.* **22**, 892 (2005).
- M. E. Davis and M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 1023 (2004).
- Z. Aytac, S. I. Kusku, E. Durgun, and T. Uyar, *Food Chem.* **197**, 864 (2016).
- M. Liu, L. Dong, A. Chen, et al., *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **115**, 854 (2013).
- G. S. Borghetti, I. S. Lula, R. D. Sinisterra, and V. L. Bassani, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **10** (1), 235 (2009).
- D. W. Frank, J. E. Gray, and R. N. Weaver, *Am. J. Pathol.* **83** (2), 367 (1976).
- S. Gould and R. C. Scott, *Food Chem. Toxicol.* **43**, 1451 (2005).
- I. M. Savic, V. D. Nikolic, I. Savic-Gajic, et al., *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **82**, 383 (2015).
- T. Higuchi and K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instr.* **4** (2), 117 (1965).
- S. Erkoc, F. Erkoc, and N. Keskin, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* **631**, 141 (2003).
- S. B. Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, and M. I. Bhanger, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **71** (5), 1901 (2009).
- A. M. Mendoza-Wilson, H. Santacruz-Ortega, and R. R. Balandrán-Quintana, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **81** (1), 481 (2011).
- G. S. Borghetti, I. S. Lula, R. D. Sinisterra, and V. L. Bassani, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **10** (1), 235 (2009).
- J. Zhou, L.-F. Wang, J. Y. Wang, and N. Tang, *J. Inorg. Biochem.* **83** (1), 41 (2001).
- K. Dias, S. Nikolaou, and W. F. De Giovanni, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **70**, 154 (2008).
- M. Heneczowski, M. Kopach, D. Nowak, and A. Kuzniar, *Acta Polon. Pharmaceut. – Drug Res.* **58** (6), 415 (2001).
- R. F. V. Souza and W. F. Giovanni, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 1985 (2005).
- Э. Преч, Ф. Бюльманн и К. Аффольтер. *Определение строения органических соединений* (БИНОМ, М., 2006).
- Т. В. Ильич, А. Г. Вейко, Е. А. Лапшина и И. Б. Заводник, *Биофизика* **63** (4), 690 (2018).
- S. Belica, D. Jeziorska, P. Urbaniak, et al., *J. Chem. Thermodynamics* **70**, 160 (2014).
- G. Baranović and S. Šegota, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **192**, 473 (2018).
- K. Güleç and M. Demirel, *Curr. Drug Deliv.* **13** (3), 444 (2016).
- F. D'Aria, C. Serri, M. Niccoli, et al., *J. Therm. Anal. Calorim.* **130** (1), 451 (2017).
- Y. Zhang, J. Yu, X.-D. Dong, and H.-Y. Ji, *Molecules* **23**, 20 (2018).
- M. L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 365 (2004).
- M. C. Bergonzi, A. R. Bilia, L. Di Bari, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5744 (2007).
- T. Pralhad and K. Rajendrakumar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**, 333 (2004).
- C. Jullian, L. Moyano, C. Yañez, and C. Olea-Azar, *Spectr. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **67**, 230 (2007).
- E. R. C. Vinadé and P. R. Petrovick, *Rev. Port. Farm.* **XLVIII**, 149 (1998).
- Y. Zheng, I. S. Haworth, Z. Zuo, et al., *J. Pharm. Sci.* **94**, 1079 (2005).

Inclusion Complexes of Quercetin with β -Cyclodextrins: Ultraviolet and Infrared Spectroscopy, Quantum-Chemical Modeling

T.V. Ilyich*, E.A. Lapshina*, A.A. Maskevich**, A.G. Veiko*, A.V. Lavysh**, B. Palecz***, A. Stępnia***, V.U. Buko****, and I.B. Zavodnik*

**Department of Biochemistry, Yanka Kupala State University of Grodno, bul. Leninskogo Komsomola 50, Grodno, 230030 Belarus*

***Department of General Physics, Yanka Kupala State University of Grodno, ul. Ozheshko 22, Grodno, 230023 Belarus*

****Faculty of Chemistry, University of Lodz, ul. Pomorska 165, Lodz, 90-236 Poland*

*****Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, National Academy of Sciences of Belarus, bul. Leninskogo Komsomola 50, Grodno, 230030 Belarus*

The aim of the present study was to evaluate the parameters of formation of supramolecular inclusion complex between quercetin, the flavonoid, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, the molecular container, using ultraviolet and infrared spectroscopy and quantum-chemical modeling. The water solubility of quercetin increased by more than 50 times when included in the supramolecular complex with the concentration of hydroxypropyl- β -cyclodextrin 16 mM. The results showed that quercetin bioavailability was improved after encapsulating by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The association constant for the inclusion complex with a 1 : 1 mixture of quercetin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin determined by Higuchi and Connors method was equal to $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$. The formation of the inclusion complex results in considerable changes in the vibrational spectra of components compared to the spectrum of physical mixture of quercetin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin; this also happens because of hydrogen bond formation. The molecular modeling of the inclusion complex has shown that after encapsulation of quercetin molecule ("guest") inside the cavity of β -cyclodextrins ("host"), the geometry and properties of the components change. The torsion angle between the rings of the planar quercetin molecule in the complexes with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin is equal to 149.5° and 138.7° , respectively.

Keywords: quercetin, β -cyclodextrin, UV- and IR spectroscopy, quantum chemical modeling, association constant

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

© 2020 г. А.Б. Узденский

Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

E-mail: auzd@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 03.02.2020 г.

Удивительно небольшое количество генов человека (19–20 тысяч) не согласуется с намного большим числом белков и количеством их функций. Один из факторов функционального разнообразия — многофункциональность белков. Важным подвидом таких белков являются moonlighting белки, у которых одна полипептидная цепь в разных условиях выполняет две и более функций. Часто это избыточные белки домашнего хозяйства — гликолитические, рибосомные и т.д. В обзоре рассмотрены структуры и функции нескольких таких белков — рибосомного белка рS3, цитохрома с, глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназы, факторов транскрипции STAT3, β-катенина и р53. Важную роль в переключении их функций играют нарушение баланса процессов синтеза, использования и деградации, изменение внутриклеточной локализации, посттрансляционные модификации. Отмечена существенная роль внутренне неупорядоченных участков в формировании межмолекулярных комплексов с другими белками и нуклеиновыми кислотами. Обсуждается вопрос о возникновении многофункциональных белков в ходе эволюции.

Ключевые слова: многофункциональные белки, цитохром с, GAPDH, β-катенин, STAT3, р53.

DOI: 10.31857/S0006302920030059

Молекулярная биология двадцатого столетия базировалась на ряде классических постулатов, таких как «В ДНК содержится информация о структуре всех белков и РНК организма». К ним также относилось утверждение Бидла и Тэйтума (1941): «Один ген — один фермент» [1], которое позднее трансформировалось в постулат «Один ген — один белок», а после уточнения — «Один цистрон — одна полипептидная цепь». Другой важнейший постулат сформулирован Анфинсеном [2]: «Первичная структура белка, т.е. последовательность аминокислот, которая однозначно определяет последовательность нуклеотидов в ДНК, однозначно определяет его пространственную структуру и функциональную активность».

Но факты, полученные в последнее время, показали, что эти положения не вполне соответствуют современному состоянию молекулярной

биологии. Сначала предполагали, что у человека порядка миллиона генов. Потом эту оценку снизили до 40–100 тысяч. Но секвенирование геномов человека и других организмов в начале XXI века привело к ошеломляющему открытию: у человека всего около 20 тысяч генов, кодирующих белки [3]. Это величина того же порядка, что у примитивной нематоды *Caenorhabditis elegans*. Откуда же берется сложность организма? В чем, если не в генах, причина отличия человека от червя? Вероятно, дело не столько в генах, сколько в белках. Действительно, количество белков значительно больше числа генов. Тут нет никакого однозначного соответствия. Точное количество белков неизвестно. В базе данных UniProtKB/Swiss-Prot на 2014 г. зафиксировано около 500 тысяч белковых аминокислотных последовательностей [4]. В банке данных Protein Data Bank представлены более 150 тысяч трехмерных структур белков [5]. Количество структурных протеоформ, т.е. локальных вариаций исходной аминокислотной последовательности, которые определяются в тканях с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии, двухмерно-го или капиллярного электрофореза и других методов, составляет несколько миллионов [6, 7]. А число идентифицированных полиморфизмов в

Сокращения: MLP — moonlighting proteins, Araf-1 — Aporotic protease-activating factor 1, GAPDH — глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназа, STAT3 — signal transducer and activator of transcription 3, DBD — DNA-binding domain (домен, связывающийся со специфическими участками ДНК), TAD — transactivation domain (трансактиваационный домен), р53RE — р53-response element, TET — tetramerization domain (домен, ответственный за тетрамеризацию), IDR — intrinsically disordered regions (внутренне неупорядоченные участки).

человеческом геноме превышает 150 миллионов [7]. Несомненно, что информация о всех клеточных белках содержится в геноме. Но почему количество белков в разы превышает количество генов?

Основными источниками разнообразия протеоформ являются: альтернативный сплайсинг мРНК, аминокислотные замены в белках в результате однонуклеотидного полиморфизма (SNP — single nucleotide polymorphism) и ковалентные посттрансляционные модификации. В случае посттрансляционных модификаций к белкам присоединяются небольшие молекулярные группы — метильные, ацетильные, фосфатные и т. п. или большие полимерные цепи — липидные, углеводные (гликозилирование), белковые (убиквитинирование), нуклеотидные (поли-АДФ-рибозилирование). От белков также могут отщепляться небольшие ингибирующие пептиды. Все же, несмотря на огромное разнообразие протеоформ, количество канонических белков, которые встречаются чаще альтернативных форм, и которые наиболее похожи на ортологи-ческие формы белков у других организмов [7], значительно превосходит число генов. В каждой клетке есть свой набор белков, состав и количество которых (белковый профиль) динамичны и определяются сложнейшей сетью сигнальных каскадов, реагирующих на внешние воздействия, меняющих метаболизм и гомеостаз.

Белковое разнообразие можно условно разделить на разнообразие структур и разнообразие функций. Различные белковые структуры, например, разные сплайсоформы, могут, хотя и с разной эффективностью, выполнять одну и ту же функцию. С другой стороны, один белок может в разных условиях выполнять разные функции. Тем не менее большое число структурных протеоформ не означает такое же большое число выполняемых ими функций. Многие протеоформы не активны и ликвидируются в клетке. Замены аминокислот могут носить безразличный характер и не влиять на активность белка, хотя во многих случаях они приводят к нарушениям функций и гибели клетки [7].

Важнейший механизм белкового разнообразия и происхождения новых белков — альтернативный сплайсинг, при котором из пре-мРНК вырезаются значительные фрагменты — интроны, а оставшиеся фрагменты — экзоны — сшиваются и после дополнительного процессинга формируют зрелую мРНК. В среднем, в каждом гене содержится четыре-пять экзонов, иногда их больше десятка, и разные их комбинации могут в принципе дать начало новым белкам [8]. Количество сплайсоформ, т.е. РНК-транскриптов, в клетках человека оценивалось в 80–200 тысяч, т.е. от четырех до десяти на каждый ген [9]. Однако изучение реально существующих сплайсо-

форм показывает, что в результате экспрессии большинства генов реализуется одна основная белковая изоформа, которая оптимально соответствует биологическому предназначению, более консервативна и не имеет нарушений в функциональных доменах. Альтернативный сплайсинг ткане- и видоспецифичен: в других тканях или в других организмах могут преобладать альтернативные сплайсоформы, но обычно их количество ограничено. Хотя многие пре-мРНК могут подвергаться альтернативному сплайсингу, большинство возможных сплайсоформ в клетках не образуется и не транслируется [9]. Например, ген белка-предшественника амилоида (APP — amyloid precursor protein) содержит 18 экзонов. Однако из множества возможных комбинаций в клетках встречаются только три похожие альтернативные изоформы: APP695, APP751 и APP770, из которых в мозге преобладает APP695 [10]. По всей видимости, альтернативный сплайсинг играет ограниченную роль в сложности клеточного протеома, в его белковом разнообразии.

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Многофункциональность белков обеспечивается их структурой, доменной организацией. Переключение функций может происходить при связывании аллостерических регуляторов, посттрансляционных модификациях, изменении внутриклеточной локализации и микроокружения, при внешних воздействиях и т.д. Это в разы увеличивает функциональную предопределенность, задаваемую генами. В базе данных Multi-taskProtDBII на декабрь 2018 г. собраны данные о почти 700 многофункциональных белках (табл. 1) [11, 12].

Схематично белки можно разделить на две категории:

1. «Ферменты», в активном центре которых осуществляются биохимические или биофизические процессы, т.е. разрыв или образование химических связей в результате перестройки электронных оболочек атомов; переноса заряженных частиц (электронов, протонов, ионов) или фрагментов молекул и т.д.

2. «Платформы», у которых поверхностные участки распознают комплементарные поверхности других молекул при сборке надмолекулярных комплексов. Процессы сборки включают поиск и сближение взаимодействующих молекул за счет дальнедействующих сил (электростатических, ван-дер-ваальсовых); причаливание (докинг), связывание комплементарных поверхностей с участием электростатических, ван-дер-ваальсовых, водородных и гидрофобных взаимодействий; конформационную подстройку и активацию комплекса. На распознавании и взаимо-

Таблица 1. Базы данных о moonlighting-белках

Базы данных MLP	Число MLP белков (на декабрь 2018)	URL
MultitaskProtDB-II (мультифункциональные белки, включая MLP)	694	http://wallace.uab.es/multi taskII
MoonProt	361	http://moonlightingproteins.org/
MoonDB v2.0	351	http://moondb.hb.univ-amu.fr/

действию «платформ» основана самосборка белковых комплексов и комплексов белков с нуклеиновыми кислотами (рибосомы, нуклеосомы, транскрипционные и репарационные комплексы и т.п.). В зависимости от прочности взаимодействия такие комплексы могут быть стабильными или короткоживущими.

С физиологической точки зрения, многие сигнальные белки, такие как протеинкиназы, фосфатазы, ацетилтрансферазы или деацетилазы, многофункциональны. Осуществляя посттрансляционные модификации (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и т.п.), они активируют или ингибируют разные белки, включают, выключают или переключают их функции и тем самым регулируют разнообразные клеточные процессы. Более высокий уровень регуляции — факторы транскрипции, регулирующие экспрессию целых комплексов функционально связанных белков. Они осуществляют сложные, комплексные реакции клеток: изменение функциональной активности, переключение метаболизма, деление, апоптоз и т.д. Физиологические функции таких регуляторных белков опосреду-

ются тем набором белков, который они модифицируют.

Мы рассмотрим белки, функции которых не опосредуются другими белками. Они непосредственно трансформируют субстраты или осуществляют молекулярное узнавание при сборке надмолекулярных комплексов. Их функции переключаются при изменении условий.

MOONLIGHTING PROTEINS

В последние годы привлекают внимание moonlighting proteins (MLP, от термина moonlighting — работа по совместительству). MLP — подгруппа многофункциональных белков, у которых одна полипептидная цепь, кодируемая одним геном, может образовывать разные пространственные структуры и в разных условиях выполнять две и более биохимических или биофизических функций. У них каждая функция регулируется независимо от других, а инактивация одной не влияет на другие [13–18]. Функционально MLP — комбинация доменов типа «фермент» и/или участков распознавания типа «платформа» (рис. 1).

Таких MLP уже найдено несколько сотен на всех ступенях эволюционного дерева от бактерий до высших организмов, причем многие из них весьма консервативны [11, 12]. Функции MLP разнообразны. Часто это избыточные белки домашнего хозяйства, экспрессирующиеся в клетках в больших количествах, как, например, некоторые компоненты гликолиза, цикла Кребса, шапероны, белки рибосом, факторы транскрипции, компоненты цитоскелета, рецепторы клеточной поверхности, белки клеточной адгезии и т.д. [13–17]. Так, семь из десяти белков гликолиза, семь из восьми белков цикла Кребса, ряд белков рибосом (gpS3, gpL10A, gpL13a и др.) — это MLP. Информация о более 350 MLP представлена в базах данных MultitaskProtDB-II, MoonProt и MoonDB v2.0 (табл. 1) [11, 12]. Примеры разных MLP приведены в табл. 2. Рассмотрим некоторые из них.

Рибосомный белок gpS3. Более десятка рибосомных белков, участвуют также в других белковых комплексах в клеточном ядре и задействованы в репарации ДНК и регуляции транскрипции.

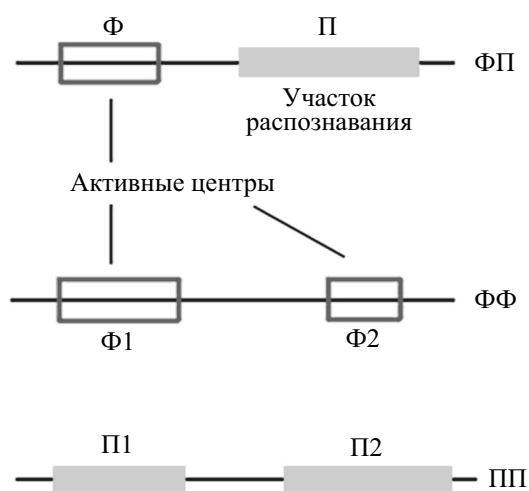


Рис. 1. Комбинации доменов типа фермент (Ф) и/или участков распознавания типа платформа (П) в MLP-белках: (а) — белок типа «фермент»–«платформа», (б) — белок типа «фермент»–«фермент», (в) — белок типа «платформа»–«платформа».

Таблица 2. Некоторые примеры MLP-белков

Белок	Функция 1	Функции 2 +	Тип
ε-Кристаллин	Структурный компонент хрусталика	Лактатдегидрогеназа (гликолиз)	ПФ
τ-Кристаллин	Структурный компонент хрусталика	Энолаза (гликолиз)	ПФ
Лактатдегидрогеназа	Гликолиз	ssDNA-связывающийся белок	ФП
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Гликолиз	15–20 разных функций, в т.ч. трансферриновый рецептор, опосредующий поглощение Fe, тимидингидроксилаза, контроль везикулярного транспорта, экспорт тРНК из ядра, ssDNA-связывающийся белок и др. У бактерий – адгезин, токсин, инвазин	ФФ, ФП
Аконитаза	Цикл Кребса (цитрат → изоцитрат)	Гомеостаз Fe: при недостатке Fe активирует экспрессию генов регулирующих поглощение Fe; поддерживает стабильность мтДНК	ФФ, ФП
Цитохром c	Переносчик электронов в митохондриях	В цитозоле в комплексе с Araf-1, dATP и прокаспазой 9 инициирует апоптоз	ФП
grS3	Белок малой субъединицы рибосомы	Фосфорилируется РКСδ, приобретает эндонуклеазную активность и участвует в репарации ДНК; связываясь с NF-κB, участвует в регуляции экспрессии генов	ПФ, ПП
STAT3	Фактор транскрипции	Активатор электронного транспорта в митохондриях	ПП
β-Катенин	Клеточная адгезия	Фактор транскрипции	ПП
p53	Фактор транскрипции	Регулирует клеточный цикл и репарацию ДНК; в митохондриях стимулирует апоптоз	ПП

Примечание. Типы MLP-белков: ПФ – «платформа»–«фермент», ФП – «фермент»–«платформа», ФФ – «фермент»–«фермент», ПП – «платформа»–«платформа».

Так, белок grS3, входящий в состав малой субъединицы рибосомы 40S, может выполнять ряд дополнительных функций [19–21]. После синтеза в цитоплазме он с помощью импортина-α переносится в ядро. Большая его часть идет на синтез малой субъединицы рибосомы, но некоторое количество участвует в реализации транскрипционной функции фактора NF-κB. Белок grS3 усиливает аффинность к промоторам субъединицы p65 белка NF-κB, которая связывается с доменом КН (рис. 2) и направляет NF-κB к контролируемым им генам. С-концевой домен grS3 (рис. 2) участвует в репарации ДНК [21]. Разные функции grS3 обусловлены фосфорилированием ряда аминокислот и связыванием различных белков с его доменами. После фосфорилирования серина 209 и треонинов 42 и 221 протеинкиназами ИККβ, ERK и РКСδ соответственно (рис. 2) grS3 участвует в распознавании повреждений ДНК и, благодаря эндонуклеазной активности, вносит вклад в эксцизионную репарацию. При избытке grS3 его до-

мен КН может связывать p53 и стимулировать апоптоз. Сверхэкспрессия grS3 приводит к конденсации ДНК, деградации белков PARP и ламин A/C, а также к экспрессии проапоптозных каспаз 3, 8 и 9 [21]. Также grS3 может связываться с бактериальными белками NleH1 и NleH2, регулируя ответ клетки на микробный патогенез [29]. Белок grS3 проявляет MLP-функции скорее по типу «платформа»–«платформа» или «платформа»–«платформа»–«платформа», чем по типу «фермент»–«платформа».

Другие рибосомные белки также проявляют MLP-свойства. Так, при рибосомном стрессе, когда в клетке нарушен синтез рибосом, белки рибосом grL5, grL11 и другие подавляют активность убиквитинлигазы MDM2, которая инициирует протеасомную деградацию белка p53. Это приводит к стабилизации и активации p53 и стимуляции апоптоза. В последнее время такое свойство обнаружено уже у четырнадцати рибосомных белков. Предполагается, что это связано с выра-

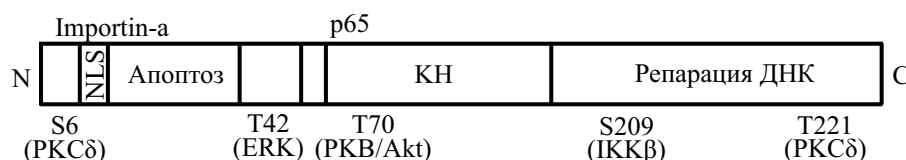
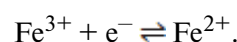


Рис. 2. Структурная схема и места посттрансляционных модификаций рибосомного белка р53. Указаны сайты фосфорилирования серина S6 и треонина T221 протеинкиназой PKCδ, серина S209 — киназой IKKβ, треонина T42 — киназой ERK и треонина T70 — киназами PKB/Akt.

ботавшейся в ходе эволюции реакции организмов на нестабильность генома. В эукариотических клетках гены, кодирующие различные рибосомные белки, разбросаны по разным хромосомам. Но в рибосомы эти белки должны поступать в одинаковом количестве. При геномной нестабильности возможен дисбаланс, нарушающий сборку функционирующих рибосом. Таким образом, влияя на способность белков MDM2 и p53 регулировать апоптоз, организм избавляется от клеток с нестабильностью генома [22].

Цитохром с. Цитохром с — древний белок, распространенный на всех уровнях эволюционного дерева от микроорганизмов до эукариот. Он играет важнейшую роль в биоэнергетике клетки. В

митохондриях он переносит электроны, а после перемещения в цитозоль стимулирует апоптоз [23, 24]. В эукариотических клетках после синтеза в цитозоле апоцитохром с переносится в межмембранное пространство митохондрий. Там два его цистеиновых остатка связывают гем, создавая цитохром с, который диффундирует по поверхности внутренней митохондриальной мембраны и переносит электроны от цитохрома c_1 комплекса III к цитохромоксидазе в комплексе IV благодаря окислительно-восстановительным превращениям гемового железа:



Митохондриальный цитохром с имеет консервативную трехмерную структуру. Его простота, стабильность и доступность позволили тщательно изучить на атомном уровне процессы электронного транспорта с его участием. Но его moonlighting-свойства и структурные перестройки в разных ситуациях пока изучены не так детально. Цитохром с имеет сравнительно гибкую структуру, легко перестраивающуюся при разных молекулярных взаимодействиях и изменении локализации. Выявлен ряд структурных модификаций цитохрома с в разных условиях. Он также может подвергаться разным посттрансляционным модификациям: фосфорилированию, нитрозилированию, и др. Показано, что кроме нативной конформации цитохром с может переходить в альтернативную, частично развернутую форму, в которой он не переносит электроны, а вовлекается в moonlighting-функции [23].

Если цитохром с выходит из митохондрий в цитозоль через разрывы или мегаканалы в наружной митохондриальной мембране, образованные белками Bax и Bak, он инициирует образование апоптосомы — мультибелкового комплекса, стимулирующего апоптоз [23–25]. За счет электростатических взаимодействий он связывается с двумя «пропеллерными» доменами цитозольного мономерного белка Araf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1). Это приводит к изменению конформации Araf-1, ведущему к замене связанного ADP на dATP, и образуется апоптосома — стабильный гептамерный комплекс из семи субъединиц «Araf-1–dATP–цитохром с» (рис. 3) [23–26]. Апоптосома отщепляет от прокаспазы 9 ин-

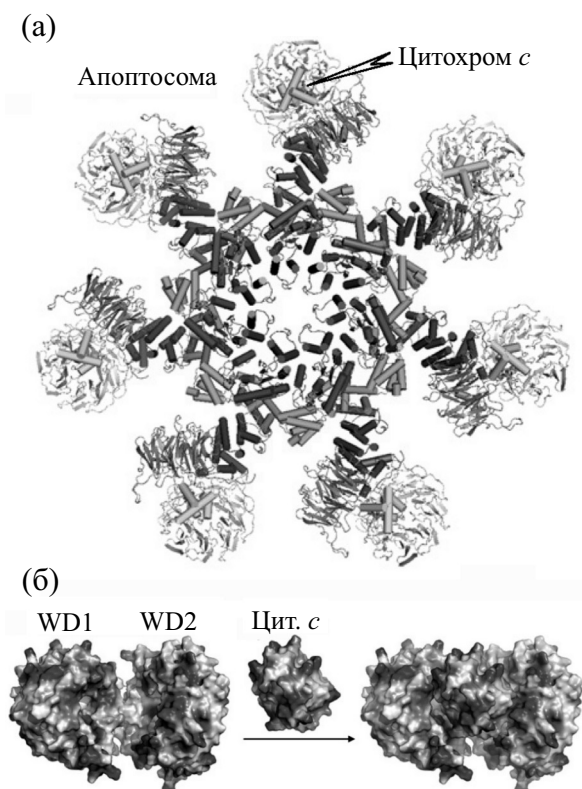


Рис. 3. Структура апоптосомы, образованной семью белками Araf-1 со встроенными цитохромами с (а). Комплементарное связывание цитохрома с доменами WD1 и WD2 белка Araf-1 (согласно работе [24]).

гибиторный фрагмент. Получившаяся каспаза 9 активирует каспазу 3, запуская дальнейшие апоптотические процессы. Интересно, что такая структура апоптосомы — позднее эволюционное приобретение. У нематоды *C. elegans* апоптосомы состоят из четырех белков CED-4, гомологов Araf-1, а у дрозофилы — из восьми белков Dronc. Эти апоптосомы не содержат цитохрома *c*, который присутствует только в апоптосомах позвоночных животных [25, 27]. Недавно показано, что при повреждении ДНК цитохром *c* может транслоцироваться в ядро, где он препятствует сборке нуклеосом, что снижает выживаемость клеток. Правда, молекулярные механизмы этой транслокации и структурные превращения цитохрома *c* пока не выяснены [23].

Таким образом, цитохром *c* представляет собой MLP типа «фермент»–«платформа».

Бифункциональные белки. У бифункциональных белков, кодируемых одним геном, обычно имеются два активных центра в разделенных полипептидной цепью доменах, которые выполняют разные функции. Это MLP типа «фермент»–«фермент». Часто они катализируют последовательные реакции одного метаболического пути с переносом между ними субстрата или интермедиата (substrate channeling) для того, чтобы сократить его путь, предотвратить взаимодействие с внешними метаболитами и утечку в среду. При этом каталитический акт в центре А стимулирует перенос интермедиата и вызывает открывание «ворот» для интермедиата в центре Б и/или его активацию. Линкер, соединяющий домены, играет важную роль в стабилизации конформации одного из доменов и передаче сигнала об активации одного домена к другому [28–32]. В механизме «ворот» часто участвуют ароматические аминокислоты, благодаря их способности к ротации. Их небольшой поворот может вызвать существенное перемещение боковых цепей и конформационный переход, увеличивающий ширину «ворот» [29, 30].

Примером такого бифункционального белка является триптофансинтаза. В ней домен α расщепляет индол-3-глицеролфосфат на индол и D-глицеральдегид-3-фосфат. После конформационного перехода и перемещения индола по 25-ангстремному туннелю домен β катализирует соединение индола и серина в триптофан. В середине туннеля, в домене β , стенки туннеля содержат Tyr279 и Phe280. Повороты их ароматических колец обуславливают динамическое равновесие между альтернативными конформациями, открывающими или закрывающими туннель. Связывание субстрата с α -субъединицей приводит к закрыванию туннеля, а после расщепления субстрата равновесие между открытой и закрытой

формами восстанавливается, и индол передается в β -субъединицу [29].

Еще один бифункциональный фермент — глюкозамин-6-фосфатсинтаза. В ее N-доме (i) из глутамина высвобождается NH_3 , и это вызывает конформационный переход с открыванием 18-ангстремного туннеля, по которому NH_3 переносится в C-домен (ii) на фруктозо-6-фосфат, в результате чего синтезируется глюкозамин-6-фосфат [29].

Метаморфные белки. Так называемые метаморфные белки в физиологических условиях могут обратимо переключаться между фиксированными конформациями. Это возможно, если потенциальный барьер для перехода не очень большой и глубина потенциальных ям не сильно различается, в отличие от необратимого перехода в более глубокую потенциальную яму, ловушку, характерную для стабильной конформации неправильно свернутого белка (misfolding trap). Между этими формами устанавливается динамическое равновесие. Структурные переходы облегчаются наличием гибкого участка в середине полипептидной цепи.

Хорошо изученный пример метаморфного белка — сверочный белок Mad2, который контролирует правильность сборки митотического веретена и инициирует остановку митоза [33]. В отсутствие лигандов неактивная открытая (O-Mad2) и активная закрытая (C-Mad2) конформации этого белка находятся в динамическом равновесии. Центральное ядро Mad2 сохраняет свою структуру, а фрагменты на C- и N-концах подвергаются значительной структурной перестройке. Переход между открытой и закрытой конформациями обеспечивает правильное прикрепление микротрубочек к кинетохорам, что необходимо для точного расхождения хромосом во время митоза [33].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Поражительный пример MLP — гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Этот многофункциональный белок называют «квинтэссенцией MLP». Кроме гликолиза, он участвует в выполнении до двадцати разных функций. Многообразие его функций определяется олигомеризацией, межмолекулярными взаимодействиями, различным микроокружением в разных клеточных компартментах и посттрансляционными модификациями [34–40]. Так, на клеточной поверхности GAPDH образует комплекс с трансферриновым рецептором, который опосредует поглощение железа клетками [38]. Связывание GAPDH с клеточной мембраной способствует слиянию мембран и эндоцитозу. Цитоплазматическая GAPDH участвует в пузырьковом транспорте от эндоплазматического ретикула к цистернам комплекса Гольджи. Она

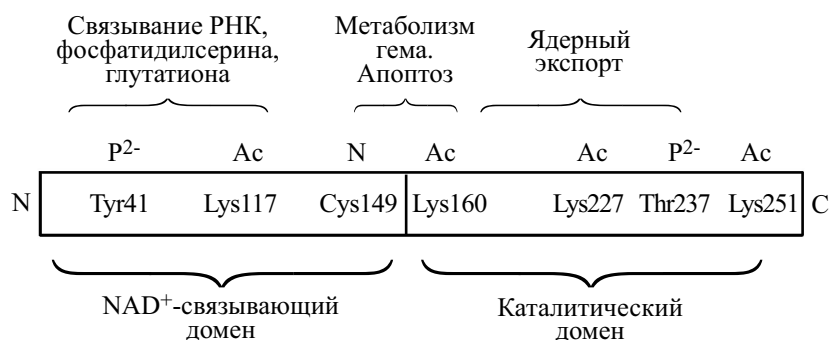


Рис. 4. Структура, функции и пост-трансляционные модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Обозначены аминокислоты, подвергающиеся фосфорилированию (P²⁻), ацетилованию (Ac) и нитрозилованию (N).

также регулирует стабильность мРНК. В ядре GAPDH участвует в поддержании целостности ДНК, регуляции экспрессии генов, экспорте тРНК из ядра, а также в регуляции апоптоза [34–37]. Это позволяет рассматривать GAPDH как центральный регулятор клеточного метаболизма и информационный центр [34–36, 39, 40].

GAPDH – вездесущий и избыточный белок, высококонсервативный на протяжении всей эволюционной лестницы. В соматических клетках он кодируется единственным геном; альтернативных транскриптов не обнаружено. GAPDH состоит из 335 аминокислот и имеет массу 37 кДа. Его кофактор – NAD⁺. В структуре GAPDH выделяют NAD⁺-связывающий домен из 150 аминокислот и каталитический домен (аминокислоты 151–335) (рис. 4). NAD⁺-связывающий домен участвует в стабилизации мРНК и регуляции трансляции. Мембранные функции GAPDH основаны на связывании фосфатидилсерина в пределах NAD⁺-связывающего домена на внутренней стороне клеточной мембраны (аминокислоты 70–94). Связанная с мембраной GAPDH катализирует слияние мембран, а также регулирует поглощение, транспорт и метаболизм Fe²⁺. GAPDH также связывает глутатион (аминокислоты 67–77). Каталитический домен участвует в экспорте тРНК из ядра (аминокислоты 258–270) [37, 38, 41].

Экспрессия GAPDH в клетках динамична и чувствительна к условиям внутри клетки – уровню Ca²⁺, гипоксии, концентрации железа, стадии клеточного цикла и т.д. [37]. Функциональная активность GAPDH существенно регулируется. Имеется много данных о роли посттрансляционных модификаций, таких как ацетилирование лизина 117, 160, 227 и 251, фосфорилирование треонина 237 и тирозина 41, нитрозилование цистеина 149 и др. (рис. 4) в множественности функций GAPDH. Например, цистеин 149 весьма чувствителен к окислению, что делает GAPDH одним из

редокс-сенсоров в клетке и регуляторов клеточного гомеостаза [39, 40]. Его окисление повышает способность GAPDH связываться с тРНК и ДНК [41], а нитрозилование оксидом азота регулирует метаболизм гема, клеточный ответ на окислительный стресс и апоптоз [38]. Ацетилирование лизина 160 влияет на экспрессию ряда генов, кодирующих проапоптотические белки p53, pUMA и Вах. Фосфорилирование GAPDH влияет на везикулярный транспорт, синаптическую передачу [34, 35]. Однако точные биофизические и биохимические механизмы такого разнообразия функций пока выяснены не полностью.

В настоящее время проведены более ста исследований трехмерной структуры GAPDH из разных организмов от микробов до человека, как отдельно, так и вместе с разными субстратами, интермедиатами, продуктами, ингибиторами и т.д. GAPDH обычно присутствует как гомотетрамер или, точнее, как димер из двух димеров, состоящий из четырех одинаковых субъединиц [37]. В трехмерной структуре тетрамера GAPDH выделяются две поперечные бороздки длиной 70 Å, которые охватывают участки связывания субстрата и кофактора NAD⁺. Предполагается, что эти области могут связывать нуклеиновые кислоты, так как в них находится много положительно заряженных остатков лизина и аргинина. Узкий центральный канал (4 × 10 Å) хорошо связывает небольшие молекулы. Несмотря на обилие структурных данных, еще многое необходимо выяснить для понимания биофизических и биохимических механизмов реакций, опосредованных GAPDH. В гликолизе GAPDH фосфорилирует D-глицеральдегид-3-фосфат и переводит его в 1,3-бисфосфоглицерат (BPG). Предполагается, что это происходит в два этапа. Сначала осуществляется нуклеофильная атака на D-глицеральдегид-3-фосфат цистеином C152 GAPDH с переносом гидрида на NAD⁺. При этом H179 является основным катализатором. Затем происходит нуклеофильная атака неорганического

фосфата на карбонильную группу тиоэфира с последующим ее фосфорилированием [37]. Механизмы других moonlighting-функций GAPDH еще предстоит выяснить. Пока неизвестно, как осуществляется переключение функций и изменение локализации GAPDH в клетках. Например, она не содержит сигнала ядерной локализации NSL, но обнаруживается в ядре. Оказалось, что протеинкиназа AMPK, фосфорилируя серин 122, индуцирует переход GAPDH в ядро, а фосфорилирование треонина 237 протеинкиназой Akt предотвращает это перемещение. Но механизмы этих процессов пока неясны [37].

ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Факторы транскрипции управляют целым комплексом клеточных реакций, иницилируя экспрессию множества белков, выполняющих или регулирующих данную функцию. Среди них выделяются несколько мастер-регуляторов, которые, в отличие от сравнительно узконаправленных факторов транскрипции, как например Nrf-2, регулирующий экспрессию группы антиоксидатных генов, обладают невероятно широким спектром действия. К ним относятся такие белки, как c-Myc и p53, которые регулируют экспрессию до 10–15% всех генов [42, 43]. Но кроме регуляции экспрессии генов многие факторы транскрипции могут выполнять и другие функции, являясь moonlighting-белками. Рассмотрим несколько важных примеров.

Белок STAT3. Белок STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) играет ключевую роль в клеточном росте и выживании. Это фактор транскрипции, но перемещаясь в митохондрии, он регулирует окислительное фосфорилирование [44, 45]. Связывание интерлейкинов 6 или 10 с рецептором цитокинов на поверхности клетки активирует цитоплазматическую киназу JAK, которая фосфорилирует тирозин в STAT3. Это иницирует димеризацию STAT3 и перемещение его в клеточное ядро, где он как фактор транскрипции контролирует экспрессию ряда генов [45]. Если же под влиянием внутриклеточных сигнальных путей цитоплазматические протеинкиназы фосфорилируют сериновые остатки в STAT3, то он перемещается в митохондрии, где активирует перенос электронов от комплексов I и II на комплекс III, что повышает интенсивность окислительного фосфорилирования (рис. 5б). Так, с помощью STAT3 различные сигнальные пути могут регулировать биоэнергетические процессы в митохондриях [44].

Известны две изоформы STAT3 α и STAT3 β с молекулярной массой 770 и 705 Да соответственно. Основные домены в STAT3 α (рис. 5а): N-концевой домен NTD (аминокислоты 1–137), участ-

вующий в димеризации и даже тетрамеризации STAT3, которая усиливает его транскрипционную активность; суперспиральный домен CDD (аминокислоты 138–320), связывающийся с различными регуляторными белками; домен DBD (DNA-binding domain), связывающийся со специфическими участками ДНК (аминокислоты 321–493); линкерный домен LD (аминокислоты 494–582); SH2 домен (аминокислоты 583–687), связывающийся STAT3 с фосфорилированными рецепторами. Фосфорилирование тирозина в STAT3 киназами JAK и Src приводит к его димеризации и переносу в ядро. С-концевой трансктивационный домен TAD (transactivation domain, аминокислоты 688–770; у STAT3 β укорочен до 705-й аминокислоты). Он внутренне неупорядочен и по-разному сворачивается при взаимодействии с разными партнерами при формировании транскрипционных комплексов [45, 46]. При взаимодействии с ДНК белок STAT3 димеризуется так, что домены DBD охватывают ДНК. Также эти домены могут связываться с импортином или экспортином для импорта STAT3 в ядро или экспорта его в цитоплазму. Таким образом, STAT3 – moonlighting-белок типа «платформа»–«платформа».

β -Катенин. β -Катенин – высококонсервативный белок из 781 аминокислот – имеет интересную структуру [47–49]. Его центральная область содержит несколько повторов из примерно 40 аминокислот (например, у человека – двенадцать повторов), которые образуют жесткий удлинённый домен ARM (от слова armadillo – броненосец). Из-за сложной формы отдельных повторов домен ARM имеет небольшую кривизну (рис. 6). Его внутренняя поверхность может связывать различные белки и нуклеиновые кислоты. N-концевой и C-концевой фрагменты β -катенина внутренне неупорядочены. В растворе они не имеют определенной структуры. Но они играют решающую роль в связывании β -катенина с другими белками и ДНК. N-концевой фрагмент содержит консервативный короткий линейный мотив (SLiM – short linear motif), который после фосфорилирования связывается с убиквитинлигазой β -TrCP, стимулирующей его протеасомную деградацию. С-концевая область при взаимодействии с ДНК является сильным активатором транскрипции. Этот сегмент не полностью неупорядочен: его участок на С-конце образует стабильную спираль (HelixC), которая располагается вблизи домена ARM. Хотя эта спираль не необходима для участия β -катенина в клеточной адгезии, она важна для регуляции транскрипции [48, 49].

После синтеза β -катенин встраивается в плазматическую мембрану, где вместе с винкулином, α -катенином и катенином p120 образует платформу для связывания цитоплазматического

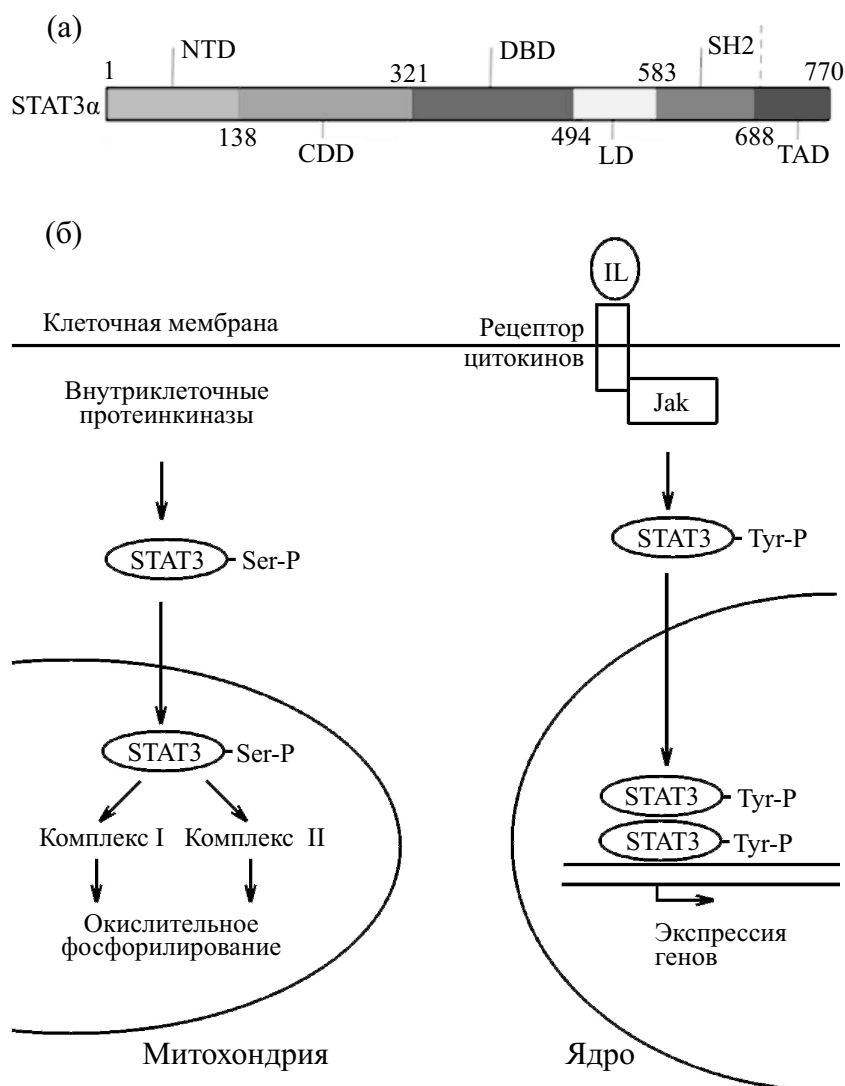


Рис. 5. Структура и функции STAT3. (а) – Схема основных структурных доменов STAT3: NTD – N-концевой домен, CDD – суперспиральный домен, DBD – ДНК-связывающий домен, LD – линкерный домен, SH2 – SH2-домен, TAD – трансаkтиваторный домен. (б) – Альтернативные функции STAT3. При активации интерлейкинами цитокинного рецептора на клеточной мембране белок JAK фосфорилирует тирозин в STAT3. Это вызывает димеризацию STAT3, транслокацию в ядро и стимуляцию экспрессии генов. Если цитоплазматические протеинкиназы фосфорилируют серин в STAT3, то он транслоцируется в митохондрии, где активирует транспорт электронов от комплексов I и II на комплекс III, повышая скорость окислительного фосфорилирования.

фрагмента кадгерина, участвующего в межклеточной адгезии, с внутриклеточным актиновым цитоскелетом. Свободный β -катенин в цитоплазме практически отсутствует. Он связывается с мультиферментным комплексом белков APC, axin1, GSK3 и CK1, в котором протеинкиназы GSK3 и CK1 фосфорилируют его, после чего β -катенин убиквитинируется лигазой β -TrCP и деградирует. Но под влиянием внеклеточного сигнала Wnt, APC-комплекс распадается, и в цитоплазме появляется свободный β -катенин. Он транслоцируется в ядро, где как фактор транскрипции регулирует экспрессию различных генов, которые кодируют компоненты сигнального

пути Wnt, белки с-Мус, COX и т.п. [47]. Таким образом, β -катенин – MLP типа «платформа»–«платформа».

Белок p53. Белок p53 исключительно важен и интересен. Он экспрессируется во всех клетках организма и регулирует основные клеточные функции, включая метаболизм, клеточный цикл, репарацию ДНК, выживаемость и апоптоз [50–52]. В качестве фактора транскрипции он регулирует экспрессию сотен генов [43, 53]. В клетках с нерепарируемыми повреждениями ДНК p53 стимулирует апоптоз [54–57]. Это позволяет устранять злокачественные клетки и защищать орга-

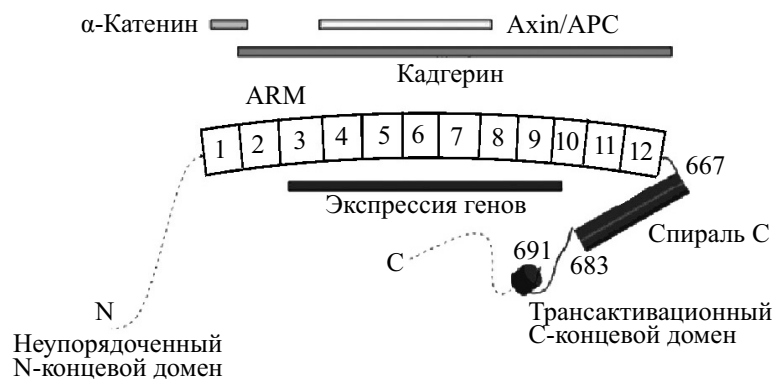


Рис. 6. Структура β -катенина человека с двенадцатью повторами (ARM-домен), внутренне неупорядоченным N-доменом и трансаактивационным C-доменом.

низм от раковых опухолей. Поэтому его называют супрессором опухолей и стражем генома. Мутации гена *TP53*, инактивирующие p53, найдены в половине случаев рака человека. Однако p53 не только регулирует экспрессию генов, но также, независимо от транскрипции, регулирует митохондриальные функции и индуцирует апоптоз в клетках с митохондриальной недостаточностью [58–60]. Этот древний консервативный белок найден у организмов на ранних эволюционных стадиях у простейших и губок, намного раньше, чем возникли раковые опухоли. Поэтому предполагается, что истинная роль белков семейства p53 заключается в поддержании целостности генома при неблагоприятных воздействиях на организм [61, 62].

Обычно уровень белка p53 в цитоплазме поддерживается на низком уровне. После синтеза в цитоплазме он транспортируется в ядро, где связывается с ДНК. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который моноубиквитинирует его и транспортирует обратно в цитоплазму, где он дополнительно убиквитинируется и быстро деградирует в протеасомах [63]. При активации онкогенов, радиационном повреждении ДНК или окислительном стрессе p53 фосфорилируется протеинкиназами JNK, p38, ERK и т.п. [57], что предотвращает его взаимодействие с MDM2, препятствует деградации и значительно повышает его уровень в ядре [51, 62, 64, 65]. Белок p53 тетрамеризуется, связывается с ДНК и стимулирует

транскрипцию целой группы генов, содержащих в регуляторной области специальную нуклеотидную последовательность p53RE (p53-response element). Уже известно более 600 таких p53RE [53]. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК, репарация повреждений ДНК, а при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза [57, 58, 64]. Белок p53 также обнаруживается в клеточных ядрышках, являющихся «фабриками рибосом». Нарушение синтеза рибосом в ядрышке повышает уровень p53, что передает сигнал о повреждении клетки в системы, контролирующие клеточный метаболизм, гомеостаз и выживание [66, 67].

Белок p53 состоит из одной полипептидной цепи из 393 аминокислот. В клетках он образует тетрамер из двух одинаковых димеров. Как у многих факторов транскрипции, в первичной структуре p53 можно выделить ряд функциональных модулей (рис. 7). На N-конце располагается трансаактивационный домен TAD (transactivation domain), подразделяющийся на два субдомена TAD1 и TAD2 (аминокислоты 1–43 и 44–63). За ними следует богатый пролином участок PRR (proline-rich region, аминокислоты 64–92), ДНК-связывающий домен DBD (аминокислоты 102–292), который распознает p53RE и связывается с ним, сигнал ядерной локализации NLS (nuclear localization sequence); домен TET (tetramerization domain, аминокислоты 320–355), ответственный за тетрамеризацию p53, и C-концевой домен (аминокислоты 356–393). Домены DBD и TET

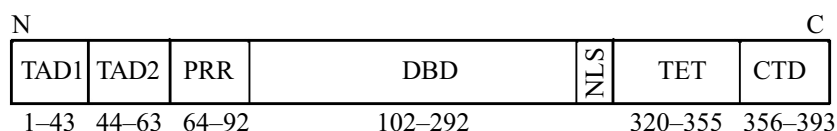


Рис. 7. Схема основных структурных доменов p53: TAD1 и TAD2 — внутренне неупорядоченные трансаактивационные домены, PRR — богатый пролином домен, DBD — ДНК-связывающий домен, NLS — сигнал ядерной локализации, TET — домен, ответственный за тетрамеризацию, CTD — внутренне неупорядоченный C-концевой домен.

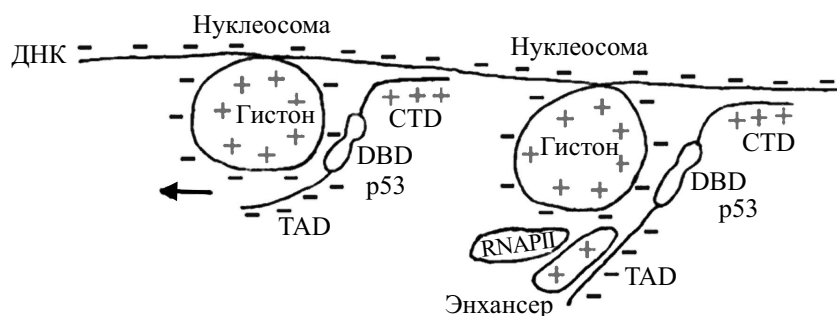


Рис. 8. Предполагаемое взаимодействие p53 с нуклеосомой: «качение» нуклеосомы и взаимодействие с положительно заряженными доменами белков, связывающихся с ДНК.

высококонсервативны, тогда как внутренне неупорядоченные домены TAD и С-концевой домен более изменчивы, что позволяет белку p53 гибко взаимодействовать со многими партнерами [53, 68–71].

Домены DBD в тетрамерах p53 при взаимодействии с p53RE сгибают ДНК, причем по-разному в участках с разными последовательностями нуклеотидов [72]. При этом ДНК частично расплетается, что облегчает связывание белков.

Домен TAD (TAD1+TAD2) из 63 аминокислот несет значительный отрицательный заряд благодаря 17 остаткам глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Он внутренне неупорядочен. Его конформация определяется взаимодействием с ДНК или другими белками. Известно, что p53 человека может взаимодействовать более, чем с 1000 различных белков, включая коактиваторы, энхансеры и другие регуляторы транскрипции, а также белки, осуществляющие посттрансляционные модификации — протеинкиназы, ацетилтрансферазы и т.п. [73].

С-концевой домен из 29 аминокислот также внутренне неупорядочен. В отличие от отрицательного TAD, он содержит семь положительно заряженных аминокислотных остатков (шесть остатков лизина и один — аргинина). Это позволяет ему неспецифически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатами ДНК независимо от ее формы — с изогнутыми участками, сверхспиральными, намотанными на нуклеосомы и т.п. [69]. С-концевой домен играет важную роль в активации, клеточной локализации и деградации p53 [62]. Предполагается, что благодаря сравнительно непрочному и неспецифическому электростатическому связыванию положительно заряженного С-концевого домена с отрицательно заряженной ДНК, p53 может скользить вдоль молекулы ДНК в поисках нужного сайта, где домены DBD, также несущие положительные заряды, более прочно и специфично связываются с p53RE [74]. Это облегчает проблему навигации фактора транскрипции, заменяя трехмерную диффузию

одномерной [68, 75–77]. (Источник энергии и механизм выбора направления движения p53 и других белков по ДНК неизвестны. При диффузии направление движения определяется градиентом концентрации, который отсутствует в случае отдельных молекул). Еще одна проблема: неясно, как белки, перемещающиеся по хромосоме (РНК-полимеразы, факторы транскрипции, репарационные комплексы), преодолевают нуклеосомы, на которые намотана ДНК. Можно предположить, что тогда как положительно заряженный С-концевой домен стабилизирует p53 на ДНК, отрицательно заряженный TAD за счет электростатического отталкивания может сдвигать нуклеосому, несущую на поверхности отрицательно заряженную ДНК. Это будет вызывать «качение» нуклеосомы по ДНК и освобождение участков для транскрипции или репарации. Известно, что p53 часто связывается с p53RE, расположенными на нуклеосомах, вероятно из-за того, что сгибание ДНК на нуклеосоме повышает сродство к p53 [53, 78, 79]. При этом между отрицательно заряженными ДНК и TAD могут встраиваться положительно заряженные участки взаимодействующих с ДНК белков, таких как РНК-полимеразы, белки репарационных комплексов, коактиваторы или энхансеры транскрипции (рис. 8).

Способность некоторых факторов транскрипции, таких как p53 или с-Мус, неспецифически регулировать экспрессию многих сотен генов кажется загадочной. Предполагается, что регуляция множества генов может быть обусловлена не только специфическим связыванием p53 с p53RE в промоторах определенных генов, но и его связыванием с рядом сильных энхансеров, что повышает его общую транскрипционную активность [53]. Тем не менее активация экспрессии разных групп генов факторами транскрипции в определенной степени специфична [80]. Каковы структурные основы специфического связывания p53 с теми или иными p53RE? Еще вопрос: каким образом p53 по-разному реагирует на различные

стимулы? Возможно, это обеспечивается внутренне неупорядоченными участками (IDR, intrinsically disordered regions), которые могут взаимодействовать с разнообразными белками. Наличие IDR очень характерно для разных факторов транскрипции [81]. У p53 таким участком является TAD, способный взаимодействовать со множеством белков, что обеспечивает его чувствительность к разным стимулам и способность активировать экспрессию различных генов [53]. Благодаря жесткому линкерному пролиновому участку PRR, TAD высвобождается наружу из центрального комплекса DBD/ДНК и таким образом может взаимодействовать с разнообразными коактиваторными и энхансерными белками [70]. Сродство к разным партнерам p53 регулируется посттрансляционными модификациями, особенно фосфорилированием и ацетилированием TAD [70]. Также предполагается, что разная экспрессия p53-регулируемых групп генов, которые контролируют разные клеточные процессы, обусловлена локальными различиями в структуре хроматина: топологией ДНК, расположением p53RE, метилированием ДНК в промоторах, сближением далеких энхансеров, доступностью промоторов генов для RNAPII и т.п. [53]. В частности, селективность действия p53 может быть связана со способностью по-разному изгибать ДНК в местах с разными последовательностями нуклеотидов [72, 74].

Разные посттрансляционные модификации регулируют активность p53, у которого 36 аминокислот могут подвергаться фосфорилированию, метилированию, ацетилированию, гликозилированию и т.д. [82]. Как отмечалось выше, фосфорилирование серинов 18 и 20 в TAD препятствует связыванию MDM2, ведущему к деградации p53 [57]. Ацетилирование различных лизинов дифференциально усиливает транскрипционную активность p53, приводя к экспрессии разных групп генов и разным клеточным ответам. Так, неацетилированный белок p53 стимулирует экспрессию MDM2 и других белков, препятствующих его чрезмерной активации. При повреждении ДНК p53 ацетилируется ацетилтрансферазой CBP/p300 и вместе с белками Tip 60 и MOF стимулирует экспрессию белков p21 и GADD45, вызывающих остановку клеточного цикла и индуцирующих репарацию ДНК [82]. При сильных, нерепарируемых повреждениях ДНК, вызванных такими вредными факторами, как гипоксия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, ионизирующее излучение или нарушение функции ядрышка, увеличивается экспрессия p53. При этом ацетилируются почти все лизиновые остатки, и p53 начинает стимулировать экспрессию генов, кодирующих апоптотические белки: каспазы 6, Araf-1, HtrA2, Bax, Bid, NOXA, PUMA, Fas, DR4, DR5 и т.п. Это приводит к апоптотиче-

ской смерти клеток [64–67]. Но p53 может индуцировать апоптоз не только транскрипционным путем, но и независимо от транскрипции. Цитоплазматический p53 непосредственно связывается с наружной митохондриальной мембраной, ингибирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-XL, активирует проапоптотические белки Bax и Bid и стимулирует Bax/Bak-опосредованное формирование мегапор в наружной митохондриальной мембране, через которые цитохром c, SMAC/Diablo, AIF и другие проапоптотические белки выходят в цитозоль и вызывают апоптоз [54, 58–60].

Таким образом, p53 — многофункциональный moonlighting-белок, который действует как фактор транскрипции, функции которого опосредованы экспрессией множества белков, и как проапоптотический агент, непосредственно влияющий на митохондрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многофункциональность белков — не единичное явление. Она характерна для сотен белков, и это существенно расширяет функциональное разнообразие, которое, казалось бы, ограничено малым числом генов. Почему и как появились moonlighting и более сложные многофункциональные белки — волнующий вопрос, на который, как и на другие эволюционные проблемы, пока нет ответа. Согласно одному из предположений, «безразличные» мутации, затрагивающие поверхностные участки белков, которые не критичны для выполнения их канонической функции, могут приводить к появлению новых функций. Имеется немало примеров, когда точечные мутации, затрагивающие одну-две аминокислоты, могут существенно изменить свойства поверхности, изменяя тем самым участие данного белка в надмолекулярном комплексе или его клеточную локализацию. Такие мутации могут быть одним из механизмов возникновения MLP. Далее следует дупликация гена, амплификация и отбор, если эти мутации приводят к полезным свойствам [14]. Вероятность появления новых функций выше у избыточных белков, которых много в клетке, и чаще их столкновения с белками-партнерами. Возможно, именно поэтому многие белки домашнего хозяйства, такие как белки гликолиза, рибосом, молекулярных моторов и т.п., обладают moonlighting-функциями [83, 84]. Они найдены как у бактерий и дрожжей, так и у высших организмов [83–87]. Была высказана мысль о том, что широкая распространенность moonlighting белков в природе представляет собой резервуар функций для адаптации к изменяющейся среде [87].

Важным фактором этого процесса является несбалансированность синтеза и использования таких белков. Так, в случае рибосомных белков

возможно, что перепроизводство некоторых из них могло приводить к появлению в цитоплазме избыточных свободных белков, не встроившихся в рибосомы. Такие белки, как рассмотренный выше белок грS3, приобрели способность использоваться для других процессов, таких как участие в репарации ДНК и регуляции экспрессии генов. Ярким и более сложным примером нарушения баланса процессов синтеза, использования и протеолиза является β -катенин: белок, не встроившийся в мембранный адгезионный комплекс, деградирует. Но приход внеклеточного сигнала Wnt на поверхностные рецепторы предотвращает деградацию β -катенина. Он переносится в ядро, где регулирует экспрессию генов. Важным регулятором изменения внутриклеточной локализации белков и, соответственно, переключения его функций являются посттрансляционные модификации. Это показано на примере белка STAT3, который после фосфорилирования тирозинов направляется в ядро, где служит фактором транскрипции, а после фосфорилирования серинов цитоплазматическими протеинкиназами перемещается в митохондрии, где активирует электрон-транспортные процессы. Таким образом, источником информации в клетке является не только зафиксированная в нуклеотидной последовательности ДНК информация о структуре белков, которая сообщает, какие белки будут синтезироваться, но и информационные сигналы, приходящие извне: изменение физико-химического состояния среды (температура, ионный и газовый состав, pH, свободные радикалы, контакты с соседними клетками и т.д.), а также сигнальные молекулы, поступающие от других клеток и запускающие внутриклеточные сигнальные каскады. Они регулируют экспрессию генов и определяют динамику и количество синтезируемых белков.

Классические представления о роли периферических аминокислотных последовательностей, не входящих в активный центр и его ближайшее окружение, в последнее время расширяются. Периферия белковой глобулы не только является комплементарной поверхностью при сборке надмолекулярных комплексов или встраивании белка в мембрану, но участвует в более широком круге межмолекулярных взаимодействий. Разработанные в последние годы компьютерные методы поиска, выявления и предсказания многофункциональных белков [88, 89] показали, что в белковых взаимодействиях, участвующих в образовании надмолекулярных комплексов и формировании сигнальных и метаболических цепочек и сетей, важную роль играют внутренне неупорядоченные участки белков (IDR). IDR широко распространены у многих сигнальных белков и факторов транскрипции [81, 90–95]. Часто они располагаются на N- или C-концах полипептидной цепи. На сегодняшний день обнаружено более

650 тысяч видов сетевых межбелковых взаимодействий [89, 95]. Вышеупомянутые факторы транскрипции STAT3, β -катенин и p53 тоже содержат IDR. Неупорядоченными могут быть и целые белки, такие как кальмодулин или шапероны. IDR более лабильны и чаще мутируют, поэтому они более изменчивы и могут играть важную роль в эволюционном происхождении MLP белков [96–98]. Как оказалось, в их взаимодействиях существенную роль играют консервативные короткие линейные последовательности (SLiM) из трех-десяти аминокислот [96–98]. Белковые взаимодействия в таких последовательностях сравнительно слабые, со сродством в микромолярном диапазоне. Поэтому они кратковременны и обратимы. Они легко модулируются посттрансляционными модификациями, которые переключают структуру и функции белка. При этом определяющую роль во взаимодействиях и изменениях конформации MLP и переключении их функций играют их белковые или нуклеиновые партнеры, находящиеся в зоне взаимодействия.

Таким образом, хотя число генов весьма ограничено, у многих белков, кодируемых одним геном, развилась способность выполнять две и больше различных функций, реализующихся в зависимости от контекста: клеточной локализации, микроокружения, образования комплексов с другими белками, посттрансляционных модификаций и т.д. Наличие многофункциональных белков порождает целый ряд вопросов: об их первичной и третичной структуре, о связи структуры с функциями, о механизмах структурно-функционального переключения, о фолдинге белков из нескольких доменов и их рефолдинге при изменении клеточной локализации, о самосборке белковых и нуклеопротеиновых комплексов, о роли MLP в системе управления клеткой, о появлении и преобразованиях MLP в процессе эволюции, и т.д.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ БАЗ 0110/20-5-14АБ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. W. Beadle and E. L. Tatum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**, 499 (1941).
2. C. B. Anfinsen, *Fed. Proc.* **16**, 783 (1957).
3. F. Moraes and A. Góes, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **44**, 215 (2016).
4. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucl. Acids Res.* **43** (Database issue), D204 (2015).
5. S. K. Burley, H. M. Berman, G. J. Kleywegt, et al., *Methods Mol. Biol.* **1607**, 627 (2017).
6. F. E. Regnier and J. H. Kim, *Anal. Chem.* **90**, 361 (2018).
7. O. I. Kiseleva, A. V. Lisitsa, and E. V. Poverennaya, *Mol. Biol. (Moscow)* **52**, 394 (2018).
8. S. Y. Chen, C. Li, X. Jia, and S. J. Lai, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E3834 (2019).
9. M. L. Tress, F. Abascal, and A. Valencia, *Trends Biochem. Sci.* **42**, 98 (2017).
10. K. V. Nguyen, *Biomol. Concepts* **6**, 11 (2015).
11. Multitasking Proteins DataBase (moonlighting proteins database). <http://wallace.uab.es/multitaskII>.
12. M. Mani, C. Chen, V. Amblee, et al., *Nucl. Acids Res.* **43**, D277 (2015).
13. C. J. Jeffery, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **373**, 1738 (2018).
14. C. J. Jeffery, *J. Proteomics* **134**, 19 (2016).
15. K. W. Min, S. H. Lee, and S. J. Baek, *Cancer Lett.* **370**, 108 (2016).
16. S. D. Copley, *Bioessays* **34**, 578, (2012).
17. B. Henderson and A. C. Martin, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1671 (2014).
18. C. E. Chapple and C. Brun, *Oncotarget* **6**, 16812 (2015).
19. F. Wan, D. E. Anderson, R. A. Barnitz, et al., *Cell* **131**, 9279 (2007).
20. B. Pertschy, *Microb. Cell* **4**, 140 (2017).
21. X. Gao and P. R. Hardwidge, *Front. Microbiol.* **2**, 137 (2011).
22. T. H. Kim, P. Leslie, and Y. Zhang, *Oncotarget* **5**, 860 (2014).
23. D. Alvarez-Paggi, L. Hannibal, M. Castro, et al., *Chem. Rev.* **117**, 13382 (2017).
24. M. Zhou, Y. Li, Q. Hu, et al., *Genes Dev.* **29**, 2349 (2015).
25. L. Dorstyn, C. W. Akey, and S. Kumar, *Cell Death Differ.* **25**, 1194 (2018).
26. Y. P. Ow, D. R. Green, Z. Hao, and T. W. Mak, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 532 (2008).
27. A. Oberst, C. Bender, and D. R. Green, *Cell Death Differ.* **15**, 1139 (2008).
28. H.-X. Zhou, S. T. Wlodek, and J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9280 (1998).
29. H.-X. Zhou and J. A. McCammon, *Trends Biochem. Sci.* **35**, 179.10.007 (2010).
30. F. M. Raushel, J. B. Thoden, and H. M. Holden, *Accounts Chem. Res.* **36**, 539 (2003).
31. N. K. Nagradova, *FEBS Lett.* **487**, 327 (2001).
32. N. Nagradova, *IUBMB Life* **55**, 459 (2003).
33. S. C. Goodchild, P. M. G. Curmi, and L. J. Brown, *Biophys. Rev.* **3**, 143 (2011).
34. M. A. Sirover, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* **1810**, 741 (2011).
35. M. A. Sirover, *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 665 (2018).
36. H. He, M. Lee, L. L. Zheng, et al., *Biosci. Rep.* **33**, e00018 (2013).
37. M. R. White and E. D. Garcin, *Subcell. Biochem.* **83**, 413 (2017).
38. V. M. Boradia, M. Raje, and C. I. Raje, *Biochem. Soc. Transact.* **42**, 1796 (2014).
39. M. Schneider, J. Knuesting, O. Birkholz, et al., *BMC Plant Biol.* **18**, 184 (2018).
40. T. Hildebrandt, J. Knuesting, C. Berndt, et al., *Biol. Chem.* **396**, 523 (2015).
41. M. A. Sirover, *J. Biochem. Cell Biol.* **57**, 20 (2014).
42. P. S. Knoepfler, *Cancer Res.* **67**, 5061 (2007).
43. M. Fisher, *Oncogen* **36**, 3943 (2017).
44. M. G. Myers, *Science* **323**, 723 (2009).
45. A. Subramaniam, M. K. Shanmugam, E. Perumal, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1835**, 46 (2013).
46. J. Sgrignani, M. Garofalo, M. Matkovic, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E1591 (2018). DOI: 10.3390/ijms19061591
47. B. T. MacDonald, K. Tamai, and X. He, *Dev. Cell* **17**, 9 (2009).
48. Y. Xing, K. Takemaru, J. Liu, et al., *Structure* **16**, 478 (2008).
49. C. J. Gottardi and M. Peifer, *Structure* **16**, 336 (2008).
50. M. Napoli and E. R. Flores, *Br. J. Cancer* **116**, 149 (2017).
51. V. Marcel, F. Nguyen Van Long, and J. J. Diaz, *Cancers (Basel)* **10**, E152 (2018).
52. F. M. Simabuco, M. G. Morale, I. C. B. Pavan, et al., *Oncotarget* **9**, 23780 (2018).
53. K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, and J. M. Espinosa, *Cell Death Differ.* **25**, 133 (2018).
54. B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, et al., *Cell Death Differ.* **25**, 104 (2018).
55. S. Nicolai, A. Rossi, N. Di Daniele, et al., *Aging (NY)* **7**, 1050 (2015).
56. L. J. Hofseth, S. P. Hussain, and C. C. Harris, *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 177 (2004).
57. C. Culmsee and M. P. Mattson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 761 (2005).
58. C. Wan, X. Ma, S. Shi, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **281**, 294 (2014).
59. D. B. Wang, C. Kinoshita, Y. Kinoshita, and R. S. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1186 (2014).

60. Q. Dai, T. T. Luo, S. C. Luo, et al., J. Bioenerg. Biomembr. **48**, 337 (2016).
61. E. Åberg, F. Saccoccia, M. Grabherr, et al., BMC Evol. Biol. **17**, 177 (2017).
62. A. C. Joerger and A. R. Fersht, Annu. Rev. Biochem. **85**, 375 (2016).
63. V. Gottifredi and C. Prives, Science **292**, 1851 (2001).
64. P. Bonini, S. Cicconi, A. Cardinale, et al., J. Neurosci. Res. **75**, 83 (2004).
65. S. Rashi-Elkeles, R. Elkon, S. Shavit, et al., Mol. Oncol. **5**, 336 (2011).
66. R. Parlato and G. Kreiner, J. Mol. Med. (Berl.) **91**, 541 (2013).
67. S. J. Woods, K. M. Hannan, R. B. Pearson, and R. D. Hannan, Biochim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms **1849**, 821 (2015).
68. M. Kitayner, H. Rozenberg, N. Kessler, et al., Mol. Cell. **22**, 741 (2006).
69. E. Fadda and M. G. Nixon, Phys. Chem. Chem. Phys. **19**, 21287 (2017).
70. A. C. Joerger and A. R. Fersht, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **2**, a000919 (2010). DOI: 10.1101/cshperspect.a000919.
71. A. C. Joerger and A. R. Fersht, Annu. Rev. Biochem. **77**, 557 (2008).
72. Y. Pan and R. Nussinov, J. Biol. Chem. **282**, 691 (2007).
73. Y. S. Tan, Y. Mhoumad, and C. S. Verma, J. Mol. Cell Biol. **11**, 306 (2019).
74. Y. Pan and R. Nussinov, J. Mol. Recognit. **23**, 232 (2010).
75. K. McKinney, M. Mattia, V. Gottifredi, and C. Prives, Mol. Cell. **16**, 413 (2004).
76. A. Tafvizi, F. Huang, A. R. Fersht, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 563 (2011).
77. A. Murata, Y. Itoh, E. Mano, et al., Biophys. J. **112**, 2301 (2017).
78. N. E. Lidor, Y. Field, Y. Lubling, et al., Genome Res. **20**, 1361 (2010).
79. F. Cui and V. B. Zhurkin, Nucl. Acids Res. **42**, 836 (2014).
80. Y. Pan, C. J. Tsai, B. Ma, and R. Nussinov, Trends Genet. **26**, 75 (2010).
81. J. Liu, N. B. Perumal, C. J. Oldfield, et al., Biochemistry **45**, 6873 (2006).
82. J. P. Kruse and W. Gu, Cell **137**, 609 (2009).
83. S. D. Copley, Biochem. Soc. Trans. **42**, 1684 (2014).
84. W. Lu, V. I. Gelfand, Trends Cell Biol. **27**, 505 (2017).
85. B. Henderson, Biochem. Soc. Trans. **42**, 1720 (2014).
86. C. Gancedo, C. L. Flores, and J. M. Gancedo, Biochem. Soc. Trans. **42**, 1715 (2014).
87. M. A. Fares, Biochem. Soc. Trans. **42**, 1709 (2014).
88. C. E. Chapple, B. Robisson, L. Spinelli, et al., Nat. Commun. **6**, 7412 (2015).
89. G. Hu, Z. Wu, V. N. Uversky, and L. Kurgan, Int. J. Mol. Sci. **18**, 2761 (2017).
90. L. M. Iakouchava, C. J. Brown, J. D. Lawson, et al., J. Mol. Biol. **323**, 573 (2002).
91. R. van der Lee, M. Buljan, B. Lang, et al., Chem. Rev. **114**, 6589 (2014).
92. N. S. Latysheva, T. Flock, R. J. Weatheritt, et al., Prot. Sci. **24**, 909 (2015).
93. A. Balcerak, A. Trebinska-Stryjewska, R. Konopinski, et al., Open Biol. **9**, 190096 (2019). DOI: 10.1098/rsob.190096.
94. E. A. Lemke, J. Mol. Biol. **428** (10, Pt A), 2011 (2016).
95. N. N. Sluchanko and D. M. Bustos, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. **166**, 19 (2019).
96. A. Zanzoni, D. M. Ribeiro, and C. Brun, Cell Mol. Life Sci. **76**, 4407 (2019).
97. R. J. Weatheritt, N. E. Davey, and T. J. Gibson, Nucl. Acids Res. **40**, 7123 (2012).
98. K. Van Roey, B. Uyar, R. J. Weatheritt, et al., Chem. Rev. **114**, 6733 (2014).

Multifunctional Proteins

A.B. Uzdensky

*Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University,
prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

A surprisingly small number of human genes (19–20 thousand) are not consistent with a much larger number of proteins and the number of their functions. One of the factors of functional diversity is protein multifunctionality. Important subgroups of such proteins are moonlighting proteins, in which single polypeptide chain serves two or more functions under different conditions. They are often abundant housekeeping proteins: ribosomal proteins and other glycolytic enzymes. This review article deals with the aspect of structures and functions of some of these proteins such as ribosomal protein S3, cytochrome c, glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase, and STAT3, β -catenin and p53 proteins as transcription factors. Shifting balance of protein synthesis, utilization and degradation, protein localization-dependent changes, post-translational modifications play important role in switching protein functions. It was shown that the internal intrinsically disordered protein regions are significant in the formation of intermolecular complexes with other proteins and nucleic acids. The appearance of multifunctional proteins during evolution is discussed.

Keywords: multifunctional proteins; cytochrome c; GAPDH; β -catenin; STAT3; p53

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДНОГО РАСТВОРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

© 2020 г. Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Е.Н. Тумаев, Г.П. Ильченко

Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

E-mail: tekytska@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2019 г.

После доработки 02.03.2020 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

Обсуждаются экспериментальные данные, полученные при изучении влияния переменного магнитного поля низкой частоты на конформационные переходы человеческого сывороточного альбумина в присутствии наночастиц серебра с помощью флуоресцентной спектроскопии при разных значениях pH. Обнаружен эффект резкого усиления интенсивности флуоресценции альбумина в присутствии наночастиц серебра, изменяющийся при воздействии переменным магнитным полем низкой частоты. Полученная формула для расчета сечения рассеяния света на сферической наночастице определенного радиуса позволяет рассчитывать размеры наномикроструктур на основе наночастиц и природных биополимеров по типу «ядро–оболочка», физико-химическими свойствами которых можно управлять с помощью магнитного поля. Предложенная модель образования в растворе ассоциатов «белок–наночастица» по диполь-дипольному механизму хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Ключевые слова: переменное магнитное поле низкой частоты, альбумин, наночастицы серебра, собственная флуоресценция, конформационные переходы.

DOI: 10.31857/S0006302920030060

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняет важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций [1]. Альбумин обратимо связывает лиганды различной химической структуры: биологически активные вещества, жирные кислоты, неорганические ионы, лекарственные вещества и их метаболиты [2]. Существует ограниченное число мест связывания в молекуле ЧСА, в идентификации которых основополагающей считается работа G. Sudlow с соавт. [3]. Одним из важных центром связывания в структуре ЧСА или рекомбинантного ЧСА является участок в субдомене ПА, который содержит единственный в молекуле сывороточного альбумина человека остаток триптофана — Trp214. Это позволяет исследовать структурные изменения молекулы альбумина с помощью регистрации триптофановой флуоресценции. Во многих работах отмечается гибкость и конформа-

ционная лабильность молекулы ЧСА, а также восприимчивость к разного рода регуляторным влияниям [2, 4, 5].

Плазмонно-резонансные наночастицы серебра благодаря редкому сочетанию уникальных бактерицидных и оптических свойств широко применяются в медицинских целях [6–8], а также для включения в структуру оболочек микрокапсул в терапии онкологических заболеваний [9]. Для дистанционного высвобождения веществ из объема микрокапсул используется оптическое излучение, при этом механизм высвобождения, как правило, — это нагрев наночастиц, встроенных в оболочку микрокапсул [10, 11]. В новом направлении персонализированной медицины — тераностике — широкое распространение получили платформы гигантского комбинационного рассеяния на основе частиц, декорированных плазмонно-резонансными наночастицами, как сенсорные системы для внутриклеточных исследований [11, 12]. Как отмечается в работе [12], существенными проблемами в тераностике являются биосовместимость искусственных носителей с транспортными системами крови и

Сокращения: ЧСА — сывороточный альбумин человека, МП — магнитное поле.

экранирование биологически активных препаратов от действий иммунной системы.

Изучение объектов и систем, структурированных в нанометровом масштабе, вызывает большой интерес у исследователей вследствие наличия у них специфических физических свойств [13]. В качестве такой системы рассмотрены коллоидные растворы наночастиц серебра в растворе ЧСА. Высокая восприимчивость биополимеров к разного рода регуляторным влияниям, в том числе изменение их структуры при воздействии электромагнитных полей, как это отмечается в работах [14–16], создает предпосылки для реализации аллостерических влияний со стороны наночастиц серебра на процесс связывания с ЧСА.

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия наночастиц серебра заданного размера с человеческим сывороточным альбумином методом флуоресцентной спектроскопии под действием переменного магнитного поля низкой частоты, по уровню напряженности сопоставимого с геомагнитным полем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали водный раствор наночастиц серебра (диаметр $12 \text{ нм} \pm 10\%$) с исходной концентрацией 630 мкг/мл . Раствор содержал в качестве стабилизатора поливинилпирролидон. Размеры наночастиц серебра контролировали с помощью электронного растрового микроскопа JSM-7500F (Jeol, Япония). Водный раствор ЧСА был получен путем разведения белка до концентрации 5 мкМ в буферной системе ($\text{pH } 6.5$). Рабочие растворы ЧСА готовили с использованием физиологического раствора. Для исследования смешивали растворы таким образом, чтобы концентрации ЧСА и наночастиц серебра составляли 10^{-6} М и 0.33 мкг/мл соответственно.

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония). Триптофановую флуоресценцию раствора ЧСА регистрировали в диапазоне длин волн от 270 до 500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}}$ 290 или 295 нм .

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Обработка проб магнитным полем. В ходе экспериментов использовали разработанное ранее устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле (рис. 1) [17]. Обработку растворов ЧСА и наночастиц серебра переменным магнитным полем (МП) низкой частоты проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$ и толщине обрабатываемого слоя 2 мм . Образец размещали в центр со-

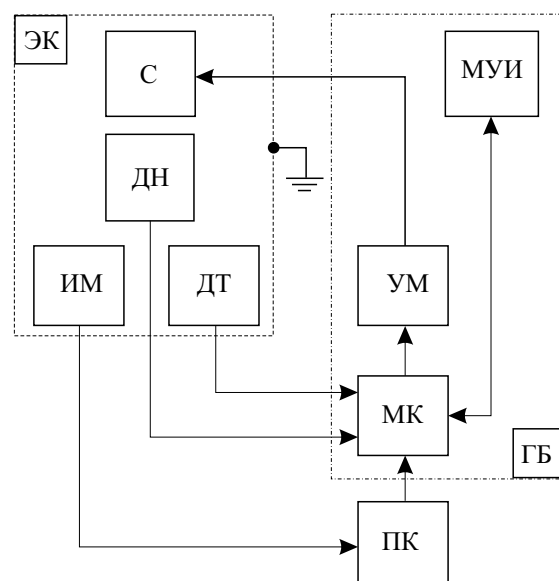


Рис. 1. Структурная схема устройства для автоматизированного поиска оптимальных параметров обработки биологических жидкостей переменным МП: ИМ — измерительный модуль; ДН, ДТ — датчики напряженности магнитного поля и температуры соответственно; ЭК — заземленная экранированная камера; С — соленоид; МУИ — модуль управления и индикации; УМ — усилитель мощности; МК — микроконтроллер; ГБ — генераторный блок; ПК — персональный компьютер

леноида, где МП с достаточной точностью можно считать однородным, поскольку размеры соленоида много больше размеров образца. Напряженность МП в месте нахождения образца составляла $24 \pm 4 \text{ А/м}$, частота МП изменялась с шагом 0.2 Гц в диапазоне от 3 до 30 Гц .

В модуль для измерения физических характеристик биологических жидкостей помещали водный раствор ЧСА, содержащий или не содержащий наночастицы серебра. Температуру раствора контролировали с помощью датчика температуры с точностью до 0.2°C , задавали начальную частоту МП и соответствующую напряженность и проводили обработку образца в течение 10 мин . Затем регистрировали интенсивность флуоресценции образца при соответствующей длине волны. Далее микроконтроллер изменял частоту МП с шагом в 0.5 Гц . После каждого изменения частоты МП и обработки образца регистрировали интенсивность его флуоресценции и делали паузу в течение 30 с .

Статистическая обработка. Полученные данные анализировали в пакете статистического анализа Statistica 6.0. Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Корреляционную зависимость и силу связи устанавливали, используя корреляционный анализ

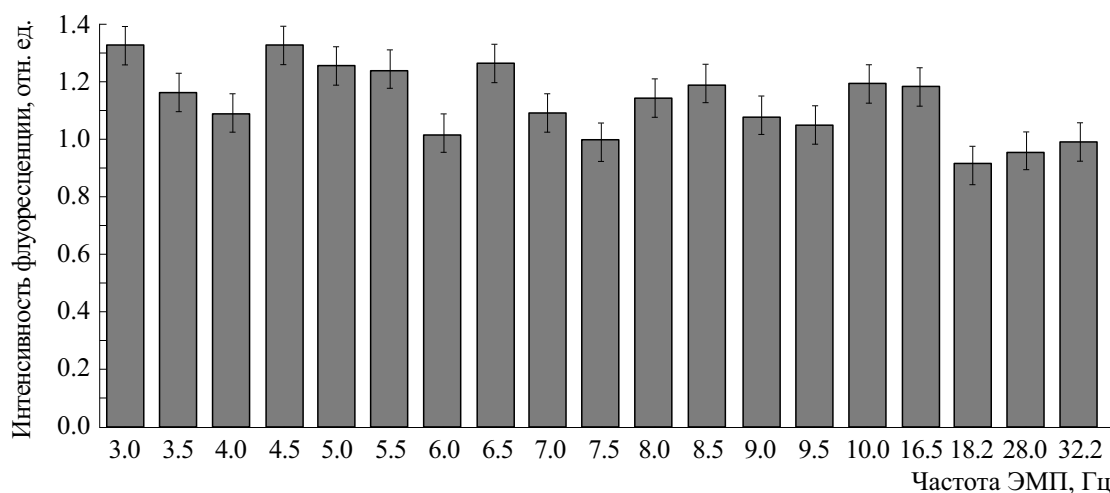


Рис. 2. Относительная интенсивность триптофановой флуоресценции человеческого сывороточного альбумина при обработке ЭМП разной частоты и pH 4.5. Время облучения образцов 10 мин, $t = 22^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм ($n = 10$, $p = 0.95$, $t_{0.95} = 1.96$).

по Спирману. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$ [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресценцию водного раствора ЧСА селективно возбуждали при длинах волн $\lambda_{\text{возб}}$ 290 или 295 нм, при которых поглощает главным образом аминокислотный остаток триптофана в молекуле ЧСА. Величина интенсивности флуоресценции ЧСА при обработке переменным МП разной частоты изменялась от 950 до 1300 отн. ед. в зависимости от используемой частоты МП. Относительную интенсивность флуоресценции определяли, как отношение суммарной флуоресценции для образца, обработанного МП, к флуоресценции контроля (необлученный образец). При подсчете суммарной флуоресценции для всех образцов брали диапазон длин волн излучения от 270 нм до 440 нм. Относительная интенсивность флуоресценции вычислялась по формуле:

$$I_{\text{отн}} = I_{\text{сум.ф}} / I_{\text{сум.К}} \quad (1)$$

Зависимость $I_{\text{отн}}$ от частоты облучения при pH, близком к изоэлектрической точке ЧСА, представлена на рис. 2.

Исследования флуоресцентно-спектральных характеристик аминокислотного остатка триптофана в молекуле ЧСА при различных значениях pH растворов в отсутствие действия МП показали, что при увеличении значения pH от 3.5 до 6.5 происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции в максимуме спектра $I_{\text{фл-мах}}$, что согласуется с данными, полученными в работе [19] (рис. 3). Как видно из рис. 3, при изменении pH раствора от 4.0 до 6.5 наблюдается

смещение максимума интенсивности флуоресценции на 20 нм в длинноволновую область, а интенсивность флуоресценции $I_{\text{фл-мах}}$ увеличивается от 50 до 1250 отн. ед. Это свидетельствует о существенном изменении конформации молекулы альбумина при изменении pH и подтверждает так называемый конформационный N–F-переход, который не приводит к денатурации альбумина, а лишь разворачивает аминокислоты относительно друг друга [1].

Помимо разгорания триптофановой флуоресценции ЧСА при увеличении pH происходит красный сдвиг максимума спектра флуоресценции (рис. 3), что, по-видимому, обусловливается протонированием карбоксильных групп белка, поскольку F-форма ЧСА, имеющая место при низких значениях pH, характеризуется более рыхлой структурой с разупорядоченными гидрофобными областями, более доступными для молекул воды [1].

На рис. 4 приведены спектры флуоресценции водного раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра при pH 6.5, соответствующего физиологическому значению плазмы крови, полученные после их обработки переменным МП низкой частоты. Добавление в раствор ЧСА эквимольных количеств наночастиц серебра приводит к резкому увеличению интенсивности флуоресценции с 450 отн. ед. (рис. 3) до 3900 отн. ед. (рис. 4). Видно, что дальнейшая обработка МП раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра приводит к еще более значительному увеличению интенсивности флуоресценции.

На рис. 5 приведены зависимости интенсивности флуоресценции раствора наночастиц серебра ($C(\text{Ag}) = 0,33$ мг/л), водного раствора ЧСА,

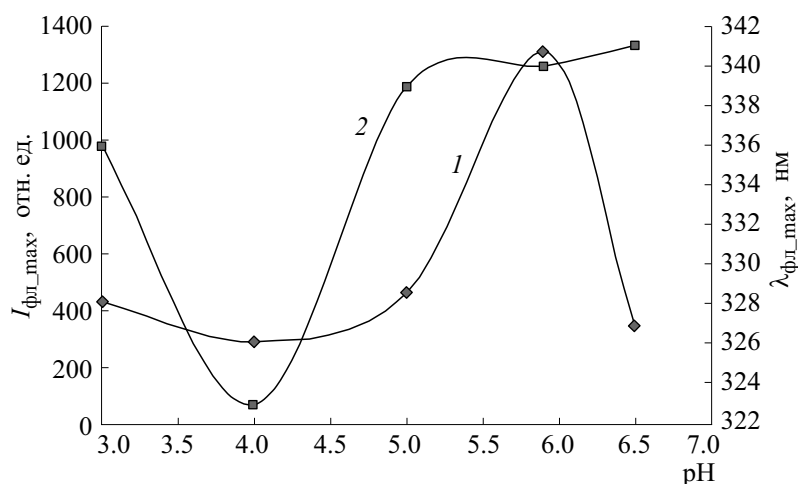


Рис. 3. Зависимости интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл_max}}$ (1, левая шкала) и длины волны $\lambda_{\text{фл_max}}$ (2, правая шкала) в максимуме спектра флуоресценции ЧСА (5 мкМ) от pH растворов ($\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм).

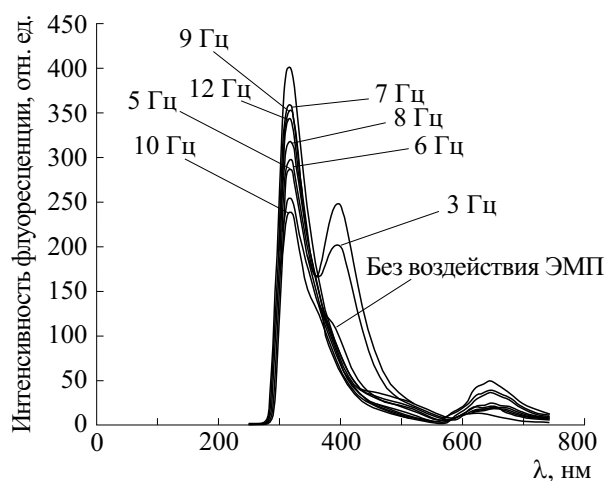


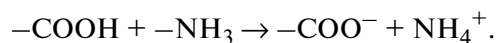
Рис. 4. Спектр флуоресценции раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра ($C(\text{Ag}) = 0.34$ мг/л) при pH 6.5 и $t = 22^\circ\text{C}$ после воздействия магнитным полем ($\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм).

а также водного раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра при pH 6.5 от частоты воздействующего переменного МП на раствор, из которых видно, что максимальное значение интенсивности флуоресценции наблюдается при воздействии на изучаемые растворы МП с частотой 4 и 12 Гц. Также, как видно из рис. 5, интенсивность флуоресценции растворов HSA с наночастицами серебра возрастает в 15–20 раз по сравнению с интенсивностями флуоресценции растворов, содержащих только наночастицы серебра и только ЧСА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию

лигандов различной химической структуры. Считается, что одним из механизмов транспортировки является поляризация входящих в структуру ЧСА функциональных групп аминокислотных остатков по схеме



В изоэлектрической точке при pH 4.7 поляризация ЧСА отсутствует [1], но при изменении pH возникают поляризованные участки альбумина, способные взаимодействовать с лигандами.

Наночастицы серебра в водных растворах взаимодействуют с ЧСА по диполь-дипольному механизму, образуя ассоциаты, о наличии которых свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции ЧСА в присутствии наночастиц серебра (рис. 4). При обработке растворов ассоциа-

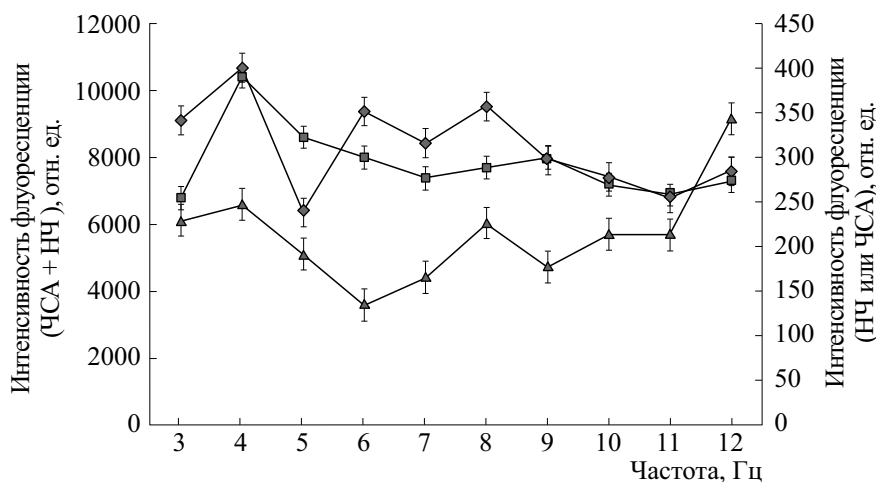


Рис. 5. Зависимости интенсивности флуоресценции раствора ЧСА и наночастиц серебра ($C(\text{Ag}) = 0.33$ мг/л) — правая шкала и водного раствора ЧСА (1 мкМ) в присутствии наночастиц серебра — левая шкала при pH 6.5 и $t = 22^\circ\text{C}$ после воздействия магнитным полем различной частоты в течение 10 мин, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 354$ нм ($n = 10$, $p = 0.95$, $t_{0.95} = 1.96$).

тов ЧСА с наночастицами серебра переменным МП низкой частоты наблюдается дальнейшее значительное увеличение интенсивности флуоресценции, что объясняется индуктивно-резонансным переносом энергии плазмонных колебаний наночастиц на молекулы ЧСА.

Для подтверждения высказанной гипотезы был проведен теоретический анализ процесса резонансного рассеяния, который, в отличие от теории Ми [19], опирался на разложение падающей плоской электромагнитной волны по сферическим волнам для всех мультипольностей $l \geq 1$. Нами была получена следующая формула для сечения рассеяния электромагнитной волны на сферической наночастице радиуса r :

$$\frac{\sigma}{\pi r^2} = 2 \sum_{l=1}^{\infty} \left(\frac{2l+1}{l(l+1)} \right)^2 \frac{2l+1}{3l+2} \text{Im} \left(\frac{l(\epsilon_m - \epsilon_r)}{l\epsilon_m + (l+1)\epsilon_r} \right), \quad (2)$$

где ϵ — комплексная диэлектрическая проницаемость материала наночастицы, ϵ_m — диэлектрическая проницаемость окружающей среды, и символом Im обозначено взятие мнимой части. При $l = 1$ формула (2) переходит в соответствующую формулу теории Ми [20].

Спектры флуоресценции как раствора ЧСА, так и ЧСА в присутствии наночастиц Ag имели четко выраженный пик в области длин волн от 300 до 400 нм, который имел почти гауссову форму. Наличие такого пика объясняется резонансным рассеянием света на наночастице серебра. Использование экспериментальных данных для диэлектрической проницаемости серебра позволило рассчитать резонансную длину волны для наночастицы диаметром 12 нм, которая оказалась равной 354 нм, что хорошо согласуется с экспери-

ментом (рис. 4). Высота пика резонансного рассеяния составляла около 400 отн. ед. для раствора, содержащего только наночастицы серебра, и свыше 8000 отн. ед. для раствора ЧСА с наночастицами Ag. Полученный результат можно объяснить, если предположить, что молекулы ЧСА, взаимодействующие с наночастицами Ag посредством диполь-дипольного механизма, образуют систему двух связанных резонаторов, что и приводит к резкому усилению интенсивности флуоресценции по сравнению с флуоресценцией раствора, содержащего только альбумин. Такая модель позволяет объяснить влияние низкочастотного переменного МП на спектры флуоресценции ЧСА в присутствии наночастиц Ag. Расчеты, проведенные для пары ЧСА+Ag, позволили подтвердить это предположение, показав, что возрастание сечения рассеяния света происходит при образовании ассоциатов. Поскольку присутствие наночастиц серебра в растворе ЧСА приводит к увеличению интенсивности флуоресценции более чем в 20 раз, а концентрации молекул ЧСА и наночастиц Ag сопоставимы по величине и размеры молекул альбумина и наночастиц примерно одинаковы, то, возможно, в растворе образуются сложные ассоциаты, содержащие несколько молекул белка, связанных с наночастицами Ag. Образование таких ассоциатов может приводить к радикальной перестройке структуры и функций белков, а влияние МП на структуру ассоциатов позволяет в определенной степени управлять этими свойствами.

Эффект усиления люминесценции наночастиц серебра в присутствии молекул ЧСА может быть также объяснен сенсibilизацией люминесценции. Это явление, хорошо исследованное для

неорганических материалов [21], наблюдается как значительное увеличение интенсивности люминесценции при дополнительном введении в люминофор примеси, которая сама по себе либо не светит вообще, либо обладает незначительными люминесцентными свойствами. Суть явления сенсibilизации люминесценции заключается в том, что центры-сенсibilизаторы (в данном случае — молекулы ЧСА) переходят из основного в возбужденное состояние при поглощении света, после чего передают свою энергию электронного возбуждения акцепторам — люминесцирующим центрам (наночастицам Ag) с последующим высвечиванием. Механизм передачи энергии электронного возбуждения — индуктивно-резонансный, взаимодействие в паре «сенсibilизатор—акцептор», как правило, диполь-дипольное. В наших системах сенсibilизация люминесценции наночастиц Ag приводит к увеличению интенсивности свечения более чем в 20 раз, следовательно, сечение поглощения молекул ЧСА превышает сечение поглощения наночастиц серебра более чем в 20 раз. Таким образом, добротность системы составляет около 20, поскольку часть энергии электронного возбуждения молекул ЧСА теряется при внутрицентральной релаксации, т.е. в конечном счете переходит в тепло.

С помощью предложенной математической модели возможен расчет резонансных длин волн переменного МП для сферических наночастиц серебра заданного размера в присутствии ЧСА, при которых внутри клетки будет происходить самоорганизация и образование крупных ассоциатов «наночастица—ЧСА». Это может быть использовано для внутриклеточных исследований или последующего воздействия на подобную нано/микроструктуру оптическим излучением в терапии онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

Влияние наночастиц серебра на молекулярное окружение определяется наличием у них плазмонных колебаний плотности электронного газа, что изменяет эффективность взаимодействия близлежащих молекул ЧСА с внешним переменным МП. Обнаружен эффект резкого усиления интенсивности флуоресценции альбумина в присутствии наночастиц серебра, который изменяется при воздействии на раствор, содержащий ЧСА и наночастицы серебра в соизмеримых количествах, переменного МП. Образование таких ассоциатов может приводить к радикальной перестройке функций белков. Предложенная универсальная математическая модель позволяет рассчитывать размеры нано-микроструктур на основе плазмонно-резонансных наночастиц и природных биополимеров по типу «ядро—оболочка», физико-химическими свойствами ко-

торых можно управлять с помощью МП. Полученные результаты могут найти применение в развитии персонализированной медицины, направленной на повышение качества лечения, связанной с разработкой функциональных нано-и микроструктур на основе наночастиц в новом направлении медицины — тератоноистике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Peters, Jr., *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, San Diego, 1996).
2. Н. Н. Пшеникина, *Фармакология* **12** (1), 1065 (2011).
3. G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2** (2), 129 (1975).
4. J. K. Kamal, L. Zhao, and A. H. Zewail, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101** (37), 13411 (2004).
5. B. A. Noskov, A. A. Mikhailovskaya, S. Y. Lin, et al., *Langmuir* **26** (22), 17225 (2010).
6. Ю. А. Крутиков, А. А. Кудринский, А. Ю. Олейник и др., *Успехи химии* **77** (3), 242 (2008).
7. И. Е. Станишевская, А. М. Стойнова, А. И. Марахова и др., *Разработка и регистрация лекарственных средств* **1** (14), 66 (2016).
8. S. S. Dzhimak, V. V. Malysheko, A. I. Goryachko, et al., *Nanotechnologies in Russia* **14** (1–2), 48 (2019). DOI: 10.1134/S199507801901004X
9. A. A. Skirtach, A. A. Antipov, et al., *Langmuir* **20** (17), 6988 (2004).
10. A. Wang and Y. Cui, *Chem.-An Asian* **5** (8), 1780 (2010).
11. C. M. Dvorocek, G. Sukhonosova, et al., *Langmuir* **25** (17), 10322 (2009).
12. А. М. Яшенков, Автореф. дис. ... докт. физ.-мат. наук (Сарат. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2016).
13. А. К. Зейниденов, Н. Х. Ибраев и М. Г. Кучеренко, *Вестн. ОГУ* **9** (170), 96 (2014).
14. E. E. Tekutskaya, M. G. Barishev, and G. P. Ilchenko, *Biophysics* **60** (6), 913 (2015). DOI: 10.1134/S000635091506024X
15. E. E. Tekutskaya, *Rus. Open Med. J.* **8** (2), e0202 (2019). DOI: 10.15275/rusomj.2019.0202

16. E. E. Tekutskaya, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., *Med. News of North Caucasus* **10** (3), 287 (2015). DOI: 10.14300/mnnc.2015.10067
17. G. P. Il'chenko, M. G. Baryshev, E. E. Tekutskaya, et al., *Measur. Techn.* **60** (6), 632 (2017). DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
18. А. Н. Герасимов, *Медицинская статистика* (Медицинское информационное агентство, М., 2007)
19. И. М. Власова и А. М. Салецкий, *Хим. физика* **28** (12), 66 (2009).
20. C. R. Bohreh and D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley-VCH, 2009).
21. В. Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов и Е. Б. Свешникова, *Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения* (Наука, Л., 1977).

The Influence of an Alternating Magnetic Field and Silver Nanoparticles on the Spectral Characteristics of an Aqueous Solution of Human Serum Albumin

E.E. Tekutskaya, M.G. Baryshev, E.N. Tumaev, and G.P. Ilchenko

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

In this paper we are concerned with experimental data that are obtained from the study of the effect of low-frequency alternating magnetic field on the conformational transitions of human serum albumin in the presence of silver nanoparticles by means of fluorescence spectroscopy at different pH values. Albumin in the presence of silver nanoparticles showed a sharp increase of fluorescence intensity with further variations of this effect due to exposure to low frequency alternating magnetic field. The obtained formula for calculating a cross-section of the light scattering from a spherical nanoparticle of a certain radius can be used to calculate sizes of nano/microstructures based on natural biopolymer core-shell nanoparticles, physico-chemical properties of which can change under the influence of a magnetic field. The proposed model for the formation of interactions between protein and nanoparticle as a dipole-dipole interaction in a solution is in good agreement with the experimental data.

Keywords: low-frequency alternating magnetic field, albumin, silver nanoparticles, natural fluorescence, conformational transitions

УДК 535.8 + 547.8/963

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОПОЛИМЕРАМИ НА ПРИМЕРЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

© 2020 г. Е.Ф. Немова*, ***, О.П. Черкасова*, Н.А. Николаев*, **, Г.Г. Дульцева***

*Институт лазерной физики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 13/3

E-mail: endy.endy@gmail.com

**Институт автоматики и электрометрии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

***Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Методом ЭПР-спектроскопии в присутствии спиновой ловушки и спинового зонда исследовано влияние терагерцового излучения на функциональную активность бычьего сывороточного альбумина. Применение рН-чувствительной имидазолиновой спиновой ловушки позволило зафиксировать изменение прочности связывания альбумина с оксидом азота. При помощи спинового зонда, образующегося непосредственно в водном растворе альбумина из предшественника — дигидропиразиндиоксида, — показано, что под воздействием терагерцового облучения изменяются интенсивность и ширина линий в спектре ЭПР спинового зонда, что свидетельствует об изменении числа и подвижности парамагнитных центров. Наблюдаемые изменения соотнесены со структурными характеристиками реакционных центров бычьего сывороточного альбумина — функциональных групп аминокислот, входящих в состав белка.

Ключевые слова: терагерцовое излучение, бычий сывороточный альбумин, ЭПР-спектроскопия, спиновая ловушка, спиновый зонд, конформация.

DOI: 10.31857/S0006302920030072

Терагерцовое излучение охватывает спектральный диапазон от 0.1 до 10 ТГц, располагаясь между микроволновой и инфракрасной областями [1]. Это излучение поглощается водой, и одни из первых примеров биомедицинских применений этого излучения были связаны со слежением за изменениями содержания воды в биологических объектах [2]. Проводились исследования биологических эффектов терагерцового излучения на клеточном уровне [3] и на уровне организма [4]. Так, например, сообщалось об обнаружении влияния терагерцового излучения на изменение числа мутаций у дрозофил после предварительной обработки гамма-излучением [5]. Было обнаружено влияние терагерцового излучения на ДНК человеческих лейкоцитов [6] и

на фибробласты [7]. Интерес к изучению биологических эффектов терагерцового излучения связан с тем, что у многих биологических полимеров частоты колебательно-вращательных переходов лежат в этой спектральной области. Энергии кванта терагерцового излучения недостаточно для разрыва даже слабых водородных связей, поэтому не приходится ожидать прямого химического действия излучения в этом диапазоне. Энергетически область терагерцового излучения соответствует коллективным колебательно-вращательным переходам, и именно в изменениях конформаций сложных молекул могут быть причины экспериментально наблюдавшегося влияния терагерцового излучения на биообъекты, хотя детальные молекулярные механизмы такого влияния остаются малоизученными. Механизмы влияния терагерцового излучения необходимо изучать на всех уровнях организации биологической материи: от молекул до клеток и целого ор-

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДПДО — 1,4-дигидропиразиндиоксид, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, ПМИО — 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксид.

ганизма. Так, было исследовано изменение отклика в терагерцовой области в зависимости от степени окисления для цитохрома с [8], изучалось связывание белков с лигандами [9, 10], влияние на гибкость структуры белка с рассмотрением коллективных структурных переходов [11], а также влияние на динамику сольватации пептидов [12].

Данная работа базируется на результатах предыдущих исследований влияния терагерцового излучения на конформации пептидов [13, 14]. В этих работах было обнаружено влияние облучения белковых препаратов на последующую адсорбцию кислорода на реакционных центрах молекулы белка. Было высказано предположение, что одной из причин такого действия излучения может быть вызванное облучением изменение конформации белковой молекулы, приведшее к изменению стерических условий для доступа молекулы кислорода к реакционным центрам. В настоящей работе сделана попытка изучить молекулярный механизм влияния терагерцового излучения на транспортные свойства бычьего сывороточного альбумина (БСА) — водорастворимого глобулярного белка, структура и свойства которого хорошо изучены.

Альбумины выполняют в организме в основном транспортные функции: перенос липидов, билирубина, жирных кислот, аминокислот, ионов металлов [15]. Альбумины в крови также связываются с лекарственными веществами и осуществляют их перенос к органам. При выполнении белком транспортной функции важна возможность обратимой адсорбции, так как переносимый компонент должен связаться с белком достаточно прочно, чтобы переместиться с белком по кровотоку, но затем должна осуществиться десорбция переносимого компонента в органе-мишени. Для адсорбции, помимо размерного соответствия реагирующего фрагмента биомолекулы и лиганда, важна трехмерная структура адсорбционного центра, поэтому ясно, что изменения конформации молекулы белка могут приводить к существенным изменениям биологической активности. В данной работе исследовано влияние терагерцового излучения на изменение прочности связывания БСА с оксидом азота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучали пленочные препараты лиофилизированного БСА (Sigma-Aldrich, США), приготовленные нанесением 50 мкл водного раствора белка с концентрацией 1 мг/мл на предварительно очищенную подложку из кристалличе-

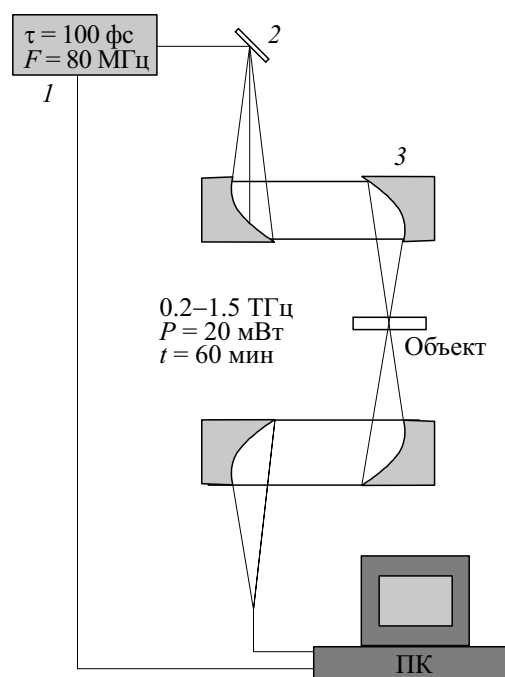


Рис. 1. Схема установки для облучения пленочных образцов бычьего сывороточного альбумина: 1 — фемтосекундный волоконный лазер, 2 — кристалл InSb для генерации терагерцового излучения, 3 — оптическая схема терагерцового спектрометра.

ского кварца. Нанесенную каплю распределяли покровным стеклом по поверхности подложки, затем образец высушивали в токе воздуха при атмосферном давлении и комнатной температуре. Относительная влажность воздуха при нанесении и сушке образца поддерживалась на уровне не выше 40%. Образцы хранили в эксикаторе над обезвоженным силикагелем. Толщина полученных пленок составляет 1–3 мкм, как было показано эллипсометрическими измерениями [16].

Облучение пленочных образцов проводили на установке, схема которой приведена на рис. 1. Подробнее установка была описана ранее [17]. Источник терагерцового излучения работает в импульсном режиме. Длительность импульса — 2–3 пс, частота следования ~ 80 МГц, спектр излучения 0.2–1.5 ТГц, пиковая мощность 20 мВт. Длительность облучения исследуемого объекта составляла 60 мин. Все образцы готовили парами: экспериментальный и контрольный. Контрольный образец находился в тех же условиях, что и экспериментальный, но его не облучали. В предварительных опытах было показано при помощи контроля температуры пленки в процессе облучения, а также при помощи нагревания контрольных образцов до заданной температуры, что вли-

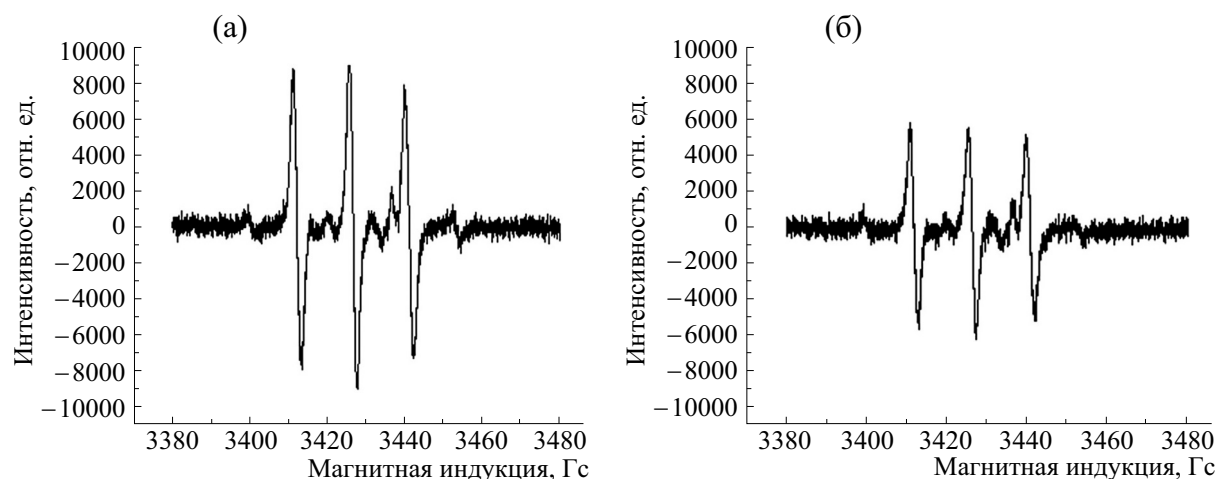


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильного радикала, образовавшегося из дигидропиразиндиоксида в присутствии облученного (а) и необлученного (б) бычьего сывороточного альбумина.

яние облучения на химические свойства пленки не связано с ее нагревом [16].

В качестве предшественника спинового зонда использовали органическое соединение класса динитронов, синтезированное в Новосибирском институте органической химии (НИОХ СО РАН), — 1,4-дигидропиразиндиоксид (ДПДО) [18]. Концентрация соединения в растворе для исследования методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) составляла 7 мМ. Для оценки адсорбции кислорода на реакционных центрах молекулы БСА и для определения локальных изменений рН вблизи центров адсорбции оксида азота применяли имидазолиновый нитрон — 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксид (ПМИО), также синтезированный в НИОХ СО РАН [18]. Перед использованием это соединение очищали возгонкой при пониженном давлении. Концентрация ПМИО в растворе для исследования методом ЭПР составляла 2 мМ.

Оксид азота (II) получали по реакции нитрита натрия с хлоридом железа (II) в присутствии соляной кислоты (все реактивы — квалификации «х.ч.»). Реакцию проводили в круглодонной трехгорлой колбе, соединенной с буферной емкостью для получения равномерного потока газа. После обработки пленочного препарата альбумина в потоке газообразного оксида азота пленку смывали дистиллированной водой (500 мкл) в стандартную ампулу для ЭПР-спектроскопии водных растворов, приливали раствор спиновой ловушки и производили запись спектров ЭПР.

Спектры ЭПР записывали на приборе Bruker EMX (Bruker, Германия). Микроволновая мощность не превышала 10 мВт. Амплитуда модуля-

ции составляла 0.3–1.0 Гс, частота модуляции 100 кГц, усиление $1 \cdot 10^4$ – $5.6 \cdot 10^5$, постоянная времени 0.2 с, развертка 100 Гс/200 с, микроволновая частота 9.6 ГГц. Константы сверхтонкого расщепления определяли с точностью не менее 0.02 Гс. Количественные измерения интенсивности сигнала ЭПР проводили при помощи внешнего стандарта — кристалла дифенилпикрилгидрида, прикрепленного к внешней стороне плоской кварцевой ампулы для ЭПР-спектроскопии водных растворов.

Расчет структуры реакционных центров и оценку выигрыша энергии при адсорбции кислорода и оксида азота на функциональных центрах БСА проводили при помощи программы CS Chem 3D Pro, версия 5.0 (Cambridge Soft Corporation, Великобритания). В программе используются расчетные методы *MNDO*, *AM1*, *PM3*, а также *MM2* [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование парамагнитных центров в присутствии предшественника спинового зонда (1,4-дигидропиразиндиоксида). Было обнаружено, что диамагнитное соединение ДПДО в водных растворах альбумина частично превращается в нитроксильный радикал, который легко зарегистрировать методом ЭПР-спектроскопии. Этот сигнал представляет собой триплет с константой сверхтонкого расщепления $a_N = 14.7$ Гс (рис. 2). При помощи внешнего стандарта интенсивности было проведено сравнение интенсивностей сигналов ЭПР нитроксильного радикала, образовавшегося из ДПДО в растворе альбумина, облученного терагерцовым излучением, и в растворе не-

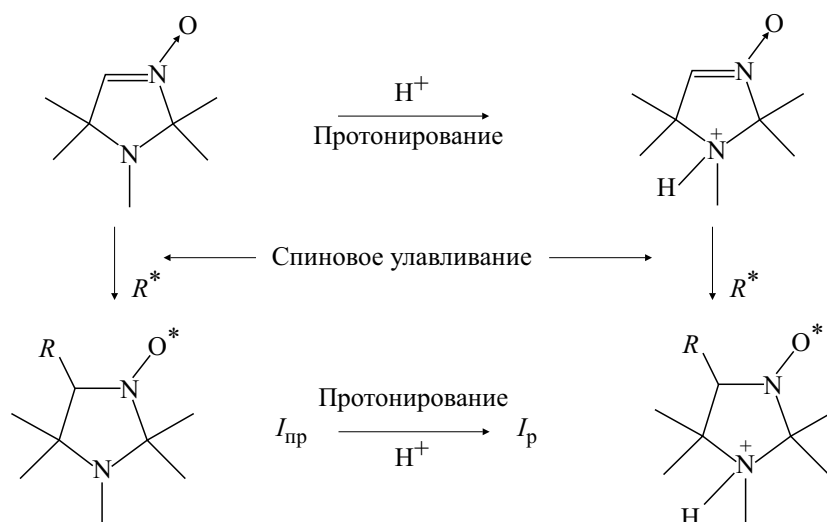


Рис. 3. Схема протонирования и спинового улавливания для спиновой ловушки 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксида.

облученного альбумина. Сравнение показало, что интенсивность сигнала в первом случае примерно в 1.6 раза больше, чем во втором. Это означает, что число возникающих парамагнитных центров больше в случае облученного альбумина. Было также отмечено, что ширина линий в спектре ЭПР ДПДО в присутствии облученного БСА (2.14 ± 0.02 Гс) больше, чем в случае необлученного (1.81 ± 0.02 Гс). Как видим, различие составляет около 15%. Ширина линии в спектре ЭПР связана с подвижностью парамагнитного центра: если подвижность велика, то происходит сужение линии. Таким образом, видно, что парамагнитные центры, возникающие в присутствии облученного альбумина, менее подвижны по сравнению с необлученным.

В предположении, что образованию парамагнитных центров способствует адсорбция кислорода на группах альбумина, было проведено моделирование энергетики процесса адсорбции при помощи программы CS Chem 3D Pro. При моделировании искали положения атомов, отвечающие локальным минимумам потенциальной энергии. Было показано, что наибольший выигрыш энергии дает адсорбция кислорода на сульфгидрильных группах, а также на пирролидиновом цикле, который является частью пролинового фрагмента структуры белка. Эти группы полярны и участвуют в образовании водородных связей, стабилизирующих пространственное строение молекулы альбумина. Ранее было показано, что в результате облучения альбумина терагерцовым излучением изменяется число альфа-спиралей, в образовании которых решающая роль принадлежит как раз пролиновому фрагменту, который обеспечивает резкий изгиб полипептидной цепи

[20]. Таким образом, терагерцовое излучение вызывает некоторое изменение конформации молекулы альбумина, а это приводит к увеличению адсорбции кислорода на реакционных центрах белка. Следует отметить, что зависимость окислительных свойств от облучения в терагерцовом диапазоне для альбуминов ранее не была описана.

Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с оксидом азота (II). Оксид азота NO контролирует многие функции в различных клетках организма, кроме того, было установлено, что это соединение играет роль внутриклеточного мессенджера. Обзор результатов изучения многообразных биологических функций оксида азота представлен, например, в работах [21, 22]. Одним из свойств NO является его способность образовывать комплекс с альбумином. Для изучения связывания БСА с оксидом азота NO пленочные препараты альбумина обрабатывали потоком газообразного оксида азота, выделяющегося в отдельном реакционном сосуде при взаимодействии хлорида железа (II) с нитритом натрия в присутствии соляной кислоты. Оксид азота — парамагнитная молекула, во многих реакциях ведущая себе как свободный радикал. Для исследования описанной реакционной системы была использована спиновая ловушка класса имидазолин-оксидов (ПМИО), обладающая чувствительностью к pH среды. Это свойство позволяет использовать ловушку для измерения pH в микроокружении радикального центра. Чувствительность спиновой ловушки к кислотности среды определяется наличием в ее молекуле аминного атома азота, способного к протонированию. Было показано, что ловушка эффективно улавливает

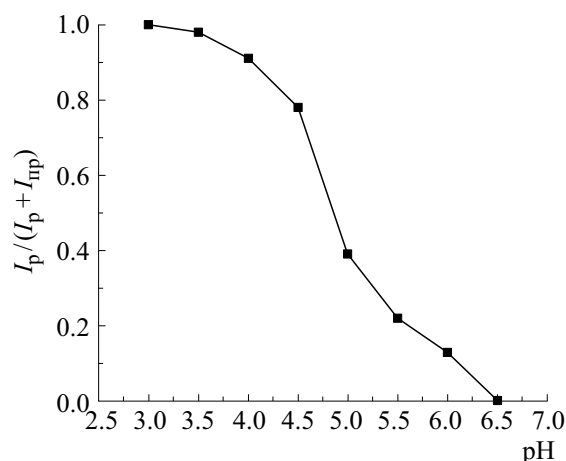


Рис. 4. Кривая титрования спиновой ловушки 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксида.

короткоживущие свободные радикалы как в протонированной форме, так и в непротонированной. Схема процессов протонирования и спинового улавливания приведена на рис. 3. Параметры спектров ЭПР протонированных и непротонированных спиновых аддуктов различаются, причем в области pH от 3 до 6 в спектрах ЭПР наблюдаются оба аддукта. По отношению интенсивности I_p сигнала, соответствующего протонированному спинового аддукту, к сумме интенсивностей сигналов протонированного I_p и непротонированного $I_{пр}$ аддуктов $I_p / (I_p + I_{пр})$ удалось построить кривую титрования для ловушки в водном растворе, в котором кислотность среды формировали добавками соляной кислоты и едкого натра и измеряли лабораторным pH-метром. Полученная кривая титрования приведена на рис. 4. Измерив в спектре ЭПР спинового аддукта ловушки ПМИО величину $I_p / (I_p + I_{пр})$, можно при помощи кривой титрования оценить величину pH.

Пример спектра, содержащего сигналы одновременно протонированного и непротонированного спиновых аддуктов, показан на рис. 5. Были получены отношения интенсивностей $I_p / (I_p + I_{пр})$ для облученного БСА 0.27 ± 0.02 (что приблизительно соответствует pH 5.3) и для необлученного — 0.17 ± 0.03 (pH ~ 5.6). Таким образом, при помощи кривой титрования было установлено, что взаимодействие облученного альбумина с оксидом азота приводит к более сильному локальному закислению, чем необлученного. Образование кислоты в растворе происходит за счет присутствия диоксида азота, который является продуктом окисления NO кислородом воздуха и кислородом, адсорбированным на группах альбумина. Присутствие диоксида азота в водном рас-

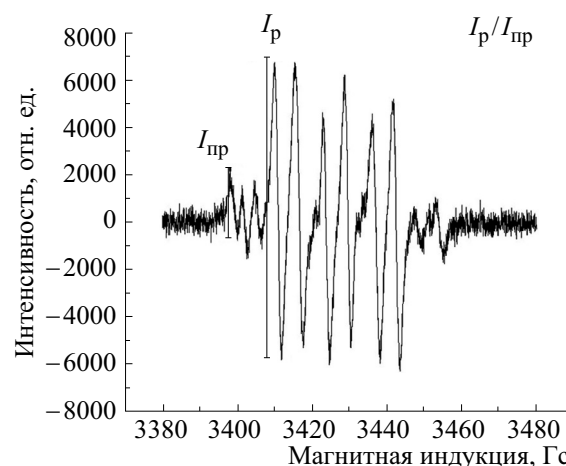


Рис. 5. Спектр ЭПР, содержащий сигналы от протонированной и непротонированной форм спинового аддукта.

творе создает кислую среду, что приводит к протонированию ловушки. Таким образом, чем сильнее наблюдаемое закисление, тем выше концентрация диоксида азота в растворе. В случае облученного альбумина конверсия $\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2$ идет быстрее, а значит, под действием терагерцового излучения связывание оксида азота с альбумином ослабевает.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что вызываемые терагерцовым излучением колебательно-вращательные переходы в молекуле БСА частично снимают стерические затруднения для адсорбции кислорода на функциональных группах БСА, содержащих азот и серу, облегчая тем самым адсорбционное взаимодействие с кислородом. Вторичная и третичная структуры взаимозависимы от адсорбции кислорода, поскольку обусловлены водородными связями, которые участвуют и в адсорбционных взаимодействиях [23]. Для реализации экспериментально обнаруженного уменьшения связывания оксида азота с реакционными центрами БСА под действием терагерцового облучения должен быть облегчен доступ оксида азота к окислительным центрам, на которых адсорбирован кислород. Моделирование показало, что для этого необходим конформационный переход с участием азотсодержащих гетероциклов и тиольных групп.

Для того чтобы понять природу конформационного перехода, вызываемого в молекуле БСА терагерцовым излучением, результаты квантово-химического исследования были дополнены моделированием пространственной структуры путем последовательного «отключения» функциональных групп, участвующих в ее формировании.

Это позволило определить группы, вовлеченные в наблюдаемый конформационный переход. Ключевым структурным звеном, обеспечивающим конформационный переход, оказался пролиновый фрагмент. По-видимому, терагерцовое излучение возбуждает вращательные моды в петлях, связанных с пролиновыми звеньями БСА [23]. Для экспериментального подтверждения полученных результатов предлагается подобрать лиганды для селективного связывания функциональных групп в этих петлях и исследовать влияние такого связывания на конформационный переход.

ВЫВОДЫ

Показано, что облучение пленочных препаратов альбумина терагерцовым излучением приводит к увеличению адсорбции кислорода на реакционных центрах альбумина и ослаблению связывания альбумина с оксидом азота. При помощи квантовохимического моделирования были выявлены участки первичной структуры альбумина, обеспечивающие эффективную адсорбцию кислорода: $-SH$, $-S-S-$, $=NH$, атом азота пирролидинового гетероцикла. Моделирование пространственной структуры показало, что причиной наблюдаемых явлений может быть конформационный переход с участием пролинового фрагмента.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Центр коллективного пользования «Спектроскопия и оптика» Института автоматики и электрометрии СО РАН за предоставленный источник терагерцового излучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в рамках государственной программы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (AAAA-A17- 117030310290-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y.-S. Lee, *Principles of Terahertz Science and Technology* (Springer-Verlag, USA, 2009).
2. M. Van Exter, C. Fattinger, and D. Grischkowsky, *Opt. Lett.* **14**, 1128 (1989).
3. В. И. Федоров, Д. С. Сердюков, О. П. Черкасова и др., *Оптич. журн.* **84** (8), 9 (2017).
4. I. Ilina, D. S. Sitnikov, and M. B. Agranat, *High Temperature* **56** (5), 789 (2018).
5. В. И. Федоров, А. С. Погодин, Т. Д. Дубатолова и др., *Биофизика* **46** (2), 298 (2001).
6. A. A. Angeluts, A. B. Gapeyev, M. N. Esaulkov, et al., *Quantum Electronics* **44** (3), 247 (2014).
7. G. J. Wilmink, B. D. Rivest, C. C. Roth, et al., *Lasers Surg. Med.* **44**, 152 (2011).
8. J.-Y. Chen, J. R. Knab, J. Cerne, et al., *Phys. Rev. E* **72** (4), 040901 (2005).
9. J. Chen, J. Knab, S. Ye, et al., *Appl. Phys. Lett.* **90**, 243901 (2007).
10. О. П. Черкасова, В. И. Федоров, Е. Ф. Немова и А. С. Погодин, *Оптика и спектроскопия* **107** (4), 566 (2009).
11. B. Born, S. J. Kim, S. Ebbinghaus, et al., *Faraday Discuss.* **141**, 161 (2009).
12. B. Born, H. Weingärtner, E. Bründermann, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3752 (2009).
13. E. F. Nemova, O. P. Cherkasova, and V. I. Fedorov, *Proc. SPIE* **7993**, 799325-1 (2010).
14. O. P. Cherkasova, V. I. Fedorov, E. F. Nemova, et al., *Proc. SPIE* **6727**, 672721-1 (2007).
15. A. Farrugia, *Transfusion Med. Rev.* **24** (1), 53 (2010).
16. А. В. Капралова и А. С. Погодин, *Вестн. НГУ. Сер. Физика* **5** (4), 182 (2010).
17. В. Д. Анцыгин, А. А. Мамрашев, Н. А. Николаев и др., *Автометрия* **46** (3), 110 (2010).
18. G. G. Dultseva, G. I. Skubnevskaya, A. Ya. Tikhonov, et al., *J. Phys. Chem.*, **100** (44), 17523 (1996).
19. F. N. Dultsev and G. G. Dultseva, *Chem. Engineer. Sci.* **1** (2), 17 (2013).
20. V. M. Govorun, V. E. Tretiakov, N. N. Tulyakov, et al., *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **12** (12), 1469 (1991).
21. A. C. Pereira, M. Paulo, A. V. Araujo, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44** (9), 947 (2011).
22. А. Ф. Ванин, *Успехи физ. наук*, **170** (4), 455 (2000).
23. В. И. Федоров, Н. Я. Вайсман, Е. Ф. Немова и др., *Биофизика* **58** (6), 1043 (2013).

Investigation of the Molecular Mechanisms of the Interaction between Terahertz Radiation and Biopolymers: A Case Study on Bovine Serum Albumin

E.F. Nemova^{*, ***}, O.P. Cherkasova^{*}, N.A. Nikolaev^{*, **}, and G.G. Dultseva^{***}

**Institute of Laser Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Lavrentyeva 13/3, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
, prosp. Akademika Koptiyuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

****Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia*

Electron paramagnetic resonance spin trapping and spin probing techniques were used to investigate the effect of terahertz radiation on the functional activity of bovine serum albumin. Using a pH-sensitive imidazoline spin trap it was possible to detect changes in the binding strength of nitrogen oxide to albumin. With the help of a spin probe formed directly in the aqueous solution of albumin from a dihydropyrazine dioxide precursor it was shown that terahertz radiation causes changes in the signal intensity and widths of EPR spectral lines of the spin probe, which is the evidence of changes in the number and mobility of paramagnetic centers. The observed changes were compared to the structural characteristics of reaction centers in bovine serum albumin—functional groups of amino acids incorporated into the protein.

Keywords: terahertz radiation, bovine serum albumin, EPR spectroscopy, spin trap, spin probe, conformation

МАГНИТНО-ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАГНИЯ И ЦИНКА В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА АТФ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МОТОРАМИ

© 2020 г. В.К. Кольтовер*, Р.Д. Лабынцева**, В.К. Карандашев***

*Институт проблем химической физики РАН,

142432, Черноголовка Московской области, просп. Академика Семенова, 1

**Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01030, Киев, ул. Леонтовича, 9, Украина

***Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН,

142432, Черноголовка Московской области, ул. Академика Осипяна, 6

E-mail: koltover@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 04.03.2020 г.

Принята к публикации 06.03.2020 г.

Изучено влияние различных изотопов магния и цинка на ферментативную активность субфрагмента-1 миозина. В реакционной среде с магнитным изотопом магния (^{25}Mg) скорость ферментативного гидролиза АТФ вдвое выше, чем в среде с немагнитными изотопами (^{24}Mg или ^{26}Mg). Аналогичный магнитно-изотопный эффект обнаружен в экспериментах с изотопами цинка в качестве кофактора фермента. Скорость ферментативного гидролиза АТФ с магнитным изотопом цинка (^{67}Zn) на 40–50% выше, чем с немагнитными изотопами (^{64}Zn или ^{68}Zn). Магнитно-изотопные эффекты наблюдаются при физиологической концентрации (5 мМ) хлоридов магния и цинка. Каталитический эффект магнитного изотопа магния выявлен также в экспериментах с Mg-зависимой АТФазой плазматических мембран миометрия. Магнитно-изотопный эффект свидетельствует о том, что в хемомеханическом процессе, катализируемом «молекулярным мотором» за счет энергии гидролиза АТФ, имеется лимитирующая стадия, зависящая от электронного спинового состояния, и что ядерный спин изотопа ускоряет эту стадию. Обсуждаются механизмы ядерного спинового катализа.

Ключевые слова: ядерный спиновый катализ, миозин, АТФазная активность, биомолекулярные моторы, бионадежность, магнитно-изотопный эффект, магний, цинк.

DOI: 10.31857/S0006302920030084

Клетки и ткани состоят из атомов химических элементов, многие из которых имеют два типа стабильных изотопов — магнитные и немагнитные. Например, магний имеет три стабильных изотопа, ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg , с относительным содержанием 78.7, 10.1 и 11.2% соответственно. Изотоп ^{25}Mg — магнитный, так как его атомное ядро имеет ядерный спин ($I = 5/2$), создающий магнитное поле; изотопы ^{24}Mg и ^{26}Mg — немагнитные, так как их ядра не имеют ядерного спина ($I = 0$) и соответственно не создают магнитное поле. Другой распространенный в живой природе элемент, цинк, имеет пять стабильных изотопов — ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn и ^{70}Zn с относительным содержанием соответственно 48.6, 27.9, 4.1, 18.8 и 0.6%. Из них ^{67}Zn — магнитный изотоп (имеет ядерный спин, $I = 5/2$); остальные четыре изото-

па — немагнитные ($I = 0$). Известно также, что магнитные изотопы создают внутренние магнитные поля, которые на расстояниях порядка длинны химической связи могут превышать в 10–100 раз магнитное поле Земли (≈ 0.05 мТ) [1].

Недавно, в экспериментах с живыми клетками, обогащенными магнитным изотопом магния, были обнаружены магнитно-изотопные эффекты (МИЭ). Например, активность антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в клетках *E. coli*, выросших на среде, обогащенной ^{25}Mg , на 40% ниже, чем в клетках, выросших на среде, обогащенной немагнитным изотопом магния [2]. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, обогащенные магнитным изотопом магния, восстанавливаются после облучения коротковолновым ультрафиолетовым светом или ионизирующей радиацией в два раза быстрее, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом магния [3]. В работах нашей группы был впервые обнаружен МИЭ маг-

Сокращение: МИЭ — магнитно-изотопные эффекты.

ния в реакции гидролиза АТФ, катализируемой одним из важнейших «молекулярных моторов» биоэнергетики — миозином [4, 5].

В настоящей работе представлены результаты наших экспериментов, в которых изучалась АТФ-гидролазная активность биомолекулярных моторов в присутствии, в качестве кофактора фермента, различных изотопов магния и цинка. В экспериментах с миозином обнаружены значительные по величине эффекты ускорения ферментативного гидролиза магнитными изотопами магния и цинка, по сравнению с немагнитными изотопами того же элемента (ядерный спиновый катализ). Небольшой каталитический эффект магнитного изотопа магния выявлен также в экспериментах с Mg-АТФазой, изолированной из плазматических мембран миомерии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали оксиды магния ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO с изотопным обогащением 99,9, 98,8 и 97,7 атом. % и оксиды цинка ^{64}ZnO , ^{67}ZnO , и ^{68}ZnO , с изотопным обогащением 99,3, 94,2 и 98,9 атом. % соответственно производства ФГУП «Электрохимприбор» (Россия). Из этих оксидов были приготовлены растворы хлоридов, $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$, $^{64}\text{ZnCl}_2$, $^{67}\text{ZnCl}_2$, $^{68}\text{ZnCl}_2$, с использованием концентрированной HCl аналитической чистоты по стандартной методике [6]. Хлориды магния и цинка природного изотопного состава (MgCl_2 , ZnCl_2) и другие реактивы, использованные в настоящей работе, были произведены компаниями Sigma-Aldrich (США), Perkin Elmer (США) и Merck (Германия).

Концентрации магния и цинка в исходных растворах измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, после чего все растворы выравняли по концентрации ионов соответственно магния и цинка. Изотопные составы растворов магния и цинка, а также их элементный состав определяли методами масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой в Аналитическом центре Института проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (Черноголовка Московской области). Содержание примесных элементов Li, B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr и Ba определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием спектрометра iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, США). Содержание Li, B, Be, Al, P, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In,

Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th и U определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с использованием спектрометра X-Series II (Thermo Scientific, США) по методикам, описанным ранее [7]. Определение Li, B, Al, P, V, Mn, Cu, Zn, Sr и Ba двумя независимыми методами позволяло контролировать правильность проведения анализа в каждом образце [7].

Биохимические эксперименты были выполнены в отделе биохимии мышц Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины (Киев, Украина). Субфрагмент-1 миозина получали из гладкой мышцы (миомерии) свиней по стандартной методике [8, 9]. Субфрагмент-1 миозина считается достаточной функциональной единицей миозина, поскольку сохраняет все его нативные свойства, а именно каталитическую АТФ-гидролазную активность и способность взаимодействовать с актином [8–10]. Mg^{2+} -зависимая АТФаза плазматической мембраны («базальная Ca^{2+} -независимая Mg^{2+} -АТРаза») была получена из гладкой мышцы по методике, описанной в работах [11, 12]. АТФ-гидролазную активность ферментов измеряли при температуре 37°C по количеству неорганического фосфата (P_i), отщепленного при гидролизе АТФ [13]. В основе этого метода («метод Фiske—Суббароу») лежит реакция неорганического фосфата с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты как восстановителя, в результате которой образуется окрашенный комплекс в количестве, пропорциональном количеству P_i , образованного при гидролизе АТФ [13]. Экспериментальные данные анализировали с использованием стандартных методов дисперсионного анализа (ANOVA) и программ MS Office и Statistica 4.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа изотопного состава реакционных сред для измерений гидролиза АТФ представлены в табл. 1 (эксперименты с различными изотопами магния) и табл. 2 (эксперименты с различными изотопами цинка). Результаты свидетельствуют о высокой степени изотопного обогащения реакционных сред соответствующими изотопами магния (^{24}Mg , ^{25}Mg или ^{26}Mg) и цинка (^{64}Zn , ^{67}Zn или ^{68}Zn).

Результаты измерений АТФ-гидролазной активности субфрагмента-1 миозина в средах с различными изотопами магния представлены на рис. 1а. Активность определяли в стандартной реакционной среде, содержащей 5 мМ (физиологическая концентрация) хлорида магния, а именно: $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ или MgCl_2 природ-

Таблица 1. Изотопный состав магния в реакционных средах для измерений гидролиза АТФ

Изотоп	Изотопное обогащение, %			
	$^{24}\text{MgCl}_2$	$^{25}\text{MgCl}_2$	$^{26}\text{MgCl}_2$	MgCl_2
^{24}Mg	99.7 ± 0.1	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03	79.2 ± 0.4
^{25}Mg	1.3 ± 0.1	98.2 ± 0.2	0.46 ± 0.1	10.1 ± 0.1
^{26}Mg	1.1 ± 0.1	0.22 ± 0.1	98.7 ± 0.3	10.7 ± 0.2

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (pH 7.2), 0,01 мМ CaCl_2 , 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида магния, соответственно, природного изотопного состава (MgCl_2), $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$ и $^{26}\text{MgCl}_2$. Представлены средние значения $\pm$ среднее квадратичное отклонение ($m \pm SD$); число независимых измерений в каждом растворе $n = 5$.

Таблица 2. Изотопный состав цинка в реакционных средах для измерений гидролиза АТФ

Изотоп	Изотопное обогащение, %		
	$^{64}\text{ZnCl}_2$	$^{67}\text{ZnCl}_2$	$^{68}\text{ZnCl}_2$
^{64}Zn	99.2 ± 0.1	0.74 ± 0.02	0.48 ± 0.02
^{66}Zn	0.54 ± 0.04	1.6 ± 0.02	0.42 ± 0.02
^{67}Zn	0.063 ± 0.009	93.9 ± 0.1	0.27 ± 0.01
^{68}Zn	0.20 ± 0.01	3.7 ± 0.03	98.8 ± 0.1
^{70}Zn	0.006 ± 0.001	0.045 ± 0.003	0.027 ± 0.004

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (pH 7.2), 0,01 мМ CaCl_2 , 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида цинка, соответственно, $^{64}\text{ZnCl}_2$, $^{67}\text{ZnCl}_2$ и $^{68}\text{ZnCl}_2$. Представлены средние значения $\pm$ среднее квадратичное отклонение ($m \pm SD$); число независимых измерений в каждом растворе $n = 5$.

ного изотопного состава. Были выполнены три независимые серии экспериментов с разными препаратами миозина, выделенными в разное время из трех разных животных. С каждым из

этих препаратов выполняли от трех до восьми повторов с каждым изотопом магния и магнием природного изотопного состава. Во всех экспериментальных сериях наблюдался один и тот же

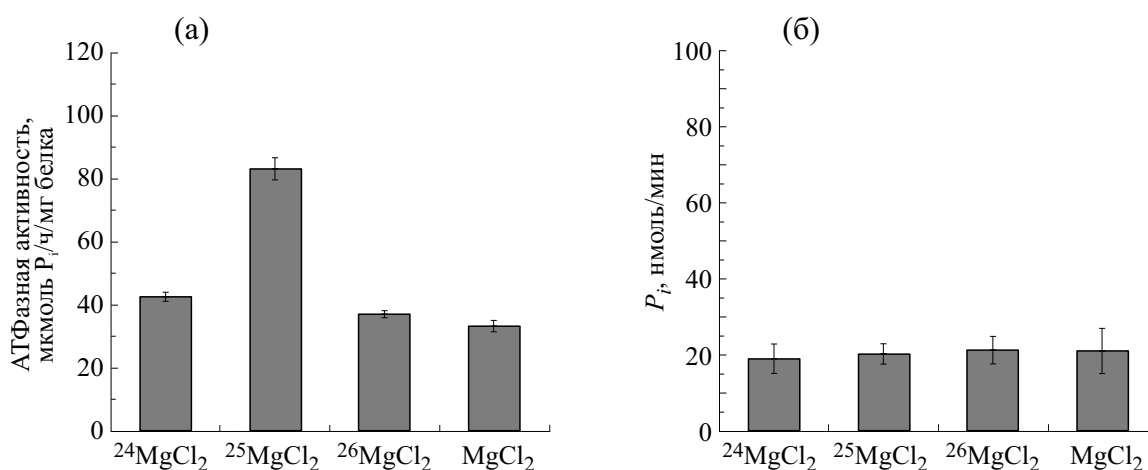


Рис. 1. (а) — АТФазная активность ($m \pm SD$) субфрагмента-1 миозина (мкмоль P_i /ч/мг белка) в реакционных средах с различными изотопами магния. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (pH 7.2), 0,01 мМ CaCl_2 , 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ, субфрагмент-1 миозина (20 мкг белка/мл) и 5 мМ хлорида магния, соответственно $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ и MgCl_2 природного изотопного состава. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом ^{25}Mg и средними значениями в экспериментах с немагнитными изотопами магния статистически достоверны при $P < 0.01$. (б) — Неферментативный гидролиз АТФ в водных растворах с $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ и MgCl_2 природного изотопного состава. По данным работы [4].

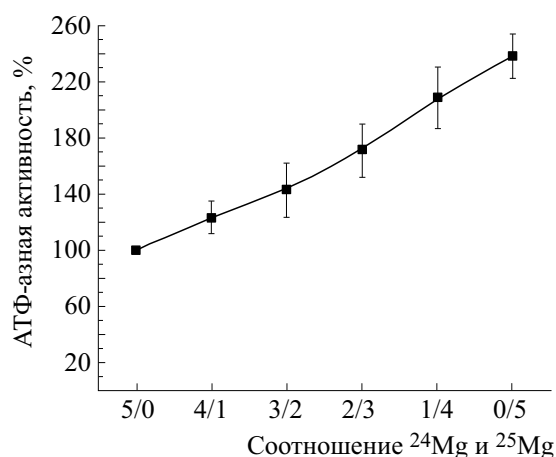


Рис. 2. АТФазная активность субфрагмента-1 миозина как функция доли содержания магнитного изотопа магния, ^{25}Mg , в реакционном растворе. Данные ($m \pm SD$) представлены в процентах к активности при 5 мМ $^{24}\text{MgCl}_2$, принятой за 100%.

магнитно-изотопный эффект, а именно: активность фермента в присутствии магнитного изотопа (^{25}Mg) была в два-два с половиной раза выше, чем активность фермента в присутствии немагнитного изотопа (^{24}Mg или ^{26}Mg). При этом не было обнаружено существенных различий активности фермента в экспериментах с немагнитными изотопами магния. Важно отметить, что МИЭ не наблюдается при неферментативном (спонтанном) гидролизе АТФ. В реакционных средах того же состава, содержащих все компоненты за исключением фермента, величина скорости гидролиза АТФ была одинаковой с $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ и MgCl_2 природного изотопного состава (рис. 16). МИЭ наблюдается только при ферментативном гидролизе АТФ.

На следующем рисунке представлены результаты измерений АТФ-гидролазной активности того же фермента в реакционных средах, содержащих $^{25}\text{MgCl}_2$ и $^{24}\text{MgCl}_2$ в различных соотношениях, т.е. доля магнитного изотопа (^{25}Mg) в растворе варьировала от 0 до 5 мМ, а доля немагнитного (^{24}Mg) соответственно от 5 до 0 мМ.

Можно видеть, что имеет место практически линейный рост скорости гидролиза АТФ с ростом доли содержания магнитного изотопа в реакционном растворе (рис. 2).

В следующих экспериментах было изучено влияние различных изотопов цинка на АТФ-гидролазную активность субфрагмента-1 миозина. Была использована стандартная реакционная среда, но содержащая хлорид цинка вместо хлорида магния, а именно: 5 мМ $^{67}\text{ZnCl}_2$ (магнитный

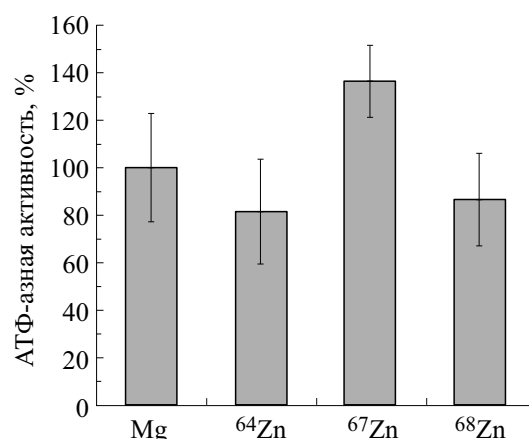


Рис. 3. АТФазная активность субфрагмента-1 миозина в реакционных средах, содержащих различные изотопы цинка. Растворы содержали 20 мМ трис-НCl (pH 7.2), 0.01 мМ CaCl_2 , 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ, субфрагмент-1 миозина (20 мкг белка/мл) и 5 мМ хлорида цинка, соответственно $^{64}\text{ZnCl}_2$, $^{67}\text{ZnCl}_2$ или $^{68}\text{ZnCl}_2$. Данные ($m \pm SD$, $n = 3$) представлены в процентах к ферментативной активности в присутствии 5 мМ MgCl_2 природного изотопного состава, принятой за 100%. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом, ^{67}Zn , и средними значениями в экспериментах с немагнитными изотопами цинка статистически достоверны при $P < 0.05$.

изотоп цинка) или 5 мМ $^{64}\text{ZnCl}_2$, или $^{68}\text{ZnCl}_2$ (немагнитный изотоп цинка). Были выполнены две независимые серии экспериментов с ферментативными препаратами, изолированными из двух разных животных, не менее трех повторов с каждым изотопом цинка в экспериментах с каждым ферментативным препаратом. Результаты представлены на рис. 3. Известно, что ион Zn^{2+} в качестве кофактора миозина менее эффективен, чем Mg^{2+} [14, 15]. Действительно, активность фермента в присутствии немагнитных ионов цинка оказалась ниже, чем в присутствии ионов магния (рис. 3). В экспериментах с различными немагнитными изотопами цинка различий в скорости гидролиза АТФ нет. Однако с магнитным изотопом цинка (^{67}Zn), скорость гидролиза АТФ на 50–70% выше по сравнению со скоростью гидролиза АТФ в присутствии немагнитных изотопов цинка. Таким образом, в экспериментах с изотопами цинка также обнаружен эффект ускорения ферментативного гидролиза АТФ, аналогичный МИЭ, ранее обнаруженному нами в экспериментах с изотопами магния.

Кроме экспериментов с миозином были выполнены эксперименты с Mg^{2+} -зависимой АТФ-гидролазой плазматических мембран миометрия. Этот фермент, так называемая «базальная Mg^{2+} -

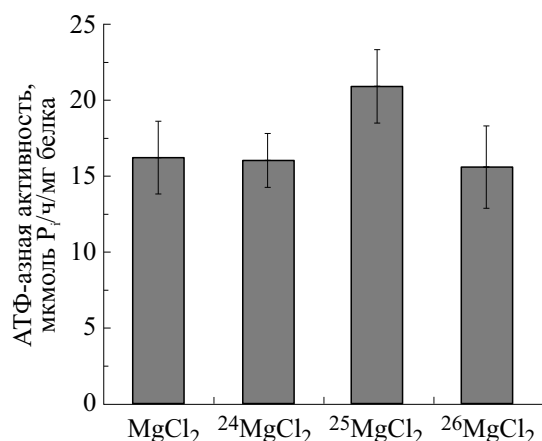


Рис. 4. Активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы плазматических мембран миомерии (мкмоль P_i /ч/мг белка) в реакционных средах с различными изотопами магния. Растворы содержали 50 мМ трис-НCl (pH 7.4), 25 мМ NaCl, 125 мМ KCl, 0.1 мМ $CaCl_2$, 0.1 мМ ЭГТА, 10 мкг/мл белка, 3 мМ АТФ, 5 мМ хлорида магния, соответственно природного изотопного состава, $^{24}MgCl_2$, $^{25}MgCl_2$ или $^{26}MgCl_2$. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом магния и в экспериментах с немагнитными изотопами магния ($m \pm SD$, $n = 4$) статистически достоверны при $P = 0.05$.

АТРаза» или « Ca^{2+} -независимая Mg^{2+} -АТРаза», играет важную роль в регулировании концентрации протонов вовне и внутриклеточном пространстве, а также в регулировании концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме гладкомышечных клеток [11, 12]. Были выполнены три независимые серии экспериментов с препаратами этого фермента, выделенными из трех разных животных. Типичные результаты представлены на рис. 4. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в реакционной среде, содержащей магнитный изотоп ^{25}Mg , в среднем на 15–20% выше, чем в средах с немагнитными изотопами. Таким образом, и в этих экспериментах выявлен каталитический эффект магнитного изотопа магния.

Можно было бы предположить, что причиной обнаруженных магнитно-изотопных эффектов служит разное содержание примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в реакционную среду с различными изотопами магния или, соответственно, цинка. Однако такое предположение исключается данными элементного анализа сред, содержащих различные изотопы магния (табл. 3) и цинка (табл. 4). Согласно данным атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии, элементный состав реакционных сред был одинаков при содержании примесных элементов не более нескольких микромолей на литр, независимо от типа изотопа магния или соответственно цинка. Например, содержа-

ние железа (Fe) в растворе с магнитным изотопом магния (^{25}Mg) почти в четыре раза больше, чем в растворе с немагнитным изотопом (^{24}Mg), но в два с половиной раза меньше, чем в растворе с другим немагнитным изотопом (^{26}Mg). Между тем активность фермента в растворе с немагнитным изотопом ^{24}Mg и в растворе с другим немагнитным изотопом ^{26}Mg практически одна и та же и вдвое ниже, чем активность фермента в растворе с магнитным изотопом магния. Аналогичным образом исключается возможность влияния других примесных элементов. Кроме того, следует принять во внимание, что не только исходные оксиды магния и цинка, но и другие реактивы, необходимые для проведения экспериментов, также содержат примеси, которые вводятся в экспериментальные среды, причем в количествах, значительно превышающих количества тех же примесей, вводимые с гораздо меньшими добавками магния и цинка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, в наших экспериментах обнаружены магнитно-изотопные эффекты. А именно, ферментативный гидролиз АТФ, катализируемый миозином, изолированным из миомерии, и ферментативный гидролиз АТФ, катализируемый Mg -зависимой АТФазой плазматических мембран миоцитов, ускоряются ядерным спином магнитного изотопа. Имеет место ядерный спиновый катализ. Ранее аналогичный каталитический эффект ядерного спина изотопа ^{25}Mg , небольшой, но статистически достоверный, был обнаружен в экспериментах по влиянию различных изотопов магния на гидролиз АТФ, катализируемый H^+ -АТФазой (комплекс MF_0F_1), выделенной из митохондрий дрожжей и встроенной в липосомы [16]. Не удалось, однако, обнаружить магнитно-изотопные эффекты в экспериментах по изучению влияния различных изотопов магния на АТФ-зависимые реакции, катализируемые креатин-фосфаткиназой [17] и люциферазой [17]. Складывается впечатление, что ядерный спиновый катализ наблюдается в работе только тех ферментов, которые выполняют функцию молекулярного мотора, т.е. используют химическую энергию АТФ для выполнения механической работы или полностью, как миозин, или хотя бы частично, как митохондриальная H^+ -АТФаза и Mg -зависимая АТФаза плазматических мембран.

В химической и молекулярной физике магнитно-изотопные эффекты давно известны [19–21]. В химии МИЭ проявляются в том, что скорость и выход продуктов реакции с участием свободных радикалов и/или ион-радикальных пар

Таблица 3. Результаты анализа элементного состава реакционных сред с хлоридами различных изотопов магния

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л			
		природный Mg	²⁴ Mg	²⁵ Mg	²⁶ Mg
Li	0.00008	0.00027	0.00015	0.00017	0.00010
Be	0.00008	< DL	< DL	< DL	< DL
B	0.03	< DL	< DL	< DL	< DL
Na	0.3	158	149	135	137
Mg	0.1	154	159	142	139
Al	0.02	0.045	0.030	0.049	0.065
Si	0.3	0.17	0.17	0.15	0.13
P	0.5	224	229	227	230
S	2	< DL	< DL	< DL	< DL
K	0.3	6360	6247	6280	6313
Ca	0.7	2.0	2.0	2.4	2.1
Sc	0.001	< DL	< DL	< DL	< DL
Ti	0.02	< DL	< DL	< DL	< DL
V	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
Cr	0.02	< DL	< DL	< DL	< DL
Mn	0.003	0.029	0.031	0.037	0.080
Fe	0.1	< DL	< DL	< DL	< DL
Co	0.003	< DL	< DL	< DL	< DL
Ni	0.007	< DL	< DL	< DL	< DL
Cu	0.003	0.0056	0.0039	0.0067	0.011
Zn	0.009	0.065	0.050	0.070	0.063
Ga	0.001	< DL	< DL	< DL	< DL
Ge	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
As	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
Se	0.009	< DL	< DL	< DL	< DL
Br	0.3	2.2	2.4	2.6	2.6
Rb	0.0003	0.0860	0.0936	0.0950	0.0969
Sr	0.002	< DL	0.0029	0.0046	< DL
Y	0.0001	< DL	< DL	< DL	< DL
Zr	0.0001	0.0031	0.0013	0.0022	0.0028
Nb	0.0004	< DL	< DL	< DL	< DL
Mo	0.0003	0.0079	0.0093	0.0136	0.0168
Ru	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Rh	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Pd	0.0004	< DL	< DL	< DL	< DL
Ag	0.0002	0.00078	0.00068	0.00075	0.00109
Cd	0.0003	0.0037	0.0040	0.0043	0.0040
In	0.0001	< DL	< DL	< DL	< DL
Sn	0.0002	0.00081	0.00027	0.00063	0.00100
Sb	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Te	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Cs	0.00004	< ПО	0.00006	0.00008	0.0001
Ba	0.001	0.0040	0.0045	0.0045	0.0043
La	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Ce	0.0008	< DL	< DL	< DL	< DL

Таблица 3. Окончание

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л			
		природный Mg	^{24}Mg	^{25}Mg	^{26}Mg
Pr	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Nd	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
Sm	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Eu	0.000007	< DL	< DL	< DL	< DL
Gd	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Tb	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Dy	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Ho	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Er	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Tm	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Yb	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Lu	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Hf	0.0001	0.00120	0.00078	0.00062	0.00062
Ta	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
W	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
Re	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Os	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Ir	0.00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Pt	0.00003	< DL	< DL	< DL	0.00067
Au	0.0001	< DL	< DL	< DL	< DL
Hg	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
Tl	0.00001	0.0088	0.0091	0.0091	0.0094
Pb	0.0008	0.038	0.037	0.039	0.039
Bi	0.00003	0.00006	< DL	< DL	0.00004
Th	0.00002	0.00060	0.00036	0.00027	0.00025
U	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL

существенно изменяются в зависимости от того, содержат ли исходные реагенты магнитный или немагнитный изотоп одного и того же элемента. МИЭ — прямое следствие закона сохранения момента импульса, в данном случае — электронного углового момента. Суммарный электронный спин (S) продуктов химической реакции должен быть равен суммарному электронному спину исходных реагентов. В физике аналогичный спиновый запрет возникает, например, при синглет-триплетных переходах в молекулах и твердом теле.

Магнитно-изотопный эффект однозначно свидетельствует о том, что в изучаемом процессе имеется «узкое место» — лимитирующая стадия, зависящая от электронного спинового состояния, и что ядерный спин магнитного изотопа ускоряет эту стадию. В химии для объяснения МИЭ обычно предполагается существование радикальной пары или ион-радикальной пары в качестве промежуточного продукта («узкого места») реакции

[20]. Известно, однако, что реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ и P_i следует кислотно-основному механизму [22]. Соответственно, возникновение ион-радикальной пары в качестве интермедиата в этой реакции маловероятно. Действительно, МИЭ не наблюдается в неферментативном гидролизе АТФ. Иная ситуация, однако, может иметь место в случае гидролиза АТФ, катализируемого молекулярным мотором. Доказано экспериментально, что гидролиз АТФ инициирует электронно-конформационные взаимодействия в активном центре фермента. Благодаря энергии, освобождаемой при гидролизе АТФ, имеет место конформационное возбуждение, по существу, деформация макромолекулы [23, 24]. Более того, при гидролизе АТФ, катализируемом миозином, цикл генерации механического напряжения макромолекулы состоит, согласно квантово-механическим расчетам, из нескольких стадий [25]. На первой стадии γ -фосфат АТФ стабилизируется в состоянии диссоциированного

Таблица 4. Результаты анализа элементного состава реакционных сред с хлоридами различных изотопов цинка

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л		
		⁶⁴ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn
Li	0,001	< DL	< DL	< DL
Be	0,0002	< DL	< DL	< DL
B	0,02	0,52	0,70	0,60
Na	0,3	0,57	1,0	0,77
Mg	0,05	< DL	0,069	< DL
Al	0,06	0,22	0,27	0,23
Si	0,6	< DL	< DL	< DL
P	0,6	< DL	< DL	< DL
S	2	< DL	< DL	< DL
K	0,1	< DL	< DL	< DL
Ca	0,3	< DL	< DL	< DL
Sc	0,008	< DL	< DL	< DL
Ti	0,01	< DL	< DL	< DL
V	0,003	< DL	< DL	< DL
Cr	0,01	< DL	< DL	< DL
Mn	0,003	< DL	< DL	< DL
Fe	0,09	< DL	< DL	< DL
Co	0,003	< DL	< DL	< DL
Ni	0,02	0,14	< DL	< DL
Cu	0,02	0,047	0,098	0,099
Ga	0,0004	< DL	< DL	< DL
As	0,06	< DL	< DL	< DL
Se	0,009	< DL	< DL	< DL
Rb	0,003	< DL	< DL	< DL
Sr	0,001	< DL	< DL	< DL
Y	0,001	< DL	< DL	< DL
Zr	0,002	< DL	< DL	< DL
Nb	0,001	< DL	< DL	< DL
Mo	0,000	< DL	< DL	< DL
Rh	0,001	< DL	< DL	< DL
Pd	0,001	< DL	< DL	< DL
Ag	0,002	< DL	< DL	< DL
Cd	0,001	< DL	< DL	< DL
Sn	0,004	< DL	< DL	< DL
Sb	0,001	< DL	< DL	< DL
Te	0,001	< DL	< DL	< DL
Cs	0,0002	< DL	< DL	< DL
Ba	0,001	0,0051	0,0025	0,010
La	0,0003	< DL	< DL	< DL
Ce	0,0003	< DL	< DL	< DL
Pr	0,0002	< DL	< DL	< DL
Nd	0,0007	< DL	< DL	< DL
Sm	0,0002	< DL	< DL	< DL
Eu	0,0001	< DL	< DL	< DL
Gd	0,0002	< DL	< DL	< DL

Таблица 4. Окончание

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л		
		^{64}Zn	^{67}Zn	^{68}Zn
Tb	0,0001	< DL	< DL	< DL
Dy	0,0001	< DL	< DL	< DL
Ho	0,0001	< DL	< DL	< DL
Er	0,0001	< DL	< DL	< DL
Tm	0,0001	< DL	< DL	< DL
Yb	0,0001	< DL	< DL	< DL
Lu	0,0001	< DL	< DL	< DL
Hf	0,0001	< DL	< DL	< DL
Ta	0,0003	< DL	< DL	< DL
W	0,0003	< DL	< DL	< DL
Re	0,00003	< DL	< DL	< DL
Ir	0,0001	< DL	< DL	< DL
Pt	0,0006	< DL	< DL	< DL
Au	0,0002	< DL	< DL	< DL
Hg	0,0009	< DL	< DL	< DL
Tl	0,0001	< DL	< DL	< DL
Pb	0,002	0,0024	0,019	0,0082
Bi	0,0001	< DL	< DL	< DL
Th	0,0003	< DL	< DL	< DL
U	0,0001	< DL	< DL	< DL

метафосфата ($\text{P}_\gamma\text{O}_3^-$). При этом продукты гидролиза, АДФ и P_i , остаются в активном центре фермента в близком контакте и освобождаются только после того, как миозин связывается с филаментами актина. Это согласуется с хорошо известным фактом обратимости реакции гидролиза АТФ миозином. До тех пор, пока продукты гидролиза остаются связанными миозином и в близком контакте, они могут снова образовать АТФ [25]. Можно предположить, что в условиях электронно-конформационного возбуждения макромолекулы в активном центре фермента имеет место перенос электронной плотности на АДФ или Mg^{2+} , например, от OH^- -группы связанной молекулы воды или от NH_2 -группы Glu-459 с образованием соответственной ион-радикальной пары. Затем следует нуклеофильная атака неорганического фосфата окси-анионом аденозиндифосфата с образованием АТФ. Стабильное спиновое состояние продукта, АТФ-Mg (в экспериментах с цинком соответственно АТФ-Zn), должно быть синглетным (электронный спин $S=0$). Между тем ядерный спин ^{25}Mg (^{67}Zn) через сверхтонкое взаимодействие с неспаренным электроном ион-радикальной пары способен конвертировать эту пару, связанную миозином, в триплетное состояние ($S=1$). Создавая

при этом спиновый запрет, ядерный спин изотопа ^{25}Mg (^{67}Zn) затрудняет нежелательную обратную реакцию синтеза АТФ, способствуя, таким образом, прямой реакции гидролиза АТФ. Гипотеза о ключевой роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТФ при окислительном фосфорилировании была высказана около 50 лет тому назад [26].

Возможно иное, альтернативное, объяснение ядерного спинового катализа в реакциях гидролиза АТФ, катализируемых «молекулярными моторами» [21]. Можно предположить, что энергия, выделяемая при гидролизе АТФ (~ 0.54 эВ), недостаточно велика для электронно-конформационного перехода макромолекулы в синглетное возбужденное состояние. Этой энергии достаточно для перехода в более низкое триплетное состояние ($S=1$), но такой переход из основного состояния ($S=0$) запрещен законом сохранения спина. Магнитный изотоп (^{25}Mg или соответственно ^{67}Zn) изменяет ситуацию, а именно: ядерный спин изотопа устраняет спиновый запрет. Таким образом, обеспечивая необходимую спиновую конверсию электронно-конформационного состояния макромолекулы в триплетное состояние (когерентные бозоны), магнитный изотоп ускоряет хемомеханический цикл ферментативной реакции [21]. Подобный механизм был предло-

жен в физике твердого тела для объяснения влияния магнитных полей на подвижность дислокаций [27].

Рассмотрим еще одно возможное объяснение каталитического эффекта ядерного спина изотопов $^{25}\text{Mg}/^{67}\text{Zn}$. Гидролиз АТФ, катализируемый молекулярным мотором, сопровождается значительной конформационной перестройкой макромолекулы. При этом имеют место процессы дегидратации и регидратации электрически заряженных аминокислотных групп. Между тем существуют два изомера молекул воды, различающиеся по взаимной ориентации ядерных спинов водорода, а именно: *орто*- H_2O с параллельной ориентацией протонных спинов и *пара*- H_2O с антипараллельной ориентацией протонных спинов. Согласно квантовой статистике, при комнатной температуре *орто*- H_2O составляет 75% общего объема [28]. Имеются основания полагать, что по сравнению с молекулами *пара*- H_2O молекулы *орто*- H_2O имеют преимущественное сродство к *L*-аминокислотам [29]. Если так, то перемещение преимущественно связанных молекул *орто*- H_2O при конформационном превращении макромолекулы затруднено, а спин-вращательные взаимодействия протонов слишком слабы, чтобы обеспечить должную эффективность *орто*-*пара*-переходов. Опять-таки, магнитный изотоп ^{25}Mg (или соответственно ^{67}Zn) способен существенно улучшить ситуацию, а именно — устранить проблему спинового запрета, обеспечив таким образом необходимую скорость конверсии изомеров воды.

В «молекулярных моторах», работающих на немагнитном изотопе магния, функцию спинового катализа могут выполнять в принципе ядерные спины водорода (^1H , $I = 1/2$) и фосфора (^{31}P , $I = 1/2$). Относительно высокая каталитическая активность магнитных изотопов магния и цинка обусловлена, очевидно, тем, что ядерные спины ^{25}Mg ($I = 5/2$) и ^{67}Zn ($I = 5/2$) в пять раз больше, чем ядерные спины ^1H и ^{31}P , и создают соответственно более сильные локальные магнитные поля (константа сверхтонкого взаимодействия ≈ 21 мТл) в активном центре фермента.

ВЫВОДЫ

В экспериментах с важнейшим молекулярным мотором биоэнергетики — миозином — обнаружены значительные по величине эффекты ускорения ферментативного гидролиза АТФ магнитными изотопами магния и цинка. Эффект ядерного спинового катализа выявлен также в экспериментах с Mg-зависимой АТФазой плазматической мембраны миометрия.

Детальные механизмы ядерного спинового катализа в молекулярных моторах являются задачей дальнейших исследований.

Данная статья подготовлена на основе доклада, сделанного на VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019) [30].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Т.А. Веклич за выполненные эксперименты с АТФазой плазматической мембраны миометрия. Авторы глубоко признательны академику НАН Украины С.А. Костерину (зав. отделом биохимии мышц, ИБХ НАН) и его коллегам за плодотворное сотрудничество.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема АААА-А19-119092390041-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными выполняли в полном соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых для научных экспериментов и в других научных целях (Strasbourg, 18.III.1986).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, ed. by D. M. Grant and R. K. Harris (Wiley, Chichester, 1996).
2. Л. В. Авдеева и В. К. Кольтовер, Вестн. МГУ, сер. 2 (химия), **57** (3), 145 (2016).
3. L. V. Avdeeva, T. A. Evstyukhina, V. K. Koltover, et al., Nucl. Phys. At. Energy **20** (3), 271 (2019).
4. В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, В. К. Карандашев и С. О. Костерин, Биофизика **61** (2), 239 (2016).
5. V. K. Koltover, R. D. Labyntseva, and S. O. Kosterin, in: *Myosin: Biosynthesis, Classes and Function*, ed. by D. Broadbent (Nova Science Publ., N.-Y., 2018), pp. 135–158.
6. Ю. В. Карякин и И. И. Ангелов, Чистые химические вещества (Химия, М., 1974).
7. V. K. Karandashev, A. N. Turanov, T. A. Orlova, et al., Inorg. Mater. **44**, 1491 (2008).
8. S. A. Burgess, S. Yu, M. L. Walker, et al., J. Mol. Biol. **372**, 1165 (2007).

9. Р. Д. Лабынцева, А. А. Бевза, О. В. Бевза и др., Укр. биохим. ж. **84**, 34 (2012).
10. A. H. Iwane, K. Kitamura, M. Tokunaga, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **230**, 46 (1997).
11. Т. А. Веклич, А. А. Шкрабак, Н. Н. Слигченко и др., Биохимия **79**, 532 (2014).
12. Т. А. Веклич, Ю. Ю. Мазур и С. А. Костерин, Укр. биохим. ж. **87**, 5 (2015).
13. P. S. Chen, T. Y. Toribara Jr., and H. Warner, Analyt. Chem. **28** 1756 (1956).
14. R. D. Labyntseva, T. V. Ulianenko, and S. O. Kosterin, Ukr. Biochem. J. **70**, 71 (1998).
15. A. A. Bevza, R. D. Labyntseva, O. V. Bevza, et al., Ukr. Biochem. J. **82**, 22 (2010).
16. V. K. Koltover, P. Graber, V. K. Karandashev, et al., in: *Abstr. Book of 11th Int. Conf. "Biocatalysis: Fundamentals and Applications"* (Innovations and High Technologies MSU Ltd, Moscow, 2017), pp. 50–51.
17. D. Crotty, G. Silkstone, S. Poddar, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 1437 (2012).
18. Д. А. Смирнова, В. К. Кольтовер, С. В. Носенко и др., Вестн. МГУ. Сер. 2 (Химия), **59**, 266 (2018).
19. Я. Б. Зельдович, А. Л. Бучаченко и Е. Л. Франкевич, Успехи физ. наук **155** (1) (1988).
20. A. L. Buchachenko and R. G. Lawler, Acc. Chem. Res. **50** (4) 877 (2017).
21. V. K. Koltover, J. Mol. Liquids **235**, 44 (2017).
22. D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Freeman, N.-Y., 1996).
23. М. В. Волькенштейн, *Общая биофизика* (Наука, М., 1978).
24. Д. С. Чернавский и Н. М. Чернавская, «Белок—машина». *Биологические макромолекулярные конструкции* (Янус-К, М., 1999).
25. F. A. Kiani and S. Fischer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111** (29) 2947 (2014).
26. Л. А. Блюменфельд и В. К. Кольтовер, Молекуляр. биология **6** (1), 161 (1972).
27. М. В. Бадялевич, В. В. Кведер, В. И. Орлов, and Yu. A. Osipyan, Phys. Stat. Sol. (c) **2** (6), 1869 (2005).
28. V. I. Tikhonov and A. A. Volkov, Science **296**, 2363 (2001).
29. Y. Scolnik, I. Portnaya, U. Cogan, et al., Phys. Chem.—Chem. Phys. **8** (3), 333 (2006).
30. В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, В. К. Карандашев и др., в сб: *Тез. докл. VI Съезда биофизиков России* (Сочи, 2019), т. 2, сс. 208–209.

Magnetic-Isotope Effects of Magnesium and Zinc in the Enzymatic ATP Hydrolysis Reactions Driven by the Molecular Motors

V.K. Koltover*, R.D. Labyntseva**, and V.K. Karandashev***

*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

**Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Leontovicha 9, Kiev, 01030 Ukraine

***Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials, Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Osipyana 6, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

The effects of different isotopes of magnesium and zinc on the enzyme activity of myosin subfragment-1 have been explored. The rate of the enzymatic ATP hydrolysis in the reaction media enriched with the magnetic isotope, ^{25}Mg , is twice as high as it is in the reaction media enriched with the nonmagnetic isotopes, ^{24}Mg or ^{26}Mg . A similar effect of nuclear spin catalysis has been detected in the experiments with isotopes of zinc as a cofactor of the enzyme. The rate of the enzymatic ATP hydrolysis with the magnetic ^{67}Zn increases by 40–50 percent compared to that with the nonmagnetic ^{64}Zn or ^{68}Zn . The magnetic-isotope effects are observed at the physiological concentration of magnesium and zinc chlorides (5 mM). The catalytic effect of the magnetic magnesium isotope ^{25}Mg has been revealed in the experiments with the Mg-dependent ATPase of plasma membranes from the myometrium. The observation of the magnetic isotope effects indicates that there is a spin-selective rate-limiting step in the chemo-mechanical process driven by the “molecular motor” which uses energy from ATP hydrolysis and that nuclear spin catalysis causes acceleration of this stage. Some possible mechanisms of the nuclear spin catalysis are discussed.

Keywords: nuclear spin catalysis, myosin, ATPase activity, biomolecular motors, bioreliability, magnetic-isotope effect, magnesium, zinc

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК: АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМА И ОШИБОК СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2020 г. И.А. Ильичева*, М.В. Ходыков*, Л.А. Панченко**,
Р.В. Полозов***, Ю.Д. Нечипуренко*

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

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

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

E-mail: imb_irina@rambler.ru, nech99@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 27.02.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Приведен краткий обзор одной из сторон многогранной научной деятельности выдающегося ученого-экспериментатора С.Л. Гроховского — открытия им нового физико-химического явления специфичности ультразвукового расщепления межнуклеотидных связей в двухспиральной В-ДНК. Это явление позволило связать эффекты расщепления с конформационно-динамическими характеристиками нуклеотидных последовательностей в В-ДНК и дало возможность проводить биоинформатический анализ геномов на новой основе. Функциональные участки ДНК обладают определенными конформационно-динамическими характеристиками, что позволяет ставить и решать задачи эпигенетики и канцерогенеза.

Ключевые слова: ультразвуковое расщепление ДНК, конформационно-динамические характеристики ДНК, специфичность расщепления ДНК, эпигенетика, биоинформатический анализ генома.

DOI: 10.31857/S0006302920030096

Посвящается памяти Сергея Львовича Гроховского

Жизнь человека есть самодвижущийся круг, который из бесконечно малого расходится во все стороны, в новые и все большие круги, не имеющие конца.

Р.У. Эмерсон

В 2018 г. ушел из жизни удивительный человек и выдающийся экспериментатор — Сергей Львович Гроховский. Талантливый химик-синтетик, он синтезировал большое число различных лигандов, специфично связывающихся с ДНК. Эти работы широко известны. Они дали основание для построения моделей связывания противоопухолевых соединений и других лекарственных средств с ДНК [1–3]. Гроховский также довел до совершенства методы ультразвукового футпринтинга ДНК. Две последние его работы [4, 5] — яркое тому свидетельство. Они были опубликованы уже после того, как автора не стало.

В 2006 г. виртуозное владение экспериментом позволило Сергею Львовичу при облучении двойной спирали ДНК ультразвуком обнаружить зависимость частоты расщепления межнуклеотидных связей от нуклеотидной последовательности [6].

Ранее считалось, что позиции ультразвукового расщепления межнуклеотидных связей в двойной спирали ДНК расположены вдоль ДНК случайно и не зависят от нуклеотидной последовательности. Точность определения нуклеотидных последовательностей геномов методами NGS (next generation sequencing — секвенирование но-

Сокращения: Ключевые слова: ультразвуковое расщепление ДНК, конформационно-динамические характеристики ДНК, специфичность расщепления ДНК, эпигенетика, биоинформатический анализ генома.

вого поколения) существенно зависит от справедливости этого предположения. Гроховский провел детальное исследование процесса ультразвукового расщепления ДНК. Он облучал рестриктные фрагменты плазмид ультразвуком с частотой 22 и 44 кГц. Разработанная им схема эксперимента включала два этапа: а) предварительную пришивку на 3'-конец рестриктного фрагмента плазмидной ДНК одного (любого из четырех возможных) дополнительного нуклеотида, который был мечен по фосфору (^{33}P); б) анализ полученных фрагментов расщепления при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. Полученный результат был неожиданным и противоречил принятым представлениям о случайности позиций разрывов межнуклеотидных связей. Электрофорез меченых по 3'-концу фрагментов ДНК плазмид фиксировал в полиакриламидном геле полосы почернения разной интенсивности. Каждая из полос отвечала фрагменту известной нуклеотидной последовательности (рис. 1).

Методики, которые были разработаны для выявления влияния нуклеотидной последовательности на частоту расщепления плазмидных ДНК, детально описаны в работах [7–11]. Оцифровка интенсивностей полос на гелях позволила получить значения относительных частот расщепления динуклеотидов (R) и тетрануклеотидов (T) и провести статистический анализ позиций расщепления [7, 8]. Здесь мы приводим значения этих величин в таблице и на рис. 2 соответственно. Эти данные показывают различия частот ультразвуковых разрывов в зависимости от типа динуклеотида и его ближайшего окружения (нуклеотидного контекста).

Мы проанализировали различные версии объяснения явления зависимости частот ультразвукового расщепления ди- и тетрануклеотидов от последовательности нуклеотидов при облучении раствора двуспиральной ДНК. Многие физические свойства двойной спирали ДНК зависят от ее нуклеотидной последовательности. Термодинамическая стабильность дуплексов ДНК описывается в рамках модели «ближайших соседей». Согласно этой модели значения свободных энергий стэкинга дуплексов динуклеотидов CpG и GrC очень близки. Однако частоты расщепления этих динуклеотидов существенно различаются. Другая версия – влияние резких изгибов оси двойной спирали (например, появление кинков) также не объясняет эти отличия. Такие изгибы наиболее часто встречаются на участках с высоким содержанием АТ-пар, тогда как частоты расщепления ДНК на этих участках близки средним значениям. В этой связи важно также отметить, что совершенно иной характер ультразвукового расщепления наблюдается при облучении повре-

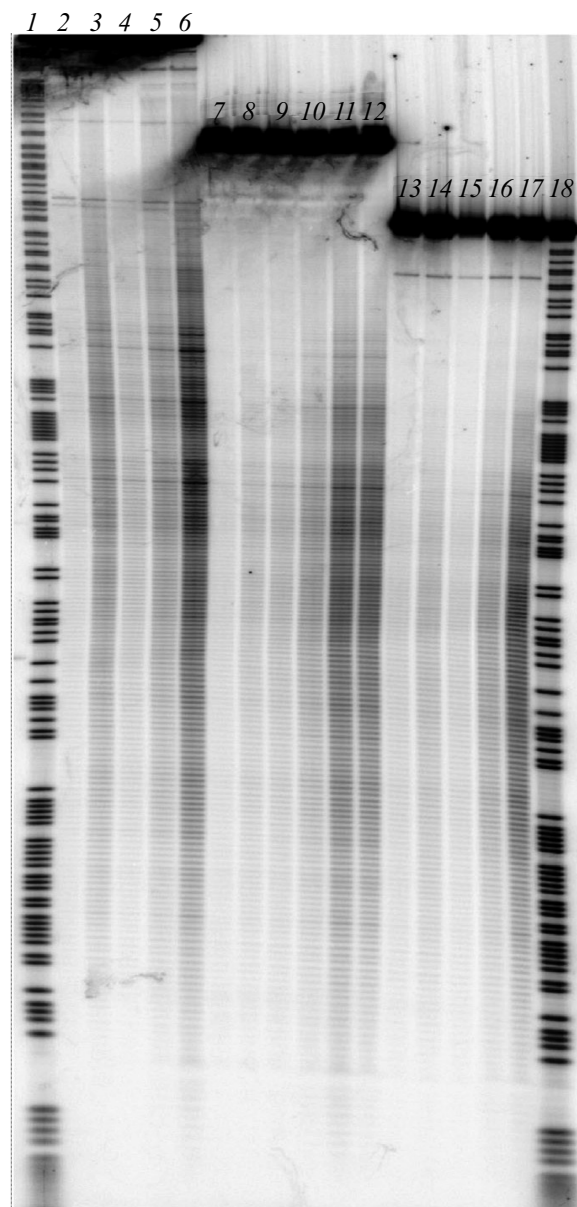


Рис. 1. Результат расщепления фрагмента ДНК в 6%-м денатурирующем полиакриламидном геле после обработки ультразвуком с частотой 22 кГц: дорожки 1, 18 – химическое расщепление по пуринам; дорожки 2, 7 и 13 – облучение фрагментов в течение 2 мин; дорожки 3, 8 и 14 – облучение фрагментов в течение 2 мин в присутствии 50% глицерола; дорожки 4, 9 и 15 – облучение фрагментов в течение 4 мин; дорожки 5, 10 и 16 – облучение фрагментов в течение 8 мин; дорожки 6, 11 и 17 – облучение фрагментов в течение 16 мин; дорожка 12 – облучение фрагментов в течение 16 мин в присутствии 0.5 М тиомочевины.

жденной ДНК, которая содержит одноцепочечные разрывы («ники»). Эти разрывы вызывают резкие изгибы оси спирали. В этом случае характерная для регулярной двуспиральной ДНК специфичность расщепления отсутствует [12].

Относительные частоты ультразвукового расщепления динуклеотидов

Динуклеотид	N	R	d
AA	1636	0.919	0.129
AC	1076	0.913	0.128
AG	1028	0.900	0.124
AT	1374	0.904	0.119
CA	1265	1.160	0.209
CC	1141	1.007	0.144
CG	1230	1.444	0.334
CT	1077	1.130	0.198
GA	1153	0.970	0.133
GC	1317	0.954	0.146
GG	1168	0.922	0.145
GT	1101	0.952	0.126
TA	1065	0.973	0.12
TC	1173	0.912	0.131
TG	1305	0.979	0.126
TT	1672	0.932	0.127

Примечание. Использованы обозначения: N — объем выборки; R — среднее значение; d — стандартное отклонение выборочного среднего.

Мы проанализировали литературные данные, включающие ЯМР-исследования малых фрагментов ДНК, рентгеноструктурные работы и конформационные расчеты ДНК [8]. Связь частот ультразвукового расщепления разных ди- и тетра-нуклеотидов с особенностями их локальной конформационной динамики удалось обнаружить при анализе данных ЯМР и соотношении их с особенностями карт потенциальной энергии нуклеозидов и нуклеотидов [8]. Конформации цикла β -D-дезоксирiboзы в двойной спирали В-ДНК находятся в динамическом равновесии. Позиции атомов кольца по отношению к его средней плоскости постоянно меняются. Эти конформационные движения, называемые псевдо-вращением (переходы $N \rightleftharpoons S$ между двумя низкоэнергетическими областями), сопряжены с

конформационными движениями вокруг связей $C3'-O3'$ и $O3'-P$ и с движениями оснований вокруг гликозидной связи. Низкоэнергетические области (S , *high-anti*) совпадают у трех дезоксирибонуклеотидов (dA , dG , dT) и отличаются от низкоэнергетической области dC , которая смещена в сторону (N , *anti*). Именно после дезоксицитидина ультразвуковой разрыв межнуклеотидных связей происходит наиболее часто. Мы предположили, что частоты разрыва межнуклеотидной связи зависят от времени пребывания дезоксирибозы в N -области псевдовращения.

Ультразвуковое расщепление ДНК имеет механохимическую природу. Физическая модель, которая описывает динамику растяжения фрагмента ДНК, оказавшегося в потоке жидкости с высоким градиентом скоростей в результате коллапса кавитационных пузырьков, возникающих при ультразвуковом облучении, была построена в работе [13]. У фрагмента ДНК, оказавшегося вблизи схлопывающегося кавитационного пузырька, глобальная ось двойной спирали ориентируется вдоль потока. Вероятность механохимического расщепления связи $C3'-O3'$ зависит от степени ее растяжения в потоке. Поэтому важным фактором в процессе расщепления является ориентация этой связи по отношению к глобальной оси спирали ДНК.

Предложенная модель дает качественное описание расщепления ДНК. Однако количественное описание механизма расщепления ДНК — все еще нерешенная задача. Трудности ее решения заключаются в том, что мы не знаем в полной мере систему определяющих параметров (их тип и число), характеризующих процесс расщепления. Как известно, нахождение системы определяющих параметров представляет очень важный этап постановки задачи.

Важно отметить, что частоты расщепления асимметричных комплементарных ди- и тетра-нуклеотидов различны. Например, значение R для динуклеотида CpA равно 1.13, а для комплементарного ему динуклеотида TrG оно равно 0.90; значение T для тетра-нуклеотида $ApCpGpA$ равно 1.54, а для комплементарного ему тетра-нуклеотида $TrCpGpT$ — 1.26. Это означает, что величины относительных частот расщепления динуклеотидов позволяют охарактеризовать каждую из комплементарных цепей в отдельности [8].

Далее нами был проведен анализ фрагментации геномных ДНК разными методами (ультразвук, небулизация, Коварис). Основой механизма расщепления ДНК всеми этими методами является механохимическая реакция. Библиотеки фрагментов для NGS-секвенирования доступны, и мы воспользовались ими, чтобы определить частоты разных позиций расщепления ДНК [14]. Частоты встречаемости каждого из четырех нук-

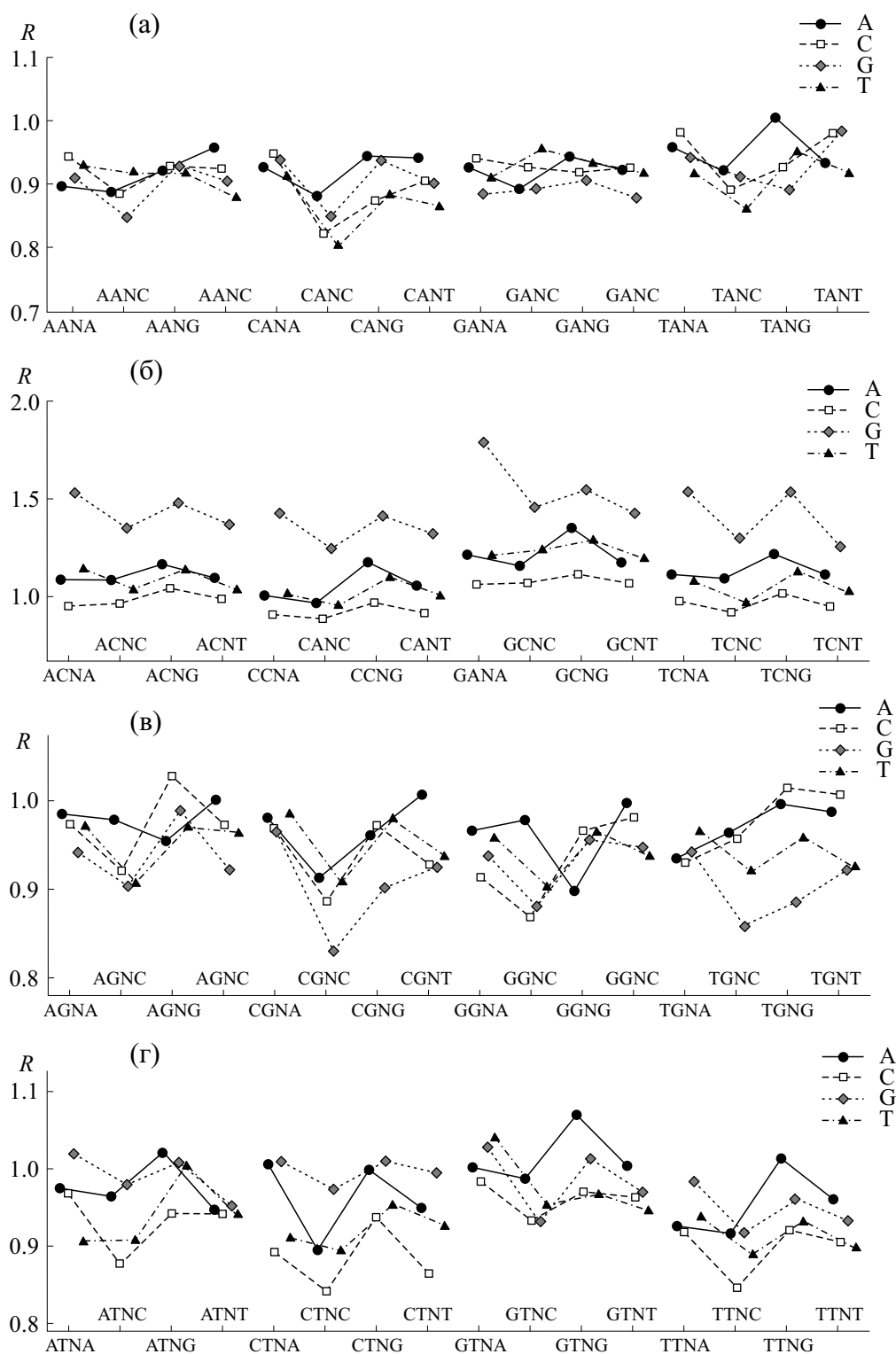


Рис. 2. Средние значения относительных частот ультразвукового расщепления рестриктных фрагментов плазмидных ДНК. R - частота расщепления, по оси абсцисс представлены тетра-нуклеотиды.

леотидов на участке в 200 пар (± 100 пар) с центром в позиции фрагментации показаны на рис. 3. Нуклеотидные последовательности фраг-

ментов можно наложить на нуклеотидную последовательность референсного генома и таким образом оценить частоты разрывов в ди- и тетра-

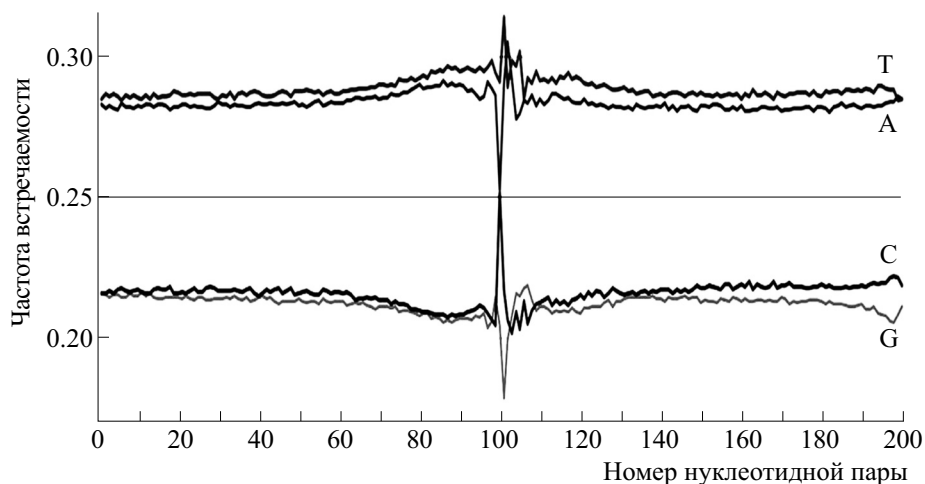


Рис. 3. Частоты встречаемости каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов (A, C, G и T) на участке в 200 нуклеотидных пар (± 100 нуклеотидных пар) с центром в позиции расщепления.

нуклеотидах при фрагментации геномной ДНК. Нами проведено сравнение относительных частот расщепления 16 динуклеотидов, полученных на основании данных NGS-фрагментации геномных ДНК этими тремя методами, с относительными частотами, полученными в результате анализа данных ультразвукового расщепления плазмидных ДНК (рис. 4) [14, 15].

В геномной ДНК расщепление показывает примерно такую же зависимость от последовательности нуклеотидов, что и в плазмидных ДНК. Единственный динуклеотид, частота расщепления которого в геномной ДНК значительно выше, чем в плазмидных ДНК, — это динуклеотид CpG. Возможно, это связано с тем, что в геномных ДНК определенная часть CpG-динуклеотидов метилирована. Наличие ме-

тильной группы в 5-м положении кольца цитозина играет важную роль в эпигенетике. Мы предположили, что метилированные динуклеотиды CpG расщепляются чаще, чем неметилированные [15]. Это предположение было подтверждено в работах [16, 17], где проведен анализ относительных частот встречаемости метилированного и неметилированного CpG-динуклеотидов в позициях расщепления геномных ДНК. Для этого были использованы данные бисульфитного секвенирования. Оказалось, что частота расщепления метилированных CpG примерно в полтора раза выше неметилированных.

Величины R и T характеризуют структурно-конформационную динамику локального участка ДНК, далее мы будем называть их характеристиками СКД. Мы полагаем, что структурно-кон-

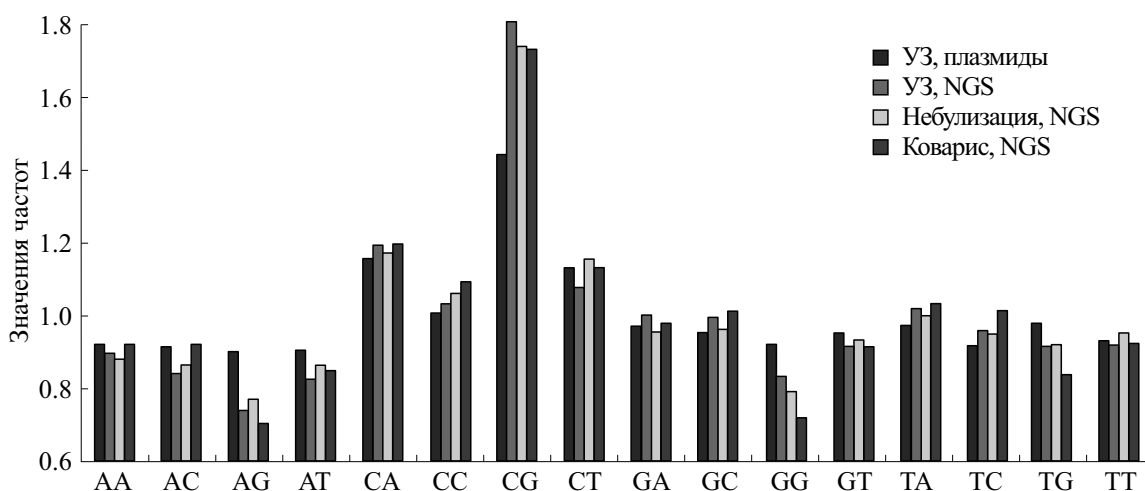


Рис. 4. Значения средних частот расщепления 16 динуклеотидов, полученных на основании данных NGS-фрагментации геномных ДНК тремя методами, в которых используется ультразвуковое облучение, и значения относительных частот ультразвукового облучения плазмидных ДНК.

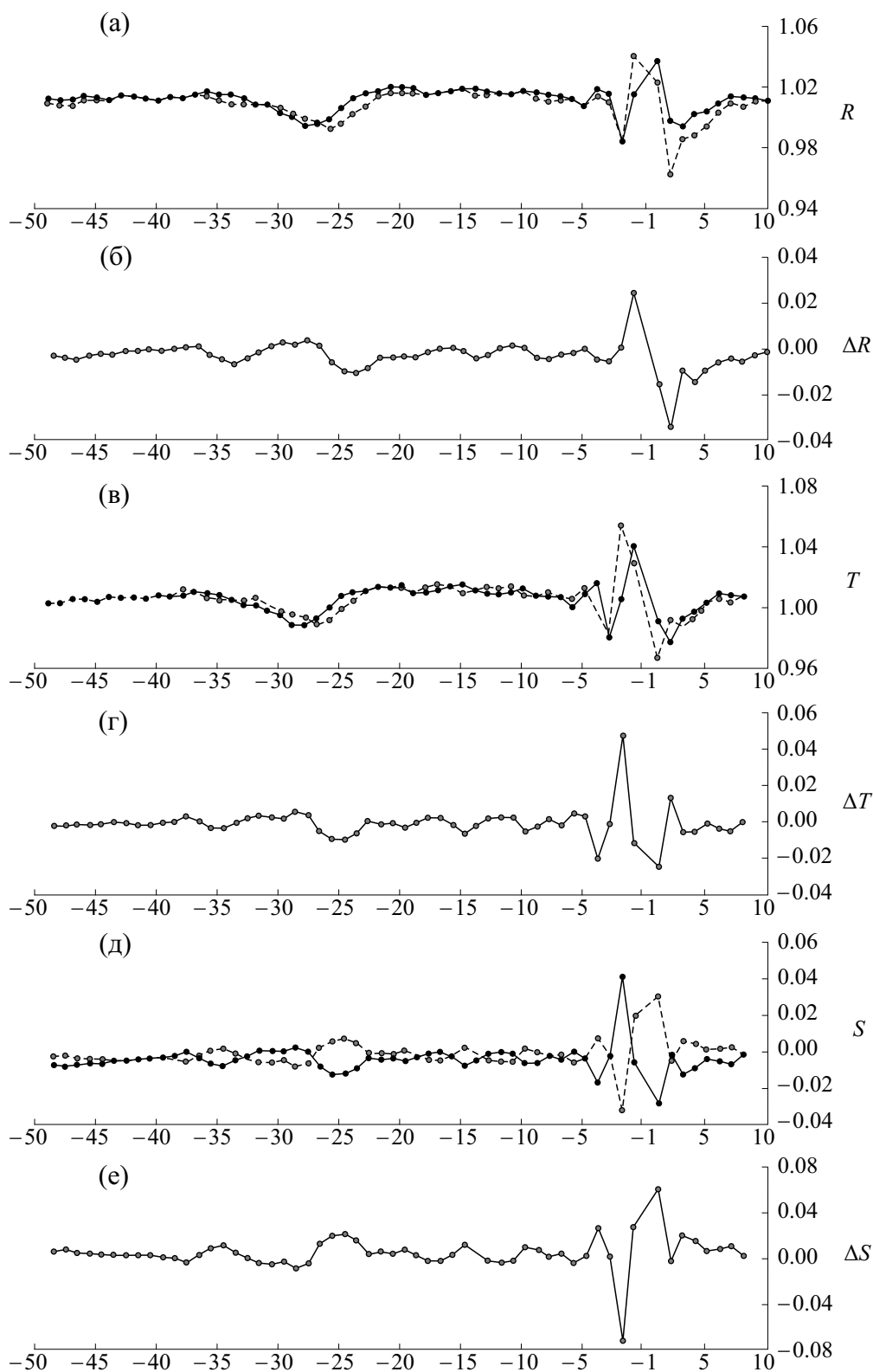


Рис. 5. Профили СКД-характеристик промоторов генома человека: (а) — профили величины R в кодирующей (сплошная линия) и некодирующей (пунктирная линия) цепях; (б) — разность величин R для кодирующей и некодирующей цепей; (в) — профили величины T в кодирующей (сплошная линия) и некодирующей (пунктирная линия) цепях; (г) — разность значений T для кодирующей и некодирующей цепей; (д) — профили величины S в кодирующей (сплошная линия) и некодирующей (пунктирная линия) цепях; (е) — разность величин S кодирующей и некодирующей цепей.

формационная динамика участков геномных ДНК является важным фактором регуляции экспрессии генов. Для проверки этого предположения мы воспользовались базой EPD (New section of the Eukaryotic Promoter Database, <http://epd.vital-it.ch>), которая содержит нуклеотидные последовательности различных организмов. Вначале мы проанализировали профили последовательностей нуклеотидов в промоторах, рассматриваемые как их текстовые характеристики, и обнаружили в них существенные различия [18]. Затем мы построили так называемые «обобщенные профили» изменений шести механических и структурных параметров (энергии стэкинга, параметров Roll и Slide, изменения энергии дуплексов при отклонении от равновесных значений, а также энергии изгиба двойной спирали в сторону узкого желоба). Эти параметры характеризуют локальные особенности структуры ДНК (использовалась база данных <http://diprod.b.fli-leibniz.de>). Термином «обобщенные профили» мы называем профили, полученные суммированием профилей индивидуальных промоторов, которые представлены в базе организмов определенного вида. Также мы построили «обобщенные профили» частот расщепления ди- и тетрануклеотидов – СКД-характеристики R и T , и ввели параметр $S = (T - R)/T$, величина которого характеризует влияние ближайших соседей динуклеотида (контекст) на его механохимическое расщепление. Поскольку мы связываем интенсивность механохимического расщепления с конформационными движениями, то полагаем, что при $S < 0$ контекст ослабляет их интенсивность, а при $S > 0$ усиливает. Профили СКД-характеристик ДНК строили как для кодирующей цепи, так и для комплементарной цепи. Все они представлены в работе [18]. Эти профили позволили сделать следующий важный вывод: несмотря на различия нуклеотидных последовательностей промоторов у разных организмов, при рассмотрении их, как текстов, механические, структурные и конформационные характеристики двойной спирали ДНК на этих участках сходны. Эти характеристики позволяют выделить промоторы среди других участков нуклеотидных последовательностей ДНК. Наиболее заметны особенности профилей в окрестности начала транскрипции, которая может захватывать от шести до восьми нуклеотидных пар. Все характеристики на этом участке меняются скачкообразно на каждом шаге, что свидетельствует о потере регулярности двойной спирали на этом участке. Отсутствие строгой регулярности облегчает перестройку структуры при связывании регуляторных белков и формировании «открытого комплекса», необходимого для транскрипции.

Другим участком, выделяющимся на профилях СКД характеристик последовательностей промоторов, является так называемый ТАТА-

бокс, с которым непосредственно связывается регуляторный белок ТВР – окрестности позиции (–30) относительно начала транскрипции. Для всех организмов характер изменений структурных и физико-химических параметров на этом участке схож. Значения механических и структурных характеристик указывают на расширение малой бороздки и увеличение жесткости двойной спирали на изгиб в сторону малой бороздки. Детальное описание особенностей профилей для каждой из характеристик дано в работе [18]. На рис. 5 приведены профили характеристик R , T , S промоторов человека. Позиции от –32 до –24 пар оснований относительно начала транскрипции, т.е. позиции ТАТА-бокса отличаются малыми значениями R и T , что может свидетельствовать об уменьшении интенсивности конформационных движений в цепях ДНК на этом участке. Профиль характеристики S указывает на периодические изменения интенсивностей конформационных движений в обеих комплементарных цепях, которые происходят в противофазе вплоть до позиции –3 пары оснований. В позиции ТАТА-бокса различие в амплитудах колебаний значений S у комплементарных цепей наибольшее. Итак, СКД-характеристики нуклеотидной последовательности геномов указывают на характерные структурные и конформационные особенности двойной спирали в промоторных областях.

В последнее время появились многочисленные указания на ошибки в результатах секвенирования геномов [19, 20]. Большинство из них связано с неточной оценкой встречаемости GC-пар оснований. Заметное увеличение частот механохимического расщепления после дезоксицитидина в двойной спирали может быть одним из источников погрешностей получаемых нуклеотидных последовательностей. Разработка методов, которые могли бы учитывать частоты встречаемости нуклеотидов на 5'-концах фрагментов («ридов»), используемых при NGS-секвенировании, и проводить на их основе корректировку результатов – это еще одно направление, которое стало возможным благодаря открытию С.Л. Гроховским явления специфичного к нуклеотидной последовательности механохимического расщепления ДНК.

Открытие, сделанное Гроховским, дает новые возможности развития и разработки методов изучения особенностей структуры и конформационной динамики ДНК (см., например, работу [21]), которые влияют на генную экспрессию и, тем самым, определяют такие процессы, как канцерогенез и эпигенез.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить Д.Ю. Нечипуренко и Л.А. Урошлеву за полезные обсуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных Академий наук на 2013–2020 годы (темы №№ 01201363818 и 01201363820) и Программой по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН № 01201456592, а также Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 18-07-00354а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. V. Gursky, et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **47**, 367 (1983).
2. А. С. Заседателев, А. Л. Жузе, К. Циммер, С. Л. Гроховский и др., Докл. АН СССР **231** (4), 1006 (1976).
3. S. L. Grokhovsky, A. N. Surovaya, G. Burckhardt, et al., FEBS Lett. **439** (3), 346 (1998).
4. С. Л. Гроховский, Молекуляр. биология **52** (4), 705 (2018).
5. С. Л. Гроховский, Молекуляр. биология **52** (5), 846 (2018).
6. С. Л. Гроховский, Молекуляр. биология **40** (2), 317 (2006).
7. С. Л. Гроховский, И. А. Ильичева, Д. Ю. Нечипуренко и др., Биофизика **53** (3), 417 (2008).
8. S. L. Grokhovsky, I. A. Il'icheva, D. Yu. Nechipurenko, et al., Biophys. J. **100** (1), 117 (2011).
9. Ю. Д. Нечипуренко, М. В. Головкин, Д. Ю. Нечипуренко и др., Журн. структур. химии **50** (5), 1040 (2009).
10. S. L. Grokhovsky, I. A. Il'icheva, D. Yu. Nechipurenko, et al., in *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*, ed. by S. Magdeldin (InTech, 2012).
11. S. L. Grokhovsky, I. A. Il'icheva, D. Yu. Nechipurenko, et al., in *Advances in Engineering Research*, ed. by V. M. Petrova (Nova Science Publishers, 2014), v. 8, pp. 213–236.
12. I. A. Il'icheva, D. Y. Nechipurenko, and S. L. Grokhovsky, J. Biomol. Structure and Dynamics **27** (3), 391 (2009).
13. Д. Ю. Нечипуренко, И. А. Ильичева, М. В. Ходыков и др., Биофизика **59** (6), 1061 (2014).
14. M. S. Poptsova, I. A. Il'icheva, D. Y. Nechipurenko, L. A. Panchenko, et al., Sci. Rep. **4**, 4532 (2014).
15. Ю. Д. Нечипуренко, И. А. Ильичева, М. С. Попцова и С. Л. Гроховский, Актуальные вопросы биологической физики и химии **2** (1), 339 (2017).
16. Ю. Д. Нечипуренко, И. А. Ильичева, Э. Т. Абдуллаев и др., Актуальные вопросы биологической физики и химии **3** (4), 884 (2018).
17. L. A. Uroshlev, E. T. Abdullaev, I. R. Umarova, et al., Sci Rep. (2020) (in press).
18. I. A. Il'icheva, M. V. Khodikov, M. S. Poptsova, et al., BMC Genomics **17** (1), 973 (2016).
19. Y. Benjamini and T. P. Speed, Nucleic acids research, **40** (10), e72 (2012).
20. J. R. Wang, B. Quach, and T. S. Furey, BMC Bioinformatics **18** (1), 357 (2017).
21. D. Semyonov, Yu. Nechipurenko, Bioessays (2020) (in press).

Ultrasonic DNA Cleavage: Analysis of Conformational-Dynamic Features of Regulatory Regions in the Genome and Sequencing Errors

I.A. Il'icheva*, M. V. Khodikov*, L.A. Panchenko**, R.V. Polozov***, and Yu.D. Nechipurenko*

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

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

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

The article is dedicated in memory of Dr. Sergei Lvovich Grokhovsky, a distinguished scientist and an experimenter. This paper contains a brief review of one aspect of the multifaceted scientific activity of Dr. S.L. Grokhovsky whose work contributed immensely to the understanding of a new physicochemical event such as the specificity of ultrasound-induced cleavage of internucleotide bonds in double-stranded B-DNA. His discovery has afforded a view of the cleavage effects within the conformational and dynamic characteristics of nucleotide sequences in B-DNA and an opportunity to conduct bioinformatical analysis of genomes on a new plane. Functional DNA regions are characterized by distinct conformational-dynamic features. We demonstrate the effectiveness of this approach for the analysis of correlation of these conformational and dynamic features with the epigenetic development and carcinogenesis.

Keywords: ultrasonic DNA cleavage, conformational-dynamic characteristics of DNA, specificity of DNA cleavage, epigenetics, bioinformatics analysis of genome data

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ РАСТВОРИТЕЛЯ И ОСВЕЩЕНИЯ НА ИЗОМЕРИЗАЦИЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ АСТАКСАНТИНА

© 2020 г. Е.А. Куликов*, И.С. Куликова*, Р.Г. Василов*, А.А. Селищева*, **

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

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

E-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Астаксантин и его эфиры, относящиеся ко «вторичным» каротиноидам, синтезируются при действии стресса в клетках *Haematococcus pluvialis*, которые из вегетативного состояния переходят в состояние гематоцист. Стрессовые факторы могут влиять не только на скорость и направление синтеза, но и на конформационные изменения в молекуле пигментов, вызывая переход *trans*-изомеров в *cis*-изомеры. Целью данного исследования является оценка эффективности действия разных факторов (полярности среды и света) на процесс изомеризации *trans*-изомеров в *cis*-изомеры астаксантина. При изучении действия этих факторов на процесс образования 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров из растворов *all-trans*-астаксантина при 50°C показали, что растворители средней полярности более эффективно стабилизируют *cis*-изомеры, чем сильно полярные, в то время как аполярные растворители не способствуют стабилизации *cis*-изомеров. Наличие π-связей в молекуле растворителя также положительно сказывается на процессе изомеризации. При изучении влияния показателя преломления различных растворителей на поляризуемость астаксантина выявили разные зависимости для полярных и аполярных растворителей. Предположили, что растворители средней полярности облегчают процесс *trans-cis*-изомеризации астаксантина благодаря снижению энергии крутильного момента и стабилизации молекулы в *cis*-конформации за счет снижения отталкивания диполей метильных групп в полиеновой цепи и иононовом кольце. Облучение светом растворов астаксантина при 25°C приводило к большему образованию *cis*-изомеров в начальный период времени (четыре часа) по сравнению с облучением в течение шести и более часов. При более длительном освещении происходил распад астаксантина с образованием продуктов деструкции и окисления.

Ключевые слова: астаксантин, *trans*- и *cis*-изомеры, полярность, показатель преломления, метод ВЭЖХ.

DOI: 10.31857/S0006302920030102

Астаксантин относится к ксантофиллам и содержит две гидроксильные и две карбонильные группы в молекуле. Как и другие каротиноиды, астаксантин имеет длинную полиеновую углеводную цепь, поэтому молекула может существовать в виде большого количества геометрических (рис. 1) и оптических изомеров. В природе астаксантин представлен в основном *all-trans*-изомером, когда углеводы при всех двойных связях располагаются в *trans*-положении относительно друг друга. В то же время *cis*-изомеры астаксантина могут накапливаться в телах животных, напри-

мер, в человеческой крови до 30% от всего астаксантина может приходиться на долю *cis*-изомеров [1]. Также известно, что *cis*-изомеры лучше сорбируются плазмой крови, чем *all-trans*-изомеры [2]. Как и другие представители каротиноидов, астаксантин обладает антиоксидантными свойствами [3, 4], причем известно, что *cis*-изомеры обладают более высокой антиоксидантной активностью [5], а значит, могут оказывать более высокий антиоксидантный эффект на весь организм.

Было показано, что реакция изомеризации обратима [6], поэтому менее стабильные *cis*-изомеры со временем переходят в свою более устойчивую *all-trans*-конфигурацию. Известно, что

Сокращение: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

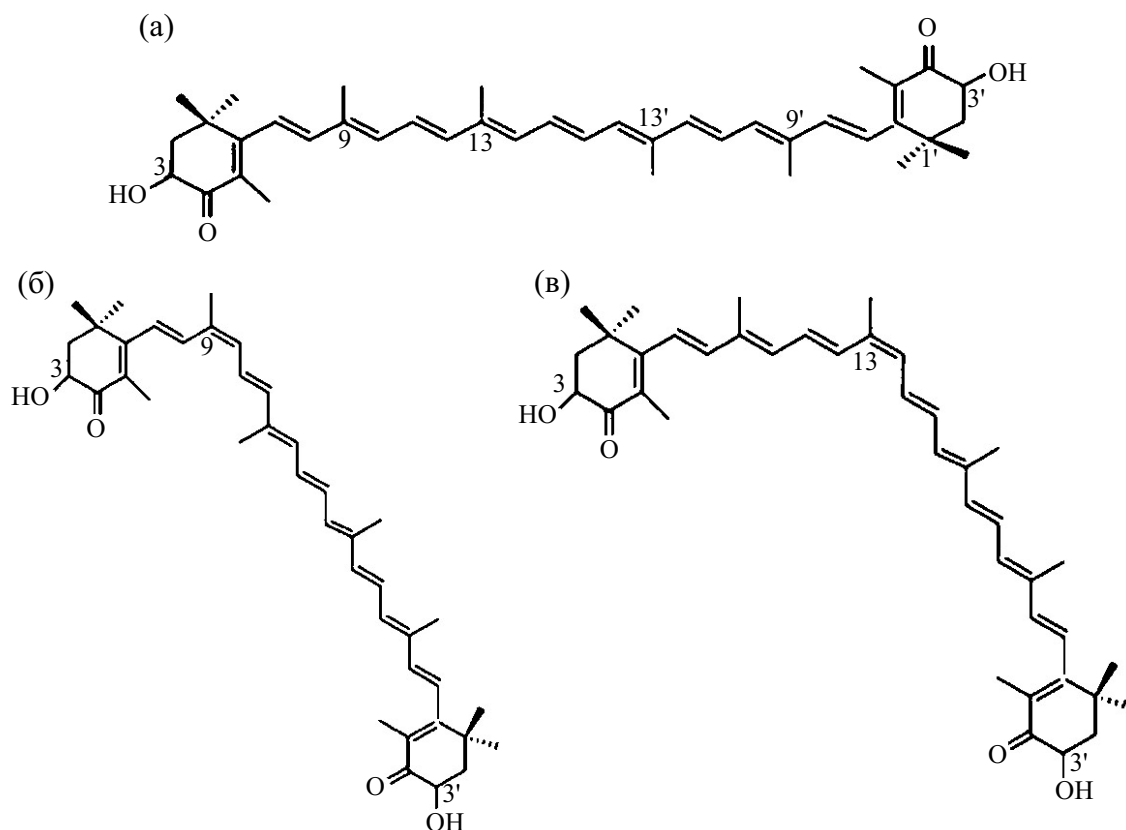


Рис. 1. Геометрические изомеры астаксантина: (а) — *all-trans*-изомер, (б) — *9Z*-изомер, (в) — *13Z*-изомер.

изомеризация астаксантина активируется под действием многих факторов: растворителей, температуры, ионов металлов, pH реакционной среды [6–9]. Несмотря на многочисленность исследований, небольшое число используемых растворителей не позволило сформулировать закономерности процесса. Кроме того, практически отсутствуют систематические исследования по влиянию света на процесс изомеризации, хотя астаксантин и его эфиры синтезируются микроводорослями именно под действием интенсивного облучения, что делает необходимым исследования такого типа. Ранее было показано, что интенсивное освещение эфиров астаксантина вызывает окислительную деструкцию и образование апо- и эпокси-производных астаксантина [10, 11]. На примере других каротиноидов, например зеаксантина, было показано, что свет вызывает изомеризацию каротиноидов [12].

Целью данного исследования является оценка эффективности действия разных факторов (полярности среды, строения молекулы растворителя и влияние света) на процесс изомеризации *trans*-изомеров в *cis*-изомеры астаксантина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые реактивы. В работе были использованы астаксантин, гексан для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ, этилацетат для ВЭЖХ (все — производства компании Sigma-Aldrich, США); ацетон, хлороформ, дихлорметан, тетрахлорметан, толуол, бензол, бутанол-1, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, изопропанол, этанол, пиридин, диоксан (все — квалификации «х.ч.», производства компании «Химмед», Россия). Деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм/см получали с помощью очистительной системы Milli-Q Integral 10 (Millipore, США).

Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров астаксантина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детекцией и детекцией в видимой области. Разделение изомеров свободного астаксантина оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Agilent 1200 series (Agilent Technologies, США) с диодноматричным детектором на обратно-фазовой колонке Exlipse XDB-C18 (250×4.6 мм, размер частиц 5 мкм). Детекцию осуществляли при длине волны 480 нм. В качестве подвижной фазы использовали систему: MeOH : CH₂Cl₂ : CH₃CN : H₂O — 82.5 : 5 : 5.5 : 7.

Режим — изократический на протяжении всего анализа, скорость потока 800 мкл/мин, объем вводимой пробы 40 мкл, температура 30°C.

ВЭЖХ с масс-детекцией проводили в режиме положительных ионов в диапазоне масс-ионов 0–1000 m/z .

Образование *cis*-изомеров астаксантина в присутствии органических растворителей при 50°C. Стоковый раствор свободного астаксантина в метаноле (0,01 мг/мл) объемом 1,5 мл разделяли на 15 образцов по 100 мкл и упаривали на концентрате. Упаренный образец растворяли в 1,5 мл органического растворителя и инкубировали в термостате при постоянной температуре 50°C в полной темноте в течение 4 ч. Детектировали содержание образовавшихся *cis*-изомеров методом ВЭЖХ каждый час.

Все пробы, вводимые в хроматографическую колонку, были растворены в метаноле. Для расчета концентраций *all-trans*-, 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров в исследуемых образцах использовали соответственно коэффициенты экстинкции 125000 л/(моль · см), 247660 л/(моль · см) и 190512 л/(моль · см) [13].

Образование *cis*-изомеров и деструкция астаксантина под действием синего света при температуре 25°C. Стоковый раствор свободного астаксантина в метаноле (0,01 мг/мл) объемом 2 мл разделяли на два образца по 1 мл. Контрольный образец находился без доступа света в холодильнике (5°C) на протяжении четырех суток, опытный образец освещали синим спектром излучения (450–500 нм) с интенсивностью 500 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ при комнатной температуре (25°C) в течение четырех суток. На спектрофотометре UV-Vis Cary 50 (Varian, США) раз в сутки измеряли оптическую плотность исследуемых растворов, а процесс изомеризации *trans* → *cis* изучали методом ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость спектра поглощения раствора астаксантина от полярности растворителя. При исследовании спектров поглощения астаксантина в органических растворителях отметили, что происходит сдвиг максимума поглощения для астаксантина от 478 нм к 490 нм, при переходе от растворителей с меньшим показателем преломления n (ацетон, метанол) к растворителям с большим значением (пиридин, бензол, ДМСО) (табл. 1). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными [14], поскольку энергетический переход электронов на S_2 очень чувствителен к n .

Корреляция между максимумом поглощения хромофора в растворителе и показателем преломления этого растворителя выражается уравнением [15]:

$$\Delta\nu(\text{см}^{-1}) = -5.5 \times 10^4 \times \Delta\alpha \times M_w^{-1} \times \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)},$$

где $\Delta\alpha$ — разница между поляризуемостью в возбужденном и основном состоянии, M_w — молекулярная масса, n — показатель преломления среды, $\Delta\nu$ — дисперсионный сдвиг растворителя.

Используя собственные и литературные данные, мы получили линейную зависимость максимума поглощения астаксантина в см⁻¹ (ν) от показателя преломления (n) растворителя:

$$\nu = \nu_0 + p \cdot f(n^2),$$

где ν_0 — значение максимума поглощения хромофора в состоянии вакуума, p — наклон кривой.

На рис. 2 изображены полученные зависимости для астаксантина в различных растворителях, разбитых на две группы: полярные ($\epsilon > 1.15n^2$) и неполярные ($\epsilon \leq 1.15n^2$) [16], где ϵ — диэлектрическая проницаемость среды.

Как видно из представленного рисунка, данные по зависимости для полярных и неполярных растворителей отличаются показателем ν_0 , которые равны соответственно 23.799 и 22.964 для неполярных и полярных растворителей и углом наклона p (–11.383 против –8.847).

При разделении всех растворителей на две группы — неполярные и полярные, согласно критерию $\epsilon > 1.15n^2$ для полярных и $\epsilon \leq 1.15n^2$ для неполярных — коэффициент корреляции оказался выше (–0.9596 и –0.9742), чем при объединении всех растворителей в одну группу (–0.941), что видно из табл. 2.

Это означает, что взаимодействие между молекулой астаксантина и растворителем различается в растворителях разной полярности, поэтому необходимо рассматривать его поведение отдельно в двух группах. Вероятно, такая зависимость связана с тем фактором, что при поглощении энергии молекула хромофора становится диполем, который по-разному взаимодействует с неполярными и полярными растворителями [17].

Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров астаксантина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детекцией в видимой области и масс-детектором. Как уже отмечалось выше, *all-trans*-изомеры астаксантина способны при повышении температуры или при облучении образовывать *cis*-изомеры. Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров проводилась методом ВЭЖХ по известной методике [6]. Для анализа использовался раствор астаксантина в метаноле, содержащий 10% *cis*-изомеров. Он был получен инкубацией метанольного раствора астаксантина в течение 4 ч при 50°C. На рис. 3 представлена хромато-

Таблица 1. Физико-химические параметры органических растворителей

№ точки	Растворитель	$\nu_{\text{аст}} \cdot 10^3$, см ⁻¹	n	$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}$	ϵ	μ , Дебай	Число неподеленных электронных пар	Число π -связей
Неполярные растворители								
1	н-Гексан*	21.19	1.365	0.223	1.88	0.00	0	0
2	Петролейный эфир*	21.1416	1.428	0.257	1.88	0.00	0	0
3	Циклогексан*	20.92	1.429	0.258	2.02	0.00	0	0
4	Диоксан	20.75	1.42	0.253	2.21	0.00	4	0
5	Тетрахлорметан	20.62	1.46	0.274	2.24	0.00	12	0
6	Бензол	20.49	1.501	0.295	2.23	0.00	0	3
7	Толуол*	20.408	1.497	0.293	2.378	0.37	0	3
8	CS ₂ *	19.76	1.624	0.353	2.64	0.00	4	2
Полярные растворители								
9	Метанол	21.14	1.329	0.203	32.66	1.71	2	0
10	Ацетонитрил	21.1	1.345	0.212	38.00	3.94	1	2
11	Ацетон	21.05	1.359	0.220	20.70	2.85	2	1
12	EtAc	21.05	1.37	0.226	27.8	1.78	4	1
13	Этанол	21.01	1.362	0.222	24.55	1.68	2	0
14	Изо-пропанол	20.92	1.384	0.234	18.30	1.68	2	0
15	Бутанол-1	20.92	1.40	0.242	17.80	1.68	2	0
16	Дихлорметан	20.58	1.424	0.255	9.08	1.55	6	0
17	Хлороформ	20.45	1.446	0.267	4.72	1.06	9	0
18	Пиридин	20.33	1.509	0.299	12.3	2.20	1	3
19	ДМСО	20.33	1.479	0.284	46.45	3.96	4	2
20	Бензиловый спирт	20.32	1,54	0.315	13.0	1.71	2	3
21	Хлорбензол*	20.28	1.525	0.306	5.61	1.69	3	3
22	Иодметан*	20.16	1.53	0.309	7.0	1.64	3	0
23	Этиловый эфир коричной кислоты*	20.16	1.56	0.323	6.1	2.14	4	5

Примечание. Знаком * помечены данные из работы [14]; $\nu_{\text{аст}}$ — положение максимума поглощения, выраженное в см⁻¹.

Таблица 2. Значения основных параметров уравнения $\nu = \nu_0 + p \cdot f(n^2)$ для растворов астаксантина

Растворители	ν_0	$-p$, см ⁻¹	Коэффициент корреляции r
Неполярные	23.799	11.383	-0.9596
Полярные	22.964	8.847	-0.9742
Сумма всех растворителей	23.161	9.4423	-0.941

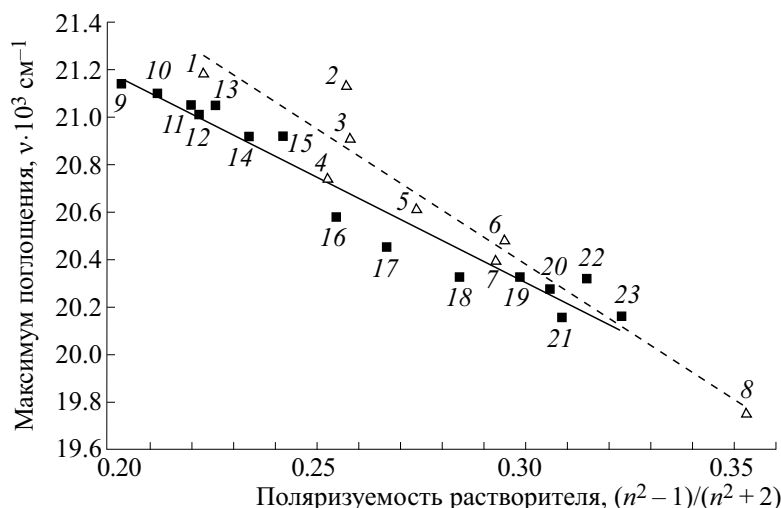


Рис. 2. Зависимости максимумов поглощения растворов астаксантина в различных органических растворителях от поляризуемости растворителя. Точки на рисунке соответствуют номерам в табл. 1. Обозначения: треугольники — неполярные растворители, пунктирная линия — тренд для неполярных растворителей; квадраты — полярные растворители, сплошная линия — тренд для полярных растворителей.

грамма данного образца. Как видно из рисунка, смесь изомеров удалось разделить на четыре пика, каждый пик соответствует определенному изомеру (*all-trans* — пик 1, *9-cis* — пик 3, *13-cis* — пик 4). Пик 2 идентифицировать не удалось.

Для качественного подтверждения изомеров для каждого пика были сняты спектры в видимой области (рис. 4). Как видно из рис. 4а, максимум поглощения для пика 1 соответствует известным значениям *all-trans*-изомера и равен 480 нм [6]. Спектр поглощения пика 2 аналогичен пику 1, но, поскольку в 100%-м чистом *all-trans*-изомере он не наблюдается, был сделан вывод, что пик 2

соответствует неизвестному нам изомеру (рис. 4б). Пики 3 и 4 были идентифицированы как *9-cis*- (рис. 4в) и *13-cis*-изомеры (рис. 4г) соответственно по характерному сдвигу максимума поглощения в область меньших длин волн (для *13-cis*-изомера — 468 нм, для *9-cis*-изомера — 472 нм), а также по появлению второго максимума поглощения для *13-cis*-изомера (370 нм).

Методом масс-спектрометрии установили, что пики 1–4 имеют один и тот же масс-ион, равный 597.3, что соответствует свободной форме астаксантина. Это подтверждает вывод о том, что

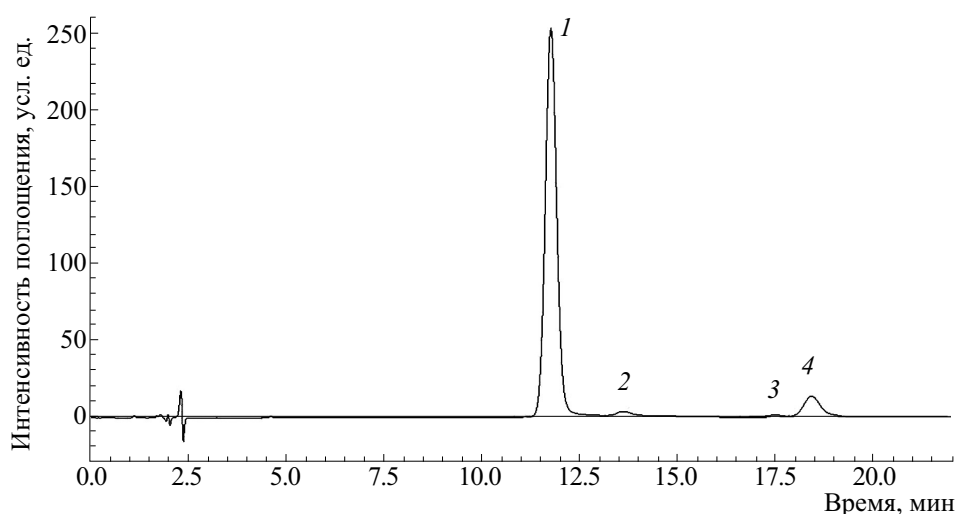


Рис. 3. Хроматограмма раствора астаксантина в метаноле, содержащего 10% *cis*-изомеров: 1 — *all-trans*-астаксантин, 2 — неизвестный *cis*-астаксантин, 3 — *9-cis*-астаксантин, 4 — *13-cis*-астаксантин.

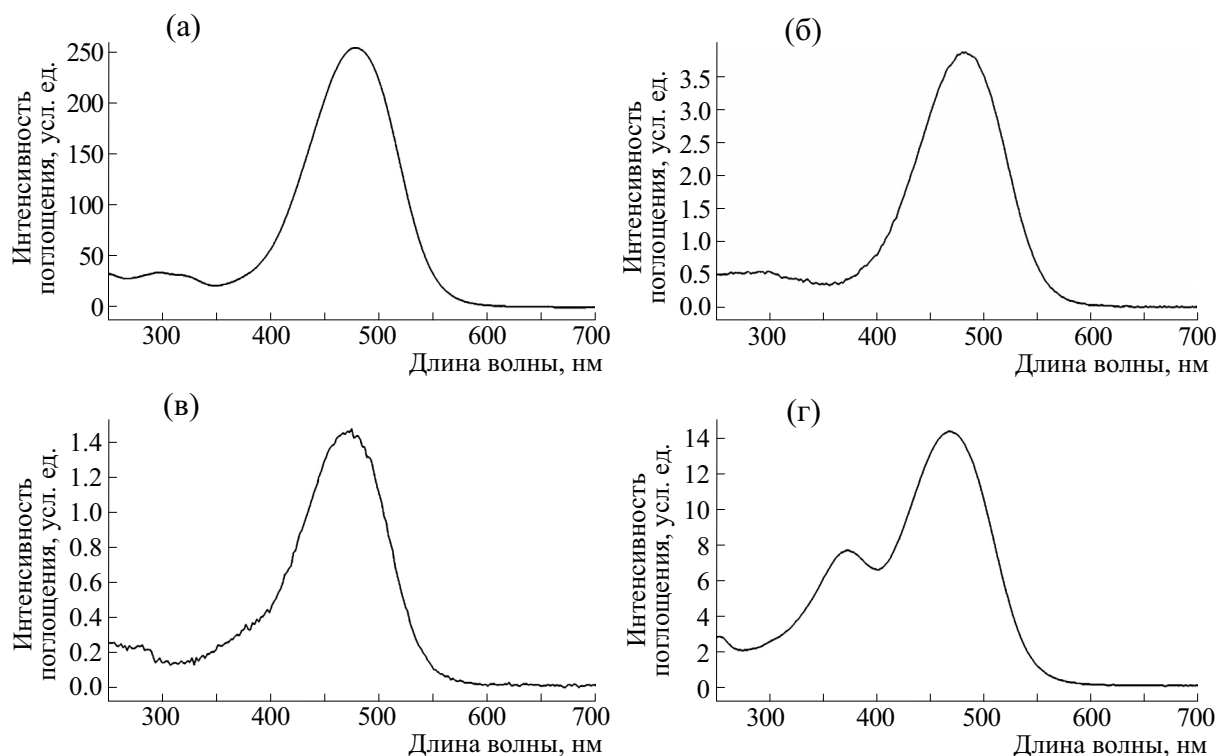


Рис. 4. Спектры поглощения пиков 1–4 хроматограммы, представленной на рис. 3: (а) — *all-trans*-астаксантин, (б) — неизвестный изомер атаксантина, (в) — *9-cis*-астаксантин, (г) — *13-cis*-астаксантин.

пики 1–4 являются изомерами одного и того же вещества.

Образование *cis*-изомеров атаксантина в присутствии органических растворителей при 50°C. Далее исследовали процесс изомеризации *all-trans*-астаксантина при 50°C в течение 4 ч в растворе четырнадцати органических растворителей, отличающихся друг от друга показателем преломления, диэлектрической проницаемостью, дипольным моментом и количеством неподеленных электронных пар и π -связей (табл. 1). Дополнительно для некоторых растворителей на рис. 5 приведены структурные формулы, на кото-

рых изображены электронные облака неподеленных электронных пар и волнистыми линиями — π -связи. Температура 50°C была выбрана потому, что скорость изомеризации растет с повышением температуры [7], однако параллельно с этим протекает и термическая деструкция атаксантина: при значениях выше 50°C его молекула начинает разрушаться.

Предварительно исследовали состояние кристаллического атаксантина при нагревании до 50°C в течение 4 ч, при котором не наблюдалось появления *cis*-изомеров. В отличие от кристаллического состояния, растворенный атаксантин

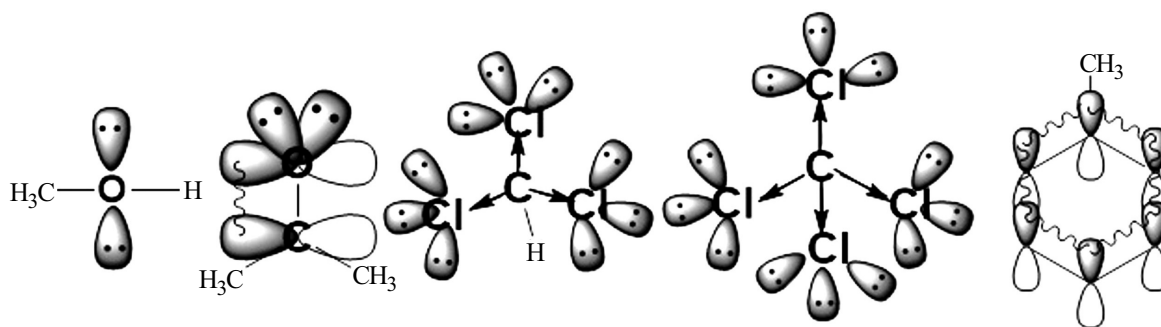


Рис. 5. Примеры структур некоторых растворителей (слева направо: метанол, ацетон, хлороформ, тетрагидрофур, толуол).

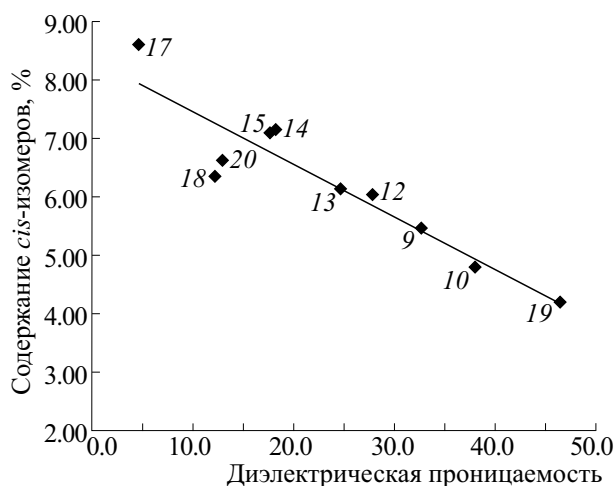


Рис. 6. Зависимость содержания *cis*-изомеров астаксантина в анализируемой пробе от диэлектрической проницаемости растворителя при инкубации в течение 4 ч при 50°C. Нумерация образцов соответствует нумерации в табл. 1. Коэффициент корреляции $r = -0.97$.

подвергается изомеризации, но в каждом растворителе содержание *cis*-изомеров различается между собой.

Итак, процесс изомеризации происходит только в растворе, причем эффект стабилизации растворителями отличается для полярных и неполярных растворителей. Поэтому далее проанализировали наличие корреляции между накоплением *cis*-изомеров в реакционной среде после инкубации при 50°C и диэлектрической проницаемостью растворителя отдельно для полярных растворителей. Точки на рисунке 6 соответствуют среднему значению после трех повторов и указаны согласно порядковому номеру растворителя в таблице 1. Оказалось, что зависимость между этими показателями имеет достаточно высокий коэффициент корреляции, который составил $r = -0.97$.

Стоит отметить, что при проведении эксперимента в ацетоне значительно уменьшилась ин-

тенсивность как *all-trans*-изомера, так и *cis*-изомеров, что объясняется деструкцией молекулы. Это предположение подтверждается появлением продуктов распада в образце, поглощающих в области 200–250 нм. Поскольку в других используемых нами растворителях не наблюдается подобной деструкции астаксантина, зависимость содержания *cis*-изомеров от ϵ изучалась без учета ацетона и не была учтена при расчете коэффициента корреляции.

Поскольку в ходе изомеризации образуются сразу несколько *cis*-изомеров (преимущественно 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеры), то для правильного отражения эффекта растворителя на стабильность изомеров использовалась их сумма. Этот момент имеет большое значение, поскольку в некоторых растворителях (например, в диметилсульфоксиде и ацетонитриле) содержание 9-*cis*-изомера равняется 0.3%, а в ацетоне — достигает почти 3%.

Образование *cis*-изомеров и деструкция астаксантина под действием синего света при температуре 25°C. Другим фактором для инициации процесса изомеризации стало облучение синим светом ($\lambda = 450\text{--}500$ нм). Свет именно такого диапазона был выбран потому, что максимум поглощения астаксантина в большинстве органических растворителей попадает в эту область. Метанол был выбран в качестве растворителя для данного анализа, поскольку способствует стабилизации *cis*-изомеров, не вызывает деструкции астаксантина и устойчив к облучению в отличие от, например, хлороформа, в котором астаксантин обесцвечивался всего за несколько часов облучения.

Метанольный раствор астаксантина непрерывно облучался в течение четырех суток синим светом при комнатной температуре (25°C). Методом ВЭЖХ каждый час изучали состав облученного образца, усредненные результаты по трем повторам представлены в табл. 3. Как можно видеть из представленных данных, содержание изомеров при облучении в течение первых пяти часов резко увеличивалось, а затем выходило на

Таблица 3. Зависимость содержания *cis*-изомеров в метанольном образце астаксантина от времени облучения

Изомеры астаксантина	Время облучения, ч											
	0	1	2	3	4	5	6	7	24	48	72	96
Содержание изомеров в зависимости от времени облучения, %												
<i>All-trans</i> -	100	89.46	89.78	90.65	90.65	91.71	91.56	89.64	88.53	87.86	86.23	85.75
9- <i>cis</i> -	0	0.31	0.55	0.67	0.85	1.15	1.09	1.13	1.14	1.17	1.2	1.21
13- <i>cis</i> -	0	1.71	2.44	2.87	3.04	3.04	3.90	2.76	2.60	2.53	2.27	2.08

Примечание. Значения усреднены по трем опытам.

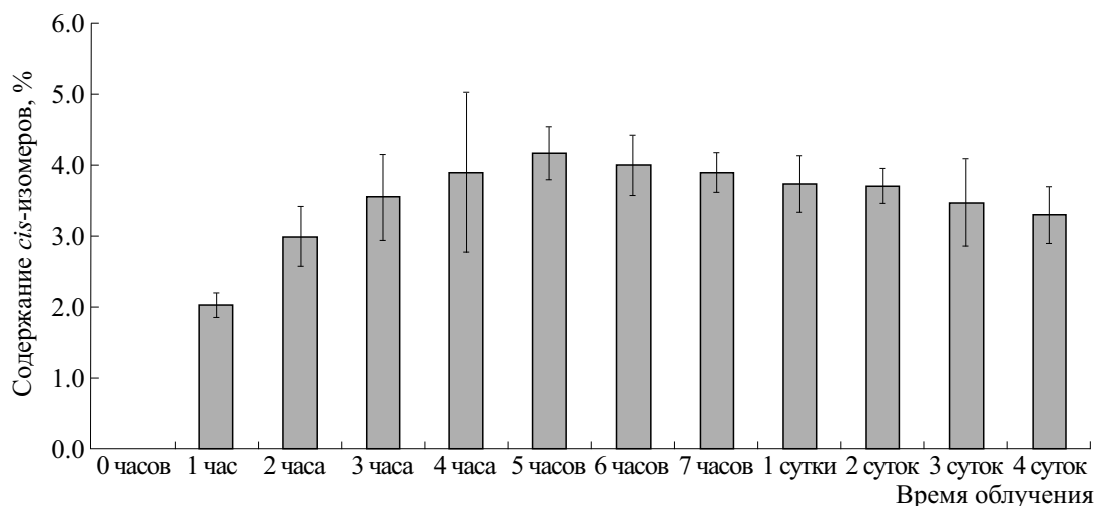


Рис. 7. Суммарное содержание *cis*-изомеров астаксантина в образце в зависимости от времени его облучения.

плато, и начинало снижаться. После облучения в течение семи часов было обнаружено достоверное падение содержания 13-*cis*-изомеров, и следующее измерение было проведено на 24-й час с момента облучения, а затем измерялось каждые 24 часа. Как видно из табл. 3, содержание 13-*cis*-изомеров продолжало уменьшаться до конца эксперимента. Исходя из этого, можно сделать вывод, что при длительном облучении происходит разрушение молекулы астаксантина.

Суммарное содержание обоих *cis*-изомеров повторяет динамику содержания 13-*cis*-изомера (рис. 7).

Концентрация *all-trans*-астаксантина начинает падать уже после первого часа, это означает, что астаксантин медленно разрушается под действием света. Продукты деградации видны на спектрах поглощения облученных растворов (рис. 8). Рост оптической плотности в синей области является подтверждением того, что полиеновая цепь разрушилась до более коротких продуктов распада (апо- и эпокси-соединения). Увеличение поглощения в области 250–260 нм соответствует максимуму поглощения апо-9-астаксантинона [11]. Полученные данные говорят о том, что при облучении светом в течение четырех часов уже образуется этот продукт деградации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость электронного переноса $S_0 \rightarrow S_2$ от структуры каротиноида. Ранее в работе [18] была продемонстрирована систематическая зависимость измеренного времени жизни состояния S_1 от длины конъюгации для толуольных растворов β -каротина.

Подобную зависимость можно наблюдать и для максимума поглощения растворов каротиноидов. Однако в случае каротиноидов эта зависимость отличается от других хромофоров за счет иононового кольца, а также карбонильных групп, которые также оказываются сопряженными с главной цепью. Для учета сопряженных связей в концевых циклах принято использовать показатель N_{eff} [19], который равняется $0.3N$ по сравнению с обычным сопряжением. Такое значение связано с уменьшением перекрывания *p*-орбиталей для сопряженных двойных связей полиеновой цепи и кольца, расположенного вне плоскости цепи из-за стерических факторов. Хотя конъюгированный концевой цикл вносит вклад в длину цепи конъюгации, он расширяет ее на эквивалент только 0.3 связи $C=C$.

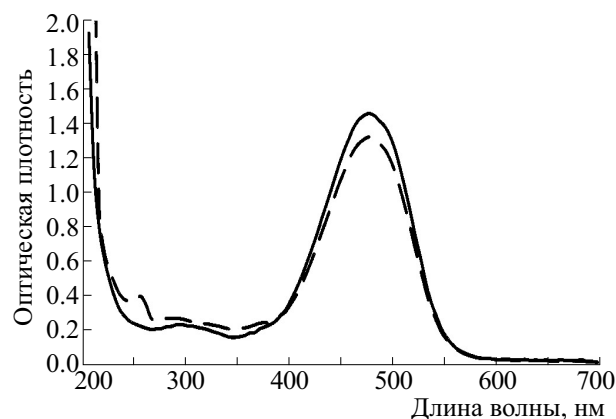


Рис. 8. Спектры поглощения раствора астаксантина в метаноле до облучения (сплошная линия) и после облучения в течение 4 ч (прерывистая линия).

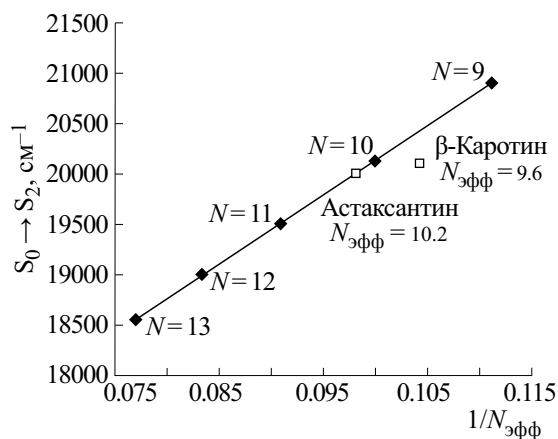


Рис. 9. Зависимость электронного переноса $S_0 \rightarrow S_2$ см $^{-1}$ от обратного числа сопряженных двойных связей (N) для линейных каротиноидов в гексане [19].

Таким образом, с учетом всех двойных связей астаксантина, получается, что молекула содержит девять С=С-связей полиеновой цепи, две С=С- и две С=О-связи в иононовом кольце. С учетом этого $N_{\text{эфф}} = 9.0 + 0.6 + 0.6 = 10.2$. Это значение полностью соответствует зависимости максимума поглощения от длины сопряжения (рис. 9). На рис. 9 добавлены собственные данные к имеющимся в работе [19].

Стабилизация органическими растворителями *cis*-изомеров астаксантина. При пространственном рассмотрении строения *cis*-изомеров астаксантина (рис. 10) видно, что метильные группы при пятом и тринадцатом атомах углерода, которые образуют диполи с зарядом δ^+ , при определенном изгибе молекулы могут быть расположены близко друг к другу, из-за чего возникают сильные электронные отталкивания.

Это отталкивание особенно важно для 9-*cis*-изомера, поскольку при повороте молекулы вокруг двойной С9=С10 связи метильная группа при С13 оказывается близко расположена по отношению к метильной группе при С5. Таким об-

разом, возникающее диполь-дипольное отталкивание положительно заряженных метильных групп вызывают вращающий момент, благодаря чему *cis*-изомер стремится вернуться в исходное *all-trans* состояние. Этому взаимодействию не наблюдается для 13-*cis*-изомера, поскольку метильная группа при С13 и С13' располагается с другой стороны полиеновой цепи. Этим объясняется тот факт, что содержание 13-*cis*-изомера значительно выше, чем 9-*cis*-изомера.

Известно, что для инициации процесса изомеризации необходимо преодолеть энергетический барьер для крутильных колебаний вокруг двойной связи. Чтобы преодолеть этот барьер, молекулу астаксантина облучают светом. В таком случае образуется радикальный аддукт, а двойная связь по свойствам становится близка к одинарной, атомы углерода находятся в sp^3 -гибридизации, благодаря чему появляется способность к вращению вокруг центральной связи. При поглощении энергии в виде света или тепла электроны переходят в возбужденное состояние $\pi \rightarrow \pi^*$. Если не происходит флуоресценции, то энергия возбужденного электрона может переходить в колебательную и вращательную энергию. Вращение вокруг центральной связи может стать таким, что возбужденные *cis-trans*-состояния могут переходить друг в друга. Поскольку энергия возбужденного состояния *cis*-изомера выше, чем возбужденного *trans*-изомера, то молекула больше времени находится в виде *cis*-изомера.

При использовании растворителей с примерно одинаковой диэлектрической проницаемостью (точки 4–6), содержание *cis*-изомеров астаксантина выше в том растворителе, который содержит сопряженную π -электронную систему (бензол). Мы предполагаем, что π -электроны растворителя взаимодействуют с возбужденными π^* -электронами подвергающейся изомеризации двойной связи. В результате такого взаимодействия происходит стабилизация *cis*-изомера (рис. 11).

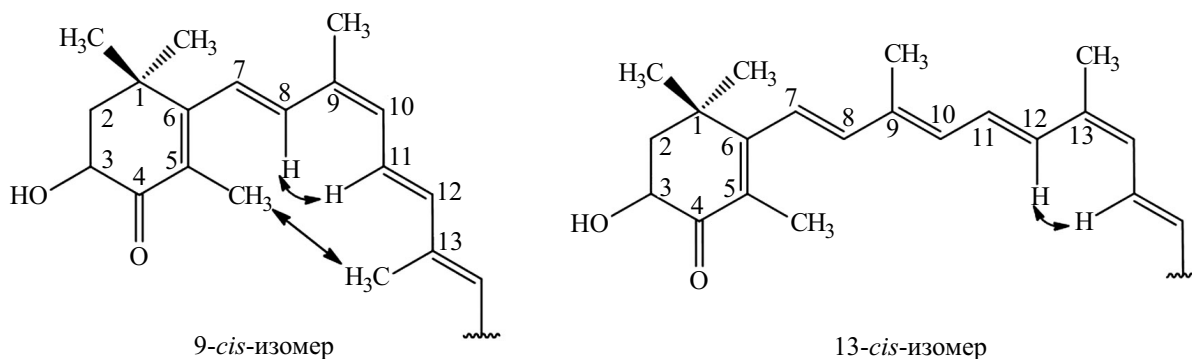


Рис. 10. Структура *cis*-изомеров астаксантина.

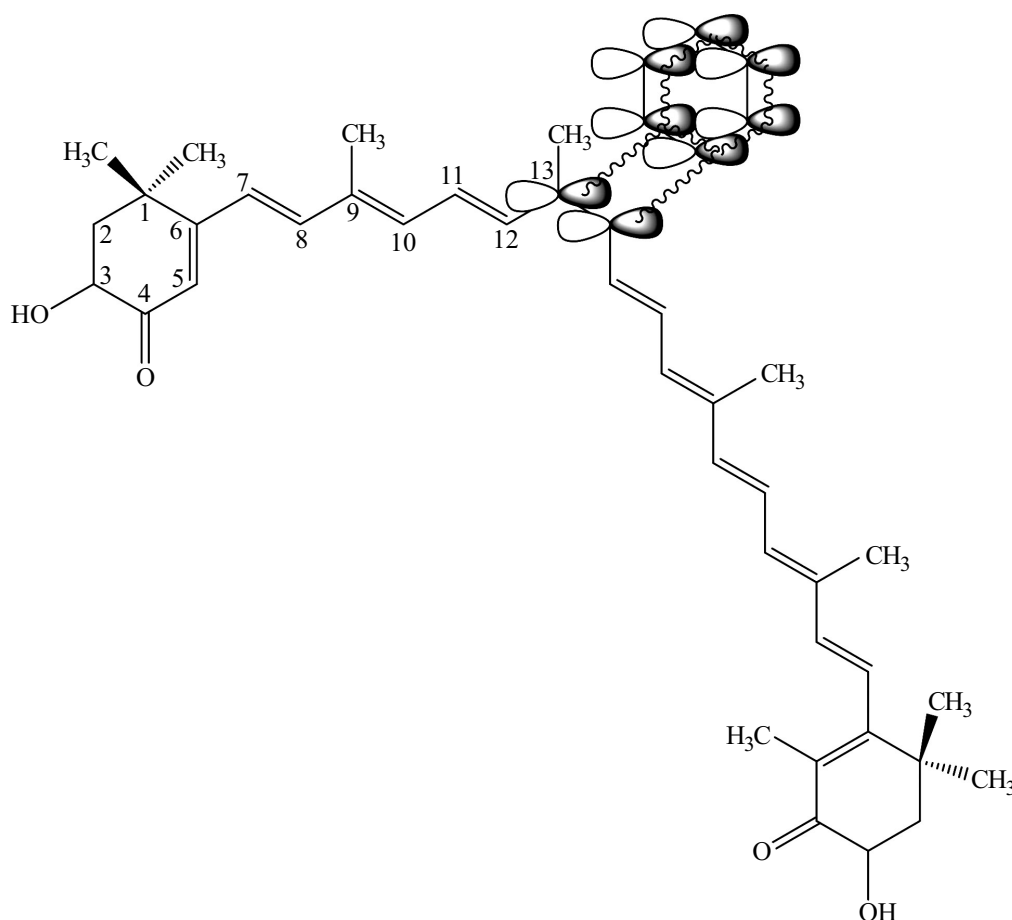


Рис. 11. Стабилизация *cis*-изомера астаксантина растворителем с π -системой на примере бензола. Волнистой линией указаны π -связи в бензоле и их сопряжение с π -электронами астаксантина в месте протекания изомеризации.

Также наблюдается определенная зависимость содержания *cis*-изомеров от диэлектрической проницаемости растворителя. В неполярных растворителях *cis*-изомеров значительно меньше, чем в полярных. Вероятно, это связано с отсутствием диполь-дипольных взаимодействий между астаксантином, который после возбуждения получает дипольный момент, и неполярным растворителем, не имеющим дипольный момент (для растворителей $4-6 \mu = 0$). В полярных же растворителях содержание *cis*-изомеров оказалось выше, причем с увеличением полярности это значение линейно падает. Это означает, что процесс изомеризации в очень полярных и очень неполярных растворителях протекает хуже, чем в растворителях со средней полярностью.

Как видно из представленных данных, *cis*-изомеры в небольших количествах присутствуют во всех растворителях. Чтобы проверить, как будет происходить изомеризация без влияния окружающей среды, были проведены опыты на кристаллах астаксантина, которые облучали либо подвергали термической обработке при $T = 50^\circ\text{C}$ в течение четырех часов. После их растворения в

метаноле методом ВЭЖХ было показано, что как первые, так и вторые образцы не содержат *cis*-изомеров. Это означает, что изомеризация не протекает (либо протекает очень медленно) в кристаллическом виде, т.е. растворитель выполняет роль стабилизатора в процессе изомеризации.

Можно предположить, что молекулы растворителя взаимодействуют с диполями метильных групп астаксантина при сопряженной полиеновой цепи. Кроме того, в случае 9-*cis*-изомера молекулы растворителя взаимодействуют с C5- и C13-метильными группами и снимают напряжение, благодаря чему в растворе появляется стерически затрудненный 9-*cis*-изомер. Также, судя по всему, растворитель взаимодействует с делокализованными π -электронами астаксантина, стабилизируя радикальный аддукт, благодаря чему появляется больше времени для вращения вокруг центральной связи. По всей видимости, если в растворителе присутствует π -система, то она дополнительно стабилизирует *cis*-изомеры.

Процесс фотоизомеризации и деструкции астаксантина. При длительном облучении астаксантина светом с длиной волны в диапазоне 450–500 нм, что соответствует максимальному перекрытию с областью поглощения молекулы, наблюдается рост *cis*-изомеров астаксантина. Стоит заметить, что содержание образующихся изомеров резко увеличивается в первые два часа, а затем это значение растет очень медленно (рис. 7). На пятом часу облучения было зафиксировано самое высокое значение для суммы 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров. После пятого часа содержание *cis*-изомеров начинает уменьшаться.

Подобную зависимость можно объяснить тем фактором, что в растворе протекают одновременно две реакции: фотоизомеризация астаксантина (*trans*→*cis*) и разрушение его молекулы. В первые часы скорость реакции фотоизомеризации очень высока, а деструкция практически не происходит, поскольку астаксантин дезактивирует образующиеся свободные радикалы, поэтому мы наблюдаем рост *cis*-изомеров. Затем скорость первой реакции начинает падать, в то же время антиоксидантная активность астаксантина начинается снижаться. Чем дольше происходит облучение, тем быстрее деградируют молекулы астаксантина, а после пятого часа скорость реакции разрушения становится выше скорости реакции фотоизомеризации. Эти выводы подтверждает и тот факт, что концентрация *all-trans*-астаксантина начинает падать уже после первого часа, в то время как наблюдается увеличение поглощения в области 250–260 нм, что соответствует максимуму поглощения апо-9-астаксантина [11]. Рост оптической плотности в синей области является подтверждением того, что полиеновая цепь разрушилась до более коротких продуктов распада (апо- и эпоксисоединения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был изучен процесс фотоизомеризации астаксантина, а также изомеризации при нагревании до 50°C в присутствии различных органических растворителей. Показано, что растворители стабилизируют *cis*-изомеры астаксантина, причем в растворителях со значением диэлектрической проницаемости от 4 до 30 процесс изомеризации протекает лучше, чем в сильнополярных и неполярных. Растворители с сопряженной π-электронной системой также увеличивают содержание *cis*-изомеров. В кристаллическом состоянии астаксантин не образует *cis*-изомеров ни при нагревании, ни при облучении. В случае фотоизомеризации протекают два процесса: образование *cis*-изомеров и деструкция молекулы. Показано, что после пяти часов облучения синим светом скорость реакции разрушения становится выше

скорости образования *cis*-изомеров, поэтому их содержание начинает снижаться.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Источник финансирования: НИР согласно Приказу № 1363 от 25 июня 2019 г. по НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. N. Coral-Hinostroza, T. Ytrestoyl, B. Ruyter, and B. Bjerkeng, *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicology & Pharmacology* **139** (1-3), 99 (2004).
2. M. Osterlie, B. Bjerkeng, and S. Liaaen-Jensen, *J. Nutritional Biochem.* **11** (10), 482 (2000).
3. Y. M. Naguib, *J. Agricult. Food Chem.* **48** (4), 1150 (2000).
4. M. Kobayashi, T. Kakizono, N. Nishio, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (3), 351 (1997).
5. X. Liu and T. Osawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357** (1), 187 (2007).
6. J. P. Yuan and F. Chen, *J. Agricult. Food Chem.* **47** (9), 3656 (1999).
7. Food chemistry J. P. Yuan and F. Chen, *Food Chem.* **73** (2), 131 (2001).
8. J. Lerfall and S. Birkeland, *Int. J. Food Sci. Tech.* **49**, 294 (2014).
9. S. Yang, Q. Zhou, L. Yang, et al., *J. Oleo Sci.* **64** (3), 243 (2015).
10. W. J. De Bruijn, Y. Weesepeel, J. P. Vincken, and H. Gruppen, *Food Chem.* **194**, 1108 (2016).
11. Y. Weesepeel, H. Gruppen, W. de Bruijn, and J. P. Vincken, *J. Agricult. Food Chem.* **62** (42), 10254 (2014).
12. J. Milanowska and W. I. Gruszecki, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **80** (3), 178 (2005).
13. L. Zhao, F. Chen, G. Zhao, et al., *J. Agricult. Food Chem.* **53** (24), 9620 (2005).
14. M. Buchwald and W. P. Jencks, *Biochemistry* **7** (2), 834 (1968).
15. Н. Г. Бахшиев, О. П. Гирин и И. В. Питерская, *Оптика и спектроскопия* **16** (5), 821 (1964).
16. I. Renge and E. Sild, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **218** (1), 156 (2011).

17. Г. Г. Мартинович, Л. А. Сазанов и С. Н. Черенкович, *Клеточная биоэнергетика: Физико-химические и молекулярные основы: Учебное пособие* (ЛЕНАНД, М., 2017).
18. M. R. Wasielewski and L. D. Kispert, *Chem. Phys. Lett.* **128** (3), 238 (1986).
19. M. J. Llansola-Portoles, A. A. Pascal, and B. Robert, *J. Roy. Soc. Interface* **14** (135), 20170504 (2017).

Effects of Solvent Nature and Light on Isomerization and Oxidative Destruction of Astaxanthin

E.A. Kulikov*, I.S. Kulikova*, R.G. Vasilov*, and A.A. Selishcheva*, **

*National Research Center "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova, Moscow, 123182 Russia

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

Astaxanthin and its esters are referred to as "secondary" carotenoids and synthesized under stress conditions in the cells of *Haematococcus pluvialis*, transformed from vegetative cells to hematocysts. Stress factors can affect not only the rate and direction of synthesis, but also the conformational changes in the pigment molecule, that cause *trans*-isomers to convert to *cis*-isomers. The aim of this study is to assess the efficiency of different factors (medium polarity and light) which have impact on the process of *trans*-*cis* astaxanthin isomerization. While studying the effect of these factors on the formation of 9-*cis*- and 13-*cis*-isomers from all-*trans* astaxanthin solutions at 50°C, it was shown that medium polarity solvents more effectively stabilize *cis*-isomers than highly polar solvents. Apolar solvents do not contribute to stabilization of *cis*-isomers. The presence of π -bonds in the solvent molecule also has a positive effect on the isomerization process. When studying the effects of the refractive index of different solvents on polarizability of astaxanthin, there were differences in the dependencies for polar and apolar solvents. Solvents of medium polarity were supposed to facilitate the process of *trans*-*cis* astaxanthin isomerization due to a reduction in the energy of the rotating moment and stabilization of the *cis*-conformation molecule as a result of reduced dipole-dipole repulsion force between methyl groups in the polyene chain and ionone ring. Exposure of astaxanthin solutions to light at 25°C induced formation of *cis*-isomers the quantity of which was higher within the first 4 hours of exposure as compared to that after exposure for 6 and more hours. Exposure of astaxanthin to irradiance for longer period caused the decay of astaxanthin and the formation of degradation and oxidation products.

Keywords: astaxanthin, trans- and cis-isomers, polarity, refractive index, HPLC method

ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ДИАПАЗОНЕ ВЕЛИЧИН ОТ «НУЛЕВОГО» ПОЛЯ (0,01 мкТл) ДО 100 мкТл НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕАКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛАХ

© 2020 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко

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

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 16.12.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Показано, что 40-минутное экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипоманнитных условиях (при величине остаточного поля 0.01 мкТл) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина. При увеличении постоянного магнитного поля до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного магнитного поля сохраняется. При дальнейшем увеличении поля до 2.5 мкТл эффект действия поля исчезает и снова проявляется при 5 мкТл в редуцированном виде, достигая максимума при 7 мкТл. При последовательном увеличении индукции постоянного магнитного поля (9, 15, 19.5 мкТл) отмечается столь же выраженный и устойчивый ингибирующий эффект, степень выраженности которого значительно снижается только при 30 мкТл. Далее, при величине постоянного магнитного поля 45 мкТл значения интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина уже не отличаются от контрольных. При дальнейшем увеличении поля до 74 мкТл и 100 мкТл также не отмечено влияние на эти процессы.

Ключевые слова: гипоманнитное поле, геомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0006302920020114

В литературе имеется ряд сообщений о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипоманнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [1–4]. Ранее нами было показано, что полуторачасовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипоманнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение базовой внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [5, 6]. Учитывая то, что эффект действия гипоманнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва (формилированным пептидом N-formyl-Met-Leu-Phe или форболовым эфиром форбол-12-ме-

ристат-13-ацетата) и, следовательно, не обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы, нами с целью определения возможных молекулярных механизмов этого действия «нулевого» поля был проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах [6]. Было показано, что снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в неактивированных нейтрофилах в гипоманнитных условиях не зависит от кальций-опосредованных регуляторных механизмов, о чем свидетельствует отсутствие действия внутриклеточного хелатора ионов кальция (ацетоксиметилового эфира 1,2-бис(2-аминофеноксид)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты) на интенсивность этого процесса [6]. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипоманнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, МП – магнитное поле, ГМП – геомагнитное поле.

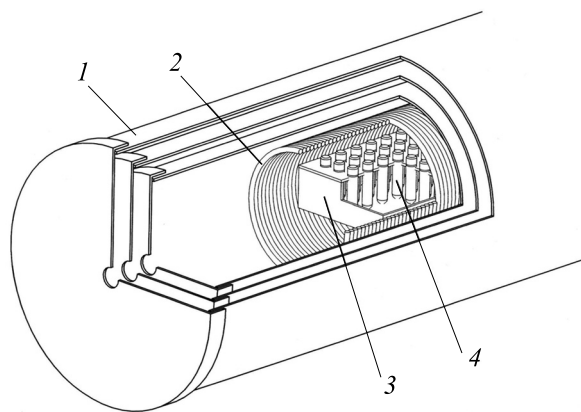


Рис. 1. Блок магнитной обработки: 1 — магнитные экраны; 2 — соленоид; 3 — термостабилизированная кювета; 4 — экспериментальные образцы.

[6]. Добавка ингибитора фосфолипазы С (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте [6]. О возможном участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме этого эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах, подвергшихся действию гипоманнитного поля [6].

В связи с этими результатами возникает вопрос о том, каким образом данный эффект гипоманнитного поля зависит от величины остаточного магнитного поля и, более широко, от величины постоянной компоненты магнитного поля (МП) в диапазоне ослабленного геомагнитного поля (ГМП), параметров ГМП (34–68 мкТл и далее до 100 мкТл). Ответить на этот вопрос предполагается в данном исследовании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 24–26 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл бескальциевого раствора

Хенкса и оставляли на 1 ч при 4°C. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов стандартной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в постоянном магнитном поле заданной величины. Нейтрофилы инкубировали при $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Заданная температура поддерживалась циркуляционным термостатом. Типичное время инкубации составляло 40 мин. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~45 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл.

В опытах была использована специальная, необходимая для корректного выполнения работ с ослабленным геомагнитным полем и со слабыми МП, исследовательская аппаратура — установка для формирования гипоманнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП — до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка состояла из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками с отверстиями для подводки измерительной и термостабилизирующей аппаратуры (рис. 1). Определение остаточных полей в установке проводили пря-

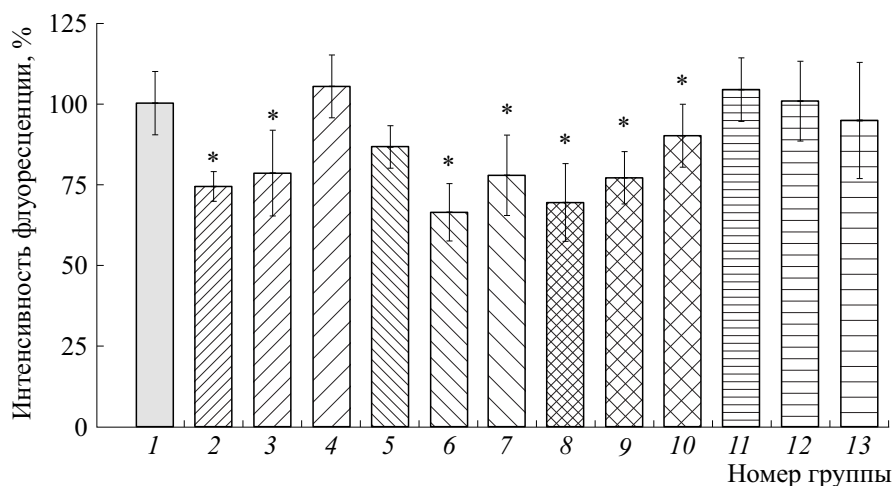


Рис. 2. Влияние постоянного магнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 8$); по оси абсцисс – номер группы: 1 – контроль, 2 – постоянное МП 0.01 мкТл, 3 – 1.0 мкТл, 4 – 2.5 мкТл, 5 – 5.0 мкТл, 6 – 7.0 мкТл, 7 – 9.0 мкТл, 8 – 15.0 мкТл, 9 – 19.5 мкТл, 10 – 30 мкТл, 11 – 45 мкТл, 12 – 74 мкТл, 13 – 100 мкТл. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0.05$).

мым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного МП различной интенсивности (1.0, 2.5, 5.0, 7.0, 9.0, 15.0, 19.5, 30, 45, 74, 100 мкТл) внутри этой системы был установлен специальный индуктор (соленоид), подключенный к источнику постоянного тока. Размеры экспериментального участка внутри экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 8). Опыты повторяли не менее трех раз.

Флуоресцентная детекция внутриклеточных АФК. После 40-минутной инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентный зонд на внутриклеточные АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат ($H_2DCF-DA$) (Sigma, США) до конечной концентрации 0.01 мг/мл. Пробы продолжали инкубировать в течение 30 мин при 37°C в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителя. Затем клетки отмывали, центрифугируя при 600 g в течение 5 мин при комнатной температуре в растворе Хенкса. Далее к осадку добавляли 1 мл среды, ресуспендировали и регистрировали спектры флуоресценции образцов на приборе Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США), при возбуждении на длине волны 488 нм.

Следует отметить, что нами был применен метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученного проникающего в

клетки флуоресцентного зонда на АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата [7–10]. $H_2DCF-DA$ проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму H_2DCF . H_2DCF – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин.

Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента. Часть результатов представлена в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции при длине волны 528 нм в опытах к значению в контроле, принятому за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при величине остаточного поля 0.01 мкТл) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 2, 3). При увеличении постоянного МП до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного МП сохраняется (рис. 2). При дальнейшем увеличении поля до 2.5 мкТл эффект действия поля исчезает и снова проявляется при 5 мкТл в редуцированном виде, достигая максимума при 7 мкТл (рис. 2). Любопытно, что при последовательном увеличении индукции МП на следующих трех значениях величины постоянного МП (9.0, 15.0, 19.5 мкТл) отмечается столь же выраженный и устойчивый ингибирующий эффект, степень вы-

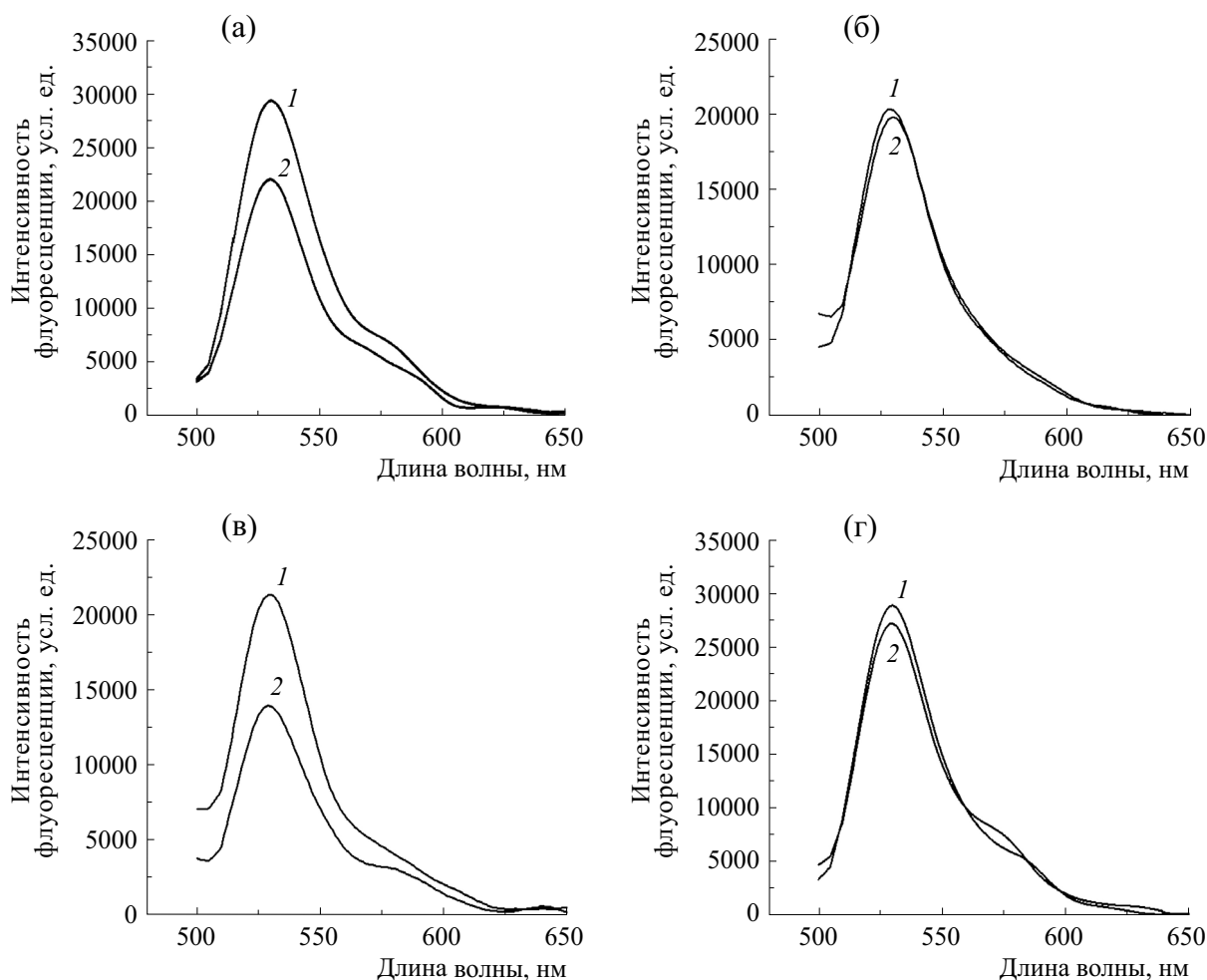


Рис. 3. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) после действия некоторых величин постоянного магнитного поля: (а) – 0.01 мкТл, (б) – 2.5 мкТл, (в) – 7.0 мкТл, (г) – 100 мкТл.

раженности которого значительно снижается только при 30 мкТл. В этой связи важно отметить, что величина постоянного поля 30 мкТл приблизительно соответствует нижнему уровню диапазона ГМП (34–68 мкТл). Далее, при величине постоянного МП 45 мкТл, соответствующей локальному значению ГМП в зоне, где были расположены контрольные образцы в наших опытах, значения интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина не отличаются от контрольных образцов (рис. 2). При дальнейшем увеличении поля до величин 74 мкТл и 100 мкТл, уже выходящих за верхний уровень диапазона ГМП, не отмечено действия поля на эти процессы. В этом случае показатели флуоресценции продукта окисления $H_2DCF-DA$ – дихлорфлуоресцеина – уже не отличаются от контрольных (рис. 2).

При анализе результатов важно отметить, что форма спектров и положение максимума интенсивности использованного флуоресценции зонда в «нулевом» магнитном поле, в ослабленном и в усиленном постоянном МП (по отношению к ГМП) не изменялись относительно этих параметров в контроле (рис. 3).

Нам представляется информативной обнаруженная зависимость интенсивности флуоресценции продуктов окисления $H_2DCF-DA$ в нейтрофилах от величины постоянного магнитного поля в изученном диапазоне его индукции (0.01–100 мкТл), которая свидетельствует о высокой чувствительности этих процессов к изменению магнитных условий. Выявленная анизотропия ответа биологической системы на такое воздействие может дать конкретную информацию для анализа физических механизмов неспецифиче-

ской магниторецепции. В настоящий момент набирает популярность модель неспецифической (не связанной с определенными рецепторами) магниторецепции [11], основанная на анализе прецессии магнитных моментов и молекулярных вращений в слабом МП, в которой для реалистичных оценок полученные нами данные могли бы быть полезны. Также нельзя исключить из рассмотрения ион-резонансные механизмы действия слабого поля [12]. В этом случае можно предположить, что при различных величинах постоянного магнитного поля система генерации внутренних электрических процессов в клетке или в межклеточной среде будет попадать или нет в резонансные условия [13, 14], что могло бы отразиться на интенсивности процессов внутриклеточного окисления.

С практической точки зрения крайне важным представляется результат отсутствия биологического действия слабого постоянного МП при величине 2.5 мкТл, в то время как при меньших (1 мкТл) и при больших (7 мкТл) значениях поля суспензия нейтрофилов реагирует на воздействие. Это тем более интересно, что ранее на другой экспериментальной модели — делении планарий *Dugesia tigrina* — был получен аналогичный результат (отсутствие действия) при близкой величине постоянного МП — 3 мкТл [15, 16]. Крайне любопытно то, что процессы окисления H_2DCF в нейтрофилах оказались чувствительны к действию слабого постоянного магнитного поля в широком диапазоне его величин, от 0.01 мкТл вплоть до практически нижней границы ГМП — 30 мкТл (исключая одно значение — 2.5 мкТл). Эти данные, наряду с ранее полученными о том, что слабые комбинированные магнитные поля — постоянное магнитное поле (60 мкТл) и коллинеарное ему переменное низкочастотное магнитное поле на частоте 49.5 Гц (близкой к промышленной частоте 50 Гц) при амплитудах в диапазоне 60–180 нТл — вызывают, при превентивном 40-минутном воздействии, значительное снижение интенсивности респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов в ответ на активатор — пептид N-формил-Met-Leu-Phe [17], а также последними данными о сильном влиянии имитаций геомагнитных бурь на биологические объекты [18, 19], указывают на высокую чувствительность биологических процессов к вариациям слабых магнитных полей. Следует отметить, что возможность выявления этих реакций появилась только в последнее время благодаря использованию специальной экранирующей и цифровой техники.

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. H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., *Prot. Cell* **8** (7), 527 (2017).
2. C. F. Martino and P. R. Castello, *PLoS One* **6** (8), e22753 (2011).
3. P. Policanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., *Bioelectromagnetics* **34**, 333 (2013).
4. V. N. Binhi and F. S. Prato, *PLoS One* **12** (6), e0179340 (2017).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (3), 484 (2018).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (4), 720 (2019).
7. J. P. Crow, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1** (2), 145 (1997).
8. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1–2), 146 (1999).
9. G. Bartosz, *Clin. Chim. Acta* **368**, 53 (2006).
10. M. Freitas, J. L. Lima, and E. Fernandes, *Anal. Chim. Acta* **649**, 8 (2009).
11. V. N. Binhi and F. S. Prato, *Sci. Rep.* **8**, 13495 (2018).
12. A. R. Liboff, *Electromagn. Biol. Med.* **38** (2), 143 (2019).
13. В. В. Новиков и М. Н. Жадин, *Биофизика* **39** (1), 45 (1994).
14. M. N. Zhadin, V. V. Novikov, F. S. Barnes, and N. F. Pergola, *Bioelectromagnetics* **19**, 41 (1998).
15. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **52** (5), 912 (2007).
16. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29**, 387 (2008).
17. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (1), 97 (2020).
18. И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, Ю. В. Чеботарева и др., *Вопросы ихтиологии* **55** (4), 476 (2019).
19. А. В. Романовский, Д. С. Песня, Е. И. Извеков и др., *Биофизика* **59** (6), 1151 (2014).

**The Effect of Weak Static Magnetic Field Ranging from 0.01 μ T
(a “Zero” Magnetic Field Level) to 100 μ T on the Production
of Reactive Oxygen Species in Nonactivated Neutrophils**

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko

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

It was shown that after 40-min exposition of peritoneal neutrophils to a hypomagnetic field (at 0.01 μ T, residual magnetic field) the fluorescence intensity of intracellular dichlorofluorescein significantly decreased (by 25%). The effect of weak magnetic field persists while increasing static magnetic field up to 1 μ T. This effect disappears when the level of exposure increases further up to 2.5 μ T and appears again in the range of 5 μ T in a reduced form achieving a maximum effect at field amplitude of 7 μ T. The equally pronounced and inhibitory effect, the magnitude of which significantly decreases only at the amplitude of 30 μ T, is observed when the intensity of static magnetic field increases gradually (9.0, 15.0, 19.5 μ T). Then, when static magnetic field is 45 μ T in magnitude, the values of the fluorescence intensity of the products of oxidation of 2,7-dichlorodihydrofluorescein do not really differ from a control. No effects of magnetic field in the range of 74 μ T and 100 μ T on the oxidation processes were observed either.

Keywords: hypomagnetic field, geomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, fluorescence

УРАВНЕНИЕ АРРЕНИУСА В АНАЛИЗЕ МЕХАНИЗМА ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

© 2020 г. Е.М. Соколова, Н.И. Нешев

Институт проблем химической физики РАН,
142432, Черноголовка Московской области, просп. Академика Семенова, 1
E-mail: neshev@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.

После доработки 12.12.2019 г.

Принята к публикации 13.03.2020 г.

Изучено влияние температуры на кинетику гемолиза эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида и динитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами. В качестве оценки скорости гемолиза использовали величину, обратную времени достижения 50% гемолиза. Это позволило представить полученные экспериментальные данные в виде линейных графиков Аррениуса. Тангенс угла наклона для *трет*-бутилгидропероксида был выше в 2.4 раза. Это означает, что гемолиз эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида является более термочувствительным и, возможно, протекает по другому химическому механизму. Гемолизу эритроцитов под действием *трет*-бутилгидропероксида предшествовало концентрационнозависимое нарастание уровня тиобарбитурат-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов, что указывало на активацию пероксидного окисления липидов. Данный эффект не наблюдался в случае динитрозильных комплексов железа с тиосульфатными лигандами. Это подтверждает различие в механизмах гемолитического действия *трет*-бутилгидропероксида и динитрозильных комплексов железа и согласуется с результатами анализа температурных зависимостей скорости гемолиза по Аррениусу.

Ключевые слова: эритроциты, химический гемолиз, уравнение Аррениуса.

DOI: 10.31857/S0006302920030126

Как известно, в основе многих сложных явлений в биологических системах лежат химические реакции. В связи с этим теоретическое описание зависимости скорости химической реакции от температуры, предложенное в конце XIX века Аррениусом, стало использоваться в биофизике для анализа сложных процессов в биосистемах [1].

Образование в мембране эритроцита разрыва или разрывов, достаточных по размеру для выхода в окружающий раствор гемоглобина, называют гемолизом эритроцита. Причиной гемолиза может быть физическое, химическое или биогенное воздействие на клетку. Предметом данного исследования является химический гемолиз, который мы рассматриваем как макроскопическое следствие химических и биохимических процессов, которые запускаются внешним химическим фактором.

Целью данной работы было исследовать влияние температуры на скорость гемолиза в рамках формализма Аррениуса и оценить возможности

данного подхода для анализа механизма гемолиза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эритроцитарной массы. В качестве источника крови были использованы мыши линии C 57 Bl/6f (возраст 3 месяца, масса 18–20 г), полученные из питомника ИПХФ РАН. Забор крови проводили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор цитрата натрия, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1 : 5.

Кровь центрифугировали в течение 7 мин при 1500 g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0,85% NaCl, 5 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Центрифугирование повторяли трехкратно. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную

Сокращения: ТБК – тиобарбитуровая кислота, *t*-BuOОН – *трет*-бутилгидропероксид, ТНКЖ – динитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами.

массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили в холодильнике при 4°C не более 36 ч.

Гемолиз эритроцитов. В гемолитических экспериментах использовали 0,2% (по объему) суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl. Эксперимент проводили при 37°C при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 700 нм. Указанная длина волны лежит за пределами основной области электронного поглощения гемоглобина, в связи с чем ослабление светового потока практически полностью связано с рассеянием света на эритроцитах. Высокий уровень разбавления суспензии позволяет радикально уменьшить влияние эффекта многократного внутреннего отражения света на эритроцитах. Это позволяет получать зависимость степени гемолиза от оптической плотности суспензии в удовлетворительном линейном приближении [2, 3]. Степень гемолиза суспензии определяли из

соотношения: $\gamma = \frac{D_0 - D}{D_0 - D_{H_2O}}$, где D_0 и D — оптические

плотности контрольного и опытного образца соответственно, D_{H_2O} — оптическая плотность образца в условиях полного лизиса всех эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плотность контрольного образца (D_0) составляла ~ 0,8, что соответствовало содержанию клеток ~ 0,2% по объему. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана. В качестве количественной характеристики активности эффектора гемолиза использовали время достижения 50%-й степени гемолиза $t(\gamma_{50})$, которое определяли графически (рис. 1).

Анализ продуктов перекисного окисления липидов. Пероксидное окисление липидов мембран эритроцитов характеризовали по уровню образования ТБК-реактивных продуктов (продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) по методу, описанному в работе [4] с модификациями. К 2 мл суспензии эритроцитов добавляли 1 мл 30%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Затем центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Отбирали по 2 мл супернатанта и переносили в стеклянные пробирки объемом 20 мл. В каждую пробирку добавляли по 0,5 мл раствора 0,8% ТБК в 0,05 М NaOH. Пробирки инкубировали 30 мин на кипящей водяной бане. После инкубации образцы охлаждали проточной водопроводной водой и определяли оптическое поглощение при длине волны 532 нм.

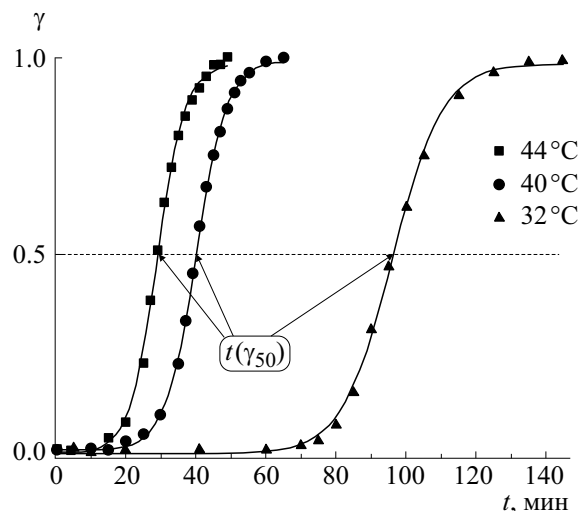


Рис. 1. Кинетика гемолиза эритроцитов под действием t -BuOOH. Содержание эритроцитов — 0,2 об. %; $[t\text{-BuOOH}]_0 = 10^{-4}$ М.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве гемолитических агентов использовали известный инициатор пероксидного окисления липидов мембран *трет*-бутилгидропероксид (t -BuOOH) и биядерный динитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами (ТНКЖ), синтезированный в ИПХФ РАН [5]. На рис. 1 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием t -BuOOH, полученные при трех различных температурах. Проведение эксперимента при температурах ниже 32°C оказалось невозможным из-за резкого увеличения периода индукции гемолиза до предела гемолитической устойчивости контрольного образца. Стрелками показано графическое определение величины $t(\gamma_{50})$, которой мы характеризовали гемолитическую активность эффектора гемолиза. На рис. 2 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием ТНКЖ. В этом случае влияние температуры на кинетику гемолиза было менее выраженным, и эксперимент удалось провести в более широком диапазоне температур.

Для построения графиков Аррениуса было необходимо оценить скорость гемолиза. Используемая нами характеристика $t(\gamma_{50})$ — это время в минутах от смешивания реагентов до достижения 50%-го гемолиза. Важно отметить, что этот промежуток времени включает, не только видимый процесс гемолиза, но и предшествующий ему период индукции. Таким образом, данная характеристика может служить оценкой длительности протекания химических процессов внутри клетки, приводящих к гемолизу. Соответственно обратная ей величина, $1/t(\gamma_{50})$, будет служить

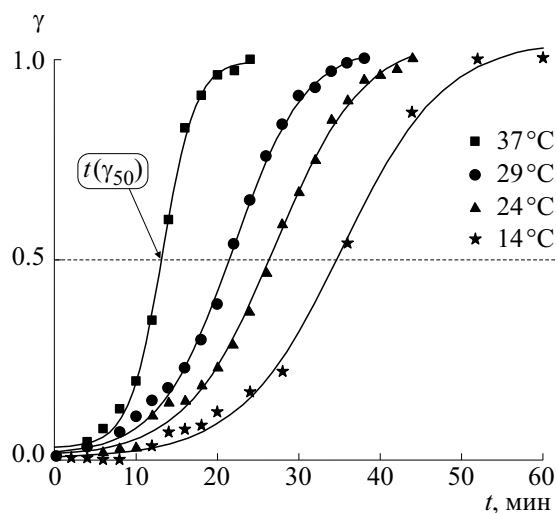


Рис. 2. Кинетика гемолиза эритроцитов под действием ТНКЖ. Содержание эритроцитов — 0.2 об. %; $[ТНКЖ]_0 = 10^{-4}$ М.

оценкой скорости этих процессов и может быть использована для построения графиков Аррениуса. На рис. 3 показаны графики Аррениуса для *t*-BuOOH и ТНКЖ, построенные на основе данных, представленных на рис. 1 и 2. Как видно из рис. 3, логарифмы характеристик $1/t(\gamma_{50})$ для каждой из гемолитических кривых для *t*-BuOOH и ТНКЖ линейно зависели от обратной абсолютной температуры. Тот факт, что данные гемолитических экспериментов удается представить в указанных координатах, свидетельствует о том, что гемолиз эритроцитов в обоих случаях имеет химическую природу. При этом величина $1/t(\gamma_{50})$ адекватно характеризует скорость предгемолитического процесса в каждом случае.

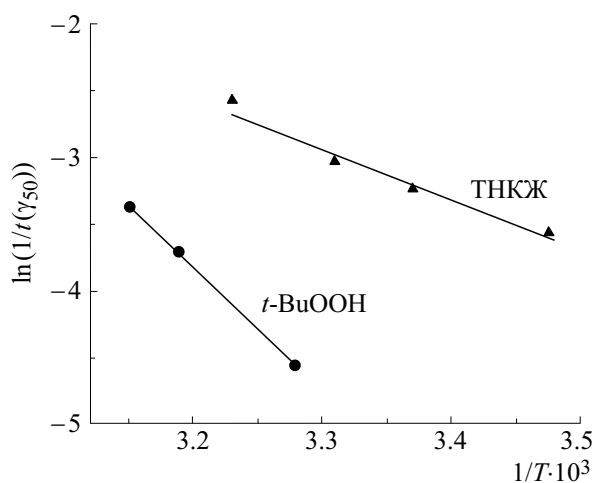


Рис. 3. Взаимосвязь между скоростью гемолиза и обратной абсолютной температурой.

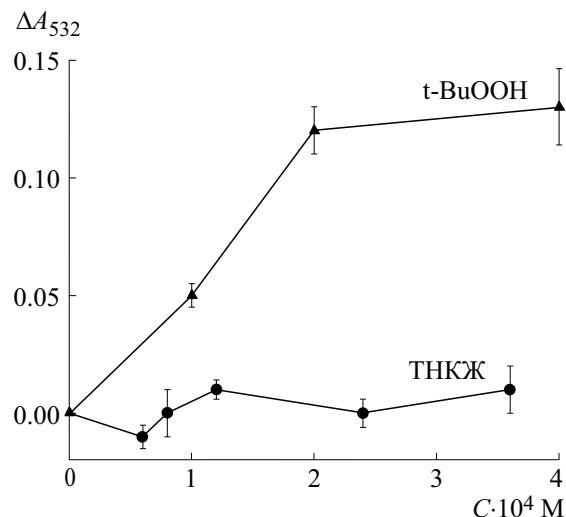


Рис. 4. Образование ТБК-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов под действием *t*-BuOOH и ТНКЖ. Содержание эритроцитов — 1.6 об. %; время инкубации — 20 мин; $t = 37^\circ\text{C}$.

Как известно, тангенс угла наклона графика Аррениуса характеризует величину энергии активации изучаемой химической реакции. В нашем случае эту характеристику можно с определенной степенью условности назвать энергией активации гемолиза. При этом тангенс угла наклона для *t*-BuOOH в 2.4 раза выше, чем для ТНКЖ (рис. 3). Это означает, что гемолиз эритроцитов под действием *t*-BuOOH является более термочувствительным и, вероятно, протекает по другому химическому механизму.

Общеизвестным маркером пероксидного окисления в мембране считается образование ТБК-реактивных продуктов, главным из которых является малоновый диальдегид. Анализ образования ТБК-реактивных продуктов в мембранах эритроцитов под действием *t*-BuOOH и ТНКЖ (рис. 4) показал характерное для *t*-BuOOH концентрационнозависимое нарастание уровня ТБК-реактивных продуктов. Это согласуется с известными литературными данными, согласно которым в основе гемолиза, инициируемого *t*-BuOOH, лежит процесс пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны, приводящий к нарушению ее барьерных свойств [6, 7]. В то же время, как видно из рис. 4, в случае ТНКЖ образование ТБК-реактивных продуктов в мембране эритроцита не обнаружено. Это подтверждает различие в механизмах гемолитического действия *t*-BuOOH и ТНКЖ, что согласуется с предположением, высказанным выше на основе анализа механизмов гемолиза по Аррениусу.

Исследования показали, что источником гемолитической активности сера-нитрозильных комплексов железа, к классу которых относится

ТНКЖ, является выделяемый ими в среду оксид азота, а непосредственным химическим индуктором гемолиза выступает продукт биохимической трансформации оксида азота — пероксинитрит [8]. Предполагается, что гемолитическое действие данной группы доноров NO реализуется через известный для пероксинитрита механизм окисления сульфгидрильных групп в белках [9]. Среди потенциальных внутриклеточных мишеней пероксинитрита в эритроците обращает на себя внимание сульфгидрильная группа цистеина в активном центре Na^+/K^+ -АТФазы, окислительная модификация которой под действием пероксинитрита, приводящая к ингибированию фермента, была ранее продемонстрирована *in vitro* [10]. Последнее может приводить к нарушению коллоидно-осмотического равновесия в эритроците и, следовательно, к гемолизу. Как известно, процессы, связанные с работой ферментов характеризуются низкими энергиями активации в сравнении с обычными химическими реакциями, что согласуется с данными настоящей работы.

Таким образом, полученные результаты показывают эффективность предложенного нами подхода к анализу механизма химического гемолиза эритроцитов на основе анализа температурных зависимостей с использованием уравнения Аррениуса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания (Регистрационный № 0089-2019-0014).

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. Л. А. Блюмфельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1977).
2. J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, and Z. A. Gohn, *Anal. Biochem.* **154** (2), 649 (1986).
3. A. Ilani and R. Granoth, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1027** (2), 199 (1990).
4. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.* **20** (1), 95 (1971).
5. Н. А. Санина, О. А. Ракова, С. М. Алдошин и др., *Координац. химия* **27** (3), 198 (2001).
6. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys. Acta* **899** (1), 113 (1987).
7. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys. Acta* **854** (2), 169 (1986).
8. Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Е. М. Соколова и др., *Изв. РАН. Сер. хим., № 12*, 2160 (2010).
9. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.* **266**, 4244 (1991).
10. P. Muriel, G. Castaneda, M. Ortega, and F. Noel, *J. Appl. Toxicol.* **23** (4), 275 (2003).

Arrhenius Equation in Analysis of the Mechanism of Erythrocyte Hemolysis

E.M. Sokolova and N.I. Neshev

*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

The effect of temperature on the kinetics of erythrocyte hemolysis induced by *tert*-butyl hydroperoxide and dinitrosyl iron complex with thiosulfate ligands was studied. The inverse of the time needed to achieve 50% hemolysis was used as an estimate of the rate of hemolysis. This has afforded us an opportunity to present the obtained experimental data in the form of linear graphs of Arrhenius. The slope for *tert*-butyl hydroperoxide was 2.4 times higher. This means that erythrocyte hemolysis induced by *tert*-butyl hydroperoxide is more thermosensitive and, probably, proceeds through a different chemical mechanism. The hemolysis of red blood cells induced by *tert*-butyl hydroperoxide was preceded by a concentration-dependent increase in the level of thiobarbiturates-reactive products in the erythrocyte membranes, indicating the activation of lipid peroxidation. This effect was not observed in the case of dinitrosyl iron complexes with thiosulfate ligands. This confirms the difference in the mechanisms of hemolytic action of *tert*-butyl hydroperoxide and dinitrosyl iron complexes and is consistent with the results of the analysis of the temperature dependences of the rate of hemolysis according to the Arrhenius equation.

Keywords: erythrocytes, chemical hemolysis, Arrhenius equation

МЕТГЕМОГЛОБИН, АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ (*in vitro*)

© 2020 г. А.А. Солдатов*, **, А.Ю. Андреева*, ***, Т.А. Кухарева*, Т.И. Андреев*, **

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН,
299011, Севастополь, просп. Нахимова, 2

E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

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

***Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

Поступила в редакцию 15.07.2019 г.

После доработки 15.07.2019 г.

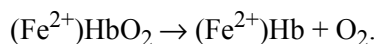
Принята к публикации 22.03.2020 г.

Изучено влияние гипоксии на ядерные эритроциты морского ерша (*Scorpaena porcus*) в условиях *in vitro*. Глубокая гипоксия (концентрация кислорода менее 1 мг О₂ л⁻¹, норма — 7–8 мг О₂ л⁻¹) приводит к переходу части гемоглобина в ферри-форму (метгемоглобин). Максимальное увеличение концентрации метгемоглобина составляет 32%. Накопление метгемоглобина в эритроцитах сопровождается повышением активности каталазы, супероксиддисмутазы и снижением содержания активных форм кислорода в цитоплазме клеток. Показано, что образование метгемоглобина не вызывает повреждений цитоплазматических мембран эритроцитов. Процент лизиса клеток красной крови в дезоксигенированных суспензиях (менее 1,0 мг О₂ л⁻¹) количественно совпадает с контрольными величинами.

Ключевые слова: гипоксия, эксперименты *in vitro*, ядерные эритроциты, метгемоглобин, каталаза, супероксиддисмутаза.

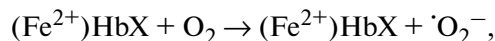
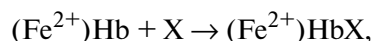
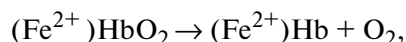
DOI: 10.31857/S0006302920030138

Эритроциты — узкоспециализированные клетки, адаптированные к транспорту газов, прежде всего кислорода. Основу их сухого остатка составляет гемоглобин (Hb). В норме процесс деоксигенации оксигемоглобина (HbO₂) сопровождается отрывом кислорода с сохранением железа в геме в двухвалентном состоянии (ферро-форма) [1]:



Однако в ряде случаев это сопровождается образованием супероксиданиона (O₂⁻) и приводит к окислению железа — гем переходит в ферри-состояние [1]. Это соединение именуется метгемоглобином (MtHb) и кислород не связывает. Чаше всего это связано с процессом автоокисления ге-

моглобина или следствием токсической нагрузки (нитрит, анилин, нитробензол и др.) [1]. Процесс автоокисления протекает медленно и в основном затрагивает дезокси-форму гемоглобина, что приводит к образованию супероксиданиона. В нем можно выделить следующие этапы [2]:

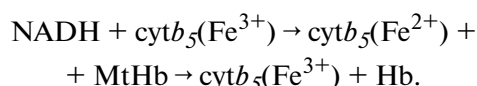


где X — нуклеофил (соединение, образующее связь с Hb по донорно-акцепторному механизму).

Окислению гемоглобина препятствует антиоксидантный молекулярный комплекс эритроцита — глутатион, аскорбиновая кислота, токоферол [3]. Однако скорость реакции MtHb с этими соединениями незначительна. Существует специфический ферментативный механизм восстановления MtHb. Ключевая роль в нем принадлежит NADH-диафоре, которая переносит элек-

Сокращения: Hb — гемоглобин, HbO₂ — оксигемоглобин, MtHb — метгемоглобин, NADH — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный), CAT — каталаза, SOD — супероксиддисмутаза, АФК — активные формы кислорода.

трон с NADH на цитохром b_5 , а затем на MtHb [4]:



Это приводит практически к 100%-му восстановлению окисленного пигмента. В норме концентрация его в крови человека не превышает 1%.

Ядерные эритроциты рыб имеют тот же, что и эритроциты высших позвоночных, антиоксидантный комплекс [5, 6]. В них выявлена NADH-диафораза [7, 8]. Активность некоторых ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) и концентрация восстановителей (глутатиона) превышает таковую у человека [9, 10]. Вместе с тем устойчивость респираторных пигментов рыб к окислению существенно ниже. Уровень MtHb в крови в норме может превышать 10% [11, 12].

Особый интерес представляют случаи спонтанного роста MtHb без видимых случаев токсической метгемоглобинемии. К ним можно отнести процессы адаптации рыб к условиям гипертермии (30–40°C) [2, 13] и гипоксии [14, 15]. В случае с гипоксией эта реакция достаточно парадоксальна, так как она наблюдается при более низком уровне окислительной нагрузки на клетки красной крови. Она отмечена не только у рыб: *Colossoma macropomum* [14], *Megalobrama amblycephala* [15], но и у высших позвоночных [16], включая человека [17]. Показано, что частично деоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению и переходит в мет-форму [18].

Гипоксия вызывает у рыб также еще ряд неоднозначных реакций: рост активности каталазы (CAT) и супероксиддисмутазы (SOD), что допускает дисмутацию O_2^- . Это отмечается на уровне различных соматических тканей, включая эритроциты крови [19–21]. Поскольку большинство гидробионтов лишь перманентно сталкиваются с условиями внешней гипоксии, предложено рассматривать факт роста активности CAT и SOD, как подготовку к последующей реоксигенации [20]. Можно также допустить наличие связи между ростом содержания MtHb в крови и увеличением активности CAT и SOD, так как повышение содержания ферри-формы в крови может сопровождаться освобождением O_2^- .

Представленная выше информация получена в основном в условиях *in situ* или экспериментов *in vivo*. Это допускает изучение не только влияния гипоксии, но и ряда других факторов, комбинацию которых иногда трудно учесть. В настоящей работе мы исследуем влияние экспериментальной гипоксии в условиях *in vitro* — на клеточных взвесах. При этом акцент делается на количественном учете уровня MtHb в крови, активности CAT и SOD в эритроцитах, а также ряде функци-

ональных характеристик клеток красной крови (проточная цитометрия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. В работе использовали взрослых особей морского ерша (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) в состоянии относительного физиологического покоя (III–IV стадия зрелости гонад): длина тела — 14–17 см, масса тела — 85–115 г. Рыбу отлавливали при помощи ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась не более трех часов. Концентрация кислорода в воде в момент отлова рыбы составляла 7–8 мг л⁻¹.

После отлова особей рассаживали в аквариумы с естественным протоком. В данных условиях рыбу выдерживали в течение одной недели для снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой. Особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В работе использовали только подвижные активно питающиеся экземпляры. Перед отбором проб крови рыб анестезировали, применяя уретан, который растворяли в воде аквариума [22]. Данное соединение оказывает мягкое действие на организм рыб, не вызывая заметных изменений дыхательной и сердечной ритмики.

Эксперименты *in vitro*. Кровь для проведения экспериментов *in vitro* получали у особей скорпены из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия). Концентрация гемоглобина в полученных образцах находилась в пределах 54–61 г · л⁻¹, а величина гематокрита изменялась в диапазоне 24–28%. Концентрацию гемоглобина определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (ООО «Агат-мед», Россия). Величину гематокрита определяли центрифугированием образцов крови (800 g, 15 мин) в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). Применяли специальные капилляры, стенки которых предварительно были обработаны гепарином.

Клетки осаждали центрифугированием (800 g, 15 мин, центрифуга СМ-50, Elmi, Латвия). Плазму и поверхностный слой клеток (фракция лейкоцитов) удаляли. Эритроциты отмывали трижды от плазмы в среде следующего состава: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM трис, 2.2 mM D-глюкозы (pH 7.8) [23].

Полученную эритроцитарную массу ресуспендировали в среде аналогичного состава, но с разной концентрацией кислорода. Исследовали диа-

пазон 0–5 мг $O_2 \times л^{-1}$. Кислород из инкубационной среды удаляли при барботаже газообразным азотом. Контроль за концентрацией кислорода осуществляли при помощи оксиметра ELWRO N 5123 (Польша). Продолжительность инкубации клеток составила 4 ч. В работе применяли вакуумные пробирки VacuetteTM объемом 6.0 мл.

После проведения экспериментов эритроциты осаждали центрифугированием (800 g, 15 мин, центрифуга СМ-50). Часть клеток использовали для проточной цитометрии. Остальные лизировали охлажденным бидистиллятом с соответствующей концентрацией кислорода. Соотношение объемов воды и эритроцитарной массы подбирали исходя из значений гематокрита. Концентрация гемоглобина в гемолизатах составляла 45–52 г $\cdot л^{-1}$. Гемолизаты использовали при спектральном анализе и определении активности СОД и КАТ.

Спектральный анализ растворов гемоглобина. Гемолизаты взвешивали в 0.35 М фосфатном буфере, pH 7.3. Спектры полученных растворов гемоглобина снимали при помощи двухлучевого спектрофотометра Lambda 35 (PerkinElmer, США). Расчет относительного содержания окси-(HbO₂), дезокси- (Hb) и мет-форм (MtHb) гемоглобина проводили по следующим уравнениям [24]:

$$[HbO_2] = (1.013 A_{576} - 0.3269 A_{630} - 0.7353 A_{560}) \cdot 10^{-4},$$

$$[Hb] = (1.373 A_{560} - 0.747 A_{576} - 0.737 A_{630}) \cdot 10^{-4},$$

$$[MtHb] = (2.985 A_{630} - 0.194 A_{576} - 0.4023 A_{560}) \cdot 10^{-4}.$$

Активности супероксиддисмутазы и каталазы. Активность SOD (КФ 1.15.1.1) определяли по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии НАДН₂ и феназин-метасульфата. Активность САТ (КФ 1.11.1.6) измеряли по реакции H₂O₂ с молибдатом аммония и образованию желтоокрашенного комплекса. Состав инкубационных сред и особенности лабораторного регламента показаны ранее в работе [25].

Проточная цитометрия. Эритроциты после эксперимента ресуспензировали в инкубационной среде следующего состава: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM трис, 2.2 mM D-глюкозы (pH 7.8) [23]. Плотность клеток составляла 10⁶ кл. $\cdot мл^{-1}$. Для оценки суммарного содержания в эритроцитах активных форм кислорода (перекисей) использовали флуорохром дихлорофлуоресцеин. Краситель растворяли в диметилсульфоксиде и хранили при –20°C. Финальная концентрация красителя в про-

бе составляла 1 мг $\cdot мл^{-1}$. Окрашивание суспензии клеток проводили в течение 30 мин в темноте.

Для анализа смертности клеток суспензию эритроцитов плотностью 10⁶ кл. $\times мл^{-1}$ окрашивали двумя красителями: SYBR Green I (максимум флуоресценции 533 нм) и йодид пропидия (максимум флуоресценции 617 нм). SYBR Green I является прижизненным ДНК-красителем, окрашивающим и живые и мертвые клетки; йодид пропидия – маркер повреждений мембран клеток. Финальная концентрация красителей в пробе составляла 10 мкг $\cdot мл^{-1}$ для SYBR Green I и 2 мкг $\cdot мл^{-1}$ для йодида пропидия. Окрашивание проводили в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре.

Анализ флуоресценции проводили на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США). Флуоресценцию дихлорофлуоресцеина и SYBR Green I регистрировали в канале FL1 (зеленая область спектра), йодида пропидия – в канале FL3 (красная область спектра). Анализ получаемых данных вели в программе Flowing software 5.1.

Статистическая обработка. Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде $M \pm SE$. Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гемоглобин. Анализ спектров поглощения гемолизатов скорпены позволил оценить функциональное состояние гемоглобина данного вида при различных кислородных режимах инкубационной среды. Понижение концентрации кислорода с 7–8 до 2–3 мг $\cdot л^{-1}$ не вызывало заметных изменений положения максимумов и величин экстинкций относительно контрольных значений (рис. 1а). При более низких концентрациях кислорода (0.2–2.0 мг $\cdot л^{-1}$) отмечали заметное увеличение значений экстинкции при 560 и 630 нм, что отражало рост содержания в растворе дезокси- и ферри-формы гемоглобина соответственно (рис. 1б).

На основании представленных выше спектров поглощения были рассчитаны величины содержания MtHb в гемолизатах (рис. 2а). Как видно, при понижении концентрации кислорода уровень данного соединения относительно контрольных значений равномерно повышался. Максимальные значения были зарегистрированы при концентрации O₂ менее 1 мг $\cdot л^{-1}$. У отдельных особей уровень ферри-формы повышался до

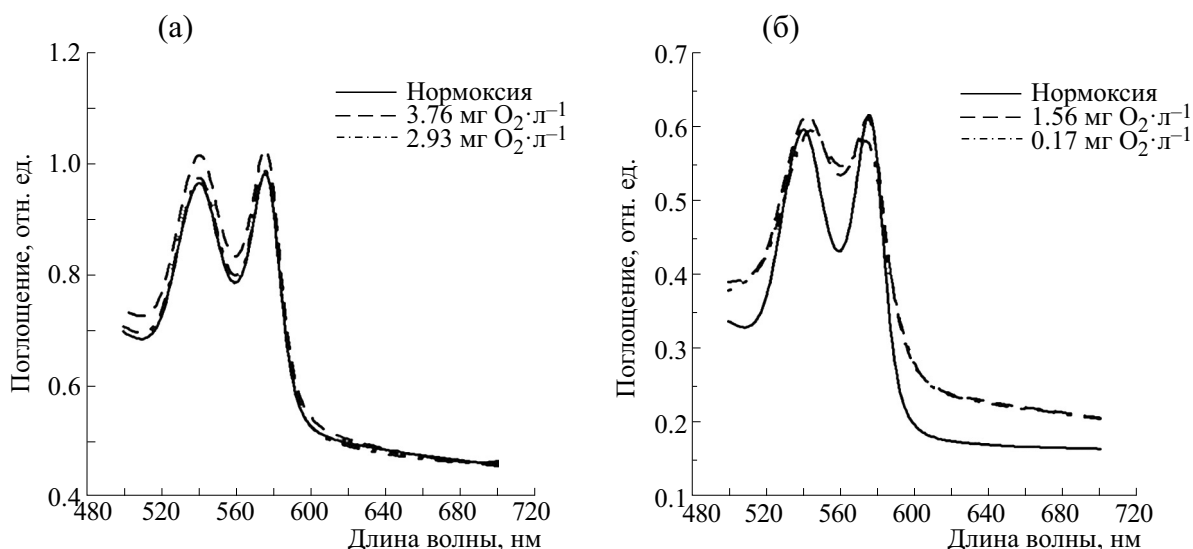


Рис. 1. Спектры поглощения гемолизатов в зависимости от содержания кислорода: (а) — нормоксия и гипоксия до $2.5 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$; (б) — нормоксия и гипоксия после $2.5 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$.

32%. Ранжирование полученных значений на три группы: более $2 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$, $1\text{--}2 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ и менее $1 \text{ мг O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$, позволило рассчитать средние величины и провести статистическое сравнение между ними (рис. 2б). Различия достигали 4–16 раз ($p < 0.01$).

Антиоксидантный ферментный комплекс. Рост содержания МtHb в условиях экстремально низких концентраций кислорода был сопряжен с увеличением активности CAT и SOD (рис. 3). Коэффициент детерминации (R^2) между активностью данных ферментов превышал 0.8 (рис. 4). Это означает, что они работали в связке, т.е. в

эритроцитах усиливалась реакция дисмутации, направленная на нейтрализацию $\cdot\text{O}_2^-$.

Достаточно высокий уровень корреляции обнаружен и между уровнем МtHb, с одной стороны, и активностью SOD и CAT — с другой (рис. 4). В первом случае значения R^2 составили 0.738, а во втором — 0.967. Это свидетельствует о том, что рост активности указанных ферментов в значительной степени был связан с продукцией $\cdot\text{O}_2^-$, который образуется при переходе гемоглобина в ферри-форму. Эффективность этого процесса можно оценить по содержанию активных форм кислорода в эритроцитах и, прежде всего, уровню

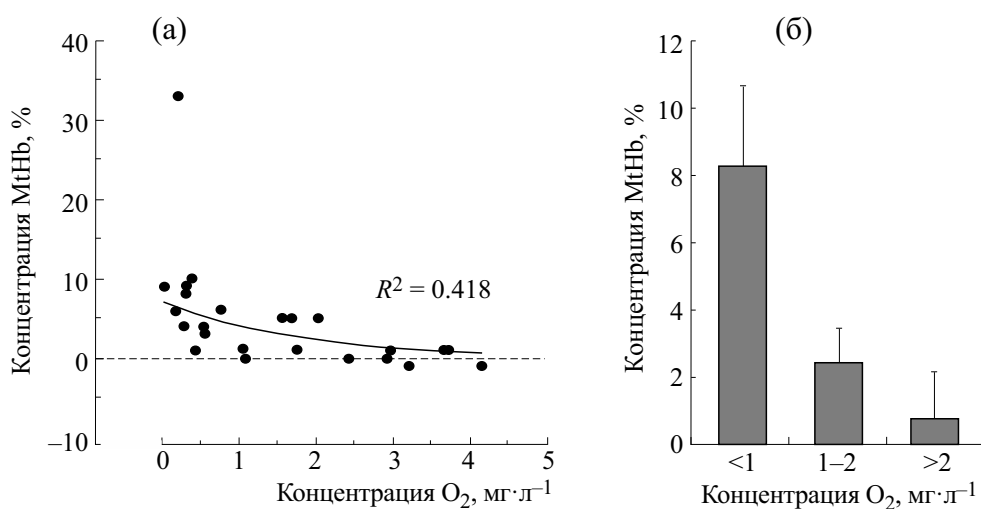


Рис. 2. Влияние гипоксии на концентрацию МtHb в гемолизатах: (а) — полигон распределения, (б) — после ранжирования.

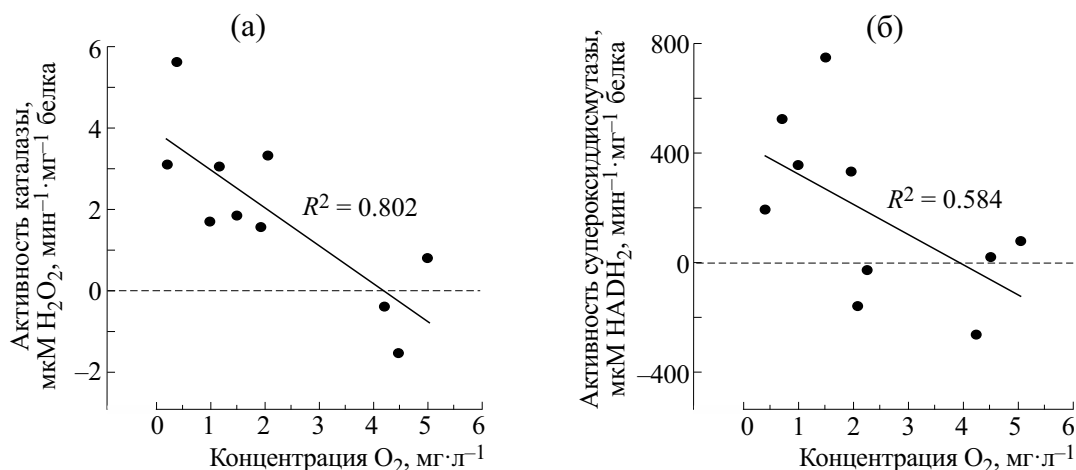


Рис. 3. Активность каталазы (а) и супероксиддисмутазы (б) в ядерных эритроцитах в условиях гипоксии.

гидроперекиси в клетках. Для этих целей мы применяли дихлорофлуоресцеин. Из рис. 5 следует, что снижение концентрации кислорода в инкубационной среде не сопровождалось ростом H_2O_2 , напротив, уровень данного соединения существенно понижался.

Эритроциты. Оценка состояния эритроцитов во взвешях проводили путем подсчета соотношения живых и мертвых клеток. Для этих целей применяли двойное окрашивание суспензии флуорохромами SYBR Green I и йодидом пропидия. Первый является прижизненным маркером ДНК окрашивающим и живые и мертвые клетки, а второй только имеющие повреждение мембран. Результаты представлены на рис. 6. Как видно, гипоксия не вызывала заметного снижения числа живых клеток в суспензии. В условиях нормоксии их доля составляла $94.0 \pm 5.7\%$, а при

гипоксии (менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) — $88.6 \pm 4.5\%$. Различия не были статистически выражены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из представленных выше результатов следует обратить внимание на следующие моменты:

- при концентрациях кислорода в инкубационной среде менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ значительно повышалась доля MtHb, что коррелировало с ростом активности SOD и CAT и не сопровождалось увеличением уровня активных форм кислорода в эритроцитах;

- при экстремальных формах гипоксии сохранялась целостность цитоплазматических мембран эритроцитов; соотношение живых и мертвых клеток в суспензии оставалось на уровне контрольных значений (нормоксия).

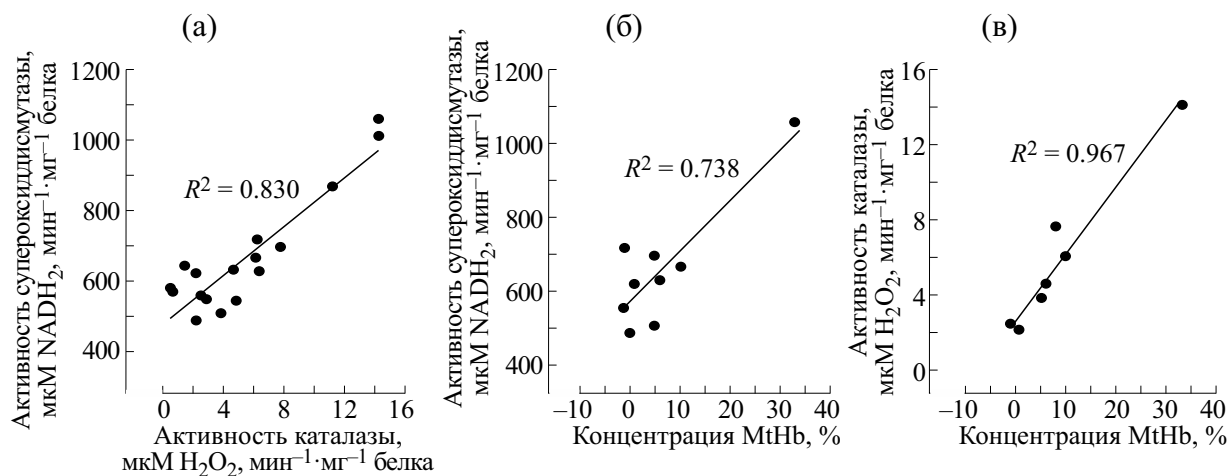


Рис. 4. Корреляционные отношения для систем «SOD↔CAT» (а), «SOD↔MetHb» (б) и «CAT↔MetHb» (в).

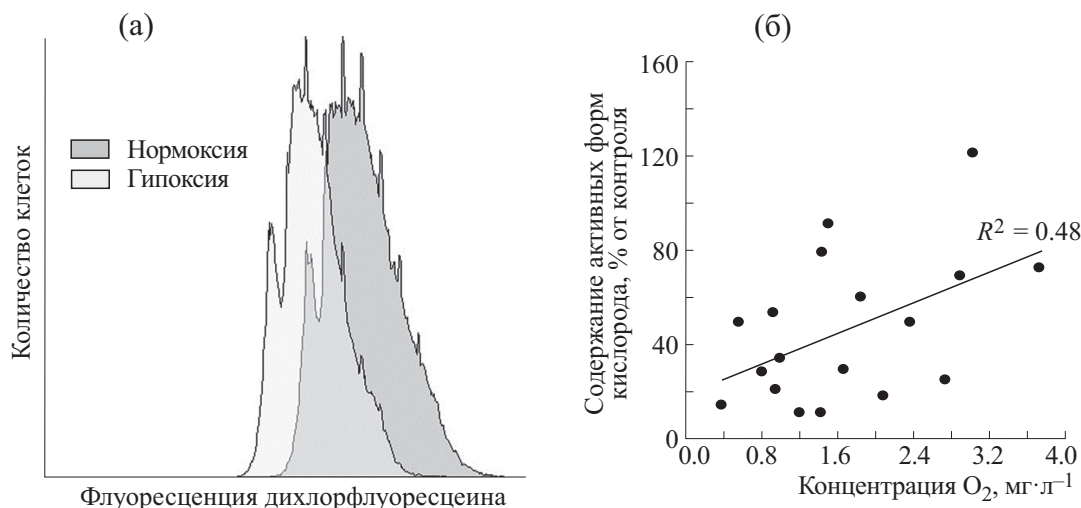


Рис. 5. Содержание активных форм кислорода в эритроцитах в условиях нормоксии и гипоксии по уровню гидроперекисей (дихлорфлуоресцеина) в клетках: (а) — данные проточной цитометрии, (б) — полигон распределения.

Метгемоглобин. Случаи перехода гемоглобина в мет-форму в условиях гипоксии отмечены во многих работах, выполненных на низших и высших позвоночных [14–17]. Реакция достаточно парадоксальна, так как наблюдается при низком уровне окислительной нагрузки. При этом отмечается, что деоксигенированный гемоглобин легче подвергается окислению [2, 18]. Это обусловлено тем, что в дезокс-форме гемоглобина феррион находится в высокоспиновом состоянии (4 неспаренных электрона). Присоединение кислорода переводит железо в низкоспиновое состояние, в котором все электроны спарены. Отсюда

следует, что любые изменения, влекущие за собой снижение низкоспинового состояния Fe^{2+} в HbO_2 -комплексе, могут стать причиной отрыва электрона от железа и приводить к его окислению. Роль акцептора электрона при этом может выполнять молекула кислорода, что приводит к образованию $\text{O}_2^{\cdot-}$. В условиях гипоксии доля дезокси-формы повышается, что должно усиливать процессы автоокисления гемоглобина. При этом в венозной крови достаточно свободного кислорода, способного принять электроны от Fe^{2+} , так как диффузия его в ткани ограничивается ввиду

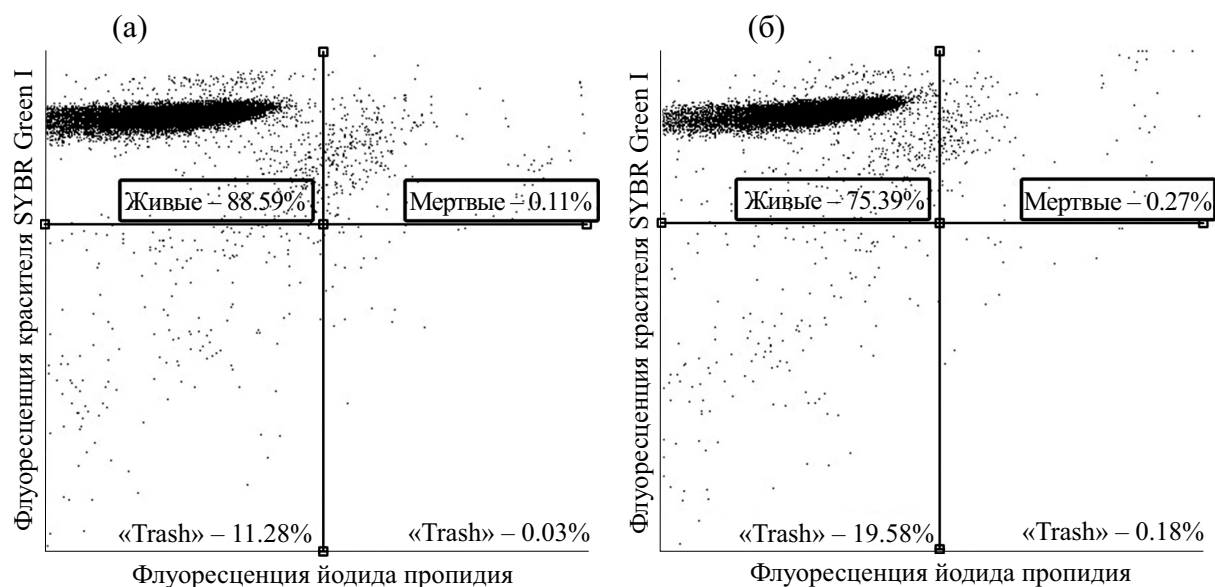


Рис. 6. Пример анализа на соотношение живых и мертвых клеток в суспензиях эритроцитов: (а) — в условиях нормоксии (7.22 мг O₂·л⁻¹), (б) — в условиях гипоксии (0.43 мг O₂·л⁻¹).

низких концентрационных градиентов в системе «кровь → ткани».

Не следует исключать из внимания и тот факт, что в условиях нормоксии в ядерных эритроцитах рыб активно протекают аэробные процессы. Об этом свидетельствует наличие в них митохондрий [26, 27]. При дефиците же кислорода в клетках красной крови должна повышаться роль реакций гликолиза, которые могут иметь два следствия: снижение величины внутриклеточной pH и возникновение дефицита NADH. Это должно сопровождаться снижением активности NADH-диафоразы, которая выполняет роль специфического переносчика электрона с NADH на цитохром b_5 , а затем на MtHb [4]. Действительно, при гипоксии наблюдается существенное закисление внутриклеточной среды эритроцита [28]. Это должно ограничивать активность NADH-диафоразы и способствовать переходу гемоглобина в окисленное состояние. Показано также, что значительное снижение pH ускоряет процесс аутоокисления гемоглобина [29, 30].

Следует также рассмотреть вероятность утечки электронов с дыхательных комплексов митохондрий эритроцитов в условиях гипоксии. Это может объясняться относительно невысоким сродством цитохромоксидазы (комплекс IV) к кислороду. При этом на предыдущих звеньях дыхательной цепи электроны замедляют свой бег, и их «утечка» на кислород усиливается, что должно сопровождаться ростом содержания $\cdot\text{O}_2^-$ в клетке. Однако данный процесс не сопровождается переходом гемоглобина в мет-форму.

Переходу гемоглобина в окисленное состояние может способствовать также еще один достаточно масштабный процесс, который развивается в эритроцитах при адаптации рыб к условиям гипоксии — свеллинг клеток красной крови. Он описан во многих работах [2, 31–33]. Считается, что данная реакция направлена на коррекцию внутриклеточного pH и определяется работой Na^+/H^+ -антипорта [34]. Она контролируется адреналином и норадреналином и реализуется через β -адренорецепторы клеток и cAMP [35–37]. Следует отметить, что свеллинг эритроцитов рыб наблюдался и в изолированных взвешках клеток [38]. Допускается, что данная реакция связана со значительным снижением pH цитоплазмы и, как следствие, ростом сродства внутренней стороны мембраны клеток к H^+ , что активирует Na^+/H^+ -антипорт.

Работа Na^+/H^+ -антипорта в условиях гипоксии предполагает вход в клетку Na^+ . Это должно обеспечить оводнение цитоплазмы и рост ее диэлектрической проницаемости. Последнее облегчает проникновение воды в гидрофобную полость белков и гемоглобина в частности [39]. Вода

встраивается на уровне имидазольной группы гистидина, вызывая окисление как окси-, так и дезокси-форм пигмента, что должно сопровождаться освобождением $\cdot\text{O}_2^-$. Учитывая масштабность данного процесса, можно допустить, что он является основным в образовании мет-формы и $\cdot\text{O}_2^-$ при экстремальных формах гипоксии.

Вместе с тем необходимо отметить, что не во всех работах отмечается рост содержания метгемоглобина в крови при гипоксии [40, 41]. Это, вероятно, связано с тем, что в них исследуются умеренные формы гипоксии (более $2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). В нашем случае эти концентрации кислорода также не оказывали заметного влияния на функциональное состояние гемоглобина.

Антиоксидантный ферментный комплекс. В работе исследуются SOD и CAT в эритроцитах. Соотношение их активности зависит от характера окислительной нагрузки. Возможны три варианта:

- увеличение активности CAT без роста активности SOD. Такое состояние отражает существенный рост содержания в клетке гидроперекисей;

- рост активности SOD без увеличения активности CAT. В этом случае можно говорить о прооксидантном эффекте, связанным с продукцией $\cdot\text{O}_2^-$;

- одновременный рост активности CAT и SOD отражает процесс дисмутации $\cdot\text{O}_2^-$.

В нашем случае следует рассматривать третий вариант. Активность обоих ферментов повышалась и достигала максимальных значений при концентрациях кислорода в инкубационной среде менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Величина R^2 для системы «SOD ↔ CAT» превышала 0.8. Одновременно обнаружена значимая связь между активностью SOD и CAT, с одной стороны, и содержанием мет-формы гемоглобина, с другой стороны (R^2 более 0.7). Это означает, что в эритроцитах морского ерша в условиях гипоксии реализуется реакция дисмутации супероксида, продукция которого с высокой долей вероятности определяется переходом гемоглобина в ферри-форму.

Об эффективности перехвата супероксида в реакциях дисмутации можно судить по состоянию эритроцитов. В условиях гипоксии уровень активных форм кислорода (гидроперекисей) в клетках красной крови не повышался. Интенсивность флуоресценции дихлорофлуоресцеина, напротив, была ниже контрольных значений. Данные по флуоресценции SYBR Green I и йодида пропидия не позволяют говорить о росте фракции мертвых клеток в суспензии эритроцитов. Это означает, что SOD и CAT полностью нейтра-

лизовали образующийся $\cdot\text{O}_2^-$, то есть контролируемая нами реакция находилась в пределах физиологической нормы.

Следует отметить, что рассмотренный выше порядок процессов имеет определенные функциональные следствия. Он позволяет проводить процесс деоксигенации венозной крови, которая содержит 40–60% связанного кислорода. Процесс не требует снижения тканевого P_{O_2} , что особенно актуально в условиях гипоксии. В наших экспериментах рост содержания метгемоглобина наблюдался при концентрации кислорода в инкубационной среде менее $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Этот процесс становился еще более выраженным в концентрационном диапазоне O_2 0–1 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$, что соответствовало венозному насыщению кислорода. Отсюда следует, что переход гемоглобина в ферриформу должен способствовать процессу деоксигенации пигмента при низком напряжении кислорода, что позволяет поддерживать окислительные процессы в тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при концентрациях кислорода в среде менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ часть гемоглобина переходит ферри-форму. Максимальный прирост составляет 32%. Этот процесс не приводит к увеличению активных форм кислорода в клетке и происходит на фоне роста активности SOD и САТ. Увеличение содержания метгемоглобина в эритроцитах не влияет на целостность цитоплазматических мембран клеток. Случаи лизиса клеток красной крови в инкубационной среде при гипоксии (менее $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) количественно совпадают с контрольными величинами (нормоксия – 7–8 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00135).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. N. Schechter, *Blood* **112** (10), 3927 (2008).
2. F. B. Jensen, A. Fago, and R. E. Weber, in *Fish Physiology*, ed. by S. F. Perry and B. L. Tufts (Acad. Press, San Diego, 1998), v. 17, pp. 1–40.
3. M. S. Krishna and G. Venkataramana, *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* **51** (3), 284 (2007).
4. M. J. Percy and T. R. Lappin, *Br. J. Haematol.* **141**, 298 (2008).
5. E. Mather-Mihaich, R. T. Di-Giulio, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20** (3), 391 (1991).
6. R. V. Zikic, A. Stajn, and V. M. Petrovic, *Acta Biol. Jugosl. C* **27** (1), 45 (1991).
7. C. S. Tucker and J. R. MacMillan, *J. Appl. Aquacult.* **1** (4), 21 (1992).
8. E. J. Schoore, B. A. Simco, and K. B. Davis, *J. Aquat. Anim. Health.* **7** (4), 304 (1995).
9. J. Wdziejczak, et al., *Comp. Biochem. Physiol. B* **73** (2), 361 (1982).
10. A. L. Dafre and E. Reischl, *Comp. Biochem. Physiol. B* **116** (3), 323 (1997).
11. J. Hardig and L. B. Hoglund, *Comp. Biochem. and Physiol. A* **76** (1), 27 (1983).
12. J. Sajiki and K. Takahashi, *Eisei-Kagaku* **37** (6), 467 (1991).
13. R. R. Wilson Jr. and F. C. Knowles, *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 210 (1987).
14. E. G. Affonso, et al., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **133** (3), 375 (2002).
15. N. Chen, et al., *Frontiers Physiol.* **8** (1), 1 (2017).
16. C. P. Olander and C. E. Parr, *Experientia* **33** (12), 1656 (1978).
17. J. Arnaud, et al., *Ann. Human Biol.* **6** (6), 585 (1979).
18. A. Mansouri, *Experientia* **37**, 95 (1981).
19. W. G. Willmore and K. B. Storey, *Mol. Cell. Biochem.* **170**, 177 (1997).
20. V. I. Lushchak and T. V. Bagnyukova, *Comp. Biochem. Physiol. B* **144**, 283 (2006).
21. A. Stara, J. Machova, and J. Velisek, *Neuro. Endocrinol. Lett.* **33** (3), 130 (2012).
22. A. A. Soldatov, *Hydrobiol. J.* **41** (1), 113 (2005).
23. K. Tiitonen, M. Nikinmaa, *J. Exp. Biol.* **161**, 509 (1991).
24. R. E. Benesch, R. Benesch, and S. Yung, *Anal. Biochem.* **55** (1), 245 (1973).
25. A. A. Soldatov, O. L. Gostyukhina, and I. V. Golovina, *J. Evol. Biochem. Physiol.* **44**, 175 (2008).
26. R. G. Boutilier and R. A. Ferguson, *Can. J. Zool.* **67** (12), 2986 (1989).
27. M. C. L. Phillips, C. D. Moyes, and B. L. Tufts, *J. Exp. Biol.* **203** (6), 1039 (2000).
28. N. C. Adragna, M. Di Fulvio, and P. K. Lauf, *J. Membrane Biol.* **201** (3), 109. (2004).
29. W. J. Wallace, et al., *J. Biol. Chem.* Vol. **257**, 4966 (1982).
30. M. F. Perutz, *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 1 (1990).
31. A. Soivio, K. Nyholm, and K. Westman, *J. Fish Biol.* **6** (6), 763 (1974).

32. M. Nikinmaa, et al., J. Exp. Biol. **47** (1), 53 (1987).
33. K. Holk, Fish Physiol. Biochem. **15** (5), 371 (1996).
34. B. Tufts, Can. J. Zool. **70** (3), 411 (1992).
35. R. A. Ferguson and R. G. Boutilier, Respir. Physiol. **74** (6), 65 (1988).
36. A. Salama and M. Nikinmaa, Raporttisar. Mat. — Luonnontieteellinen. Tiedekunnan / Joensuun Gliopisto. **30**, 13 (1991).
37. A. L. Val, G. C. De Menezes, and C. M. Wood, J. Fish Biol. **52** (1), 83 (1997).
38. A. Y. Andreyeva, A. A. Soldatov, and V. S. Mukhanov, In Vitro Cell. Developm. Biology — Animal. **53** (4), 312 (2017).
39. A. White, et al., *Principles of biochemistry* (McGRAW-Hill, 1978), v. 3.
40. J. N. Cameron, Comp. Biochem. Physiol. A **40** (3), 743 (1971).
41. A. A. Soldatov and I. A. Parfenova, J. Evol. Biochem. Physiol. **37** (6), 622 (2001).

Methemoglobin, Catalase-Like and Superoxide Dismutase-Like Activity in Erythrocytes of *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) under Experimental Hypoxia Conditions (in vitro)

A.A. Soldatov*, **, A.Y. Andreeva*, *, T.A. Kukhareva*, and T.I. Andreyenko*, ****

**Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299011 Russia*

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

****Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

The influence of hypoxia on black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) red blood cells has been studied. In deep hypoxia (oxygen concentration less than $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, oxygen level in normal range is $7\text{--}8 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) oxygen transport is impaired and the iron moiety of unoxygenated hemoglobin is in the ferric state (methemoglobin). Maximum methemoglobin level is 32%. The accumulation of methemoglobin in red blood cells is accompanied with an increase in catalase-like and superoxide dismutase-like activity and the reduction of reactive oxygen species in the cytoplasm. It has been shown that the formation of methemoglobin within red cells is not associated with damage to the cytoplasmic membrane of red blood cells. The percentage of lysis of red blood cells in deoxygenated suspensions (less than $1.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) quantitatively coincides with control values.

Keywords: hypoxia, in vitro experiments, red blood cells, methemoglobin, catalase, superoxide dismutase

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК И БЕЛКА p53 ОГРАНИЧИВАЮТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЮЛЛЕРА В СЕТЧАТКЕ МЫШЕЙ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ

© 2020 г. В.А. Тронов*, Е.И. Некрасова**

*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

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

E-mail: vtronov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.11.2019 г.

После доработки 17.11.2019 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Известно, что системная инъекция крысам метилнитрозомочевина вызывает гибель фоторецепторов в сетчатке и последующую дифференцировку клеток глии Мюллера в фоторецептор-подобные клетки. Однако пролиферативная способность клеток глии Мюллера у крыс очень ограничена и сопровождается экспрессией гистона γ H2AX и белка p21, которые, как известно, являются компонентами клеточного ответа на повреждение ДНК («DNA damage response»). Это ограничение препятствует заместительной терапии сетчатки с помощью клеточной трансплантации. С другой стороны, механизм наблюдаемого ограничения пролиферации клеток глии Мюллера в сетчатке млекопитающих пока не известен. Мы исследовали пролиферативный ответ клеток Мюллера, поврежденность ДНК в них в пострепликативный период, а также экспрессию белка p53 в ответ на ретинотоксическое воздействие метилнитрозомочевина. Показали, что метилнитрозомочевина вызывает дегенерацию сетчатки у мышей, которая выражалась в апоптотической гибели фоторецепторов. При этом остальные клеточные слои сетчатки сохраняли интактную морфологию. Тем не менее во всех клетках сетчатки через 5 ч после инъекции метилнитрозомочевина наблюдалось формирование разрывов и щелочлабильных сайтов в ДНК, которые практически полностью удалялись спустя 15 ч после инъекции метилнитрозомочевина. Однако к 72 ч в клетках глии Мюллера наблюдали достоверное увеличение разрывов ДНК. Отсутствие в последующее время включения бромдезоксисуридина в клетки сетчатки говорит об отсутствии пролиферации клеток глии Мюллера и репаративного синтеза ДНК. Вместе с тем в сетчатке наблюдалось увеличение экспрессии белка p53 — универсального маркера повреждений в ДНК. Полученные результаты подтверждают концепцию «DNA damage response» в отношении клеток глии Мюллера, которая связывает повреждения ДНК в клетках глии Мюллера с ограниченной пролиферацией этих клеток у мышей. Пострепликативная репарация рассматривается как вероятный механизм формирования разрывов ДНК в пострепликативных клетках глии Мюллера.

Ключевые слова: сетчатка, клетки Мюллера, фоторецепторы, апоптоз, разрывы ДНК, репарация ДНК, p53, метилнитрозомочевина.

DOI: 10.31857/S000630292003014X

К нейродегенеративным заболеваниям сетчатки относятся пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация сетчатки, глаукома и диабетическая ретинопатия. В основе этих заболеваний лежит необратимая утрата ретинальных клеток. Одна из стратегий терапии этих заболеваний базируется на стимуляции эндогенных стволовых клеток в глии, способных восполнять патологическую утрату клеток сетчатки [1]. Глия в сетчатке состоит на 90% из глиальных клеток

Мюллера (ГКМ), которые в ответ на повреждение сетчатки подвергаются глиозу, включающему в себя дедифференцировку, пролиферацию и в конечном счете дифференцировку ГКМ в ретинальные фоторецепторы и нейроны [2]. Процесс регенерации сетчатки присутствует в некоторых видах позвоночных (рыбы, амфибии, птицы).

Важнейшими источниками повреждения сетчатки являются наследственная предрасположенность к дегенерации из-за мутаций в специфических генах, естественная агрессивность окружающей среды (оксигенация, световое и радиационное воздействия, химическая токсич-

Сокращения: ГКМ — глиальные клетки Мюллера, BrdU — бромдезоксисуридин, МНМ — метилнитрозомочевина, PBS — натрий-фосфатный буфер.

ность), радиационная и химиотерапия при онкологических заболеваниях. В последнее время обращается внимание на окуло- и ретинотоксичность химиотерапии опухолей, поскольку большинство применяемых при этом препаратов обнаруживают ретинотоксичность *in vitro*, а используемые в химиотерапии интерферон и алкилирующие соединения проявляют ретинотоксическое действие в экспериментах на животных [3, 4]. В частности, метилнитрозомочевина широко используется в животных моделях для исследования дегенерации и восстановления сетчатки [5].

Хотя во многих работах наблюдали глиоз клеток Мюллера в сетчатке грызунов, существует устойчивое представление о том, что у млекопитающих регенеративная способность сетчатки крайне ограничена: только небольшая часть потомства делящихся ГKM у млекопитающих выживает, сохраняет способность к делению и дифференцировке [6]; основная же часть ГKM дифференцируется в фибробласты и формирует глиальный шрам [7, 8]. С одной стороны, это ограничение препятствует заместительной терапии сетчатки с помощью клеточной трансплантации. С другой стороны, механизм наблюдаемого ограничения пролиферации ГKM в сетчатке пока не известен. Таким образом, понимание молекулярных событий в ГKM после повреждения сетчатки может наметить путь к усилению регенеративной способности сетчатки у млекопитающих. В данной работе предпринята попытка определить повреждение ДНК в ГKM сетчатки у мышей в связи с возможной причастностью этих повреждений к ограничению пролиферации ГKM и регенерации сетчатки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и инъекции метилнитрозомочевины и бромдезоксисуридина. Исследования проводили на половозрелых мышах-гибридах F1CBAx57Bl6 (♀), в возрасте 2.5 мес. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха $60 \pm 10\%$ и 12-часовой световой период), имели неограниченный доступ к воде и коммерческому питанию. Методический подход для исследования глиальных клеток Мюллера у мышей базировался на модели, в которой острая дегенерация сетчатки у мышей индуцируется системной (однократной, внутрибрюшинной) инъекцией ретинотоксического агента [6]. В ответ на дегенерацию сетчатки активируется пролиферация ГKM, которую фиксировали по включению в ядра ГKM пролиферативного маркера бромдезоксисуридина (BrdU, Sigma, США). В качестве ретинотоксического агента использовали метилнитрозомочевину (МНМ, Sigma), которую хранили в кристаллическом виде при -60°C . МНМ растворяли в стерильном на-

трий-фосфатном буфере (PBS) непосредственно перед опытом в концентрации $\sim 0.1\text{ M}$ и вводили мышам однократно внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 0.4 мл. Контрольным животным вводили равный объем PBS. Спустя сутки после инъекции МНМ животным три-шесть раз внутрибрюшинно вводили BrdU в виде раствора в стерильном PBS (10 мг/мл), доза 60–70 мг/кг на инъекцию. Ретинотоксический эффект оценивали спустя 72–110 ч после инъекции препаратов.

Получение суспензии клеток сетчатки. Спустя 5 ч после последней BrdU-инъекции животных усыпляли в парах хлороформа и извлекали глаза и сетчатку. Сетчатку диспергировали в объеме 0.2–0.4 мл PBS, дважды центрифугировали по 5 мин при 400 g. Конечный осадок суспендировали в фетальной сыворотке быка, содержащей 10% диметилсульфоксида. Аликвоты суспензии хранили при -70°C .

Метод ДНК-комет: иммобилизация клеток в агарозе, лизис, электрофорез и визуализация клеток. Размороженную суспензию клеток центрифугировали (400 g, 5 мин). Осадок суспендировали в растворе легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma, США) в PBS. Из суспензии готовили слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет [9]. Лизис в щелочи, электрофорез, последующие нейтрализацию и фиксацию проводили согласно процедуре, детально описанной нами ранее [10]. Проллиферирующие ГKM проявляли с помощью первичных анти-BrdU антител (10 мкг в 60 мкл PBS/слайд; Abcam, США) и вторичных антител (1 мкг/100 мкл/слайд), ассоциированных с Alexa 594 (Abcam, США). Фоновое окрашивание, проявляющее все ДНК-содержащие клетки в слайде проводили красителем SYBR-Green I. ГKM визуализировали в режиме красной флуоресценции Alexa 594. Клетки/кометы визуализировали в режиме зеленой флуоресценции красителя SYBR-Green I. Сканирование слайда проводили на микроскопе AxioImager Z2m (Carl Zeiss, Германия), снабженном камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Сканировали весь слайд ($18 \times 18\text{ мм}$) или его репрезентативную часть с шагом 350 мкм, соответствующим размеру прямоугольника, вписанного в круглое поле зрения микроскопа при увеличении 400 $\times$. Сканирование осуществляли попеременно в синей и в зеленой области возбуждения флуоресценции. Первое сканирование давало изображение клеток (комет), флуоресцирующих в области зеленой флуоресценции SYBRGreen I (все клетки сетчатки, содержащие ДНК). Второе сканирование давало изображение только BrdU-позитивных красных клеток/комет. Изображения накапливали в памяти компьютера. Подсчет числа клеток проводили с помощью программы ImageJ 1.48v. Повреждение ДНК определяли из анализа ДНК-комет с помощью программы CASP 1.2.2 и оцени-

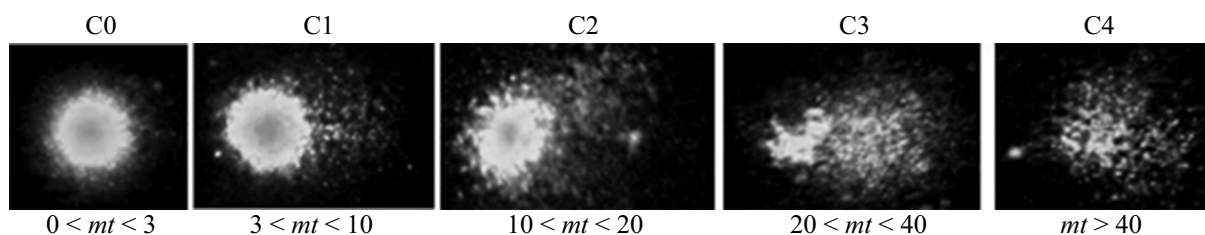


Рис. 1. Классы ДНК-комет, получаемых из клеток сетчатки мышей, и соответствующие им диапазоны поврежденности: C0 — отсутствие повреждений, C1 — низкий уровень повреждений, C2 — средний уровень повреждений, C3 — высокий уровень повреждений, C4 — апоптотическая клетка.

вали по моменту хвоста комет (mt) [11]. Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений mt (рис. 1). Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова—Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$.

Приготовление тканевых срезов. Тканевые срезы сетчатки толщиной 8–12 мкм готовили из глаз, фиксированных в параформальдегиде (4%-й раствор в PBS, 8°C, 24 ч), сразу после извлечения. Последующие процедуры спиртовой отмывки, впаивание в парафиновые блоки и приготовление срезов были стандартные и описаны нами ранее [12]. Срезы на предметном стекле окрашивали красителем SYBR Green I и анализировали микроскопически во флуоресцентном режиме. Для морфометрического измерения слоев сетчатки использовали окулярную линейку.

Оценка апоптоза в ткани методом TUNEL. Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали набор The TACS[®] 2 TdT Fluorescein kit (Ser. Nu. 4812-30-K, Trevigen, США) [13] и рекомендованную методику к нему. Визуализацию проводили на микроскопе ЛОМО МИКМЕД-2 (АО «ЛОМО», Россия) в флуоресцентном режиме, с набором фильтров для регистрации флуоресценции красителя FITC.

Детекция апоптотической фрагментации ДНК. Для детекции апоптотической фрагментации ДНК использовали суспензию клеток после стандартной процедуры экстракции из них ДНК и ее электрофоретического разделения в агарозном геле [14]. Электрофорез в 1,5%-м агарозном геле проводили при напряжении 2В/см под визуальным контролем формирования лесенки нуклеосом в геле.

Иммуногистохимия. Иммуногистохимическое исследование тканевых срезов после их депарафинизации, фиксации и пермеабиллизации проводили в соответствии со стандартным протоколом к набору The TACS[®] 2 TdT Fluorescein kit (Trevigen, США) [13]. Для этого использовали мо-

ноклональные антитела к белку p53 (Abcam, США) и к BrdU (Abcam, США). Все вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентными красителями Alexa594 или FITC. Слайды подвергали флуоресцентной микроскопии. Количественно оценивали либо число флуоресцирующих клеток на единичную площадь среза, либо суммарную интенсивность флуоресценции единичной площади среза, которую сравнивали с контролем.

Статистическая обработка результатов исследования. Все эксперименты проводили в трех независимых повторях; представлены средние значения из них $\pm sd$; сравнение экспериментальных распределений параметров осуществляли с помощью непараметрической статистики Колмогорова—Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$. Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1. (OriginLab Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилнитрозомочевина индуцирует апоптоз фоторецепторов в сетчатке у мышей. МНМ-индуцированная дегенерация сетчатки затрагивает в основном слой фоторецепторов, в то время как остальные слои сетчатки остаются интактными. Это видно из рис. 2а. Гибель фоторецепторов сопровождается межнуклеосомной деградацией хроматина (рис. 2в), что характерно для апоптотической гибели. Как следует из рис. 2б, максимум гибели приходится на 72 ч после воздействия. Последующее снижение частоты апоптоза связано с фагоцитозом поврежденных клеток в ткани.

Повреждения, индуцированные метилнитрозомочевинной, и репарация ДНК в клетках сетчатки у мышей. Известно, что МНМ является ДНК-тропным агентом, вызывающим повреждение ДНК в виде метилирования оснований, вслед за которым в клетке активируется механизм репарации. Хотя МНМ сама по себе не вызывает разрывов, образование многих метильных аддуктов и процесс их репарации протекает с образованием временных апурин-апирииминовых сайтов и

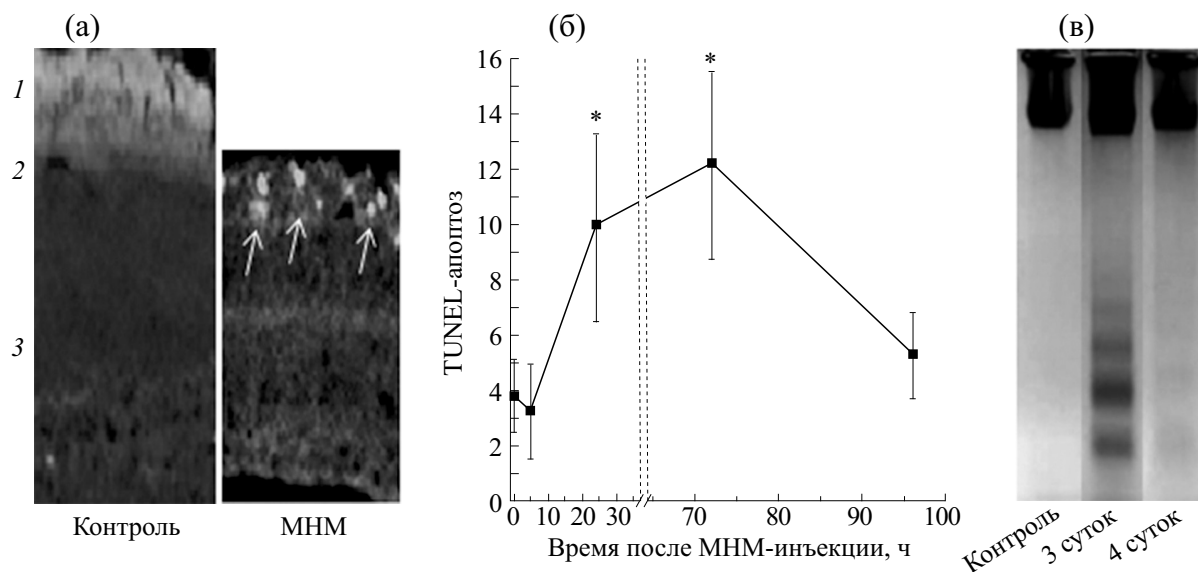


Рис. 2. Апоптоз в сетчатке у мышей, вызванный действием МНМ в дозе 60 мг/кг. (а) — TUNEL-детекция апоптоза фоторецепторов в срезах сетчатки спустя 72 ч после инъекции; 1 — слой сегментов фоторецепторов, 2 — ядерный слой фоторецепторов, 3 — внутренний ядерный слой сетчатки; стрелки на микрофотографии указывают на FITC-позитивные апоптотические клетки. (б) — Динамика числа апоптотических FITC-фокусов в фоторецепторном слое сетчатки у мышей после инъекции МНМ; * — $p < 0.01$ по сравнению с контролем (0 ч). (в) — МНМ-индуцированная межнуклеосомная деградация хроматина в фоторецепторах сетчатки через трое и четверо суток спустя после инъекции.

разрывов цепей ДНК, которые детектируются методом щелочных комет. Рис. 3 отражает динамику этих процессов в виде гистограмм распределения клеток по поврежденности (рис. 3а) и в ви-

де средних значений mt из этих гистограмм (рис. 3б). Из рисунков видно, что повреждения охватывают практически всю популяцию клеток в сетчатке (гистограмма на 5 ч), но к 15 ч значи-

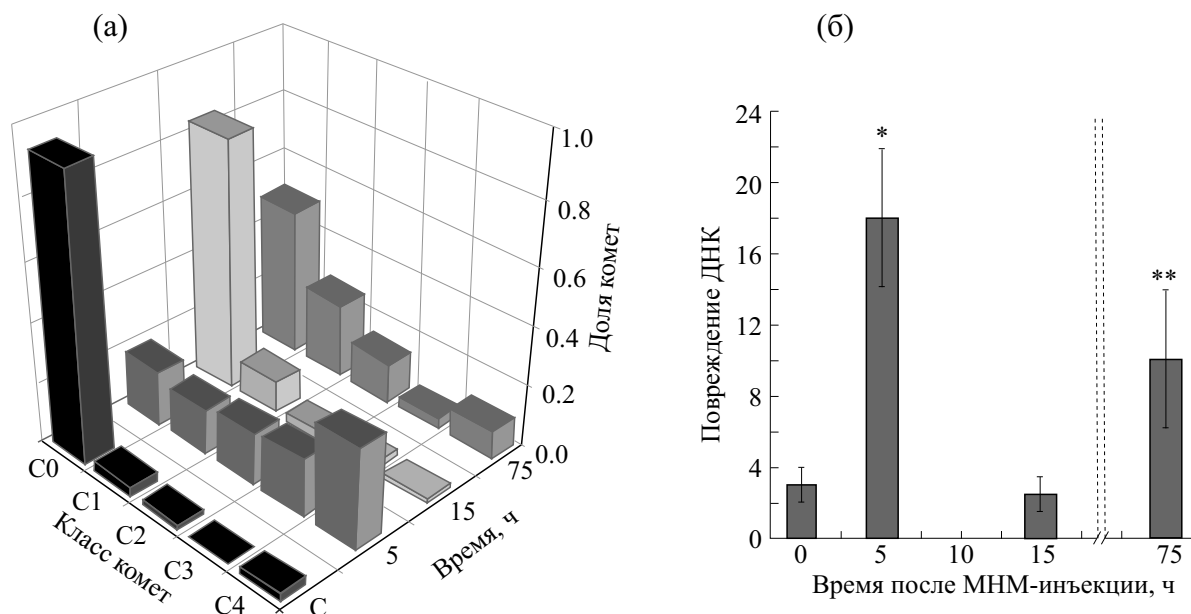


Рис. 3. Повреждение ДНК в клетках сетчатки у мышей после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг и последующей инкубации *in vivo*: (а) — гистограммы распределения клеток по повреждению ДНК в процессе инкубации; (б) — средние значения поврежденности ДНК $\pm$ sd в разное время инкубации; разница с контролем (0 ч): * — $p < 0.01$, ** — $p < 0.05$.

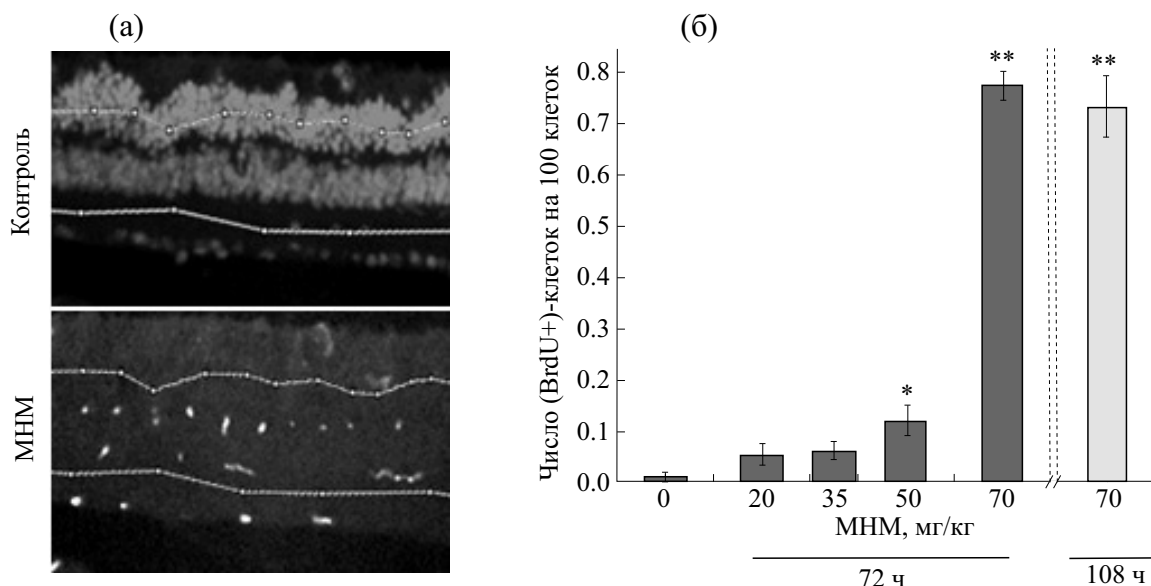


Рис. 4. Пролиферация ГKM в ответ на однократное введение мышам МНМ в различных дозах: (а) — микрофотографии срезов интактной сетчатки и спустя 72 ч после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг; (б) — число BrdU-позитивных клеток в срезах на 100 клеток в сетчатке спустя 72 ч (темные столбики) и 108 ч (светлый столбик) после инъекции МНМ. Достоверность различий с контролем: * — $p = 0.05$, ** — $p < 0.01$.

тельная часть их репарирует. Однако спустя 72 ч наблюдается вторая волна деградации ДНК, скорее всего связанная с гибелью фоторецепторов.

Пролиферация клеток Мюллера в сетчатке в ответ на действие метилнитрозомочевины. Радиальное расположение глии Мюллера в сетчатке обеспечивает контакт ГKM со всеми слоями сетчатки, что позволяет им реагировать на любой вид и локализацию повреждений. В ответ на инъекцию МНМ наблюдается активация пролиферации ГKM в сетчатке, которую мы регистрировали по включению в ДНК пролиферативного маркера BrdU. На микрофотографиях срезов сетчатки (рис. 4а) представлены BrdU-позитивные ядра клеток глии Мюллера, которые располагаются в основном в наружном и внутреннем ядерном слоях сетчатки. МНМ активирует не только пролиферацию, но и миграцию ядер клеток в направлении к фоторецепторам. Поэтому основная масса BrdU-фокусов располагается в коридоре, ограниченном двумя линиями на рис. 4а. Результат оценки их количества в зависимости от дозы МНМ показан на рис. 4б. Оценку проводили спустя 72 и 108 ч после инъекции агента. Максимальная стимуляция пролиферации наблюдается на 72 ч и далее остается постоянной до 108 ч. Количество пролиферирующих клеток в сетчатке у мышей составляет в среднем 1% и не превышает 2% от общей клеточности сетчатки.

Повреждение ДНК в клетках Мюллера в сетчатке. Поврежденность ДНК в BrdU-позитивных

клетках глии Мюллера оценивали спустя 72 ч после системной инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг. К этому времени завершается один цикл пролиферации ГKM. Как видно из рис. 5, профили гистограмм и средние значения mt для них различаются (достоверность различия между ними $p < 0.05$). Это различие проиллюстрировано микрофотографиями комет, соответствующих средним значениям mt этих распределений. Хотя ~45% всех клеток интактной сетчатки к этому времени содержат в разной степени поврежденную ДНК (левая гистограмма), доля аналогично поврежденных ГKM после инъекции МНМ составляет 85% (правая гистограмма). С учетом щелочных условий определения повреждений ДНК в клетках этими повреждениями оказываются одно- и двухнитевые разрывы, а также апурин-апиримидиновые сайты.

Экспрессия p53 в сетчатке после воздействия метилнитрозомочевины. Известно, что универсальным маркером клеточного ответа на повреждение ДНК является белок p53. Также он принимает участие в регуляции клеточного цикла. Поэтому мы оценили его экспрессию в тканевых срезах сетчатки мышей до и после инъекции МНМ. На микросрезах сетчатки p53 проявляли с помощью моноклональных антител, конъюгированных с FITC. Измерения FITC-флуоресценции, приведенной к единичной площади микросреза, проводили с помощью программы ImageJ 1.48v. Результат представлен в виде микрофотографий типичных срезов сетчатки и рассчитан-

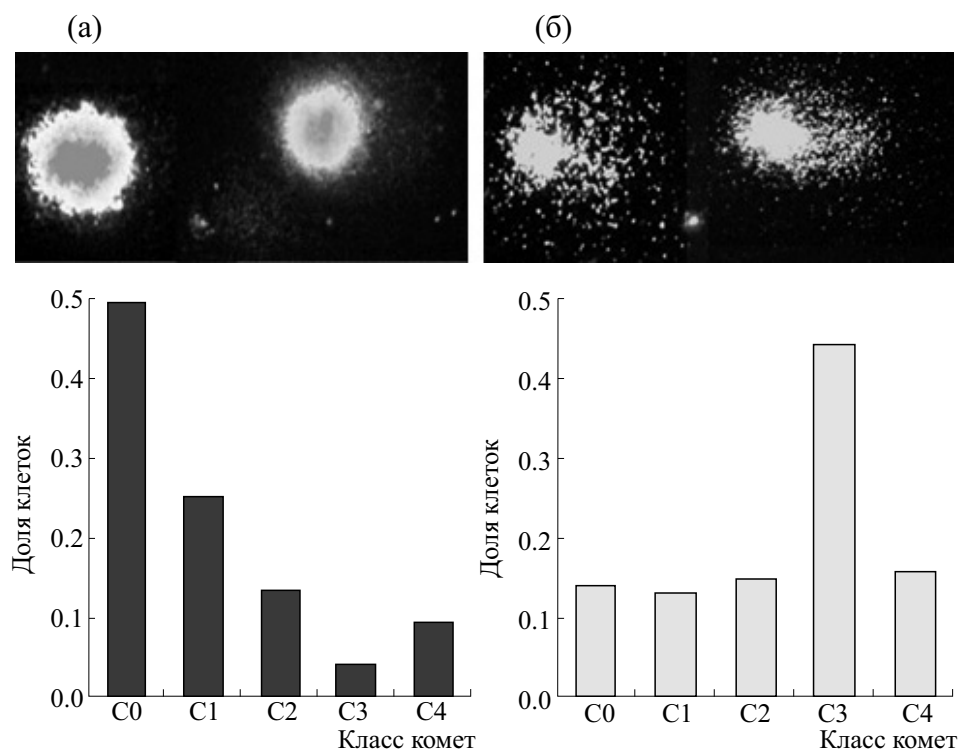


Рис. 5. Поврежденность ДНК в клетках сетчатки (а) и в клетках Мюллера (б), обработанных МНМ и после цикла пролиферации; микрофотографии представляют кометы клеток с поврежденностью, соответствующей средним показателям гистограмм для сетчатки ($mt \pm sd = 9 \pm 14$, окраска Sybr Green I) и для ГКМ ($mt \pm sd = 23 \pm 15$, окраска Alexa594). Различия гистограмм и средних значений mt достоверны, $p < 0.05$.

ной из них гистограммы на рис. 6. В интактной сетчатке обнаруживается фоновый уровень p53 в фоторецепторах и в нейронах, который резко возрастает после повреждающего воздействия МНМ в дозе 60 мг/кг, что отражает гистограмма на рис. 7.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ретинотоксичность метилнитрозомочевины.

Для исследования глиальных клеток Мюллера у мышей мы использовали экспериментальную модель, в которой острая дегенерация сетчатки у

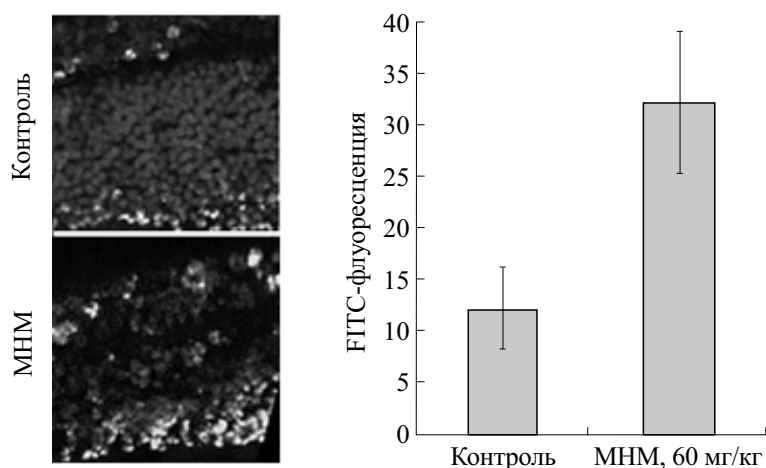


Рис. 6. Экспрессия p53 в ядерных слоях сетчатки у мышей в ответ на воздействие МНМ, 60 мг/кг, 24 ч после инъекции. На микрофотографии видны белые одиночные и скопления p53-позитивных клеток. Достоверность различия средних $\pm sd$: $p < 0.05$.

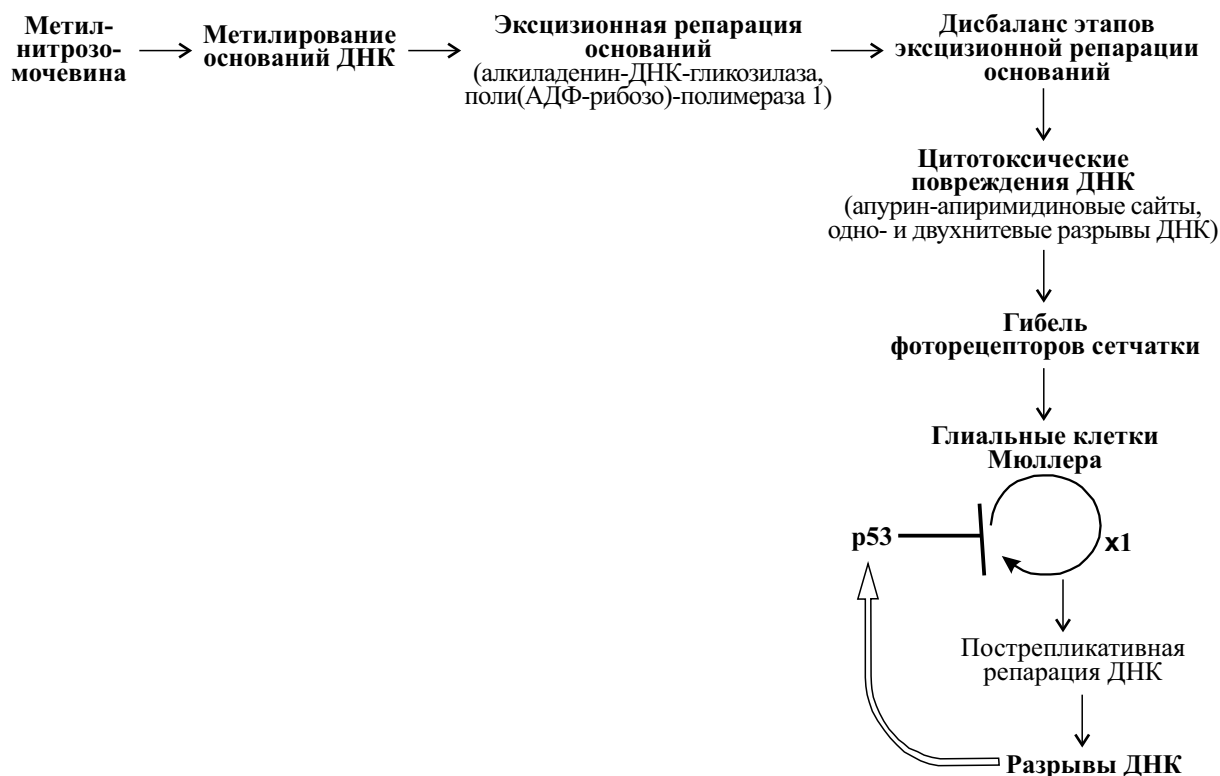


Рис. 7. Предполагаемая цепь событий при действии МНМ на сетчатку.

животных индуцируется системной инъекцией ретинотоксического агента [6]. В качестве такового была выбрана метилнитрозомочевина. МНМ индуцирует в ДНК три типа модификаций оснований — N3meA, N7meG и O6meG [15], но пока неизвестно обладают ли они ретинотоксическим действием сами по себе. В последнее время обсуждается роль репаративных механизмов в цитотоксическом эффекте МНМ [16]. Первые две модификации составляют в сумме 90% и являются субстратом для алкиладенин-ДНК-гликозилазы, фермента, инициирующего эксцизионную репарацию оснований [17]. Алкиладенин-ДНК-гликозилаза гидролизует N-гликозидную связь между алкилированным основанием и рибозофосфатным остовом ДНК, оставляя апурин-апиримидиновый сайт. Сайт является субстратом для апурин-апиримидиновой эндонуклеазы 1, которая формирует разрыв одной цепи ДНК с 3'-ОН- и 5'-dRP-концами. ДНК-полимераза β удаляет 5'-dRP-конец и на его место присоединяет один нуклеотид. Завершает процесс ДНК-лигаза I или III. Интермедиатами процесса, как видно, являются цитотоксические апурин-апиримидиновые сайты и одностранные разрывы, которые в случае несбалансированности этапов эксцизионной репарации оснований накапливаются в клетке и приводят ее к гибели. Дисбаланс этапов такой репарации неизбежен при нарастании дозы

МНМ. Дисбалансу способствует также то, что самая многочисленная модификация N7meG тормозит работу полимеразы β [18]. Как следует из наших результатов, критический уровень повреждений в сетчатке у мышей достигается при дозе МНМ ≥ 60 мг/кг. При этих дозах МНМ резко возрастает накопление разрывов ДНК в клетках сетчатки. При дозе МНМ 70 мг/кг достигается максимум апоптоза фоторецепторов (рис. 2) и пролиферации ГМК (рис. 4). Все это указывает на причастность к ретинотоксичности МНМ ферментов репарации [14].

Последняя МНМ-модификация оснований O6meG составляет 10% и репарируется деметилирующим ферментом MGMT, но, будучи нерепарированной, образует неканоническую пару с тиминном, которая в результате активности коррекционной (пострепликативной) репарации переходит в летальный двунитевой разрыв ДНК [19]. Важным посредником ретинотоксического действия МНМ может быть поли(АДФ-рибоза)-полимераза I [20]. Будучи участником репарации, эта полимеразы связывается с разрывом со стороны 5'-dRP-конца и присоединяет к ближайшему гистону разветвленный полимер поли(АДФ-рибозу), синтезируемый из АТР и NAD^+ . Это ослабляет связь гистонов с ДНК и вызывает диссоциацию или миграцию нуклеосом по ДНК, открывая доступ к повреждению для репаративного ком-

плекса [21]. Поли(АДФ-рибозной) модификации подвергаются многие ферменты и структурные белки, что делает функционирование поли(АДФ-рибозо)-полимеразы 1 в клетке в высокой степени энергозатратным, приводящим клетку к гибели [22]. Это справедливо как для пролиферирующих, так и для покоящихся клеток, в особенности для фоторецепторов сетчатки, поскольку из-за высокой оксигенации и метаболической активности эти клетки имеют крайне низкий энергетический резерв и, как видно из рис. 2, первыми подвергаются гибели при стрессе сетчатки [23,14].

Разрывы ДНК в глиальных клетках Мюллера и p53 ограничивают пролиферацию глиальных клеток Мюллера в сетчатке. Отсутствие увеличения числа BrdU-позитивных клеток в сетчатке после 72 ч (рис. 4) подтверждает вывод о блоке дальнейшей пролиферации ГМК в сетчатке у мышей, вызванном имеющимися в ДНК разрывами. Но поскольку до этого времени клетки пролиферировали, то мы полагаем, что эти разрывы проявились в пострепликативный период. Их появление можно связать с механизмом пострепликативной репарации. Субстратом для нее служат некорректные пары оснований, возникшие либо как случайные ошибки ДНК-полимеразы при синтезе на интактной матрице, либо при репликации матрицы, содержащей модифицированные основания. Принимая во внимание высокий уровень оксигенации сетчатки, можно ожидать и высокий уровень окси-модифицированных оснований в материнской цепи реплицирующейся ДНК глиальных клеток, что мы наблюдали ранее [24]. Особенностью пострепликативной репарации является то, что она оперирует только с дочерней, вновь-синтезированной цепочкой ДНК (поэтому такую репарацию часто называют пострепликативной коррекцией). Итак, возникшие в матрице и прошедшие через цикл репликации повреждения сохраняются в клетке в пострепликативный период. Но поскольку этим аддуктам в клетке отсутствуют комплементарные основания, то эксцизионная активность пострепликативной репарации на дочерней цепи ДНК становится abortивной и формирует долгоживущий или двунитевой разрыв, которые блокируют репликацию.

В ответ на возникшие повреждения ДНК в клетках глии возрастает экспрессия белка p53, который сигнализирует о снижении пролиферации. Например, глиа Мюллера в сетчатке у мышей с фенотипом (trp53+/+) обнаруживала меньшую пролиферативную активность в модели NMDA-индуцированной дегенерации сетчатки, чем глиа у нокаутных мышей с фенотипом trp53-/- [25]. В работе на модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс также наблюдали экспрессию p53 в сетчатке. Кроме того, регистрируемая пролиферация ГМК сопровождалась фосфо-

рированием гистона H2AX и экспрессией белка p21. P53 — универсальный маркер повреждений ДНК, ответственный за G1-блок цикла клетки с поврежденной ДНК; фосфорилированный гистон H2AX (γ -H2AX) — маркер двунитевых разрывов ДНК, связанных с апоптотической компактизацией хроматина, а p21 — ингибитор циклинкиназ, осуществляющих переход G1→S в клеточном цикле. Как видно, эти три белка являются компонентами клеточного ответа на повреждение ДНК (DNA damage response), который блокирует пролиферацию. С концепцией «DNA damage response» [27] в ГМК согласуется обнаруженный нами факт наличия повреждений ДНК в пострепликативных клетках Мюллера и увеличенная экспрессия p53 в сетчатке.

Таким образом, подытоживая результаты работы, на рис. 7 мы представляем предполагаемую последовательность событий в сетчатке мышей после ретинотоксического воздействия МНМ, которая завершается блоком пролиферации глиальных клеток Мюллера.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00133).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии с Положением Комитета по этике ИБХФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Jayakody, R. R. Gonzalez-Cordero Ali, and R. A. Pearson, *Prog. Retin. Eye Res.* **46**, 66 (2015).
2. D. Lamba, M. Karl, and T. Reh, *Cell Stem Cell* **2**, 538 (2008).
3. J. G. Monzon, N. Hammad, S. D. Stevens, and J. Dancey, *Oncologist* **17**, 384 (2012).
4. В. А. Тронов и Е. И. Некрасова, *Вопросы онкологии* **64**, 555 (2019).
5. A. Tsubura, K. Yoshizawa, M. Kuwata, and N. Uehara, *Histol. Histopathol.* **25**, 933 (2010).
6. M. O. Karl, S. Hayes, B. R. Nelson, et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19508 (2008).
7. G. P. Lewis, E. A. Chapin, G. Luna, et al., *Mol. Vis.* **16**, 1361 (2010).
8. K. Yoshizawa, T. Sasaki, N. Uehara, et al., *J. Toxicol. Pathol.* **25**, 27 (2012).

9. Л. А. Островская, В. А. Филов, Б. А. Ивин и др., Рос. биотерапевт. журн. **3**, 24 (2004).
10. В. А. Тронов, Е. И. Некрасова и М. А. Островский, Цитология **60**, 440 (2018).
11. К. Коффа, А. Lankoff, А. Banasik, et al., Mutat. Res. **534**, 15 (2003).
12. М. Ю. Логинова, В. А. Тронов, Т. А. Белецкая и др., Радиационная биология. Радиоэкология **48**, 698 (2008).
13. TheTACS® 2 TdTFluoresceinkit URL: https://trevigen.com/docs/protocol/protocol_4812-30-K.pdf.
14. В. А. Тронов и Е. М. Константинов, Биохимия **65**, 1516, (2000).
15. D. T. Beranek, Mutat. Res. **231**, 11 (1990).
16. D. Fu, J. A. Calvo, and L. D. Samson, Nat. Rev. Cancer **12**, 104 (2012).
17. L. B. Meira, C. A. Moroski-Erkul, S. L. Green, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 888 (2009).
18. M.-C. Koag, Y. Kou, H. Ouzon-Shubeita, and S. Lee, Nucl. Acids Res. **42**, 8755 (2014).
19. В. А. Тронов, Е. М. Константинов и И. И. Крамаренко, Биохимия **67**, 882 (2002).
20. M. Allocca, J. J. Corrigan, K. R. Fake, et al., Oncotarget **8**, 68707 (2017).
21. D. Ahel, Z. Horejsi, N. Wiechens, et al., Science **325**, 1240 (2009).
22. W. Ying, M. B. Seigny, Y. Chen, and R. A. Swanson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12227 (2001).
23. W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **42**, 1646 (2001).
24. В. А. Тронов, Ю. В. Виноградова, М. Ю. Логинова и др., Цитология **54**, 261 (2012).
25. Y. Ueki, M. O. Karl, S. Sudar, et al., Glia **60**, 1579 (2012).
26. J. Wan, H. Zheng, Z.-L. Chen, et al., Vis. Res. **48**, 223 (2008).
27. K. Nomura-Komoike, F. Saitoh, Y. Komoike, and H. Fujieda, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **57**, 1169 (2016).

DNA Damage and p53 Restrict Proliferation of Muller Cells in Mouse Retina in Response to the Influence of N-Methyl-N-Nitrosourea

V.A. Tronov* and E.I. Nekrasova**

*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

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

A systemic administration of *N*-methyl-*N*-nitrosourea in rats resulted in the death of the retinal photoreceptors followed by differentiation of retinal Müller glia cells into the photoreceptor-like cells [27]. However, the mammalian Müller glia cells display an extremely limited proliferative capacity which correlates with expression of histone H2AX and p21 protein. These proteins are known to be the components of cellular response to DNA damage [26]. The restriction of the human Muller glia cells proliferation prevents the retinal replacement therapy by cell transplantation. On the other hand, the mechanism that limits the proliferation of Müller glia in the mammalian retina is yet to be elucidated. We examined the Müller glial proliferative response, DNA damage response in Müller glia in a postreplicative stage as well as expression of p21 protein in response to the influence of retinotoxic *N*-methyl-*N*-nitrosourea. It was shown that *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced retinal degeneration in mice via apoptotic death of photoreceptors while the other retinal layers remained intact. At the same time, the formation of DNA breaks and alkali-labile sites was observed in all retinal cells 5 h after *N*-methyl-*N*-nitrosourea injection; complete disappearance of these formations occurred 15 h after *N*-methyl-*N*-nitrosourea injection. By 72 hour, there was a significant rise in DNA breaks in Müller glia. The absence of bromodeoxyuridine incorporation during subsequent time in the retinal cells indicates that there is no Müller glia cell proliferation and reparative synthesis of DNA. At the same time, an increase in the expression of p53 protein, a universal marker to determine DNA damage response was observed. Thus, our findings support the concept of “DNA damage response” with regards to Müller glia that there is a link between DNA damage in Müller glia cell and limited proliferation of these cells in mice. Postreplicative repair is considered a probable mechanism of the formation of DNA breaks in postreplicative Müller glia cells.

Keywords: retina, Muller cells, photoreceptors, apoptosis, DNA strand breaks, DNA repair, p53, methylnitrosourea

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА В ОВАРИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ГОМОГЕНАТЕ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ ЯЙЦЕКЛЕТОК РУССКОГО ОСЕТРА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ДО -196°C

© 2020 г. Е.Н. Пономарева*, А.В. Фирсова*, А.М. Тихомиров**, А. А. Андреев***

*Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

**Астраханский государственный технический университет, 414056, Астрахань, ул. Татищева, 16

***Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Пущино Московской области, Институтская, 3

E-mail: firsovaangelina1991@mail.ru

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 10.03.2020 г.

Принята к публикации 25.03.2020 г.

Проблема криоконсервации икры рыб и земноводных на сегодняшний день не решена. При глубоком замораживании яйцеклеток рыб основным повреждающим фактором является образование кристаллов льда внутри и вне клеток, а также разрастание этих кристаллов (рекристаллизация, перекристаллизация). Для предотвращения таких повреждений требуется разработка эффективных криопротекторных сред. Присутствие в криозащитной среде дополнительных компонентов, снижающих термомеханические напряжения и растрескивание замороженной среды, может увеличить выживаемость ооцитов после процедуры замораживания-оттаивания. Представляется возможным использовать в качестве таких добавок естественные компоненты икры и овариальной жидкости. Целью исследований явилось изучение процесса формирования микрочастиц льда в тонком слое (0.2 мм) овариальной жидкости и компонентов гомогената икры русского осетра при их охлаждении до температуры жидкого азота (-196°C). При постепенном понижении температуры наблюдали процесс замерзания, растрескивания льда и формирование микрочастиц. Форма и размер микрочастиц зависели от состава замораживаемого раствора. Сделано предположение что некоторые фракции гомогената икры могут быть использованы как компоненты криозащитной среды.

Ключевые слова: замораживание, растрескивание льда, микрочастицы, икра осетра.

DOI: 10.31857/S0006302920030151

Резкое сокращение популяций рыб как поверхностных континентальных вод, так и мирового океана требует принятия срочных мер для сохранения генетического материала с использованием методов криоконсервации. Технология криоконсервации спермы рыб в значительной степени отработана. Проблемой является криоконсервация ооцитов, которые сложно обратимо заморозить из-за крупного размера клеток, высокого содержания желтка и низкой проницаемости мембран для криозащитных соединений [1]. Необходим поиск новых подходов к созданию сред для консервации ооцитов. Один из таких возможных подходов — использование криозащитных сред с низким содержанием воды (например, растительного жира), чтобы уменьшить повреждения, вызываемые внеклеточными кристаллами льда.

Вода и водные растворы при замораживании в зависимости от условий охлаждения (скорости охлаждения, объемной доли воды, формы и раз-

меров объекта и т.д.) могут переходить в аморфное, полностью кристаллизованное и частично кристаллизованное состояние (т.е. образовывать аморфно-кристаллическую структуру). Зависимость температуры замерзания водного раствора от концентрации растворенных веществ определяется криоскопической константой $1.86^{\circ}\text{C}/\text{M}$ [2]. В процессе кристаллизации воды концентрация растворенных веществ в незамерзшей части раствора увеличивается. Процесс формирования кристаллов льда и увеличение концентрации раствора продолжается по мере охлаждения вплоть до тех пор, пока незамерзший раствор не достигает пороговой степени вязкости, в результате чего образуется аморфный (витрифицированный) лед [3]. Формирование льда при градуально повышающейся концентрации растворенных веществ в охлаждаемой жидкости образует неоднородную среду. Из-за разных коэффициентов температурного расширения/сжатия кристаллов льда и витрифицированных областей замороженного

раствора возникают термомеханические напряжения и растрескивание в замороженной среде [4–7].

При относительно малых напряжениях наблюдаются деформации, пропорциональные величине этих напряжений. Когда термомеханические напряжения становятся чрезмерными, возникает растрескивание замороженного материала. Формирование растрескиваний зависит от физических свойств замораживаемого материала — эластичности и жесткости [8].

Кристаллы льда в замерзшей среде характеризуются высокой жесткостью, а аморфный лед, образовавшийся из высококонцентрированных растворов, — значительной эластичностью. Увеличение эластичности материала ведет к понижению температуры, при которой начинается растрескивание и соответственно формирование микрочастиц льда [9].

Являясь крупными клетками (0.7–7.0 мм), ооциты рыб могут получать значительные повреждения как за счет внеклеточного и внутриклеточного формирования кристаллов льда [10], так и за счет растрескивания замороженной среды и формирования микрочастиц льда. Один из способов снизить повреждения при растрескивании криозащитной среды — повысить эластичность замороженного криозащитного раствора. Для этого используют добавки в криозащитную среду яичного желтка [11], липосом [12–15], водорастворимых высокомолекулярных органических соединений [14–17], растительных жиров [18]. Представляется возможным использовать в качестве таких добавок также естественные компоненты икры и овариальной жидкости рыб.

В данной работе с целью поиска перспективных криозащитных сред для консервации ооцитов нами изучены особенности заморзания овариальной жидкости и отдельных фракций гомогената икры русского осетра, а также растительного жира при охлаждении до температуры -196°C .

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили: овариальная жидкость русского осетра, три различные фракции гомогената неоплодотворенных яйцеклеток русского осетра и растительное масло «Кубаночка» (подсолнечное нерафинированное вымороженное холодного отжима, производитель ООО «Гранд-Стар», Краснодар, Россия).

Для разделения внутреннего содержимого яйцеклеток икру подсушивали на фильтровальной бумаге от овариальной жидкости, а затем растирали в ступке. Получившийся гомогенат центрифугировали в течение 40 мин на центрифуге ЦЛН-2 (Россия) при 7000 об/мин, что соответ-

ствует 4500 g. В результате оболочки икры оседали. Остальное содержимое икры распределялось на три слоя. В процессе центрифугирования молекулы со схожей массой группируются друг с другом (фракционируются): наиболее тяжелые оседают на дне и стенках сосуда; наиболее легкие собираются на поверхности. Сахара, органические кислоты и соли остаются в растворе. По нашей оценке верхний слой состоял преимущественно из содержимого жировых вакуолей, средний слой был образован цитозолем, а нижний слой — содержимым желточных вакуолей. Каждый слой изучали отдельно.

Для регистрации изменения температуры образца (термограммы), температуры заморзания и формирования микрочастиц в процессе охлаждения смонтировали установку [19], состоящую из микроскопа, пенопластового бокса, камеры Фукса–Розенталя, электронного термометра, видеокамеры (рис. 1).

Образцы (10 мкл) вносили в кварцевую камеру Фукса–Розенталя, которую помещали в пенопластовый бокс. Камеру охлаждали до -196°C сначала парами азота, а затем жидким азотом, регулируя подачу жидкого азота в бокс. Температуру измеряли с помощью электронного термометра АТТ-2004 с медь-константановой термопарой. Скорость охлаждения составила около $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Видеорегистрацию процесса заморзания осуществляли при помощи видеокамеры (Alpha A57, Sony, Япония), установленной на микроскопе «Биолам» (ЛОМО, Россия), объектив — 4×10 , окуляр — $\times 7$. Фоторегистрацию микрочастиц проводили при температуре жидкого азота.

При постепенном охлаждении образцов наблюдали изменения состояния и фиксировали температуры фазовых переходов на протяжении всего процесса. После охлаждения до температуры жидкого азота -196°C фотографировали микрочастицы, сформированные в ходе растрескивания замороженного материала (рис. 2).

Эксперименты были проведены в трех повторностях по каждому из пяти образцов. Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 12. Результаты были представлены в виде среднеарифметического $\pm$ стандартная ошибка среднего арифметического ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллизация растительного масла. При охлаждении жидкого растительного масла не наблюдали процессов образования микрочастиц вплоть до $-80 \pm 7^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$). При охлаждении до -196°C проба с растительным маслом изменилась дважды — при температуре ниже 0°C регистрировали застывание; при температуре $-80 \pm 7^{\circ}\text{C}$

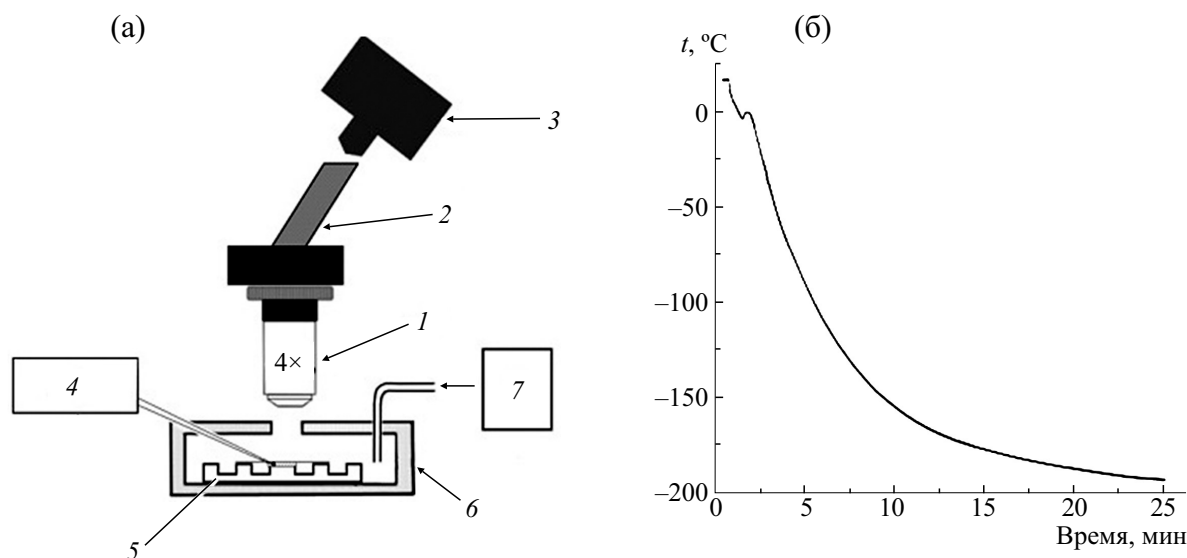


Рис. 1. (а) — Блок-схема установки для замораживания образцов: 1 — объектив микроскопа, 2 — видеоокуляр микроскопа, 3 — видеокамера Sony Alpha A57, 4 — электронный термометр, 5 — камера Фукса—Розенталя, 6 — пенопластовый бокс, 7 — регулируемая система подачи охлажденного и жидкого азота. (б) — Типичная температурная кривая процесса охлаждения образца (дистиллированной воды).

($n = 3$) — формирование микрочастиц. Микрочастицы имели продолговатую форму с округлыми краями. (рис. 2а) и не меняли своих форм и раз-

меров в процессе охлаждения до -196°C . Возможная причина формирования микрочастиц — неоднородность состава жирных кислот в расти-

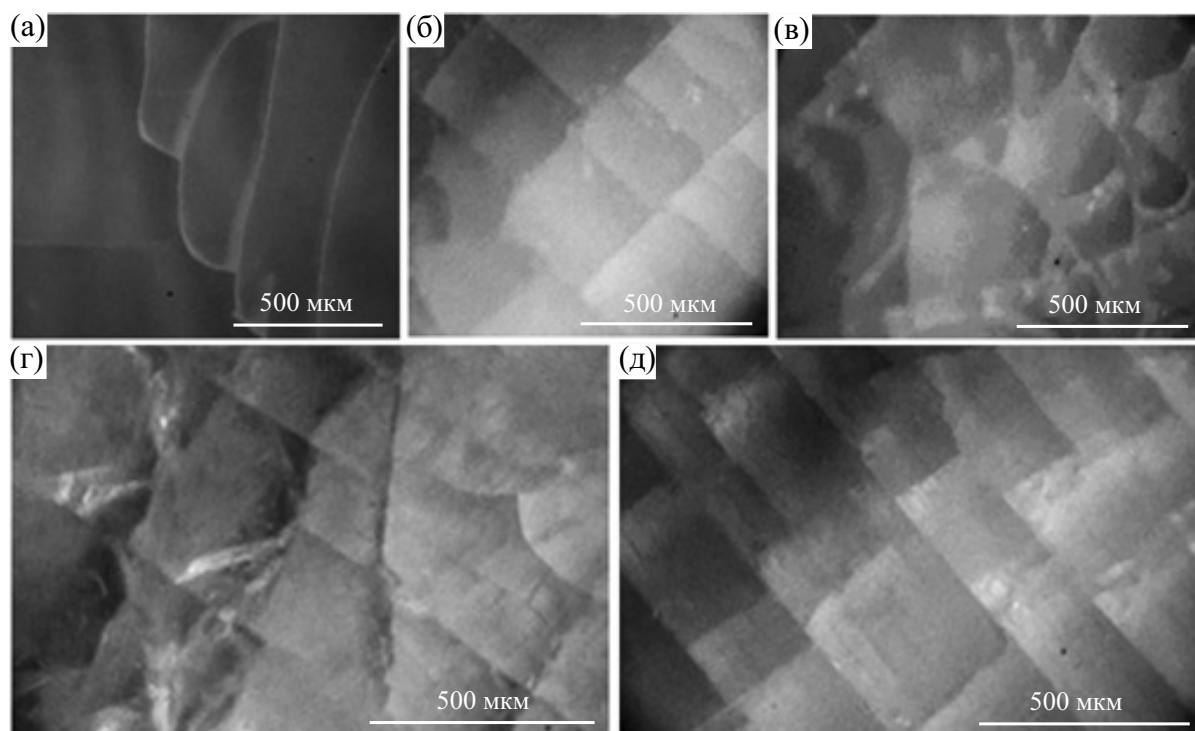


Рис. 2. Микрочастицы льда в замороженных образцах: (а) — растительный жир, (б) — средний слой отцентрифугированного гомогената икры русского осетра, (в) — верхний слой отцентрифугированного гомогената икры, (г) — овариальная жидкость самки русского осетра, (д) — нижний слой отцентрифугированного гомогената икры. Фотографии сделаны при -196°C .

тельном жире [20]. Даже небольшая разница в температурах замерзания отдельных компонентов формирует неоднородную замороженную среду, что при низких температурах приводит к образованию округлых микрочастиц.

Кристаллизация овариальной жидкости. Овариальная жидкость, имеющая вид прозрачной или полупрозрачной вязкой жидкости, по структурно-механическим свойствам является коллоидным раствором (сложным гидрозоле) белковых веществ с незначительными примесями неорганических соединений [13]. В наших экспериментах овариальная жидкость замерзала при $-5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), незначительно или совсем не отличаясь по этому параметру от очищенной воды. При температуре $-70 \pm 6^\circ\text{C}$ ($n = 3$) регистрировали начало растрескивания массива льда. Окончательно сформированные микрочастицы при -196°C имели неоднородные формы и размеры (рис. 26).

Кристаллизация трех фракций гомогената ооцитов. Замерзание пробы верхнего слоя, по нашей оценке состоящего из жировых вакуолей, регистрировали при $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Растрескивание наблюдали при температуре ниже $-105 \pm 7^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Микрочастицы, сформированные в результате растрескивания, имели различные формы, в том числе округлые, без острых краев (рис. 2в). Похожие по форме микрочастицы льда были получены при замораживании растворов криопротекторов — диметилсульфоксида, формамида, диметилформамида, этиленгликоля, глицерина [9].

Средний слой гомогената ооцитов застыл при $-5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), растрескивание и начало формирования микрочастиц регистрировали при $-70 \pm 8^\circ\text{C}$ ($n = 3$). В отличие от верхнего слоя микрочастицы льда при -196°C имели прямоугольную форму (рис. 2г).

Фазовый переход при охлаждении третьего, нижнего слоя гомогената ооцитов, регистрировали при $-2 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), растрескивание пробы — при $-65 \pm 5^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Микрочастицы льда при -196°C имели прямоугольную форму (рис. 2д).

Из всех изученных компонентов только верхний слой отцентрифугированного гомогената яйцеклеток осетра, формировал лед, обладающий повышенной эластичностью. На это указывают низкая температура начала растрескивания массива льда ($-105 \pm 7^\circ\text{C}$ ($n = 3$)) и образование округлых микрочастиц. Вероятно, эластичность замороженной среды значительно повышалась, вследствие присутствия в пробе компонентов жировых вакуолей и за счет этого увеличения доли аморфного (наиболее эластичного) льда в общем объеме замороженной среды. Подобные структуры, как ранее было показано нами, образует замороженный раствор таурина [19], одного из воз-

можных добавочных компонентов криозащитных растворов.

Второй и третий слой гомогената ооцитов в замороженном состоянии обладали сходными термомеханическими свойствами и формировали регулярную структуру из микрочастиц льда.

Овариальная жидкость, очевидно, за счет более высокого содержания воды образовывала неоднородные структуры. Наблюдаемая картина кристаллизации в целом соответствовала картине кристаллизации очищенной воды. Вероятно, белковые компоненты овариальной жидкости практически не повлияли на термомеханические свойства льда при охлаждении до сверхнизких температур.

Растительные масла (жиры) — продукты растительного происхождения, содержащие в основном триглицериды жирных кислот [20]. Растительный жир из-за низкого содержания воды не претерпевал значительных растрескиваний, при охлаждении формируя округлые микрочастицы из замороженных жирных кислот.

Основываясь на полученных данных, с точки зрения поиска новых эффективных сред для консервации ооцитов, перспективным представляется использование в качестве добавок в криозащитную среду верхнего самого легкого компонента гомогената ооцитов осетра. Данная фракция, по нашим предположениям, состоит преимущественно из содержимого жировых вакуолей икры. По своим свойствам она сходна с водными растворами, в составе которых присутствуют водорастворимые липиды или липосомы, для которых показан криозащитный эффект [14, 15]. Присутствие этой фракции в растворе снижало температуру начала растрескивания и обеспечивало морфологическую картину кристаллизации, сходную с картинками, наблюдаемыми при замораживании растворов известных криопротекторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб Южного научного центра РАН № 73602.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках реализации ГЗ ЮНЦ РАН, № государственной регистрации 01201354245 (Апробация методики криоконсервации репродуктивных клеток), и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-016-00208 (Изучение процессов образования микрочастиц льда).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Zhang and D. M. Rawson, *Cryobiology* **55**, 354, (2007),
2. А. Г. Стромберг и Д. П. Семченко, *Физическая химия* (Высш. шк., М., 1999).
3. D. E. Pegg, M. C. Wusteman, and S. Boylan, *Cryobiology* **34** (2), 183 (1997).
4. C. Kroener, B. J. Luyet, *Biodynamica* **10** (201), 47 (1966).
5. Y. Rabin and P. S. Steif, *ASME J. Appl. Mech.* **65** (2), 328 (1998).
6. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology, Abstr. Book of Int. Mechan. Engineer. Congr. and Exposition* (Nashville, TN, HTD, 1999), pp. 183–188.
7. Y. Rabin and P. S. Steif, *Int. J. Solids Struct.* **37**, 2363 (2000).
8. Y. Rabin, P. S. Steif, K. C. Hess, et al., *Cryobiology* **53** (1), 75 (2006).
9. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust and J. M. Baust (Taylor & Francis Group, 2007), pp. 359–379.
10. F. W. Kleinhans, J. F. Guenther, D. M. Roberts, and P. Mazur, *Cryobiology* **52** (1), 128 (2006).
11. L. Briand-Amirat, D. Tainturier, and M. Anton, in *Bioactive Egg Compounds*, Ed. by R. Huopalahti, R. Lypetz-Fandico, M. Anton, and R. Schade (Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg, 2007), pp. 259–264.
12. K. M. Wilhelm, J. K. Graham, and E. L. Squires, *Cryobiology* **33**, 320 (1996).
13. L. He, J. L. Bailey, and M. M. Buhr, *Biol. Reprod.* **64** (1), 69 (2001).
14. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, C. Labbe, et al., *Biofizika* **53** (4), 598 (2008).
15. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, E. N. Gakhova, et al., *Biophysics* **54** (5), 612 (2009).
16. D. A. Balentine, S. A. Wiseman, and L. C. M. Bouwens, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **37**, 693 (1997).
17. U. Rauen and H. de Groot, *Cryobiology* **56**, 88 (2008).
18. А. М. Тихомиров, Патент РФ №2010142589/13 (2010).
19. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Н. А. Ивлиева и А. В. Борода, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
20. *Химический состав пищевых продуктов*, под ред. И. М. Скурихина и М. Н. Волгарева, кн. I, 2-е изд., перераб. и доп. (Агропромиздат, М., 1987).

Formation of Ice Microparticles in Ovarian Fluid and Homogenate of Unfertilized Eggs of Russian Sturgeon during Cooling to -196°C

E.N. Ponomareva*, A.V. Firsova*, A.M. Tikhomirov**, and A.A. Andreev***

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

**Astrakhan State Technical University, ul. Tatishcheva 16, Astrakhan, 414056 Russia

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

There are a variety of approaches to increasing cryopreservation efficiency of fish and amphibian eggs, although some hurdles still remain to be overcome. During deep freezing of fish eggs, the main detrimental factor is the formation of ice crystals inside and outside the cells, as well as the growth of these crystals (recrystallization, repeated recrystallization). To avoid injury from freezing, there is a need for the development of effective cryoprotective media. The presence of additional components in the cryoprotective media that reduce thermomechanical stresses and cracks of the frozen tissues might increase survival of oocytes after freezing-thawing. It is probable that natural components of caviar and ovarian fluid may act as such additives. The aim of the research was to study the process of the formation of ice microparticles in a thin layer (0.2 mm) of ovarian liquid and components of the homogenate of Russian sturgeon caviar when they were cooled to the temperature of liquid nitrogen (-196°C). With a gradual decrease in temperature, the processes of freezing, cracking of ice and the formation of microparticles were observed. The shape and size of the microparticles depended on the composition of the frozen solution. Therefore, we assume that some fraction of the homogenate of caviar can be used as a component of cryoprotective medium.

Keywords: freezing, cracking ice, microparticles, sturgeon eggs

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ МОРСКИХ ЕЖЕЙ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОСТРАНСТВА

© 2020 г. Р. Лиу, Ш. Педлар, А. Од, С. МакДоналд, Дж. Стоун

McMaster University, 1280 Main Street West, Hamilton ON, L8S 4L8, Canada

E-mail: jstoner@mcmaster.ca

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 09.01.2020 г.

Принята к публикации 15.01.2020 г.

Морские ежи и их родственники таксономически сгруппированы в класс Echinoidea (тип Echinodermata). Эхиноиды демонстрируют значительные различия в своих фенотипах пятиугольной симметричной формы тела, от сфероидальных панцирей (скелетов) у морских ежей до дискоидных панцирей у плоских щитовидных ежей. Многие исследователи размышляли о морфологических эволюционных переходах между этими фенотипами, но не достигли консенсуса. Авторы разработали и выполнили эксперимент, в котором морские ежи росли в условиях пространственных ограничений в вертикальном измерении, физически ограничив их рост в высоту. Особи в этой группе стали более плоскими по сравнению с особями в контрольной группе по истечении восьми недель. Эти результаты можно рассматривать как результат фенотипической адаптации, недооцененного феномена, который может стать первым шагом в эволюции нового фенотипа. Авторы представляют предварительные предположения, касающиеся фенотипически адаптированных изменений в форме и морфологических эволюционных отношений между иглокожими. Демонстрируя правдоподобный иницирующий механизм в морфологическом переходе, авторы надеются внести вклад в теоретические дискуссии о фенотипической эволюции, подчеркивая роль, которую физические факторы играют в изменении сложных биологических систем.

Ключевые слова: развитие; эволюция; морфология; фенотипическая пластичность.

DOI: 10.31857/S0006302920030163

Класс Echinoidea (тип иглокожих – Echinodermata) содержит морских ежей («правильные» эхиноиды), плоских щитовидных ежей, «песчаных долларов», морских плоских ежей (Clypeasteroidea) и их родственников (Cassiduloida), а также сердцевидных ежей (Spatangoida) и их родственников (Holasteroidea, Disasteroidea). В этих группах представлен спектр фенотипов пентарадиальной формы тела. Две группы могут рассматриваться как типичные крайности в этом фенотипическом спектре: «правильные» морские ежи, характеризующиеся сфероидальными панцирями (скелетами), и «неправильные» – «песчаные доллары», характеризующиеся дискоидными панцирями, морские плоские ежи, характеризующиеся эллипсоидными панцирями, и сердцевидные ежи, характеризующиеся кардиоидными панцирями в качестве промежуточных продуктов. Однако отсутствуют общепринятые морфологические эволюционные переходы между разновидностями панциря (т. е. размерами и формами), которые можно было бы предположить на основе совре-

менной филогенетической систематики. Недавний филогенетический систематический анализ [1] может быть истолкован как предположение, что сфероидные панцири в наследственной группе превратились в дискоидные, а также в эллипсоидные и кардиоидные панцири в линиях, ведущих к «песчаному доллару», морским плоским и сердцевидным ежам.

Морские ежи традиционно считаются «модельными организмами» для проведения исследований в области биологии развития (например, работы [2–6]). Также можно считать, что морские ежи стали модельными организмами для проведения исследований в области эволюционной биологии развития («evo-devo» research) (например, работы [7–10]). Сильная междисциплинарная взаимосвязь между эволюционной биологией и биологией развития и способность панцирей морского ежа на структурную гибкость (описанную ниже) делает морских ежей идеальными организмами для изучения морфологических эво-

люционных переходов, особенно трансформаций, связанных с изменениями размера и формы.

Панцири морского ежа — это эндоскелеты, каждый из которых находится между нижележащей внутренней целомической подкладкой и вышележащим внешним эпидермисом [11]. Каждый панцирь состоит из трех компонентов (снизу вверх в направлении подачи субстрата, рис. 1): перистомы, содержащая щечные (ротовые) пластинки и иногда первичные амбулакральные пластинки [11, 12], которые окружают рот, или аристотелев фонарь; корона, содержащая амбулакральные и интерамбулакральные пластинки; апикальная система, состоящая из глазных и генитальных пластинок (и перипрокт у правильных и ранних неправильных эхиноидов [12]).

Пластины панциря содержат связанный с белком магнезиальный кальцит и сшиваются друг с другом коллагеновыми волокнами на балках, называемых трабекулами [13, 14]. Индивидуальный рост скелета включает пять интегрированных процессов: возникновение промежутков между пластинами, когда волокна коллагена разрыхляются; добавление новых пластин в апикальную систему; нарастание нового скелетного материала на периферии пластин; взаимодействия, происходящие на границах пластин; рост внутренних органов, влияющий на стенку тела [15]. Эти скелетогенетические процессы происходят в «зонах роста», двухсторонних амбулакральных балках, по обеим сторонам которых находится интерамбулакральная балка [16–19]. Коллагеновые волокна растягиваются во время активного роста, позволяя возникать промежуткам между пластинами; новые пластины добавляются рядом с глазными пластинами; это приводит к тому, что более старые пластины в зоне роста оказываются ближе к перистоме [20]; новый скелетный материал накапливается вокруг старых пластин периферии и размер панциря увеличивается [13, 14, 20, 21].

Рост панциря происходит естественным образом в течение активных сезонов, быстро в течение нескольких недель после кормления, а затем более медленно и скачкообразно [22]; у экспериментально питаемых морских ежей рост панциря выражен более четко [23]. Не кормящиеся морские ежи характеризуются жесткими панцирями; не кормленные в ходе экспериментов морские ежи характеризуются панцирями, которые со временем сжимаются из-за сокращения волокон коллагена [14, 24]. Этот прерывистый рост в сочетании с основным пятиступенчатым скелетогенезом можно сравнить с линькой [22]. На рост морских ежей влияют различные условные факторы, связанные с питанием [25] и условиями окружающей среды [26], как и при линьке у других животных.

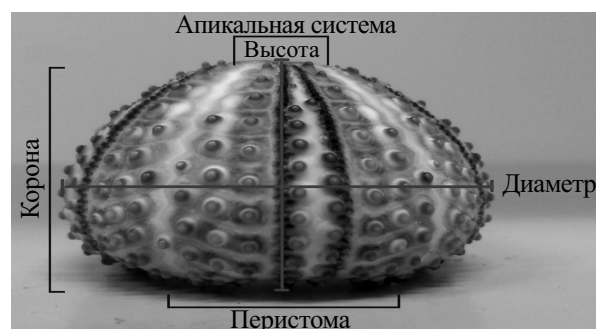


Рис. 1. Панцирь морского ежа в боковой перспективе, показывающий три компонента (снизу вверх) — перистому, корону и апикальную систему, и две измеренные переменные — высоту и диаметр.

Классическая неодарвинистская эволюция происходит, когда выгодные модификации возникают из-за генетических мутаций (т.е. когда мутантные аллели кодируют новые фенотипы) и впоследствии выбираются положительной селекцией. Фенотипическая пластичность — явление, при котором отдельные характеристики изменяются в ответ на факторы окружающей среды, — может возникнуть при таких сценариях, когда сама изменчивость (кодируемая генотипически и выраженная фенотипически) была выбрана положительно. Наоборот, явления, известные как фенотипическая и генотипическая аккомодация, имеют другую, обратную последовательность. Фенотипы, которые находятся в пределах потенциально реализуемого морфологического диапазона, возникают в ответ на индукторы окружающей среды; это фенотипическая адаптация (мутация, как другой возможный индуцирующий фактор, здесь не рассматривается как таковая [27]). Генотипы, участвующие в экспрессии этих фенотипов (и, следовательно, сами фенотипы), могут становиться фиксированными в течение продолжительных периодов времени и нескольких поколений; если индуктор окружающей среды непрерывно передает свои эффекты в течение этих периодов времени, то изменение генотипа (и, следовательно, изменение фенотипа) в конечном итоге уменьшается, особенно если «затраты» будут понесены особями, сохраняющими фенотипическую гибкость; это генотипическая адаптация (то, что согласованные ответы эквивалентно могут быть исключены, здесь не рассматривается [27]). Таким образом, фенотипическая аккомодация, сопровождаемая генотипической аккомодацией, включает первоначальное изменение частоты фенотипа (а не генотипа), которое зависит от повторного воздействия индуцирующего фактора окружающей среды, подлежащего отбору. Следовательно, фенотипическая адапта-

ция может ускорять быструю морфологическую эволюцию.

Учитывая возможность инициирования резкой морфологической эволюции, фенотипическая адаптация должна быть тщательно изучена. Однако исследования фенотипической адаптации, особенно документированные случаи, были редкостью, отчасти потому, что соответствующие механизмы часто включают физические факторы, от которых большинство биологов обычно уклоняются. Это вызывает сожаление, поскольку физические факторы играют важную роль в изменении сложных биологических систем [28], и понимание этих ролей, особенно с помощью документированных случаев, будет способствовать теоретическим дискуссиям о фенотипической эволюции. Тем не менее некоторые случаи и моменты были описаны.

Фенотипическая адаптация может вызывать изменения в развитии популяции. Например, пятнистые гиены (*Crocota crocuta*) характеризуются наличием ребристых черепов в зрелом возрасте; несовершеннолетние же особи не имеют гребней. Формирование гребня объясняется силами, создаваемыми во время развития мощными мышцами, охватывающими кости челюсти, когда особи постоянно жуют жесткое мясо и кости от своей добычи [27]. В неволе популяции особей, выращенных на мягкой диете, не генерируют никаких сил, и, следовательно, взрослые животные в неволе не имеют гребней черепа, как их молодые коллеги в диких популяциях. Жесткая пища в дикой природе влияет на использование мышц и развитие костей – реакция на механическое давление стала неотъемлемой частью процесса развития в естественных популяциях; был ли этот ответ значим или был преувеличен изменением генотипа, неизвестно.

Фенотипическая адаптация может создать сложное новшество у одной особи без генетических изменений. Например, коза, которая родилась с парализованными передними конечностями, научилась двигаться, подпрыгивая на задних лапах [27]). Анатомическое обследование после ее смерти выявило множество модификаций костей задних конечностей и таза, которые способствовали фенотипической адаптации. Эти два случая: ребристые черепа в пятнистых популяциях гиены и модификации костей, позволяющие прыгать отдельной козе, демонстрируют фенотипическую экспрессию, вызванную поведением и включаемую генотипами в ответ на индукторы окружающей среды.

Отчетливый ответ на сигнал окружающей среды, влияющий на выживаемость, включает изменение размера тела для снижения затрат на собственное обслуживание при оптимизации репродуктивной мощности; такие случаи были

продемонстрированы у морских ежей, когда ограниченный корм являлся сигналом окружающей среды, влияющим на изменения морфологии [14, 21, 25, 26, 29]. Способность регулировать форму в соответствии с условиями окружающей среды обеспечивается описанным ранее дискретным пятиступенчатым процессом роста панциря морского ежа.

Подобный динамический ответ на кормление с эпизодическим ростом в сочетании с вышеупомянутой гибкостью, обеспечиваемой волокнами коллагена, превращает морских ежей в организмы, хорошо подходящие для изучения фенотипической аккомодации в скелетогенезе в контролируемых экспериментальных условиях. В естественных условиях химические загрязнители и твердость субстрата могут влиять на формы панциря. Было показано, что металлы и детергенты ингибируют кальцификацию и приводят к сплющиванию панцирей [30]. Слабые субстраты могут препятствовать сцеплению с поверхностями и приводить к укреплению панцирей [21, 31]. Такие ответы панциря были использованы для разработки эксперимента для документирования описанной здесь фенотипической аккомодации. Морских ежей выращивали в искусственной среде, которая ограничивала вертикальное измерение, доступное для скелетогенеза, чтобы определить, может ли рост при геометрическом ограничении вызывать морфологические изменения в панцирях, выражающееся в уменьшении высоты/диаметра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вид *Arbacia punctulata* (Lamarck, 1816) был выбран из-за доступности образцов и отсутствия репродуктивной функции во время проведения эксперимента (использование неразмножающегося объекта будет гарантировать, что поступающая через кормление энергия будет отводиться преимущественно росту). Взрослые особи были приобретены в Морской лаборатории Gulf Specimen (Панасея, Флорида, США) в течение двух полевых сезонов (начало января 2010 и 2014 гг.) для проведения двух экспериментальных испытаний с использованием одной и той же начальной популяции. Для каждого испытания особи проходили короткий период акклиматизации, в течение которого питание не предоставлялось (т.е. период голодания составлял приблизительно одну неделю). Цифровые штангенциркули Samopa (Оттава, Канада) были использованы для измерения у каждой особи значений высоты (h) и диаметра (d). Из-за обширной логистики, связанной с протоколом роста (описанным далее), размеры выборки для контрольной и экспериментальной групп были ограничены соответственно шестью и четырьмя образцами.

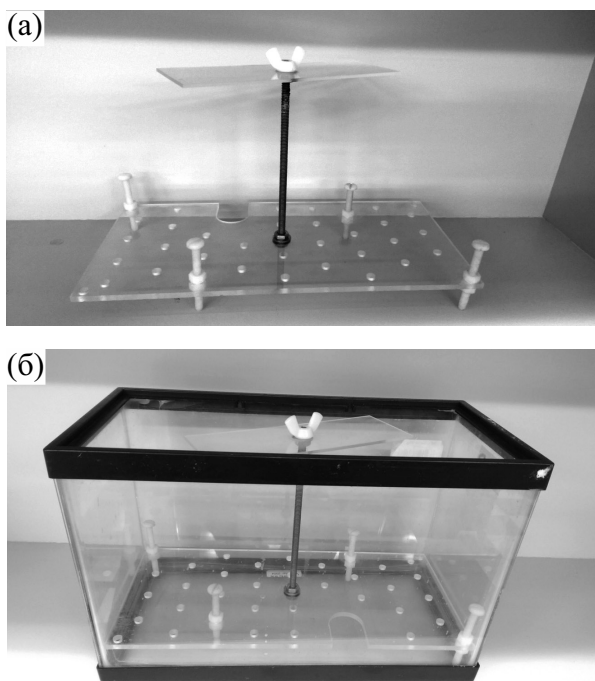


Рис. 2. Аппарат для ограничения вертикального пространственного размера и в конечном счете создания реактивных сил сжатия, действующих на панцирь морского ежа: (а) — отдельно, (б) — *in situ* в аквариуме. Устройство было разработано для выявления роли, которую физические факторы могут играть в изменении сложных биологических систем, таких как формы для панцирей морского ежа.

Отдельных особей содержали в отфильтрованной искусственной морской воде (Oceanic Natural Sea Salt Mix, Central Garden & Pet Company, Уолнат-Крик, Калифорния, США; $\rho_{\text{спес}} = 1.020\text{--}1.023$) в аквариумах (TopFin, PetSmart, Финикс, Аризона, США; максимальный объем 6 л) при комнатной температуре ($T = 24^\circ\text{C}$). Обе группы кормили морковью, нарезанной поперек колечками, запасы продовольствия пополняли по мере истощения. Пополняли воду и очищали аквариумы при необходимости (примерно раз в неделю). Размеры аквариума и объемы морской воды определяли на основе размеров образцов, чтобы обеспечить приблизительно одинаковую плотность особей на объем для контрольной и экспериментальной групп.

Особи с близкими значениями h были включены в экспериментальную группу (без каких-либо других оценок) и помещены в аквариум, который был оборудован устройством, ограничивающим вертикальные пространственные размеры (рис. 2), и в конечном счете (т.е. после того, как особи выросли так, чтобы их шипы контактировали с платформой аппарата) создающим в эксперименте реактивные силы сжатия, действующие на панцирь (рис. 3). В случае необходимости

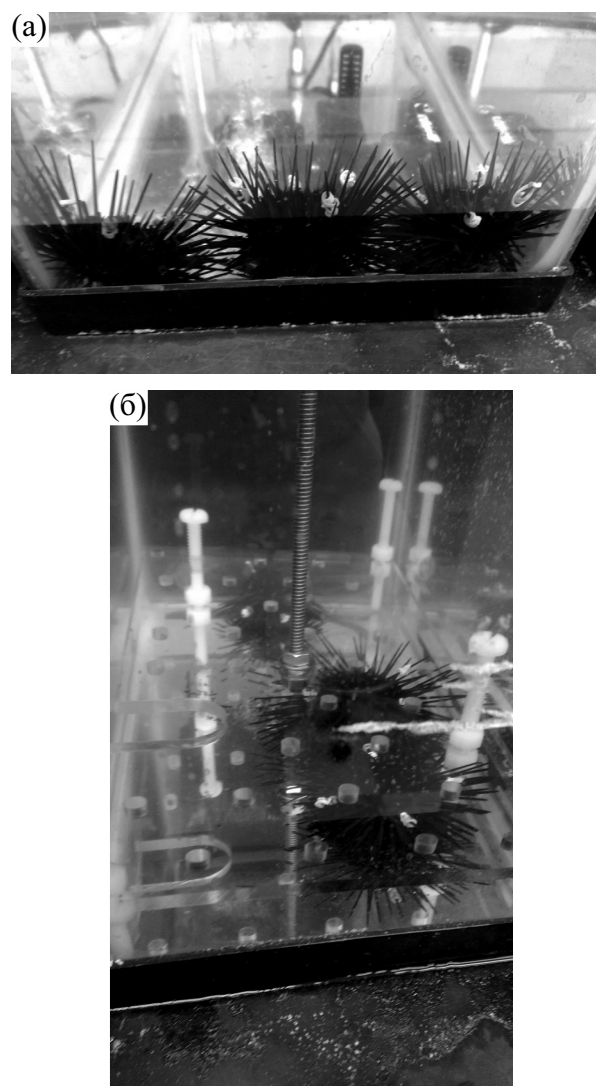


Рис. 3. Экспериментальные аквариумы для проверки того, влияет ли рост морских ежей при геометрических ограничениях на их форму скелета: (а) — образцы в контрольном аквариуме (фронтальная перспектива; особи, помеченные цветной нитью); (б) — образцы в аквариуме воздействия (боковой вид; особи, помеченные цветной нитью). Особи росли в поперечном направлении, увеличиваясь в диаметре, и становились более плоскими, уменьшаясь в соотношении высоты к диаметру.

аппарат регулировали в течение всего экспериментального периода (т.е. всякий раз, когда пополняли пищу или воду или чистили аквариумы) так, чтобы платформа аппарата просто контактировала с растущими образцами. Особи с близкими по значению h (опять же без каких-либо других оценок) были включены и в контрольную группу. Апикальные колючки на образцах в экспериментальной и контрольной группах были подпилены до максимальной средней высоты. Особи были отмечены нанесением на колючки

Значения высоты h , диаметра d панциря и отношения высоты к диаметру h/d в контрольной и экспериментальной группах для образцов *Arbacia punctulata* в начале и в конце (через восемь недель) эксперимента

Популяция 2010 года							
Группа	n	Начальные измерения			Конечные измерения		
		h	d	h/d	h	d	h/d
Контроль	6	13.215 ± 1.555	21.985 ± 2.250	0.6010 ± 0.03116	14.723 ± 2.266	24.138 ± 2.583	0.6082 ± 0.04173
Воздействие	4	13.635 ± 0.7285	23.213 ± 1.374	0.5877 ± 0.01323	14.220 ± 1.083	26.218 ± 1.640	0.5425 ± 0.02709
Популяция 2014 года							
Группа	n	Начальные измерения			Конечные измерения		
		h	d	h/d	h	d	h/d
Контроль	6	16.323 ± 2.624	28.287 ± 3.649	0.5769 ± 0.04736	18.600 ± 3.308	31.650 ± 3.774	0.5863 ± 0.07531
Воздействие	4	24.325 ± 3.813	31.650 ± 4.071	0.6454 ± 0.07999	22.675 ± 1.866	43.225 ± 2.871	0.5240 ± 0.04929

Примечание. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Различия в средних показателях до и после эксперимента были проверены с помощью парных односторонних t -критериев. Коэффициент Коэна d был (согласно работе [32]) рассчитан как разница между средними значениями, деленная на одно стандартное отклонение. Для популяции 2010 года: h для контрольной группы: $t = 4.30$, $P = 0.00380$ (d Коэна = -0.974); h для группы воздействия: $t = 3.02$, $P = 0.0285$ (d Коэна = -0.732); d для контрольной группы: $t = 3.96$, $P = 0.00590$ (d Коэна = -0.850); d для группы воздействия: $t = 6.26$, $P = 0.00410$ (d Коэна = -2.29); h/d для контрольной группы: $t = 0.354$, $P = 0.369$ (d Коэна = -0.208); h/d для группы воздействия: $t = 3.18$, $P = 0.0250$ (d Коэна = -2.51). Для популяции 2014 года: h для контрольной группы: $t = -1.28$, $P = 0.1279$ (d Коэна = 0.768); h для группы воздействия: $t = 0.924$, $P = 0.2118$ (d Коэна = 0.581); d для контрольной группы: $t = -5.51$, $P = 0.00135$ (d Коэна = 0.906); d для группы воздействия: $t = -4.74$, $P = 0.00888$ (d Коэна = 3.335); h/d для контрольной группы: $t = -0.364$, $P = 0.3889$ (d Коэна = 0.154); h/d для группы воздействия: $t = -3.40$, $P = 0.0212$ (d Коэна = 1.878).

нерастворимого в воде лака для ногтей (China Glaze©, Чжундун, Северный Тайвань, Китай) или завязыванием швейной нити примерно посередине вдоль шипов (Singer Sewing Company, Мерфрисборо, Теннесси, США) и идентифицированы впоследствии на основе цветной маркировки. Обе группы были обеспечены морковью *ad libitum* в эквивалентных количествах (равной массе моркови на особь), таким образом, особи могли питаться непрерывно в течение всего эксперимента, в течение которого их содержали в одинаковых условиях, но в ограниченном вертикальном изменении в аквариуме экспериментальной группы.

Значения h и d измеряли и записывали один раз перед началом любого кормления (т.е. когда эксперимент был начат, сразу после периода голодания) и снова после восьми недель кормления (т.е. когда эксперимент был прекращен). Группы сравнивали, рассчитывая величины эффекта как грубую разницу между средними значениями и используя коэффициент Коэна d [32]. Данные также были проанализированы с использованием обычных количественных протоколов: поскольку для обеих групп предполагалось, что особи в них будут расти, а конкретно в экспериментальной группе – что панцири будут более сплюснутыми и, следовательно, будут характеризоваться меньшим средним значением h/d , была принята нулевая гипотеза «нет разницы между группами», и

соответствующие прогнозы, означающие «среднее значение $h_{\text{после}} = \text{среднее значение } h_{\text{до}}$ », «среднее значение $d_{\text{после}} = \text{среднее значение } d_{\text{до}}$ », «среднее значение $h_{\text{после}}/d_{\text{после}} = \text{среднее значение } h_{\text{до}}/d_{\text{до}}$ » и «среднее значение h/d для контрольной группы = среднее значение h/d для экспериментальной группы», тестировали, применяя парные односторонние t -критерии с использованием GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения h и d были выше в конце эксперимента, чем в начале, для обеих групп в 2010 г.; среднее значение d было больше в конце эксперимента, чем в начале, для обеих групп в 2014 г. (таблица). Для группы воздействия среднее значение h/d было меньше в конце эксперимента, чем в начале, в оба года (рис. 4, таблица; величины эффекта, определенные как средние изменения h/d , составляли 0.0072 и 0.0452 для группы контроля и воздействия соответственно в 2010 г. и 0.0094 и 0.1214 для контрольной и экспериментальной группы соответственно в 2014 г.). Средние значения h/d между контрольной и экс-

периментальной группами значительно отличались в конце эксперимента в оба года.

ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение h/d , характеризующее панцири морских ежей, которые выросли при геометрическом ограничении, уменьшилось относительно среднего значения h/d , характеризующего панцири морских ежей, которые выросли без геометрического ограничения (рис. 4, таблица). Это можно было обнаружить даже при небольших размерах выборки, которые были обусловлены трудоемкой логистикой, связанной с экспериментальным дизайном; величина эффекта, связанного с фенотипической адаптацией у этих морских ежей, предполагает, что такой ответ соответствует понятию *bona fide*. Значение h/d для всех образцов в экспериментальной группе изменилось отрицательно в течение восьминедельного периода в обоих исследованиях (т.е. в 2010 и 2014 гг.), тогда как h/d для образцов в контрольной группе изменилось неравномерно, три положительных и три отрицательных случая в обоих испытаниях.

Средние значения h/d для контрольной группы в 2010 г. увеличились, но среднее значение h/d осталось неизменным (таблица), что указывает на то, что образцы росли изометрическим образом (т.е. они увеличивались в размерах, но сохраняли постоянные пропорции, как и ожидалось у эхиноидов [20, 33]), поскольку они были геометрически не ограничены — особи в группе воздействия в 2014 г. росли схожим образом, хотя различий по h не было обнаружено (таблица). Особи в группе воздействия в обоих исследованиях (то есть в 2010 и 2014 гг.) росли аллометрическим образом (т.е. увеличивались в размерах, но изменяли пропорции), потому что они были геометрически ограничены (см. таблицу) — увеличение d с уменьшением h/d согласуется с фенотипической адаптацией.

Гибкие панцири и эпизодическое пищевое поведение у взрослых морских ежей predisполагают к их использованию в качестве кандидатов для проявления фенотипического аккомодации [27]. Мы зафиксировали фенотипическую адаптацию в одной популяции за два разных года. Если такие же гибкие панцири и эпизодическое пищевое поведение характеризовали популяции в линиях, ведущих к «песчаным долларам» и морским плоским ежам, а также к сердцевидным ежам, то фенотипическая адаптация обеспечивает правдоподобный механизм, через который проявляется текущее морфологическое неравенство [34], наблюдаемое среди этих групп. Экологические сигналы или условия, которые могли бы вызвать морфологическое расхождение, практически неисчислимы.

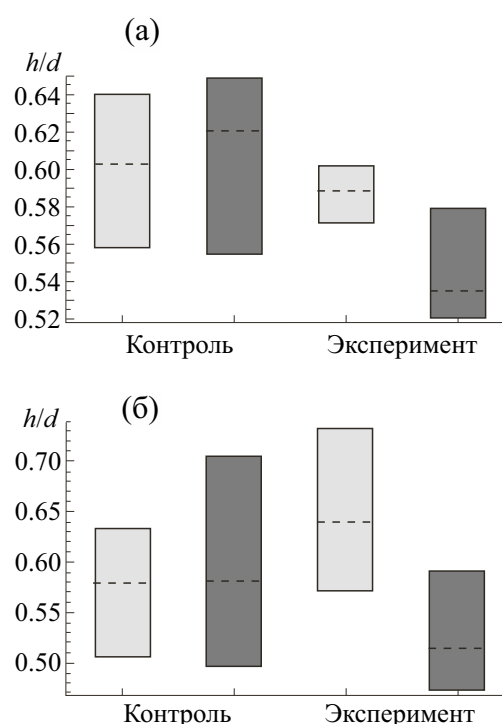


Рис. 4. Значения соотношения высоты и диаметра панциря (h/d) в контрольной и экспериментальной группах для образцов морского ежа в начале и через восемь недель эксперимента (т.е. до и после кормления, светлый и темный столбики соответственно); каждый прямоугольник содержит медианное значение (пунктирная линия) с верхом и низом (то есть «усы»), которые охватывают наблюдаемый диапазон: (а) — выборка популяции 2010 г., (б) — выборка популяции 2014 г.

Один из вероятных (весьма спекулятивных) сценариев морфологического расхождения между сфероидальными морскими ежами и дискоидными «песчаными долларами», эллипсоидальными морскими плоскими ежами, а также кардиоидными сердцевидными ежами заключается в наблюдении, что не кормящиеся ночные морские ежи часто ищут убежища в дырах или трещинах в скалах или под ними [35]. Морские ежи, как члены сообщества иглокожих (Echinodermata), характеризуются наличием изменчивой коллагеновой ткани, которая замечательна своей способностью быстро изменять жесткость под нейронным контролем [36–40]. Изменяющаяся коллагеновая ткань («catch» коллаген) может быть зафиксирована на месте и укреплять поддерживающие ткани, устраняя необходимость сокращения мышц при сохранении жизненных позиций (например, в расщелинах и трещинах на поверхности горных пород). Нахождение на месте в течение длительных периодов времени может вызывать фенотипическую адаптацию у особей в популяциях морских ежей способом, аналогичным описанному здесь росту сплюснутых панцирей, если поведе-

ние сохранялось непрерывно на протяжении многих поколений. С современной неодарвинистской, спекулятивной точки зрения, если бы подобные геометрические ограничения действовали равномерно и выгодно на протяжении многих поколений, то индивидуальные величины h/d в популяциях могли бы измениться; генотипы, лежащие в основе способности к переменному фенотипу, постепенно стали бы модифицированы и смещены в сторону создания более плоских панцирей; популяция перешла бы в измененную форму.

С представленными здесь данными могут быть связаны два основных ограничения. Во-первых, размеры выборки были небольшими. Следовательно, было недостаточно степеней свободы для проведения непараметрических тестов Вилкоксона с критерием знаковых рангов для сравнений, в которых они были бы уместны [41]. Это было неизбежно, учитывая обширную и трудоемкую логику, связанную с протоколом роста и дизайном эксперимента. Во-вторых, сама точность измерения могла зависеть от морфологии. Особи морского ежа изначально обладали шипами, охватывающими все их панцири, следовательно, измерение h и d было сложной задачей. Морские ежи потеряли колючки в течение восьминедельного периода, чем облегчили измерение h и d . Это различие в измерениях до и после эксперимента могло привести к уменьшению оценки роста в h и d , делая различия меньше, чем они могли бы быть на самом деле. Увеличение размеров выборки и уточнение протокола измерений приведет к получению данных, которые будут характеризоваться более значительными экспериментальными эффектами и, таким образом, более заметным изменением формы панциря, чем описанная здесь фенотипическая адаптация.

Потеря шипов указывает на стресс, поэтому изменение метода применения геометрических ограничений может увеличить рост, что даст больший эффект от эксперимента в будущих исследованиях. Информативный последующий эксперимент включал бы освобождение экспериментальных особей из геометрически ограниченных условий, чтобы проверить, сохраняют ли они измененные формы и если да, то как долго. Анализы *post mortem* на сравнение панцирей в образцах экспериментальной группы с панцирями в образцах контрольной группы позволили бы выяснить механизм роста, лежащий в основе изменений формы. Это может проявляться в изменениях наложения швов коллагеновых волокон, росте пластин или и в том и в другом. Сшивание коллагеновых волокон можно проанализировать с применением сканирующей электронной микроскопии, а рост пластин можно проанализировать, используя протоколы маркировки кальцеи-

ном и тетрациклином для визуализации линий роста [42, 43].

ВЫВОДЫ

Морских ежей выращивали в течение восьми недель в условиях геометрического ограничения, при котором особи были ограничены в вертикальном пространственном измерении. Особи в этой экспериментальной группе становились более плоскими по сравнению с особями в контрольной группе, создавая фенотипическую аккомодацию. Подобные геометрические ограничения, действующие равномерно на протяжении многих поколений, могли бы привести к фенотипической адаптации, создающей более плоские панцири. Этим можно было бы объяснить несоответствие, наблюдаемое между сфероидальными морскими ежами и дискоидными «песчаными долларами».

БЛАГОДАРНОСТИ

Ресурсы для разработки материала, представленного в настоящей работе, были предоставлены Университетом Макмастера (Department of Biology, SHARCNET и Origins Institute). Безграничное трудолюбие в создании ограничивающего аппарата было проявлено Р. Жилем и Д. Оадом; а предложения по расширению экспериментов были представлены И. Фернандесом и М. Спиридсом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовые ограничения были преодолены за счет средств, предоставленных Советом по естественным наукам и инженерным исследованиям Канады (Discovery Grant 261590).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Kroh and A. B. Smith, J. Syst. Pal. **7**, 147 (2010).
2. S. Horstadius, Biol. Rev. **14**, 132 (1939).
3. R. T. Hinegardner, Biol. Bull. **137**, 465 (1969).
4. J. E. Mazur and J. W. Miller, Ohio J. Sci. **71**, 30 (1971).
5. S. B. George, J. M. Lawrence, and A. L. Lawrence, Aquaculture **242**, 217 (2004).

6. M. M. Smith, L. C. Smith, R. A. Cameron, and L. A. Urry, *J. Morphol.* **269**, 713 (2008).
7. R. Dalton, *Nature* **403**, 125 (2000).
8. C. S. Goodman and B. C. Coughlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4424 (2000).
9. R. Raff, *Nat. Rev. Gen.* **1**, 74 (2000).
10. R. Raff and A. Love, *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* **302B**, 19 (2004).
11. L. H. Hyman, *The Invertebrates: Echinodermata* (McGraw-Hill Book Company, New York, 1955).
12. A. B. Smith, *Echinoid Palaeobiology* (Allen & Unwin, London, 1984).
13. M. Telford, *Zoomorphology* **105**, 114 (1985).
14. A. Johnson, O. Ellers, J. Lemire, et al., *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**, 215 (2002).
15. M. Abou Chakra and J. R. Stone, *Paleobio.* **37**, 686 (2011).
16. R. T. Jackson, *Boston Soc. Nat. Hist. Mem.* **1** (1912).
17. B. David and R. Mooi, *C. R. Acad. Sci. Paris Ser.* **319**, 577 (1996).
18. B. David and R. Mooi, in *Echinoderms: San Francisco*, ed. by R. Mooi and M. Telford (Balkema, Rotterdam, 1998), pp. 21–28.
19. R. Mooi and B. David, *Paleontol. Soc. Pap.* **3**, 305 (1997).
20. O. Ellers, *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **254**, 123 (1993).
21. J. Dafni, *Paleobiology* **12**, 143 (1986).
22. A. S. Johnson and O. Ellers, in *Echinoderms: San Francisco*, Ed. By R. Mooi and M. Telford (Balkema, Rotterdam, 1998), p. 705.
23. E. McCarron, G. Burnell, and G. Mouzakis, *Aquaculture* **288**, 83 (2009).
24. O. Ellers, A. Johnson, and P. Moberg, *P. Biol. Bull.* **195**, 136 (1998).
25. M. P. Russell, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **220**, 1 (1998).
26. C. Fernandez, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **152**, 45 (1997).
27. M. J. West-Eberhard, *J. Exp. Zool.* **304B**, 610 (2005).
28. D. W. Thompson, *On Growth and Form* (Cambridge University, Cambridge, 1917).
29. D. C. C. Lau, S. C. K. Lau, P.-Y. Qian, and J.-W. Qiu, *J. Shell. Res.* **28**, 383 (2009).
30. J. Dafni, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **67**, 1 (1983).
31. J. Dafni and J. Erez, *Mar. Biol.* **95**, 275 (1987).
32. J. Cohen, *Psych. Bull.* **112**, 155 (1992).
33. T. A. Ebert, *J. Nat. Hist.* **22**, 1407 (1988).
34. S. J. Gould, *Paleobiology* **17**, 411 (1991).
35. J. Dafni, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **47**, 259 (2011).
36. T. Motokawa, *Biol. Rev.* **59**, 255 (1984).
37. C. Wilkie, *Mar. Behav. Physiol.* **11**, 1 (1984).
38. C. Wilkie, in *Echinoderm Studies*, Ed. by M. Jangoux and J. M. Lawrence (Balkema, Rotterdam, 1996), pp. 61–102.
39. B. Lelievre, M. Telford, and O. Ellers, in *Echinoderm Research 1995. Proc. 4th Eur. Echinoderms Colloquium, London*, ed. by R. H. Emson, A. B. Smith, and A. C. Campbell (Balkema, Rotterdam, 1995), pp. 103–109.
40. M. Telford and O. Ellers, *Invert. Biol.* **116**, 255 (1997).
41. R. R. Sokal and F. J. Rohlf, *Biometry*, 3rd ed. (W. H. Freeman, N. Y., 1995).
42. J. S. Pearse and V. B. Pearse, *Am. Zool.* **15**, 731 (1975).
43. K. Markel, *Zoomorphology* **97**, 31 (1981).

Phenotypic Accommodation in Sea Urchins Grown under Geometric Constraints

R. Liu, Sh. Pedlar, A. Oad, S. McDonald, and J. Stone

McMaster University, 1280 Main Street West, Hamilton ON, L8S 4L8, Canada

Sea urchins and their relatives are taxonomically grouped as Echinoidea (phylum Echinodermata). Echinoids exhibit considerable modifications of their pentaradially symmetric body plan phenotypes, from spheroid tests (skeletons) in sea urchins to discoid tests in sand dollars. Researchers have speculated as to morphological evolutionary transitions among these phenotypes without reaching consensus. We designed and performed an experiment in which sea urchins grew under geometric constraints manifested through restricted vertical spatial dimension, physically limiting growth in height. Individuals in this treatment group became flatter than those in a control group after 8 weeks. These findings can be considered as indicative of phenotypic accommodation, an underappreciated phenomenon that may constitute the first step in novel phenotype evolution. We present preliminary speculations in regard to phenotypically accommodated changes in shape and morphological evolutionary relationships among echinoids. We demonstrate a plausible initiating mechanism in a morphological transition, which can contribute to theoretical discussions about phenotypic evolution, emphasizing the role physical factors play when complex biological systems change.

Keywords: development; evolution, morphology, phenotypic plasticity

ВОСПРИЯТИЕ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕАГИРОВАНИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ, БУМАЖНЫХ ОС И РЫЖИХ ЛЕСНЫХ МУРАВЬЕВ НА НИЗКОЧАСТОТНОЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ПОЛЕ

© 2020 г. Е.К. Еськов

*Российский государственный аграрный заочный университет,
143900, Балашиха Московской области, ул. Ю. Фучика, 1*

E-mail: ekeskov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.2019 г.

После доработки 18.02.2020 г.

Принята к публикации 19.02.2020 г.

Пчелы, осы и муравьи не имеют специализированных рецепторов восприятия электрического поля. Адекватное реагирование на природные электрические поля у пчел и муравьев связано с воздействием атмосфериков, усиливающихся при приближении грозового фронта. К восприятию насекомыми низкочастотных электрических полей высокой напряженности имеют отношения первичные преобразователи механорецепторов, реагирующих на смещение. Неспецифический механизм восприятия электрических полей основан на раздражении насекомых наведенными токами, протекающими в местах их контактирования между собой и/или токопроводящими поверхностями. Частотная характеристика чувствительности к электрическому полю определяется в основном величиной наводимого им тока и интенсивностью его контактного действия. Величина тока, наводимого в покровах тела насекомых, нелинейно связана с частотой электрического поля. Область с наибольшей чувствительностью к электрическим полям приходится примерно на 500 Гц, что согласуется с максимальной величиной наводимого тока. При этом порог чувствительности к электрическому полю у ос составляет около 0.04, у пчел — 0.45 кВ/м. Муравьи реагируют замедлением локомоций на действие электрического поля напряженностью 7–10 кВ/м. Магнитные поля и ионизация, сопутствующие генерации электрического поля, напряженность которого достигает 15–20 кВ/м, не стимулируют изменения поведения насекомых.

Ключевые слова: пчелы, осы, муравьи, электрическое поле, чувствительность, аномалии поведения, адекватное реагирование.

DOI: 10.31857/S0006302920030175

Биосфера Земли подвергается природным электромагнитным воздействиям широкого частотного диапазона — от медленных изменений магнитного и электрических полей до гамма-излучений. Природные электромагнитные процессы дополняются возрастающими по диапазону и интенсивности антропогенными воздействиями на биосферу. Антропогенные электрические (ЭП) и магнитные поля (МП) по интенсивности сравнимы с естественными ЭП и МП, а в некоторых ситуациях превосходят их.

У животных ЭП и МП воздействуют на электрические процессы, протекающие в клетках, тканях и органах. Поэтому природные и антропогенные ЭП и МП, независимо от наличия или отсутствия у животных специализированных ре-

цепторов ЭП, влияют на их физиологическое состояние [1–6].

В зависимости от образа жизни и уровня организации животные по-разному реагируют на ЭП, защищаясь от их неблагоприятного воздействия. Высокоорганизованные социальные насекомые от различных экстремальных воздействий защищаются обычно скоординированными усилиями больших групп или всех взрослых особей семьи. На типичные физические или биотические стимулы у социальных насекомых прослеживается адекватное реагирование. Так, на изменения внешней температуры пчелы и осы, находящиеся в своих гнездах, реагируют изменением генерации и выделения тепла [7–10]. Рыжие лесные муравьи изменяют наклон поверхности холмика к солнечным лучам [9, 11, 12]. Коллективные оборонительные реакции стимулирует у всех социальных насекомых нападение на их жилища врагов и грабителей. При приближении грозового

Сокращения: ЭП — электрические поля, МП — магнитные поля, ЛЭП — линия электропередачи.

фронта, чему сопутствует возрастание интенсивности атмосфериков [12], муравьи заделывают входные отверстия муравейников, а пчелы прекращают полеты и возвращаются в ульи [9–12].

Медоносные пчелы наряду с защитными реакциями на переменные ЭП приспособились использовать электростатическое поле в системе внутриульевых коммуникаций. Статическое поле, возникающее на теле пчелы-сигнальщицы при трении о поверхность сот, используется мобилизуемыми ею пчелами. Они среди множества других пчел, находящихся на сотах, по отклонению антенн под действием статического заряда обнаруживают сигнальщицу и поддерживают с нею дистанцию, необходимую для восприятия относительно слабого акустического сигнала. Посредством этого сигнала пчела-сигнальщица информирует приблизившихся к ней пчел о расстоянии до обнаруженной цели полета, например источника корма или воды [14].

Что касается антропогенных ЭП и МП, то они для насекомых и других видов животных являются новыми, нетипичными факторами среды. На них высокоорганизованные животные с большой продолжительностью жизни не могли приобрести адекватных форм реагирования.

Настоящей работой предпринят сравнительный анализ реагирования на ЭП трех видов перепончатокрылых насекомых (Hymenoptera), различающихся по образу жизни, — медоносных пчел, бумажных ос и рыжих лесных муравьев. Эти виды социальных насекомых, приспособленные к разным условиям жизни, сооружают свои гнезда из материалов, различающихся по электропроводности. Основу гнездовых построек у пчел представляют восковые, а у ос — бумажные соты. Муравьи сооружают гнезда в земле, возводя земляные холмики, включающие растительные частички.

Изучение специфики реагирования пчел, ос и муравьев на низкочастотное ЭП важно для понимания физиологических механизмов восприятия этого стимула животными, отличающимися по образу жизни и экологической валентности. У медоносных пчел семья, а не особь, представляет собою размножающуюся биологическую единицу, подлежащую действию естественного отбора. Бумажные осы живут сезонными семьями, которые размножаются половозрелыми самками. Рыжие лесные муравьи, образуя большие семьи, могут размножаться почкованием или половозрелыми особями.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЯМ

Для пчел (*Apis mellifera* L.) установлены групповые эффекты реагирования ЭП [10, 15, 16]. В

частности, одна пчела, находящаяся на изолированной поверхности, независимо от ориентации тела по отношению к силовым линиям ЭП не проявляет никаких признаков реагирования на низкочастотное ЭП высокой напряженности, достигающей 50 кВ/м. Незначительная активизация локомоций и соответственно увеличение потребления O_2 происходит под действием ЭП напряженностью 100 кВ/м.

Соответственно при увеличении численности пчел, поддерживающих между собой тактильные контакты, степень их реагирования на ЭП одинаковой частоты и напряженности возрастает. У двух пчел, находящихся на электрически изолированной поверхности (в стеклянном сосуде), ЭП частотой 500 Гц при напряженности 50 кВ/м стимулирует активизацию и увеличение потребления O_2 в 1.5 ± 0.14 раза, а у десяти пчел — в 1.8 ± 0.17 раза. Резкую активизацию у 100 пчел стимулирует ЭП напряженностью 14 ± 3 кВ/м.

Частотная характеристика чувствительности пчел к ЭП установлена на их семьях [10, 17, 18]. Семьи, содержавшие от 5 до 30 тыс. взрослых рабочих особей, находились в экранированной акустически изолированной камере. Применение акустической изоляции пчелиных семей требовалось для точной регистрации изменений звукового шума семьи, регистрируемого в диапазоне 400–500 Гц. С усилением этого частотного диапазона шумов пчелиной семьи связана активизация пчел [19]. Таким же способом на семьях земляных ос (*Paravespula vulgaris* L.), содержавших от 1200 до 2000 взрослых особей, изучали их чувствительность к ЭП.

Пчелы и осы, находящиеся в своих гнездах, обладают максимальной чувствительностью к ЭП частотой 500 ± 50 Гц. Но семьи ос, отличаясь от пчел меньшей численностью взрослых особей, примерно на порядок превышают пчелиные семьи по чувствительности к ЭП. На частоте около 500 Гц порог чувствительности ос находится на уровне 0.03–0.05 кВ/м (рис. 1б), а у пчел — 0.4–0.5 кВ/м (рис. 1а).

Чувствительность к ЭП неравномерно изменяется в ответ на понижение или повышение его частоты. И у ос, и у пчел при уменьшении частоты ЭП в 50 раз (от 500 до 10 Гц) порог чувствительности к этому стимулу возрастает примерно в два раза. При повышении частоты ЭП в десять раз (от 500 до 5000 Гц) порог чувствительности у ос возрастает в четыре раза, а у пчел — в двенадцать раз (рис. 1а,б).

Рыжие лесные муравьи (*Formica rufa* L.) характеризуются относительно низкой чувствительностью к ЭП. Если порог чувствительности определять по понижению локомоторной активности, то некоторое ее замедление у муравьев, выходящих из муравейника, наблюдается под действием

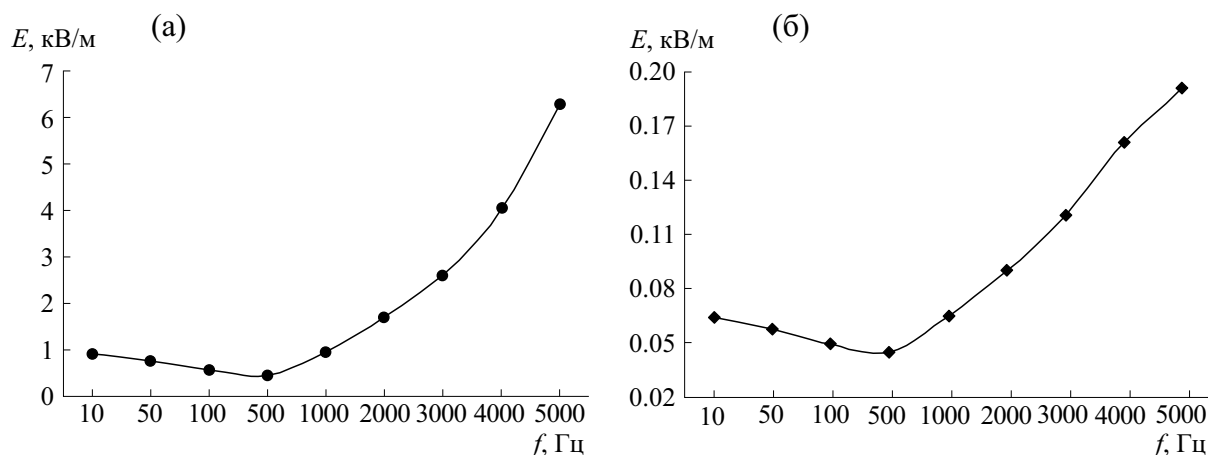


Рис. 1. Частотная зависимость чувствительности медоносных пчел (а) и бумажных ос (б) к электрическому полю (по работе [17], с изменениями).

ЭП частотой 500 Гц при напряженности, достигающей 8–10 кВ/м [20].

РЕАГИРОВАНИЕ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОЛЯ

Находясь в разных условиях жизни и обладая разной чувствительностью к низкочастотному ЭП, пчелы, осы и муравьи по-разному реагируют на этот стимул. Поскольку порог чувствительности этих насекомых к ЭП приходится примерно на 500 Гц, то эта частота использована для стимуляции ответных реакций.

Пчелы. Пчелы, находящиеся в гнезде, реагируют на ЭП повышением локомоций и активности метаболизма [21]. Заметную активизацию локомоций стимулирует ЭП напряженностью 1–2 кВ/м. Возбужденные пчелы начинают выходить из улья, когда напряженность ЭП достигает 10–15 кВ/м, а при 20–30 кВ/м сотни возбужденных пчел выходят на переднюю стенку улья. Некоторая их часть взлетает и кружится на расстоянии 1–5 м от улья. Летающие пчелы набрасываются и жалят людей и животных, оказавшихся вблизи улья.

Через 4–7 мин от начала воздействия на пчелиную семью ЭП напряженностью 20–30 кВ/м локомоторная активность пчел начинает понижаться. С этого времени ранее гиперактивные пчелы группируются на поверхности сот, образуя неровные ряды, ориентированные преимущественно вдоль или под небольшим углом к силовым линиям ЭП. В нижней части сот и у дна улья пчелы образуют беспорядочные малоподвижные скопления.

Поведение пчел, находящихся у летка во время действия ЭП, сходно с поведением сторожей при нападении на семью врагов или грабителей. Но в отличие от сторожей эти пчелы отличаются по-

вышенной двигательной активностью. Они приближаются и вступают в кратковременные тактильные контакты не только с подлетающими пчелами, что характерно для сторожей, но и с особями, выходящими из улья. Тактильным контактам всегда сопутствует повышение локомоторной активности пчел.

На пороговые и близкие к ним напряженности ЭП пчелиная семья реагирует незначительным повышением интенсивности спектральных составляющих в диапазоне 400–500 Гц. Этот диапазон акустического шума пчелиной семьи связан с активизацией пчел [19]. Всего на 0.5–0.9 дБ возрастает интенсивность спектральных составляющих пчелиного шума в диапазоне 450 ± 50 Гц под действием ЭП напряженностью 1.5–2 кВ/м. При увеличении напряженности ЭП до 5 и 10 кВ/м интенсивность этих составляющих возрастает соответственно на 1.7–1.8 и 2.1–2.3 дБ (рис. 2а).

При высокой напряженности ЭП, достигающей 35 ± 3 кВ/м, сильному возбуждению пчел сопутствует значительное изменение интенсивности и спектральной структуры акустического шума пчелиной семьи. Частота пика интенсивности, локализуемого в области 400–500 Гц, повышается на 25–35 Гц, а общая интенсивность шума возрастает на 4–5 дБ. К исходному состоянию интенсивность и спектральная структура пчелиных звуков возвращаются через 3.6–4.2 ч после отключения ЭП [10, 19].

Активизации локомоций под действием ЭП сопутствует повышение температуры и выделения CO_2 (рис 2б,в). Незначительное повышение температуры (на 0.1–0.3°C) и CO_2 (на 0.05–0.1%) над центром расплодной зоны гнезда происходит под действием ЭП напряженностью 1.5–2 кВ/м. При повышении напряженности ЭП до 5 кВ/м температура и концентрация CO_2 в указанной зо-

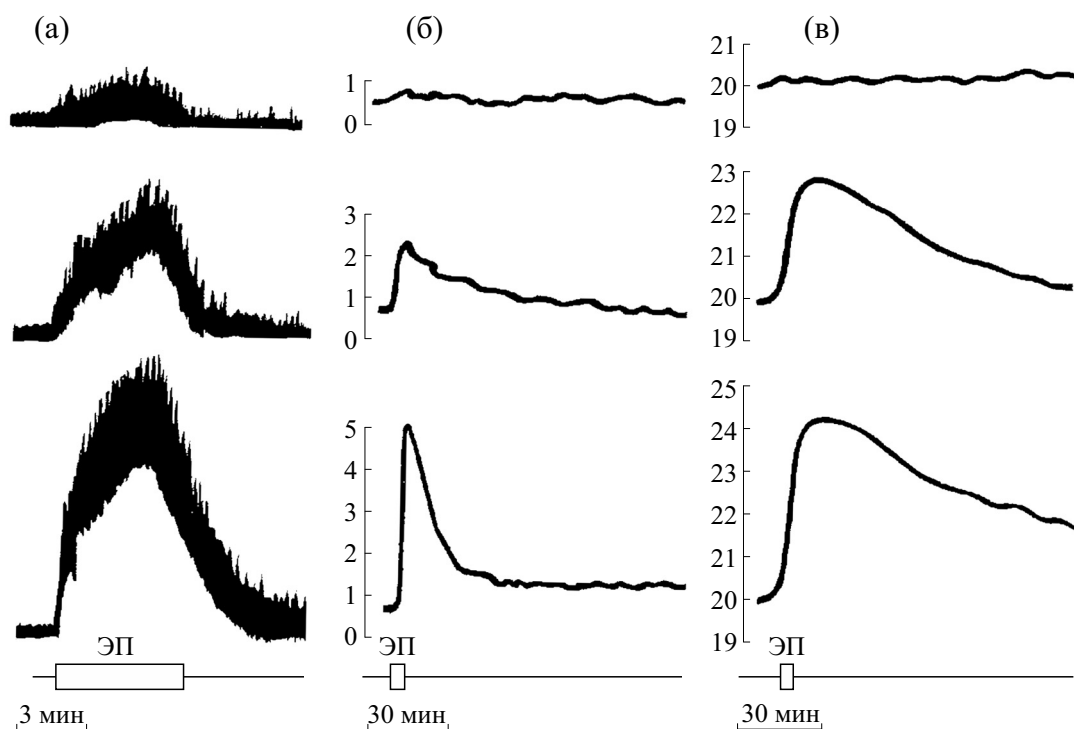


Рис. 2. Изменение интенсивности звуков, генерируемых пчелиной семьей в полосе 400–500 Гц (а), концентрации CO_2 в центре гнезда (б) и температуры над гнездом (в) под действием ЭП частотой 500 Гц при его напряженности 1.5–2 кВ/м (верхний ряд), 5 кВ/м (средний ряд) и 10 кВ/м (нижний ряд); ЭП – периоды действия поля [21].

не гнезда возрастает на $2.6\text{--}2.8^\circ\text{C}$ и $1.6\text{--}1.8\%$, а при 10 кВ/м – соответственно на $4.1\text{--}4.3^\circ\text{C}$ и $3.7\text{--}4.1\%$.

Значительные изменения микроклимата в пчелином гнезде происходят под действием ЭП напряженностью 20–25 кВ/м. На 10-минутное воздействие такого стимула температура в центре гнезда повышается на $7\text{--}9^\circ\text{C}$, а концентрация CO_2 – на $4.4\text{--}6.1\%$. Через 2–3 ч после отключения поля температура снижается всего на $0.5\text{--}1.3^\circ\text{C}$ и возвращается к исходному значению через 15–18 ч. Но концентрация CO_2 нормализуется всего за 50–70 мин.

Эффективность ЭП зависит от его генерации в форме пакетов импульсов или непрерывных синусоидальных колебаний. При подаче ЭП в импульсном режиме имеет значение скважность импульсации. В частности, ЭП частотой 300 Гц при напряженности 8 кВ/м, подаваемое в форме синусоидальных колебаний в течение 10 мин, стимулирует повышение температуры над гнездом пчелиной семьи на $2.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$. За такое же время ЭП, подаваемое в форме импульсов длительностью 30 мс со скважностью, равной 2, стимулирует повышение пчелами температуры на $1.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$, а при скважности, равной 10, – на $0.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ [21, 22].

Длительное действие ЭП не вызывает у пчел полного привыкания, хотя активность реагирования со временем уменьшается [10, 23]. Действие ЭП, напряженность которого примерно на порядок превосходит пороговое значение чувствительности, дестабилизирует внутригнездовую температуру. Например, у пчелиных семей, которые в течение 45 суток находились под крайней фазой линии электропередачи (ЛЭП) напряжением 500 кВ при напряженности ЭП около 7.5 кВ/м, температура в разных зонах гнезда скачкообразно повышалась на $2\text{--}4^\circ\text{C}$, а затем опускалась до исходных значений. Периоды подъема и понижения температуры не имели строгой упорядоченности. Продолжительность той и другой фаз находилась в пределах от нескольких минут до десятков часов.

ЭП ЛЭП влияет также на дестабилизацию концентрации CO_2 в разных зонах пчелиного гнезда. В дни, благоприятные для полетов, концентрация CO_2 в центральной части гнезда в течение ночи повышалась в среднем до $1.8 \pm 0.4\%$, а в прилетковой зоне – до $1.1 \pm 0.3\%$. К середине дня в центральной части гнезда происходило понижение концентрации CO_2 примерно в два раза, а в прилетковой – повышение в полтора раза. В то же самое время в гнездах семей, находившихся в 20–50 м от линии, суточные колебания температуры не выходили за пределы $0.23\text{--}0.37\%$ [23].

К специфическим реакциям пчел на длительное воздействие ЭП относится интенсивное покрытие воском и прополисом леткового прохода и примыкающих к нему частей улья. Такое поведение свойственно пчелам в конце лета — начале осени при подготовке к зимовке. Но в прилетковой зоне ульев, находившиеся в 10–14 м от крайней фазы ЛЭП и под нею, к концу лета пчелы накопили соответственно по 11 ± 1.3 и 37 ± 4.6 г воско-прополисовой смеси. В ульях семей, находившихся в это время в 50–60 м от ЛЭП, масса накопленной воско-прополисовой смеси составляла всего 0.9 ± 0.3 г [24]. Иногда пчелы семей, находящихся под ЛЭП, полностью заделывают прополисом летковые проходы, обрекая тем самым себя на гибель [25].

ЭП ЛЭП влияет на поведение пчел, вылетающих из ульев [23]. Им свойственна повышенная агрессивность и неупорядоченность вылетов большими группами, которые кружатся некоторое время на расстоянии нескольких метров от ульев. Вылеты этих пчел не связаны и не имеют сходства с ориентировочными и очистительными облетами, а полеты пчел-фуражиров отличаются пониженной продуктивностью. Так, если у фуражиров, возвращающихся в ульи, которые находились в 50–60 м от ЛЭП, масса содержимого медовых зобиков составляла 28.8 ± 3.9 мг, то под крайней фазой линии она была меньше примерно в полтора раза.

Пчелы, находящиеся у источника кома, покидают его под действием ЭП. Группы из 50–120 пчел, наполняющие медовые зобики 50–60%-м раствором сахарозы, под действием ЭП напряженностью 40–50 кВ/м взлетают в течение 3–10 с. Летающие пчелы кружатся между электродами и за их пределами, не проявляя признаков агрессии. После отключения ЭП пчелы в течение 0.5–1.5 мин вновь собираются на кормушке [10].

Поведение пчел у кормушки не меняется при десяти кратных включениях ЭП с 5-, 20- и 30-минутными интервалами. При длительном однократном включении ЭП пчелы, покормившись над кормушкой в течение трех-пяти минут, начинают возвращаться на нее и наполнять зобики. Этих пчел возбуждают взаимные соприкосновения и стимулируют взлеты. Но покормившись некоторое время, пчелы вновь возвращаются на кормушку.

На действие ЭП у пчел-фуражиров быстро вырабатывается отрицательный условный рефлекс. При наличии двух кормушек, расположенных на расстоянии 1 м, пчелы быстро начинают отличать кормушку, которая находится в ЭП. Для выработки отрицательного рефлекса достаточно 8–14 включений ЭП. После этого все пчелы, которым известно место подкормки, начинают игно-

рировать кормушку, подвергаемую действию ЭП, и собираются на соседней кормушке.

Осы. У ос, находящихся в гнезде, резкое повышение двигательной активности стимулирует ЭП напряженностью 1–2 кВ/м. Возбуждение взрослых особей происходит в процессе тактильных контактов. Повышение локомоций приводит к повышению внутригнездовой температуры на $0.6–0.9^\circ\text{C}$ [18].

В отличие от пчел, у ос увеличение напряженности ЭП не приводит к повышению внутригнездовой температуры, потому что активизировавшиеся осы вылетают из гнезда. Под действием ЭП напряженностью 6–8 кВ/м все взрослые осы покидают гнездо в течение одной-трех минут. Поэтому температура в гнезде понижается.

Осы, вылетающие из гнезда, кружатся у его леткового входа. Летающие осы не проявляют признаков агрессии. После отключения ЭП осы в течение двух-трех минут возвращаются в гнездо. Многократные повторные включения ЭП стимулируют стереотипные реакции ос без выраженных признаков адаптации.

Муравьи. Обнаружено специфическое реагирование муравьев на ЭП частотой от 50 до 500 Гц при размещении одного из электродов (металлической пластины размером 40×40 см) над муравейником параллельно поверхности почвы и заглублении в почву на 40 см второго электрода [20]. В зависимости от напряженности ЭП поведение муравьев существенно изменяется. В частности, через 7–10 с после включения ЭП напряженностью 7–10 кВ/м происходит замедление локомоций муравьев, находившихся на поверхности муравейника. В дальнейшем некоторое повышение активности муравьев, выражающееся в нормализации их поведения, происходит через 15–20 мин после выключения ЭП.

Под действием ЭП напряженностью 9–11 кВ/м муравьи, вышедшие из муравейника, замедляют движение. Это сходно с поведением пчел, оказавшихся на поверхности металлической пластины, подключенной к конденсатору, заряженному от постоянного источника тока напряжением 300 В [18]. Но, в отличие от пчел, муравьи, медленно передвигаясь к вершине холмика, останавливаются и принимают динамические позы угрозы — переворачиваются на спинку и поднимают вверх брюшко. Такую позу муравьи удерживают в течение одной-трех минут, а затем продолжают движение к вершине холмика.

Повышение напряженности ЭП до 24–26 кВ/м активизирует у муравьев оборонительные реакции. Муравьи собираются на вершине муравейника, поднимают вверх брюшко и выбрызгивают струйки кислотного секрета, что используется обычно для защиты от нападения врагов. Но эта типичная защитная реакция при

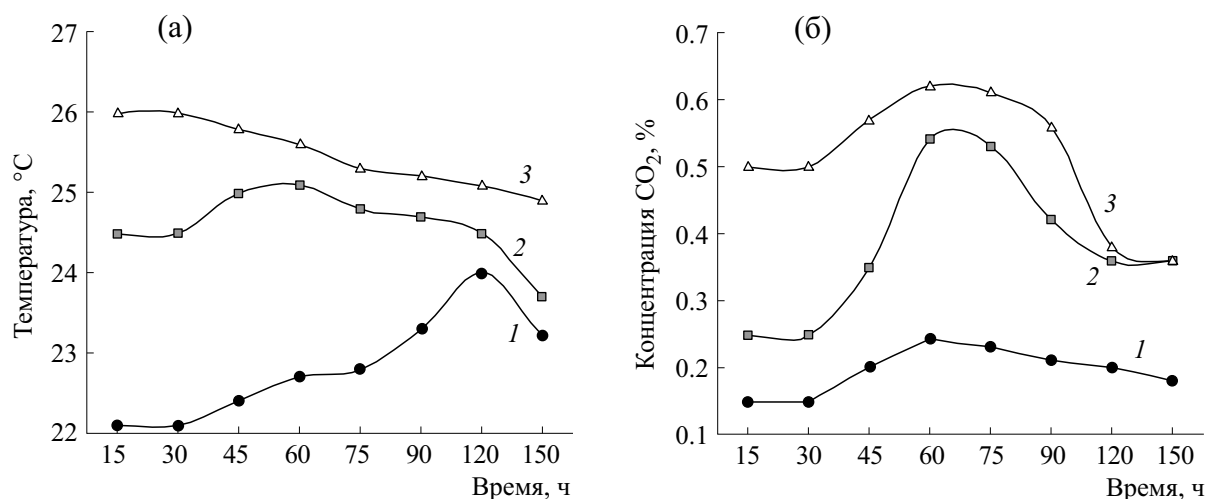


Рис. 3. Изменение температуры (а) и концентрации CO₂ (б) на глубине 10 (кривая 1), 20 (кривая 2) и 40 мм (кривая 3) от вершины муравейника на ЭП напряженностью 10 кВ/м, включенного с 30-й по 60-ю минуту (по работе [20], с изменениями).

воздействию ЭП дополняется взаимной агрессивностью муравьев, приводящей к гибели части из них. За 15 мин действия ЭП погибало около 3% особей, собиравшихся на вершине муравейника. Этого не наблюдается при разорении муравейника, активизирующего защитные реакции муравьев.

В муравейнике под действие ЭП происходит изменение температуры и содержания CO₂ (рис. 3). При температуре внешнего воздуха и поверхности муравейника в пределах 19–23°C под влиянием тридцатиминутного воздействия ЭП напряженностью 10 кВ/м температура в средней части холмика повышается в среднем на $1 \pm 0.15^\circ\text{C}$, в верхней — на $0.5 \pm 0.09^\circ\text{C}$, а в нижней — опускается на $0.3 \pm 0.06^\circ\text{C}$. В течение 15 мин после отключения ЭП температура в верхней части холмика понижается на $0.2 \pm 0.07^\circ\text{C}$, в средней — на $0.8 \pm 0.14^\circ\text{C}$ и в нижней — на $0.7 \pm 0.12^\circ\text{C}$. В последующие 30–45 мин активному передвижению муравьев в глубь муравейника и из него на поверхность холмика сопутствуют периоды повышения, а затем понижения температуры (рис. 3а).

Динамике температуры в муравейнике под действие ЭП сопутствует изменение концентрации CO₂ (рис. 3б). За 30 мин действия ЭП содержание CO₂ в верхней и средней частях холмика возрастает примерно в два раза. После отключения ЭП концентрация CO₂ возвращается к исходному уровню через 40–60 мин. В нижней части холмика в период действия ЭП содержание CO₂ возрастает в среднем в 1.2 раза, а через 40–50 мин после отключения поля уменьшается в 1.6 раза.

Сходные изменения температуры и содержания CO₂ в муравейнике происходили под действием ЭП напряженностью 25 кВ/м. Эти изменения происходят примерно в таких же пределах, как при воздействии ЭП напряженностью 10 кВ/м, но с большей скоростью, что обуславливалось активизацией локомоций.

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, СОПУТСТВУЮЩИЕ ГЕНЕРАЦИИ ЭП

К процессам, сопутствующим генерации ЭП, относится возникновение магнитного поля (МП) и увеличение концентрации аэроионов. Возможны также вибрации опорных субстратов (стенок ульев, сотов и др.), на которых находятся пчелы. По некоторым сведениям пчелы, изолированные от семьи, предпочитают локализоваться в области повышенного магнитного потока [26]. Порог чувствительности пчел к МП находится на уровне 260 мТл [27]. Имеются сведения, согласно которым, отрицательные аэроионы влияют на повышение двигательной активности пчел [28,29].

Магнитное поле. Величина магнитного поля, сопутствующего действию ЭП, определяется вы-

ражением $B = \frac{\pi f r}{C^2} E \sin(2\pi f t)$, где r — расстояние до прямой, проходящей через центры электродов (металлические пластины, размером 40×40 см); f — частота ЭП; E — его напряженность; C — скорость света; t — время [30]. Отсюда при воздействии на семью ЭП частотой 500 Гц и напряженностью 15 кВ/м величина МП составляет около $1.3 \cdot 10^{-10}$ Тл, или $1.3 \cdot 10^{-6}$ Гс. МП Земли на средних широтах приближается к 0.5 Гс, а его суточные вариации достигают 10^{-3} Гс [31], что пример-

но на три порядка превышает МП, возникающее при генерации ЭП напряженностью 15 кВ/м.

На суточные вариации МП Земли реагируют пчелы-сигнальщицы (танцовщицы). Они в течение дня «ошибаются» в указании направления на указываемую цель полета, отклоняя от нее до 30–35° направление прямолинейного пробега. Роль влияния вариаций МП на «ошибки» пчел-сигнальщиц доказана тем, что в случае компенсации МП Земли до 0–5% угол максимального отклонения направления от реального уменьшается в среднем в 3.4 раза [32].

Но на МП, соответствующие пороговым значениям чувствительности пчел и ос, эти насекомые не реагируют. Не обнаружено, чтобы пчелы, содержащиеся по 200 особей в стеклянных цилиндрах, помещаемых в соленоид, реагировали на МП частотой 50–1000 Гц, индукция которого достигала 10 Гс [33]. Это на 10^7 или 10^8 превосходило индукцию МП, которая сопутствует генерации ЭП, стимулирующей активное реагирование пчел или ос.

Ионизация. При воздействии на пчелиную семью ЭП напряженностью 15 кВ/м в течение 15 мин концентрация легких, средних и тяжелых ионов с подвижностью свыше 0.001 см/(В с) не превышает $5 \cdot 10^3/\text{см}^3$ (измерение проведено счетчиком аэроионов ИТ-8401).

Судя по внутригнездовой температуре, интенсивности и спектральной структуре звуков, генерируемых пчелами, они не реагировали на искусственное (создаваемое тритиевым ионизатором) увеличение в улье концентрации аэроионов до $2 \cdot 10^6/\text{см}^3$ [33]. Осы также не реагировали на ионизацию внутригнездового пространства.

Вибрации опорного субстрата. Отношение пчел к вибрациям опорного субстрата прослежено на пчелах, содержащихся примерно по 200 особей в энтомологических садках размером 13 × 116 см. Зависимость колебаний деревянных стенок садков от частоты и напряженности ЭП выражается уравнением $A = 0.036A_1 f^2$, где A — амплитуда вибро смещения, A_1 — изменение амплитуды виброускорения, f — частота ЭП.

При действии ЭП частотой 500 Гц и напряженностью 15 кВ/м амплитуда вибро смещения стенок садка составляла 0.18 ± 0.02 нм. Такие вибрации опорного субстрата не возбуждают пчел. У них порог чувствительности к колебаниям опорного субстрата на частоте 500 Гц составляет около 5 нм [34]. Но это стимулирует у пчел не активизацию, а торможение локомоций [21].

У ос чувствительность субгенуальных органов к вибрациям опорного субстрата примерно в три раза ниже, чем у пчел [35]. Поэтому осы, как и пчелы, не могут воспринимать колебания опор-

ного субстрата, возникающие под действием ЭП, напряженность которого многократно превосходит порог чувствительности к этому стимулу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природные ЭП и МП существовали на Земле задолго до появления на ней жизни. В процессе ее зарождения и эволюции эти физические факторы, взаимодействуя с биоэлектрическими процессами, оказывали влияние на состояние и функционирование организмов.

К флуктуациям некоторых естественных ЭП животные приобрели адаптацию, что выражается, например, в реагировании пчел и муравьев на усиление атмосфериков, происходящее при приближении грозового фронта. Для этих насекомых усиление атмосфериков служит сигналом приближения неблагоприятных погодных условий, что стимулирует у пчел инстинкт хоминга, а у муравьев — защиты муравейника от дождя [9, 12].

Преимущественно неадекватно по отношению к экологической ситуации пчелы, осы и муравьи реагируют на интенсивные искусственные ЭП антропогенной природы. Низкочастотные ЭП высокой напряженности стимулируют у них различные аномалии поведения. Насекомые резко активизируются, покидают свои жилища и проявляют немотивированную агрессивность. У пчел некоторое проявление адаптации к ЭП высокой напряженности при длительном воздействии выражается в обеспечении электрической изоляции леткового прохода, который усиленно покрывается воско-прополисовой смесью [23, 24]. Это защищает пчел, находящихся под ВЛ ЛЭП, от раздражения наведенными токами при соприкосновениях с поверхностью леткового прохода. На теле пчелы, подлетающей к улью под ЛЭП с напряжением 500 кВ, наводится ток около $4 \cdot 10^{-4}$ нА, а под ЛЭП с напряжением 750 кВ — $3 \cdot 10^{-3}$ нА [35].

В восприятии насекомыми ЭП участвуют специализированные механорецепторы и/или неспецифические структуры. Один из механизмов восприятия ЭП основан на притяжении или отталкивании под действием кулоновских сил первичных преобразователей механорецепторных органов, реагирующих на смещение. Под действием низкочастотных ЭП колеблются антенны и волоски быстроадаптирующихся трихонидных сенсилл, выполняющих у пчел функцию фонорецепторов [37].

Минимальная напряженность однородного ЭП, отклоняющего волосок быстроадаптирующейся трихонидной сенсиллы пчелы на 1°, составляет 20–25 кВ/м. Рост неоднородности ЭП, связанный, например, со сближением головами двух или более пчел, увеличивает угол отклонения во-

лосков. При сближении головами двух пчел их волоски отклоняются на 1° при напряженности 7–10 кВ/м [38, 39]. Очевидно, что поэтому одна пчела, находясь на электрически изолированной поверхности, не реагирует, а две реагируют на ЭП напряженностью 50 кВ/м.

Колебания антенн насекомых воспринимается джонстоновыми органами. У пчел при одинаковой напряженности ЭП максимальное отклонение антенн происходит под действием ЭП частотой 50 Гц. На этой частоте при напряженности 5, 7 и 10 кВ/м антенны отклоняются соответственно на 2, 3 и 6° . Накопление статического заряда на теле пчел, связанное с их активизацией, влияет на увеличение угла отклонения антенн [21]. Поэтому ЭП высокой напряженности может восприниматься джонстоновыми органами антенн.

Неспецифический механизм восприятия ЭП основан на раздражении насекомых наведенными токами, протекающими в местах их контактирования между собой и/или токопроводящими поверхностями. Частотная характеристика чувствительности к ЭП определяется в основном величиной наводимого им тока и эффективностью его контактного действия. Поскольку ток наводится в покровах тела, характеризующихся высоким сопротивлением, то величина наводимого тока нелинейно связана с частотой ЭП. Вероятнее всего, наводимый ток достигает максимума на частоте около 500 Гц, что согласуется с областью наибольшей чувствительности к ЭП, хотя чувствительность к току с понижением частоты возрастает [22]. Но под действием постоянного ЭП ток не наводится. Поэтому пчелы не реагируют на ЭП постоянного тока [21].

Высокая вариабельность чувствительности к ЭП связана с действием ряда случайных факторов. К ним относится изменчивость величины контактного тока. Она во многом зависит от электропроводности контактирующих поверхностей, которая определяется их свойствами и состоянием. В местах контакта могут находиться вещества различной электропроводности: корм, частицы пыли, воска, прополиса и т. п. Кроме того, с увеличением общей массы агрегирующихся пчел возрастает величина наводимого тока. В зонах скопления пчел создаются значительные локальные градиенты напряженности, которые можно рассматривать как вторичные поля, выступающие в роли дополнительных стимуляторов возбуждения. По этой причине взаимные ужаления происходят в местах больших скоплений пчел. Повышению их агрессивности способствует наличие в ЭП токопроводящих тел. Рефлекс ужаления стимулирует изолированный проводник, на который подается напряжение, составляющее всего несколько десятков вольт.

С раздражением пчел и муравьев наведенными токами связана модификация их поведения перед грозой. На расстоянии 50 км от грозового фронта напряженность пульсаций ЭП может достигать 10 кВ/м [13, 40], что превышает порог чувствительности к этому стимулу. С приближением грозового фронта у пчел-фуражиров, находящихся на цветках, возрастает частота прерывания наполнений зобика [41]. Это стимулирует у пчел повышение агрессивности и возвращение в ульи. У муравьев раздражение наведенными токами ассоциируется с опасностью, стимулирующей закрытие входных отверстий в муравейнике.

Таким образом, пчелы, осы и муравьи реагируют на искусственные низкочастотные ЭП высокой напряженности, хотя не обладают для этого специализированными рецепторами. Но, используя преимущественно неспециализированные средства восприятия ЭП, пчелы приобрели инстинкты хоминга, а муравьи — защиты муравейника перед ненастной погодой. Предвестниками непогоды служат у пчел и муравьев атмосферические, интенсивность которых возрастает при приближении грозового фронта, усиливающего вариации напряженности ЭП. Пчелы, обладая совершенными средствами связи, изменяют указание координат источника корма соответственно суточным вариациям магнитного поля Земли.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. С. Пресман, *Электромагнитные поля и живая природа* (Наука, М., 1968).
2. Ю. В. Сербант и М. П. Троянский, *Радиоволны и живой организм* (Знание, М., 1969).
3. А. П. Дубров, *Геомагнитное поле и жизнь* (Гидрометеоиздат, Л., 1974).
4. Ю. А. Холодов, *Реакции нервной системы на электромагнитные поля* (Наука, М., 1975).
5. О. В. Белянский, М. Б. Голант и Н. Д. Девятков, *Миллиметровые волны в биологии* (Знание, М., 1988).
6. Е. К. Еськов, *Успехи соврем. биологии* **123** (3), 195 (2003).
7. Е. К. Еськов и А. И. Торопцев, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **15** (5), 500 (1979).

8. Е. К. Еськов, Изв. АН СССР. Сер. биол., № 1, 135 (1982).
9. Е. К. Еськов, *Жилища насекомых* (Знание, М., 1983).
10. Е. К. Еськов, *Экология медоносной пчелы* (Русское слово, Рязань, 1995).
11. Г. М. Длусский, *Муравьи рода Formica* (Наука, М., 1967).
12. В. К. Дмитриенко и Е. С. Петренко, *Муравьи таежных биоценозов Сибири* (Наука, М., 1976).
13. Дж. А. Чалмерс, *Атмосферное электричество* (Гидрометеиздат, Л., 1974).
14. Е. К. Еськов, *Биофизика* **63** (3), 561 (2018).
15. Е. К. Еськов и А. М. Сапожников, Изв. АН СССР. Сер. биол., № 3, 395 (1979).
16. Е. К. Еськов, *Зоол. журн.* **64** (4), 606 (1985).
17. Е. К. Еськов, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **17** (2), 178 (1981).
18. Е. К. Еськов, *Экология*, № 6, 76 (1982).
19. Е. К. Еськов, *Акустическая сигнализация общественных насекомых* (Наука, М., 1979).
20. Е. К. Еськов, *Экология*, № 1, 60 (1997).
21. Е. К. Еськов, *Этология медоносной пчелы* (Колос, М., 1992).
22. Е. К. Еськов и А. М. Сапожников, *Биофизика* **24** (4), 780 (1979).
23. Е. К. Еськов и Н. И. Брагин, *Журн. общ. биологии* **47** (6), 823 (1986).
24. Е. К. Еськов и Н. И. Брагин, *Пчеловодство*, № 2, 9 (1986).
25. U. Warnke and R. Paul, *Umschau*, № 3, 415 (1975).
26. W. E. Caldwell and F. Russo, *J. Genet. Physiol.* **113** (2), 233 (1968).
27. M. M. Walker and M. E. Bitterman, *J. Exp. Biol.* **145**, 489 (1989).
28. А. Л. Чижевский, в сб. *Труды практической лаборатории по зоопсихологии* (М. 1928), вып. 1, сс. 42–47.
29. G. Altman and U. Warnke, *Apidologie* **2** (4), 309 (1971).
30. Р. Фейман, Р. Лейтон и М. Сендлс, *Феймановские лекции по физике* (Мир, М., 1966), т. 6, сс. 201–207.
31. Н. Г. Бочкарев, *Магнитное поле в космосе* (Наука, М., 1985).
32. M. Lindauer and H. Martin, *Z. Vergl. Physiol.* **60**, 219 (1968).
33. Е. К. Еськов и Г. А. Миронов, *Экология*, № 6, 81 (1990).
34. H. F. Little, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **55**, 82 (1962).
35. H. Autrum and W. Schneider, *Z. Vergl. Physiol.* **31** (1), 77 (1948).
36. V. P. Bindokas and B. Grenderg, *Dioelectromagnetics* **5**, 305 (1984).
37. Е. К. Еськов, *Биофизика* **20** (4), 646 (1975).
38. Е. К. Еськов и Г. А. Миронов, *Докл. АН СССР* **309** (1), 233 (1989).
39. Е. К. Еськов и Г. А. Миронов, *Биофизика* **35** (4), 675 (1990).
40. M. Friedmann, *Electrotechnik und Masghinenbau* **91** (10), 510 (1975).
41. L. Schua, *Z. Vergl. Physiol.* **34**, 258 (1952).

Perception and Specificity of Behavioral Effects observed in Honey Bees, Paper Wasp, and Red Wood Ants in Response to Low Frequency Electric Field

E.K. Eskov

Russian State Agricultural Correspondence University, ul. Yu. Fuchika 1, Balashicha, Moscow Region, 143900 Russia

Bees, wasps and ants have no specialised receptors for electroreception. An adequate response to naturally occurring electric charge in bees and ants is related to the effects of atmospherics produced due to less distant thunderstorms. Perception of low-frequency high-voltage electric field in insects involves activation of primary transduction elements of mechanoreceptors reflecting their movements. The nonspecific mechanism of electroreception is triggered when insects while in contact with each other and / or electrically conductive surfaces are stimulated with electric fields. The frequency response of the sensitivity to electric fields is determined mainly by the magnitude of the electric current used and its intensity between insect bodies and/or conductive material. The magnitude of the current used for the insect body is nonlinearly related to the electric field frequency. The region with the highest sensitivity to electric field is at about 500 Hz, which is consistent with the maximum value of the current used. Herewith, the threshold of sensitivity to electric field in wasps and bees are about 0.04 kV/m and 0.45 kV/m, respectively. Ants exposed to electric fields ranging between 7–10 kV/m show impairment in locomotion. The magnetic fields and ionization associated with the generation of electric fields up to 15–20 kV/m do not stimulate behavioral changes in bees.

Keywords: bees, wasps, ants, electric field, sensitivity, behavior anomalies, adequate response

КИНЕТИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ И ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ В МИОКАРДЕ ЖЕЛУДОЧКОВ СПОНТАННО-ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ ISIAH

© 2020 г. А.А. Балакин, О.Н. Лукин, Д.А. Кузнецов, Ю.Л. Проценко

*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,
Екатеринбург, 620049, ул. Первомайская, 106*

E-mail: virus_x@mail.ru

Поступила в редакцию 03.10.2019 г.

После доработки 13.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

На многоклеточных препаратах миокарда правого и левого желудочков здоровых контрольных крыс и крыс с врожденной артериальной гипертензией показана зависимость кинетики внутриклеточного кальция и длительности потенциала действия кардиомиоцитов от возраста животных. В препаратах миокарда контрольных и гипертензивных крыс кинетика спада свободного внутриклеточного кальция с возрастом замедляется, а различия между группами минимизируются. При этом сглаживается фаза кратковременного замедления спада внутриклеточного кальция, отчетливо выраженная в правом желудочке молодых гипертензивных крыс. С возрастом длительность реполяризации в кардиомиоцитах обоих желудочков у крыс контрольной и спонтанно гипертензивной групп уменьшается, однако в препаратах правого желудочка контрольных крыс она всегда остается большей по отношению к миокарду гипертензивных крыс. Таким образом, впервые экспериментально получены данные о возрастной динамике некоторых характеристик электромеханического сопряжения в миокарде крыс с врожденной артериальной гипертензией, которые свидетельствуют о развитии спонтанной гипертрофии, вероятно, вызванной активацией ренин-ангиотензиновой системы.

Ключевые слова: миокард; возраст; гипертензия; кинетика свободного внутриклеточного кальция; потенциал действия.

DOI: 10.31857/S0006302920030187

Длительное действие гипертензии является одной из основных причин развития гипертрофии сердца и сердечной недостаточности. Существует несколько экспериментальных моделей развития артериальной гипертензии, и, как правило, у большинства моделей механизмы инициации гипертензии запускаются практически сразу после воздействия (инъекции активных веществ, различные перевязки и т.д.). Относительно недавно появились линии крыс с генетически обусловленной гипертензией, которая развивается постепенно. Одна из таких линий — это широко известная линия спонтанно-гипертензивных крыс (SHR), вторая — выведенная в

России линия с генетически обусловленной стресс-чувствительной артериальной гипертензией (ISIAH — Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension) [1, 2]. Представляет интерес исследовать изменения биофизических характеристик миокарда крыс линии ISIAH в ходе развития гипертензии.

Известно, что гипертрофия проявляется рядом изменений в системе электромеханического сопряжения возбуждения с сокращением миокарда и, в частности, в изменении длительности потенциала действия и кинетики свободного Ca^{2+} в миоцитах [3]. Также на кинетику Ca^{2+} и длительность потенциала действия влияет и возраст [4]. Для того чтобы сопоставить данные изменений кинетики цитозольного Ca^{2+} и длительности потенциала действия от возраста и постепенного развития гипертрофии, исследование проводили на самцах крыс двух возрастов — полутора- и семимесячных. В качестве контрольных (нормотензивных) животных использовали крыс

Сокращения: SHR — линия спонтанно-гипертензивных крыс (Spontaneously Hypertensive Rats), ISIAH — линия крыс с генетически обусловленной стресс-чувствительной артериальной гипертензией (Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension), WAG — линия нормотензивных крыс Wistar Albino Glaxo, WKY — линия нормотензивных крыс Wistar-Kyoto, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — ионы несвязанного цитозольного кальция.

линии WAG (Wistar Albino Glaxo), в качестве экспериментальных (гипертензивных) — крыс линии ISIAH с генетически обусловленной стресс-чувствительной артериальной гипертензией. Поскольку электромеханическое сопряжение в миокарде крыс линии ISIAH практически не изучено, учитывая экспериментально подтвержденную содружественность функций желудочков [5–8], можно ожидать развитие гипертрофии обоих отделов сердца. В связи с этим мы исследовали изолированные препараты правого и левого желудочков сердца животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на самцах крыс двух возрастных групп — полутора и семи месяцев. Исследованы сердечные мышцы нормотензивных крыс линии WAG и гипертензивных крыс линии ISIAH; полученные данные сопоставлены друг с другом, а также с имеющимися литературными данными для крыс линии SHR. Поскольку у генетически модифицированных крыс гипертензия развивается постепенно, то исследования проводили на изолированных папиллярных мышцах и трабекулах правого (RV) и левого (LV) желудочков сердец крыс линий WAG и ISIAH для указанных выше возрастов: ISIAH 1.5 мес. ($n = 14$), WAG 1.5 мес. ($n = 9$), ISIAH 7 мес. ($n = 8$), WAG 7 мес. ($n = 14$). Для исследования и анализа сформированы восемь групп исходя из линии, возраста и отдела сердца: WAG(1.5)-RV, ISIAH(1.5)-RV, WAG(7)-RV, ISIAH(7)-RV, WAG(1.5)-LV, ISIAH(1.5)-LV, WAG(7)-LV, ISIAH(7)-LV.

Артериальное давление у крыс регистрировали плетизмографическим методом. Измерение проводили на наркотизированных самцах крыс линий ISIAH и WAG семимесячного возраста с использованием аппаратного комплекса PowerLab-30 Series (ADInstruments, США) и программного комплекса LabChart 7 (ADInstruments, США). В группах молодых крыс измерение давления представляет сложности в связи с малыми размерами животных, что приводит к высокой вариабельности данных. Перед процедурой измерения артериального давления крысам внутримышечно вводили препарат ксилазин в дозе 0.6–0.8 мл/кг, через 10–15 мин внутримышечно вводили золетил 50 в дозе 0.06 мл/кг внутримышечно. Это позволяло ввести животных в состояние поверхностного наркоза и устранить помехи, обусловленные мышечной активностью, регистрируемые пульсоксиметрическим датчиком у активных животных.

Затем животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, извлекали сердце и помещали в препаративную ванночку с раствором Кребса–Хенселейта (в mM): NaCl — 118,

KCl — 4.7, $MgSO_4$ — 1.2, $NaHCO_3$ — 14.5, KH_2PO_4 — 1.2, $CaCl_2$ — 2.5, глюкоза — 11.1 при pH 7.35 и насыщении смесью 95% O_2 + 5% CO_2 . В раствор добавляли 30 mM 2,3-бутандион моноксима для предотвращения повреждения препаратов миокарда при их иссечении. Из правого желудочка сердца вырезали тонкие папиллярные мышцы и трабекулы, из левого — только папиллярные мышцы. Извлеченные препараты миокарда перемещали в экспериментальную ванну с проточным раствором Кребса при насыщении смесью 95% O_2 + 5% CO_2 . Измерения выполняли при длине препаратов миокарда, равной 95% от максимальной, температуре 25°C и частоте электрической стимуляции 0.33 Гц.

Для регистрации свечения несвязанного внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в кардиомиоцитах сердечной мышцы использовали кальцийсвязывающий флуоресцентный краситель fura-2/AM (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 4 мкМ и специальный агент Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, США), способствующий проникновению флуорофора сквозь саркоплазматическую мембрану, в концентрации 0.2%. Перфузию этим раствором проводили в течение 1 ч, после чего омывающий раствор вновь заменяли на стандартный раствор Кребса без флуорофора. Измерения начинали через 30 мин после замены раствора. Оптическую регистрацию свечения флуорофора в многоклеточном препарате выполняли с помощью системы для исследования мышечной активности Muscle Research System (Scientific Instruments GmbH, Германия) на базе инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения флуорофора fura-2/AM использовали широкополосную ртутную лампу и систему вращающихся узкополосных светофильтров с длиной волны пропускания 340 и 380 нм (Scientific Instruments GmbH, Германия). Световой поток эмиссии флуорофора направляли на светоделительный кубик с полосой пропускания 510/590 нм (FilterSet #21HE, Carl Zeiss, Германия).

Регистрацию мембранного потенциала в клетках изолированной сердечной мышцы осуществляли с помощью плавающих стеклянных микроэлектродов с использованием системы Intracellular Electrometer IE-210 (Warner Instrument Corporation, США). Микроэлектроды были получены с помощью пуллера KOPF needle/pipette puller, model 730 (David KOPF Instruments, США), заполнены 3 M раствором KCl и с помощью вставленной внутрь хлорсеребряной проволоки прикреплены к выносному блоку согласователя измерительной системы.

Измерительные и задающие периферийные устройства через АЦП/ЦАП PCI-1716S (AdLink

Морфометрические показатели сердец нормотензивных (WAG) и гипертензивных (ISIAN) крыс для двух возрастных групп (полтора и семь месяцев)

Показатели	Группа			
	ISIAN, 1.5 мес., $n = 14$	WAG, 1.5 мес., $n = 9$	ISIAN, 7 мес., $n = 8$	WAG, 7 мес., $n = 14$
Масса тела, г	187.5 (170.0; 196.0) * #	159.0 (154.0; 170.0) * ##	398.0 (374.0; 416.0) #	374.5 (358.0; 393.00) ##
L_{tibia}	31.25 (29.30; 31.80) * #	27.80 (26.95; 28.30) * ##	42.40 (41.45; 43.20) ** #	39.95 (38.70; 41.40) ** ##
Масса сердца, г	0.6791 (0.5917; 0.7287) * #	0.5294 (0.5222; 0.5720) * ##	1.0967 (1.0547; 1.1672) ** #	0.8367 (0.7882; 0.9505) ** ##
Отношение массы сердца к массе тела, г/г	0.0037 (0.0033; 0.0040) * #	0.0034 (0.0033; 0.0034) * ##	0.0028 (0.0027; 0.0029) ** #	0.0023 (0.0022; 0.0024) ** ##
Отношение массы сердца к L_{tibia} , г/мм	0.0213 (0.0189; 0.0241) #	0.0192 (0.0187; 0.0194) ##	0.0254 (0.0250; 0.0274) ** #	0.0212 (0.0208; 0.0233) ** ##
$P_{сис}$, мм рт. ст.	—	—	169.3 (142.7; 194.3) **	114.7 (104.3; 123.0) **

Примечание. Данные представлены в следующем виде: медиана (нижний квартиль, верхний квартиль); L_{tibia} — длина берцовой кости, $P_{сис}$ — систолическое артериальное давление крови в хвостовой артерии. Различия статистически значимы (U -тест Манна-Уитни, $P < 0.05$): * — между группами ISIAN 1.5 мес. и WAG 1.5 мес., ** — между группами ISIAN 7 мес. и WAG 7 мес., # — между группами ISIAN 1.5 и 7 мес., ## — между группами WAG 1.5 и 7 мес.

Technology Inc., Тайвань) были связаны с персональным компьютером для регистрации сигналов с временной дискретностью 0.1 мс. Для онлайн-измерения использовали собственный пакет программного обеспечения, работа которого была реализована в подсистеме реального времени HyperKernel (Arc Systems Ltd., Япония), интегрированной в ОС Windows XP.

Экспериментальные данные были проверены на нормальность распределения с использованием тестов Колмогорова—Смирнова и Лиллифорса, Шапиро—Уилка и анализа асимметрии и эксцесса. Полученные нами данные не имели нормального распределения, поэтому для статистической оценки результатов были использованы непараметрические методы оценки статистической значимости различий между группами животных (U -тест Манна—Уитни и односторонний дисперсионный анализ Краскела—Уоллиса для множественных сравнений), различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Артериальное систолическое давление и морфометрия миокарда. Для оценки степени гипертрофии сердца проведены неинвазивные измерения систолического артериального давления крови в хвостовой артерии, а также проанализированы

морфометрические показатели сердец животных. У семимесячных крыс линии ISIAN обнаружено достоверное превышение артериального давления приблизительно в полтора раза по сравнению с крысами группы WAG того же возраста (таблица). Одним из признаков гипертрофии является утолщение стенки желудочков и увеличение их массы [9, 10]. В полуторамесячном возрасте медианное значение массы сердца крыс линии ISIAN составляло 0.68 г и к семимесячному возрасту достигло 1.1 г, в то время как у крыс линии WAG медианное значение массы сердца составляло 0.53 г и 0.8 г соответственно (различия достоверны между группами для каждого возраста, $P < 0.05$). Мы обнаружили, что индекс отношения массы сердца к массе тела больше у крыс линии ISIAN по сравнению с крысами линии WAG и с возрастом различия стали еще существеннее (0.0037 против 0.0034 в полуторамесячном возрасте и 0.0028 против 0.0023 — в семимесячном возрасте, см. таблицу). Таким образом, возрастной прирост массы сердца, нормированной на вес тела, в группе спонтанно-гипертензивных крыс превышает прирост в контрольной группе, что можно объяснить развитием гипертрофии сердца в группе ISIAN. Индекс отношения массы сердца к длине берцовой кости также больше у крыс линии ISIAN и с возрастом различия также усилились (0.0213 против 0.0192 в полуторамесячном воз-

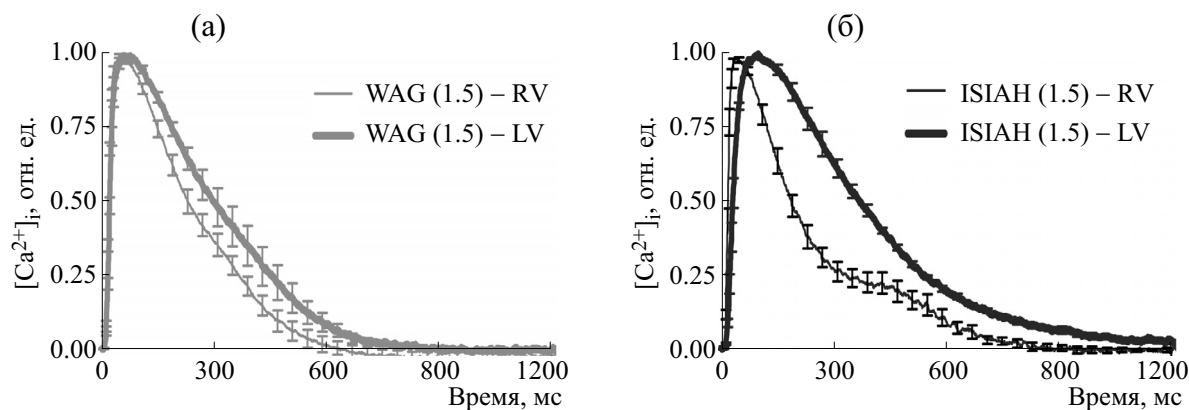


Рис. 1. Сопоставление кривых кинетики несвязанного цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) для препаратов миокарда правого и левого желудочков сердец полутрехмесячных нормотензивных (линия WAG) (а) и гипертензивных (линия ISIAH) (б) крыс. Измерения выполнены при длине мышцы 95% от оптимальной длины. Кривые нормированы на собственный максимум, диастолический уровень вычтен. Данные приведены как среднее для всех препаратов группы $\pm$ ошибка среднего.

расте и 0.0254 против 0.0212 — в семимесячном возрасте), что свидетельствует о прогрессировании гипертрофии сердца спонтанно-гипертензивных крыс наряду с возрастными изменениями.

Кинетика несвязанного внутриклеточного кальция. Кинетику несвязанного кальция в цитозоле регистрировали в стимулируемых изометрически сокращающихся изолированных многоклеточных препаратах миокарда при длине 95% от максимальной. Следует отметить, что абсолютные величины интенсивности свечения существенно зависят от: 1) геометрических размеров препарата, 2) длительности окраски препарата флуорофором, 3) качества окраски препарата флуорофором. Для исключения влияния указанных факторов мы сопоставляли нормированные на собственный максимум кривые интенсивности свечения флуорофора fura-2/AM при вычитенном диастолическом уровне, полученные в каждом препарате. Это позволило выявить особенности в кинетике $[Ca^{2+}]_i$ для препаратов миокарда различных групп животных.

Было обнаружено, что у крыс линии WAG полутрехмесячного возраста длительности фазы нарастания кальциевых переходов ($[Ca^{2+}]_i$) в препаратах миокарда правого и левого желудочков совпадают (рис. 1а). При этом у крыс линии ISIAH фаза нарастания $[Ca^{2+}]_i$ в миокарде левого желудочка более чем в два раза длиннее по сравнению с миокардом правого желудочка. У обеих линий животных полутрехмесячного возраста время спада $[Ca^{2+}]_i$ от пика до уровня <5% амплитуды $[Ca^{2+}]_i$ в миокарде левого желудочка было существенно больше, чем в миокарде правого желудочка. При этом такое увеличение времени спада

$[Ca^{2+}]_i$ (замедление фазы спада) более выражено в миокарде крыс линии ISIAH. Более того, в отличие от крыс линии WAG, у крыс линии ISIAH хорошо заметно различие характера спада $[Ca^{2+}]_i$ между препаратами миокарда левого и правого желудочков (ср. рис. 1а и 1б). Спад кальциевого перехода в миокарде левого желудочка монотонен, в то время как в миокарде правого желудочка имеет выраженную фазу кратковременного замедления, формирующую характерный коленообразный ход спада (так называемая фаза «bump» [11, 12]).

С возрастом у крыс обеих линий кинетика спада $[Ca^{2+}]_i$ в препаратах миокарда правого желудочка замедляется (рис. 2). Интересно, что при этом характер спада у крыс линии WAG (рис. 2а) не изменяется. Напротив, у крыс линии ISIAH фаза кратковременного замедления спада $[Ca^{2+}]_i$ с возрастом становится менее выраженной за счет значительного замедления начальной фазы спада (рис. 2б).

При сопоставлении изменений кинетики кальциевого перехода ($[Ca^{2+}]_i$) в препаратах миокарда правого желудочка у крыс линий WAG и ISIAH полутрехмесячного возраста было обнаружено, что характер этого спада является существенно немонотонным только у крыс линии ISIAH, так что в начальную фазу спад происходит быстрее, чем у нормотензивных крыс, но замедляется в более позднюю фазу и происходит позднее, чем у нормотензивных крыс (рис. 3а). Это обуславливает и то, что общая длительность кальциевого перехода в миокарде правого желудочка у полутрехмесячных крыс линии ISIAH на ~25% больше, чем у контрольных крыс того же возраста. Для препаратов миокарда левого желудочка у

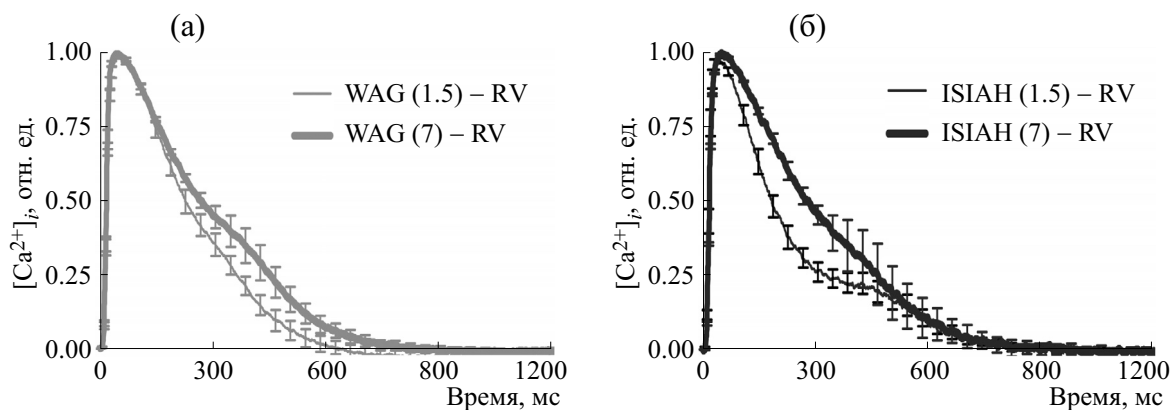


Рис. 2. Сопоставление кривых кинетики несвязанного цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) для препаратов миокарда правого желудочка сердец полутора- и семимесячных нормотензивных (линия WAG) (а) и гипертензивных (линия ISIAH) (б) крыс. Измерения выполнены при длине мышцы 95% от оптимальной длины. Кривые нормированы на собственный максимум, диастолический уровень вычтен. Данные приведены как среднее для всех препаратов группы $\pm$ ошибка среднего.

крыс линий WAG и ISIAH полуторамесячного возраста показано, что при врожденной артериальной гипертензии спад $[Ca^{2+}]_i$ происходит медленнее независимо от уровня этого спада (начальный или более поздний, см. рис. 3б). Интересно, что у семимесячных крыс линий WAG и ISIAH не оказалось различий в кинетике роста или спада $[Ca^{2+}]_i$ в препаратах миокарда правого желудочка (данные не приведены).

В миокарде правого желудочка сердец крыс линий WAG и ISIAH показано существенное влияние степени растяжения мышцы на характер спада $[Ca^{2+}]_i$ в ее клетках независимо от возраста животного. Так, если в нерастянутой мышце спад кинетики кальция монотонен, то при задании растяжения до 95% от оптимальной длины препа-

рата спад $[Ca^{2+}]_i$ при расслаблении сердечной мышцы в стационарных условиях имеет характерную фазу кратковременного замедления, причем эта фаза более выражена в миокарде крыс с врожденной артериальной гипертензией. Важно отметить, что в миокарде левого желудочка этот эффект отсутствует.

Потенциал действия. Потенциалы действия кардиомиоцитов крыс линий WAG и ISIAH полутора- и семимесячного возраста имели характерную для миокарда крыс форму, как в препаратах правого, так и левого желудочка (рис. 4). Наиболее выраженные возрастные отличия зарегистрированы в длительности фазы реполяризации потенциалов действия в препаратах правого желудочка обеих групп крыс (рис. 4а). В правом желудочке длительность реполяризации была до-

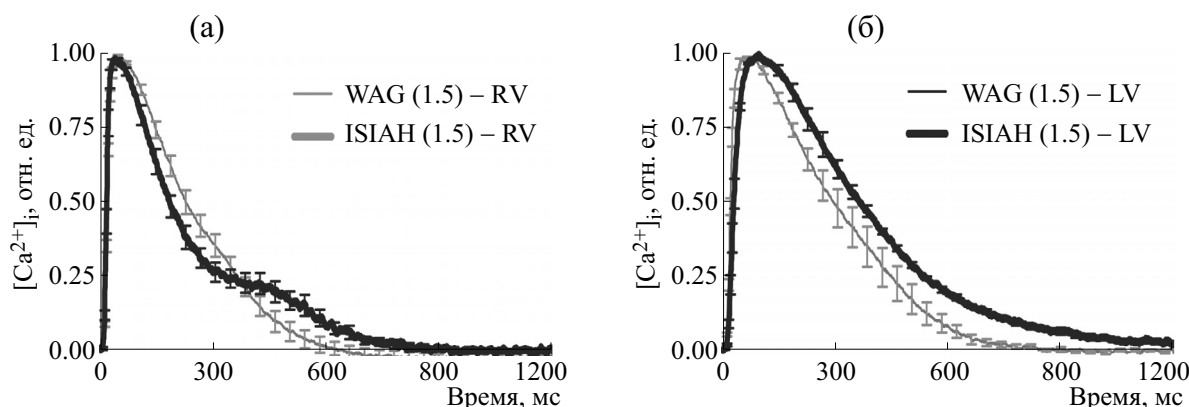


Рис. 3. Сопоставление кривых кинетики несвязанного цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) для препаратов миокарда правого (а) и левого (б) желудочков сердец полуторамесячных нормотензивных (линия WAG) и гипертензивных (линия ISIAH) крыс (сопоставление между группами). Измерения выполнены при длине мышцы 95% от оптимальной длины. Кривые нормированы на собственный максимум, диастолический уровень вычтен. Данные приведены как среднее для всех препаратов группы $\pm$ ошибка среднего.

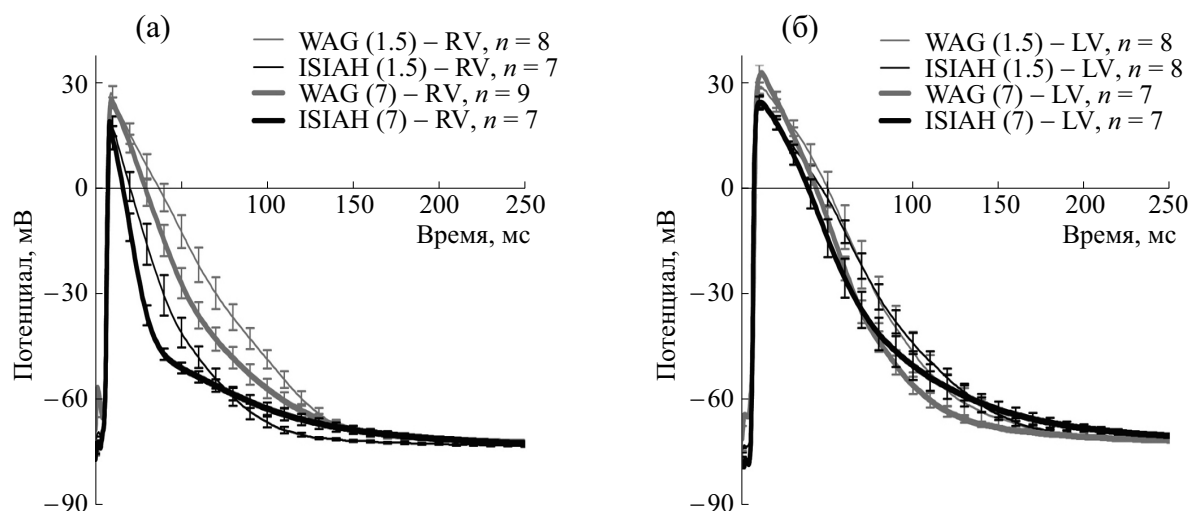


Рис. 4. Сопоставление потенциалов действия кардиомиоцитов препаратов миокарда правого (а) и левого (б) желудочков сердец полутора- и семимесячных нормотензивных (линия WAG) и гипертензивных (линия ISIAH) крыс. Измерения выполнены при длине мышцы 95% от оптимальной длины. Данные приведены как среднее для всех препаратов группы $\pm$ ошибка среднего.

стверно больше в миокарде контрольных крыс, в сравнении со спонтанно-гипертензивными крысами линии ISIAH. С возрастом у животных экспериментальной и контрольной групп длительность реполяризации уменьшалась. Так, в препаратах миокарда правого желудочка длительность реполяризации потенциалов действия на уровне 50% амплитуды при частоте стимуляции 0.33 Гц составляла у полуторамесячных крыс этой же линии — 43.1 ± 3.7 мс ($p = 0.0383$, тест Краскела–Уоллиса). В миокарде правого желудочка полуторамесячных крыс линии ISIAH длительность потенциала действия на уровне 50% амплитуды составила 30.7 ± 3.1 мс, а у семимесячных крыс этой же линии — 20.6 ± 1.1 мс ($p = 0.0086$, тест Краскела–Уоллиса). В папиллярных мышцах левого желудочка значимые отличия обнаружены между группами крыс линии ISIAH полутора- и семимесячного возраста, длительность потенциала действия на уровне 50% амплитуды составила 67.8 ± 3.9 мс и 54.6 ± 4.6 мс соответственно ($p = 0.0489$, тест Краскела–Уоллиса). С возрастом в обеих группах длительность потенциалов действия на уровне 50% амплитуды также уменьшается (рис. 4б).

Для более наглядного представления приведена сводная диаграмма величин длительности потенциалов действия в сердечных мышцах всех исследованных групп (рис. 5). Видно, что в сердечных мышцах правого и левого желудочка спонтанно-гипертензивных (ISIAH) и нормотензивных (WAG) крыс длительность потенциалов действия с возрастом уменьшается. Препараты миокарда правого желудочка отличаются от тако-

вых для левого тем, что длительность потенциалов действия на уровне 50% амплитуды у крыс линии ISIAH меньше, чем у крыс линии WAG, независимо от возраста. В левом желудочке длительность потенциалов действия зависит только от возраста крыс нормальной и гипертензивной групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

Различия характеристик кинетики кальциевых переходов ($[Ca^{2+}]_i$), обнаруженных нами в изолированных многоклеточных препаратах миокарда желудочков сердец крыс линии ISIAH (с наследственной артериальной гипертензией) и в миокарде нормотензивных крыс линии WAG, не согласуются с литературными данными о различиях кинетики несвязанного цитозольного кальция в миокарде крыс со спонтанной артериальной гипертензией (SHR) и нормотензивных крыс линии Wistar-Kyoto (WKY). А именно, в наших экспериментах у крыс линии ISIAH длительность сигнала свечения $[Ca^{2+}]_i$ больше, а амплитуда — меньше, в сравнении с таковыми в миокарде нормотензивной группы WAG. Большинство исследований на одиночных вентрикулярных кардиомиоцитах крыс линий SHR и WKY в возрасте от одного до шести месяцев показывают, что амплитуда $[Ca^{2+}]_i$ выше у гипертензивных животных [3, 13, 14]. При этом длительность $[Ca^{2+}]_i$ в миокарде гипертензивных крыс не изменяется [13] или же возрастает [15], как это показали мы в нашем исследовании. По другим данным,

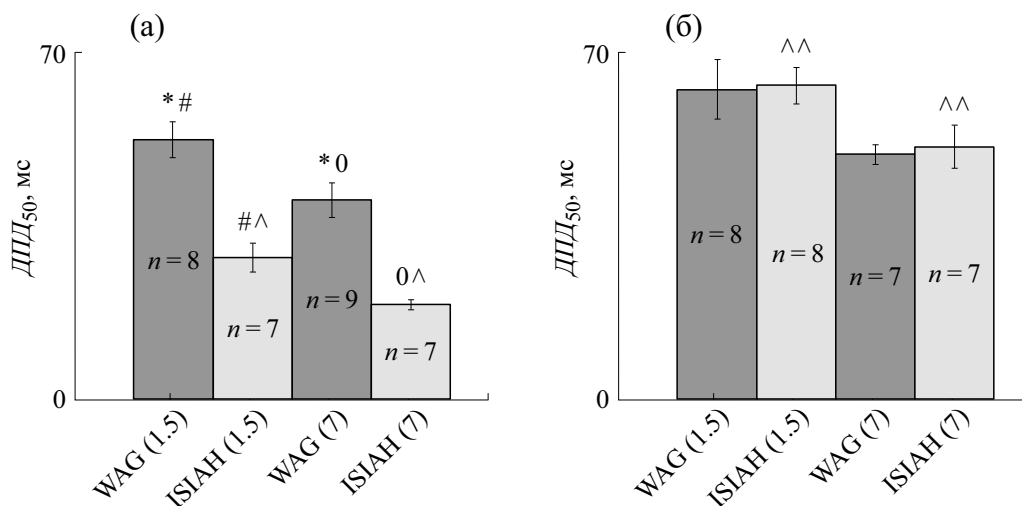


Рис. 5. Усредненные значения длительности потенциала действия на уровне 50% амплитуды потенциала действия (ДПД₅₀) в кардиомиоцитах папиллярных мышц правого (а) и левого (б) желудочков сердец самцов полутора- и семимесячных нормотензивных (линия WAG) и гипертензивных (линия ISIAH) крыс. Измерения выполнены при длине мышцы 95% от оптимальной длины. Данные приведены как среднее для всех препаратов группы $\pm$ ошибка среднего. Различия статистически значимы (тест Краскела–Уоллиса, $p < 0.05$): * – WAG 1.5 мес. по сравнению с WAG 7 мес. (правый желудочек), ^ – ISIAH 1.5 мес. по сравнению с ISIAH 7 мес. (правый желудочек), # – WAG 1.5 мес. по сравнению с ISIAH 1.5 (правый желудочек), ° – WAG 7 мес. по сравнению с ISIAH 7 мес. (правый желудочек), ^^ – ISIAH 1.5 мес. по сравнению с ISIAH 7 мес. (левый желудочек).

ни амплитуда, ни длительность $[Ca^{2+}]_i$ у крыс со спонтанной гипертензией не изменяются [16].

Обратное соотношение длительности потенциалов действия в миокарде нормотензивных и гипертензивных крыс, показанное в нашей работе, также противоречит большинству литературных данных о соотношении длительности потенциалов действия в нормальном и гипертрофированном миокарде. Как и в большинстве моделей гипертрофии сердца животных, миокард крыс линии SHR характеризуется увеличением длительности потенциалов действия [14]. Этот феномен был впервые описан в работах на многоклеточных препаратах [17]. Показано значительное увеличение длительности потенциалов действия в миокарде крыс линии SHR по сравнению с крысами линии WKY: на уровне 50% амплитуды он был равен 39.8 ± 18.9 мс у крыс линии SHR и 10.0 ± 2.7 мс – у крыс линии WKY [3]. Также показано удлинение потенциалов действия в кардиомиоцитах левого желудочка двух- и семнадцатимесячных самцов спонтанно-гипертензивных крыс (SHR) по сравнению с нормотензивными крысами (WKY) при частоте стимуляции 0.2 Гц и температуре 35°C [18].

В гипертрофированных сердцах крыс удлинение потенциалов действия обусловлено падением плотности реполяризирующего калиевого тока I_{to} . Этот феномен прямо связан с длительностью гипертензии. Ток I_{to} играет ведущую роль в фазе реполяризации потенциала действия в миокарде

крысы [19]. При этом показано, что плотность медленного кальциевого тока (I_{CaL}) была незначительно изменена в гипертрофированных миоцитах крыс линии SHR, по сравнению с контрольными крысами. Поскольку удлинение потенциалов действия показано на одиночных кардиомиоцитах, авторы приходят к выводу, что это может быть связано только с изменением свойств мембраны [18].

Кроме этого, нами впервые получены данные о кинетике внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$), потенциалах действия и морфометрических характеристиках препаратов миокарда левого и правого желудочков сердец крыс линии ISIAH в ходе развития возрастных изменений.

Обнаружено полуторакратное превышение артериального давления у семимесячных крыс линии ISIAH в сравнении с WAG того же возраста, что свидетельствует о развитии выраженной артериальной гипертензии. Превышения показателей массы сердца, а также индексов отношения массы сердца к массе тела, либо к длине берцовой кости для крыс линии ISIAH в сравнении с WAG, усиливающиеся с возрастом, указывают на развитие прогрессирующей гипертрофии сердца. Показаны существенные отличия не только в длительности фаз нарастания и спада концентрации Ca^{2+} , но и в характере спада кальциевого перехода в препаратах миокарда правого желудочка крыс линии ISIAH относительно препаратов из

левого желудочка сердец крыс той же линии, а также относительно нормотензивных животных.

Существенные изменения длительности потенциалов действия найдены нами в препаратах правого отдела. Длительность потенциалов действия на уровне 50% амплитуды у препаратов правого желудочка крыс линии ISIAH меньше, чем у крыс линии WAG, независимо от возраста. В левом желудочке длительность потенциалов действия зависит только от возраста животных, как для нормотензивной, так и для гипертензивной групп. Представленные результаты также подтверждают развитие гипертрофии сердца у крыс линии ISIAH, так как укорочение потенциалов действия, наблюдаемое при ишемии или подавлении метаболизма, в большей степени выражено в клетках гипертрофированных желудочков, по сравнению со здоровыми сердцами [20].

По современным данным запуск одного из основных механизмов развития гипертрофии происходит через высвобождение и активацию ангиотензина II [22]. Можно предположить, что механизм развития гипертензии у крыс линии ISIAH опосредует активацию ангиотензина II. Это проявляется в укорочении длительности потенциалов действия по сравнению с контрольными препаратами миокарда, как показано при активации AT_1 -рецепторов ангиотензина II [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность представленных морфометрических, биомеханических, электрофизиологических и кальциевых характеристик позволяет предположить, что развитие гипертрофии в миокарде правого и левого желудочков сердец самцов спонтанно-гипертензивных крыс линии ISIAH хотя и отличается от таковой в миокарде крыс линии SHR, но имеются и общие черты. Необходимо заметить, что корректно сопоставлять характеристики сократимости каждой из двух линий спонтанно-гипертензивных животных лишь относительно исходной линии нормотензивных животных. По нашим данным и по данным других авторов, гипертрофия миокарда, развивающаяся в ответ на постепенно нарастающую гипертензию в сердцах крыс линии ISIAH (или линии SHR), отличается по свойствам электромеханического сопряжения от гипертрофии миокарда, развивающейся в ответ на длительную, но внезапно предъявляемую нагрузку. В этом отношении гипертрофия сердца животных этих двух линий наиболее близка к гипертрофии миокарда при эссенциальной гипертензии человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят проф., д.б.н. А.Л. Маркеля (Институт цитологии и генетики СО РАН, Ново-

сибирск) за предоставление лабораторных животных для проведения экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР №AAAA-A18-118020590031-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с подопытными животными соответствовали международным правилам обращения с лабораторными животными и были одобрены комиссией Института иммунологии и физиологии УрО РАН по контролю за лабораторными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. L. Markel, Genetic Hypertension **218**, 405 (1992).
2. Л. Смолюк, Д. Кузнецов, Р. Лисин и др., Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **101** (5), 559 (2015).
3. Y. Chen-Izu, L. Chen, T. Banyasz, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **293** (6), H3301 (2007).
4. J. Weisser-Thomas, Q. Nguyen, M. Schuettel, et al., Age (Dordr.) **29** (4), 205 (2007).
5. L. La Vecchia, L. Zanolli, L. Varotto, et al., Am. Heart J. **142** (1), 181 (2001).
6. S. Mital, Arch. Mal. Coeur Vaiss. **99** (12), 1244 (2006).
7. M. M. Tumuklu, U. Erkorkmaz, and A. Ocal, Echocardiography **24** (4), 374 (2007).
8. F. Haddad, R. Doyle, D. J. Murphy, et al., Circulation **117** (13), 1717 (2008).
9. G. Olivetti, E. Cigola, R. Maestri, et al., Cardiovasc. Res. **45** (1), 68 (2000).
10. K. Berenji, M. H. Drazner, B. A. Rothermel, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **289** (1), H8 (2005).
11. Y. Jiang, M. F. Patterson, D. L. Morgan, et al., Am. J. Physiol. **274** (5, Pt 1), C1273 (1998).
12. O. Lookin and Y. Protsenko, Open Life Sci. **6** (5), 730 (2011).
13. S. R. Shorofsky, R. Aggarwal, M. Corretti, et al., Circ. Res. **84** (4), 424 (1999).
14. P. Brooksby, A. J. Levi, and J. V. Jones, Cardiovasc. Res. **27** (7), 1268 (1993).
15. M. L. Ward, D. J. Crossman, and M. B. Cannell, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **38** (10), 711 (2011).
16. M. R. Fowler, J. R. Naz, M. D. Graham, et al., J. Mol. Cell. Cardiol. **42** (3), 582 (2007).

17. H. Hayashi and S. Shibata, *Eur. J. Pharmacol.* **27** (3), 255 (1974).
18. E. Cerbai, M. Barbieri, and A. Mugelli, *Circulation* **94** (7), 1674 (1996).
19. M. Lambert, A. Boet, C. Rucker-Martin, et al., *Cardiovasc. Res.* **114** (6), 880 (2018).
20. T. Furukawa, R. J. Myerburg, N. Furukawa, et al., *Am. J. Physiol.* **266** (3, Pt 2), H1121 (1994).
21. S. M. Bryant, S. J. Shipsey, and G. Hart, *Cardiovasc. Res.* **35** (2), 315 (1997).
22. H. E. Cingolani, N. G. Perez, O. H. Cingolani, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304** (2), H175 (2013).
23. D. P. Zankov, M. Omatsu-Kanbe, T. Isono, et al., *Circulation* **113** (10), 1278 (2006).

The Kinetics of Intracellular Calcium and Action Potential in The Ventricular Myocardium of Spontaneously Hypertensive ISIAH Rats

A.A. Balakin, O.N. Lookin, D.A. Kuznetsov, and Yu.L. Protsenko

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomayskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

The multicellular myocardial preparations from the right and left ventricles of healthy rats (control group) and rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH group) were used to show the animal age dependent differences in the kinetics of intracellular calcium transient ($[Ca^{2+}]_i$) and the action potential duration in cardiomyocytes. In rat myocardial preparations from control and ISIAH groups, the kinetics of the decline of $[Ca^{2+}]_i$ slows down with age and the differences in $[Ca^{2+}]_i$ between groups become mild. At the same time, the short-term $[Ca^{2+}]_i$ decline phase clearly expressed in the right ventricle of young hypertensive rats is smoothed out. The time course of action potential repolarization in the left and right ventricular cardiomyocytes from control and ISIAH groups tends to be shorter with age. However, in preparations of the right ventricle of control rats, the duration of repolarization remains greater than that in preparations of hypertensive rats. Thus, experimental data on some characteristics of age-dependent electromechanical coupling dynamics in the myocardium of rats with inherited stress-induced arterial hypertension were obtained for the first time. Our results indicate that spontaneous hypertrophy seems to develop due to activation of the renin-angiotensin system.

Keywords: myocardium; age; hypertension; kinetics of free intracellular calcium; action potential

ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ АРТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА КРЫСЫ

© 2020 г. В.С. Копылова, С.Е. Бороновский, Я.Р. Нарциссов

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, 24/14

E-mail: kopilova.veronika@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 27.02.2020 г.

Сосудистые сети обладают свойствами самоподобия, что позволяет рассматривать их как стохастические фракталы. Для оценки параметров фрактальной структуры традиционно используется метод «Box-counting» на основе расчетов по центральной линии сосуда. Подобный алгоритм не позволяет учитывать различия структур между разными уровнями бифуркации системы, характеризующимися природным свойством изменения калибра сосудов. При этом расхождение между значениями фрактальной размерности может превышать 20%. В данной работе предложен подход, позволяющий избежать недооценки сложности системы для низких порядков бифуркации и крупных сосудов. На основе построенного артериального дерева мозга крысы показано, что при увеличении показателя ветвления и показателя затухания длины ветви происходит увеличение значения фрактальной размерности. Полученные значения наиболее полно отражают свойства артериального дерева с учетом реальной геометрии сосудов, и их предлагается использовать для оценки трехмерных сосудистых сетей.

Ключевые слова: артериальная система, ветвление кровеносных сосудов, компьютерное моделирование, фрактальная размерность.

DOI: 10.31857/S0006302920030199

Основная функция сосудистой системы состоит в обеспечении всех клеток организма кислородом и другими жизненно важными метаболитами. Для наиболее эффективного выполнения данной задачи артериальное дерево должно представлять из себя ветвящуюся систему, при этом бифуркация является наиболее распространенной формой деления на каждом шаге [1]. В связи с чрезвычайной сложностью и многоуровневостью топологии сосудистой сети отсутствует однозначное мнение о том, какие параметры использовать для описания структуры кровеносных сосудов. Кроме того, необходим критерий нормального развития, позволяющий диагностировать заболевания. Для решения этих проблем применялся фрактальный анализ при оценке различных здоровых и патологических кровеносных систем [2, 3]. Сосудистые сети не являются строго фрактальными, поскольку они не проявляют масштабную инвариантность на бесконечном диапазоне, однако они обладают свойствами самоподобия, так как процесс ветвления на каждом этапе одинаков, следовательно, сосудистая система носит фрактальный характер и может рассматриваться как псевдофрактал [4]. Было показано, что, по крайней мере, артериальная система

мозга представляет собой совокупность двух компонент: однородно заполняющей пространство капиллярной сети и разветвленной фрактальной структуры более крупных сосудов [5]. В фрактальной геометрии свойства самоподобных структур, наблюдаемых в широком спектре последовательных бифуркаций, оцениваются количественно с использованием фрактальной размерности (FD), которая является мерой сложности структур [6]. Ее можно рассматривать как количественное определение заполнения пространства, аналогичное анализу плотности сосудов [7]. Так, в случае двумерной разветвляющейся сети, чем ближе значение фрактальной размерности к двум, тем более эффективно дерево заполняет пространство, так как верхний предел фрактального измерения соответствует топологическому измерению. Оценка фрактальной размерности была использована для характеристики сетчатки человека [8], различных опухолевых образований [9, 10], а также для анализа трехмерного артериального дерева легких человека, полученного с использованием данных компьютерной томографии [11]. Кроме того, в нескольких исследованиях были оценены фрактальные измерения 2D-проекций сосудистой системы легких

пациентов [12]. Оценка фрактальной размерности широко используется для характеристики сосудистых сетей при различных заболеваниях. Так, например, уменьшение фрактальной размерности легочного артериального дерева по данным КТ-ангиографии связывают с ухудшением выживаемости в исследовании людей с легочной гипертензией [13], а также с повышенным риском развития инсульта [14]. Была выдвинута гипотеза, что любая патологическая морфология сосудистого дерева приводит к уменьшению фрактальной размерности [15]. В настоящей работе фрактальный анализ был применен для оценки структуры в модели артериального дерева мозга крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для того чтобы анатомически корректно отразить структуру церебральной сети, модельное представление артериального дерева было разделено на детерминированную и стохастическую части в зависимости от калибра сосуда. Основные артерии головного мозга, имеющие больший радиус, а также топология которых достаточно консервативна у большинства образцов, представляют собой детерминированную структуру, что позволяет максимально точно воспроизвести характерную топологию крупных артерий. Представление артерий детерминированной части было реализовано в виде упорядоченной совокупности цилиндров, для каждого из которых задавались радиусы и координаты центров их оснований, где радиус цилиндра соответствовал радиусу сосуда. Диаметры основных артерий мозга крысы, использованные для построения базового уровня, были рассчитаны на основе изображений сосудов мозга крысы.

Более мелкие сосуды, являющиеся ответвлениями от основных артерий, были выделены в отдельную стохастическую структуру. Стохастическая часть реализуется в виде бинарного дерева, что согласуется с данными морфометрического анализа, в ходе которого было установлено, что практически всегда при ветвлении сосудистой системы образуется бифуркация [16, 17]. При такой форме ветвления материнская ветвь (i) разделяется на два дочерних сосуда ($2i+1$, $2i+2$), каждый из которых в свою очередь образует бифуркацию вплоть до достижения уровня, соответствующего минимальному радиусу сосуда, который в данной модели соответствует 8 мкм. При этом процесс генерации каждой единичной бифуркации состоит из нескольких ключевых этапов (рис. 1). В качестве входных параметров выступают радиус, длина и координаты узлов материнской ветви, а также значения ключевых параметров модели, которые определяют геометрию ветвления дерева в целом. Уменьшение длин дочерних сосудов относительно длины материнской ветви характеризуется показателем затухания длины ветви (λ):

$$L_{2i+1, 2i+2} = \lambda L_i. \quad (1)$$

Взаимосвязь между радиусом материнской ветви и радиусами левой и правой дочерних ветвей устанавливается бифуркационным законом, также известным как закон Мюррэя [18]:

$$R_i^\gamma = R_{2i+1}^\gamma + R_{2i+2}^\gamma, \quad (2)$$

где γ — показатель ветвления, значения которого, согласно литературным данным, варьируют от двух до трех [19, 20]. Генерация нормализованных радиусов дочерних сосудов происходит в диапазоне, определенном радиусом материнской ветви и минимальным радиусом:

$$\begin{cases} r_{\text{low}} = \frac{R_{\text{low}}}{R_i} \\ r_{\text{high}} = \left(1 - r_{\text{low}}^\gamma\right)^{\frac{1}{\gamma}} \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} r_{2i+1} = r_{\text{low}} + (r_{\text{high}} - r_{\text{low}}) \cdot U(0,1) \\ r_{2i+2} = \left(1 - r_{2i+1}^\gamma\right)^{\frac{1}{\gamma}} \end{cases}, \quad (3)$$

где R_{low} — минимальный радиус в артериальной системе; $U(0,1)$ — стандартное равномерное распределение. Наряду с радиусами и длинами дочерних сосудов происходит генерация азимутальных углов:

$$\begin{aligned} \phi_{2i+1} &= 2\pi U(0,1), \\ \phi_{2i+2} &= \phi_{2i+1} + \pi. \end{aligned} \quad (4)$$

Далее на основе нормализованных радиусов рассчитываются бифуркационные углы между дочерними ветвями:

$$\begin{cases} \theta_{2i+1} = \arccos\left(\frac{r_{2i+1}^2}{2} + \frac{r_{2i+1}^{-2}}{2} \left(1 - \left(1 - r_{2i+1}^\gamma\right)^{\frac{4}{\gamma}}\right)\right) \\ \theta_{2i+2} = \arccos\left(\frac{r_{2i+2}^2}{2} + \frac{r_{2i+2}^{-2}}{2} \left(1 - \left(1 - r_{2i+2}^\gamma\right)^{\frac{4}{\gamma}}\right)\right) \end{cases}. \quad (5)$$

С использованием полученных координат терминальных узлов исключаются пересечения между сосудах путем вычисления расстояний до ближайших бифуркаций. В данной работе генерация артериальной системы происходит в пространстве, ограниченном геометрическими размерами фантома мозга крысы, поэтому на



Рис. 1. Алгоритм моделирования единичной бифуркации.

последнем этапе проверяется локализация терминальных узлов внутри заданной области:

$$\Omega = \bigcup_i E_i; \quad E_i = \left\{ \vec{x} : \sum_{j=1}^3 \left(\frac{x_j - c_{i,j}}{R_{i,j}} \right)^2 \leq 1 \right\}, \quad (6)$$

где $c_{i,j}$ и $R_{i,j}$ — координаты центра и величины полуосей i -го эллипсоида. Фантом мозга крысы был построен с использованием аппроксимации мозга системой эллипсоидов, геометрические параметры которых были получены на основе оцифровки изображений головного мозга крысы.

Артериальные деревья, построенные с использованием предложенного подхода, были использованы для оценки фрактальной размерности методом «Box-counting» [21]. Для заданной фрактальной структуры, встроенной в d -мерный объем, метод состоит в разбиении пространства структуры на d -мерную сетку переменного размера. Количество непустых ячеек $N(r)$ размера r , необходимых для покрытия фрактальной структуры, зависит от r :

$$N(r) \sim r^{-FD}, \quad (7)$$

где FD — фрактальная размерность заданной структуры. Алгоритм «Box-counting» подсчитывает количество непустых ячеек для различных значений r . Значение фрактальной размерности рассчитывается на основе линейной аппроксимации логарифмической кривой:

$$FD = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log N(r)}{\log \frac{1}{r}}. \quad (8)$$

На рис. 2 показан пример расчета фрактальной размерности двумерного артериального дерева, построенного на основе алгоритма, представленного выше. В описанном примере каждый сосуд для расчета был представлен центральной линией, что не позволяет учитывать влияние радиуса сосуда на величину фрактальной размерности (рис. 3а). Следует отметить, что радиус сосуда является одной из важнейших геометрических характеристик единичной ветви, определяющей топологию артериального дерева в целом. В связи с этим был разработан подход, позволяющий более точно оценивать сложность сосудистой сети. Поверхность каждого сосуда равномерно разбивается на полигоны, среднее значение длины ребер

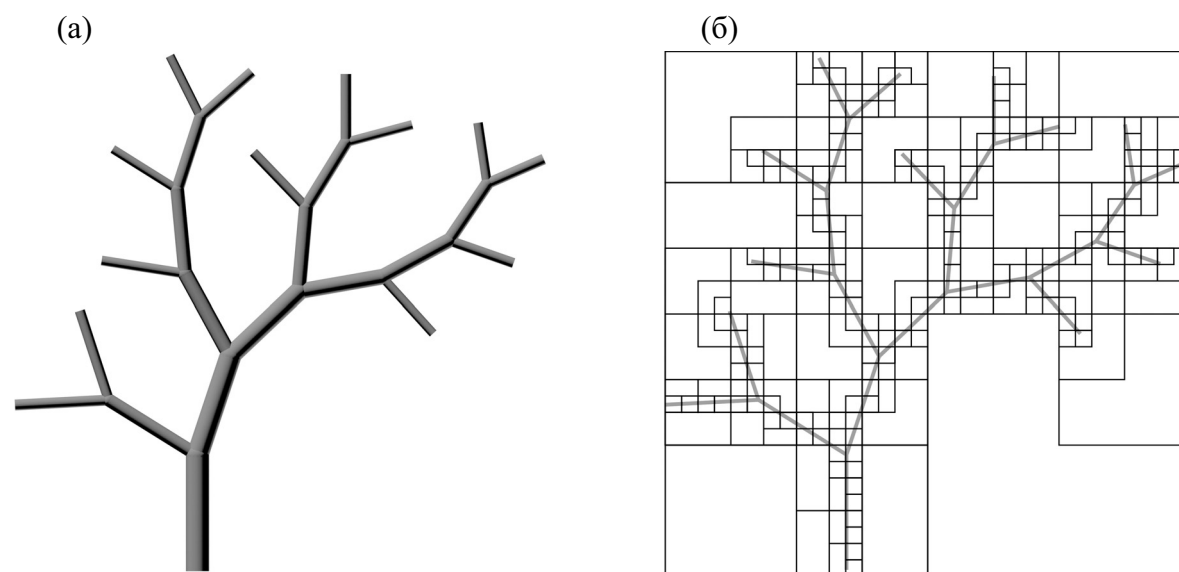


Рис. 2. Схематическое представление метода измерения фрактальной размерности на примере двумерной артериальной сети методом «Box-counting»: (а) — двумерное артериальное дерево, построенное с использованием предложенного подхода; (б) — последовательное разбиение пространства на сетку переменного размера с выделением ячеек, покрывающих структуру артериального дерева.

которых составляет величину порядка двух микрометров (рис. 3б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основное влияние на пространственное расположение сосудов и топологию артериального дерева оказывают показатели бифуркации (γ) и затухания длины ветви (λ). В большей степени это относится к стохастической части системы, поскольку геометрия крупных артерий является менее вариабельной. В качестве дополнительных параметров, ограничивающих сложность системы, выступают пространство построения сосудистой системы (Ω) и минимально возможный радиус сосуда (R_{low}), которые являются биологиче-

скими особенностями исследуемого объекта. Для оценки прямого влияния ключевых параметров модели на топологию сосудистой системы без учета ограничивающих факторов были построены двумерные единичные дочерние деревья на основе описанных выше принципов для различных значений показателя ветвления (рис. 4) и показателя затухания длины ветви (рис. 5). В представленных моделях радиус материнского сосуда принимали равным 40 мкм, далее происходило построение сосудистого дерева до достижения заданного радиуса ветви, который соответствовал 5 мкм. Из приведенных моделей видно, что при увеличении показателя ветвления плотность сосудов заметно увеличивается. В свою очередь, увеличение показателя затухания длины ветви

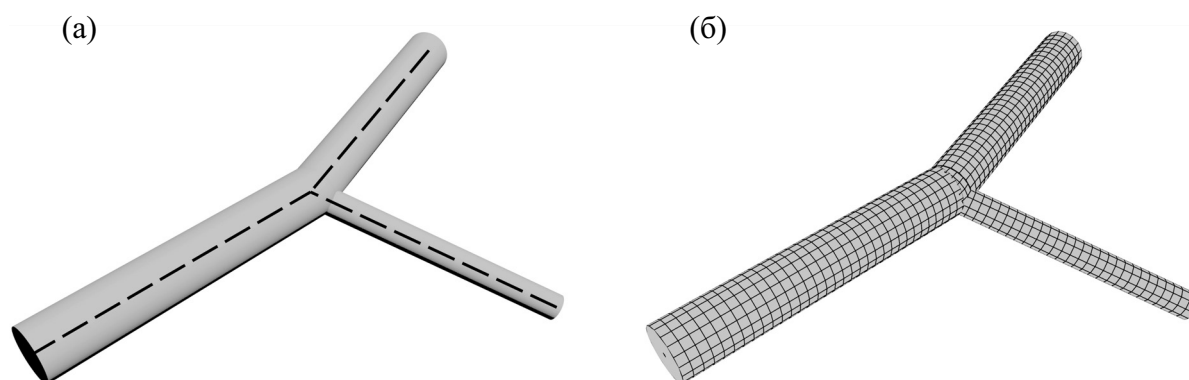


Рис. 3. Представление единичной бифуркации для расчета фрактальной размерности: (а) — сосуды аппроксимированы центральной линией; (б) — поверхность сосудов представлена совокупностью полигонов.

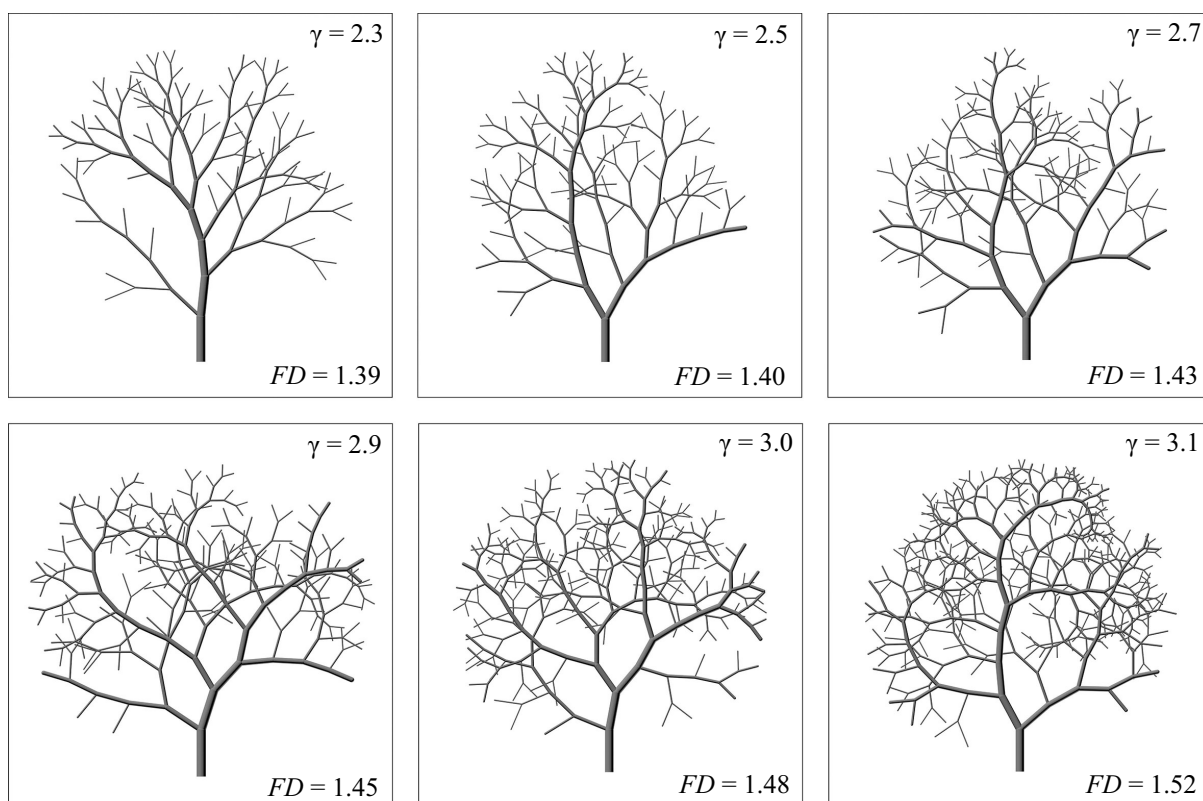


Рис. 4. Двумерные сосудистые деревья, построенные при различных значениях показателя ветвления (γ). Величина показателя затухания длины ветви (λ) принималась равной 0.90. Приведенные значения фрактальной размерности получены методом «Box-counting» по центральной линии сосудов.

приводит к формированию сосудистой системы, обеспечивающей большую область покрытия. Для того чтобы количественно определить заполнение пространства, были рассчитаны значения фрактальной размерности для каждого из построенных деревьев. С увеличением как показателя ветвления, так и показателя затухания длины ветви величина фрактальной размерности увеличивается. Это согласуется с экспериментальными данными о различных патологических морфологиях сосудистого дерева, при которых фрактальная размерность уменьшается [22–24]. Следует отметить, что диапазон изменения FD системы шире при изменении величины показателя ветвления ($\Delta FD = 0.13$), и сложность системы в большей степени определяется ее разветвленностью.

В случае анализа медицинских изображений сосудистых систем фрактальная размерность, как правило, оценивается на основе двумерных проекций [13, 25]. Это связано как со сложностью получения полной трехмерной структуры, так и с невозможностью автоматической сегментации отдельного сосуда для объемного представления, что приводит к необходимости линейной аппроксимации. Несмотря на это, оценка сложности системы по двумерным проекциям наименее за-

тратна с точки зрения вычислительных ресурсов и дает эффективный способ первичной оценки параметров модели исходя из имеющихся экспериментальных данных. Пример применения алгоритма «Box-counting» для расчета фрактальной размерности аксиальной проекции артериальной системы мозга крысы представлен на рис. 6. Были получены зависимости фрактальной размерности от показателя бифуркации и затухания длины ветви для случая аксиальной проекции (рис. 7). Характер роста FD сопоставим со случаем единичных двумерных деревьев, однако абсолютные значения в среднем выше на 0.36, а уменьшение диапазона ΔFD связано с наличием маловарианбельной структуры крупных артерий, не подчиняющихся бифуркационному принципу ветвления. При высоких значениях показателей γ и λ фрактальная размерность приближенно равна 1.83, что согласуется с экспериментальными данными и результатами моделирования, согласно которым фрактальная размерность превышает 1.80 [26, 27].

Наибольший интерес представляет анализ фрактальной размерности полной трехмерной сосудистой системы. В связи с этим была исследована зависимость фрактальной размерности от

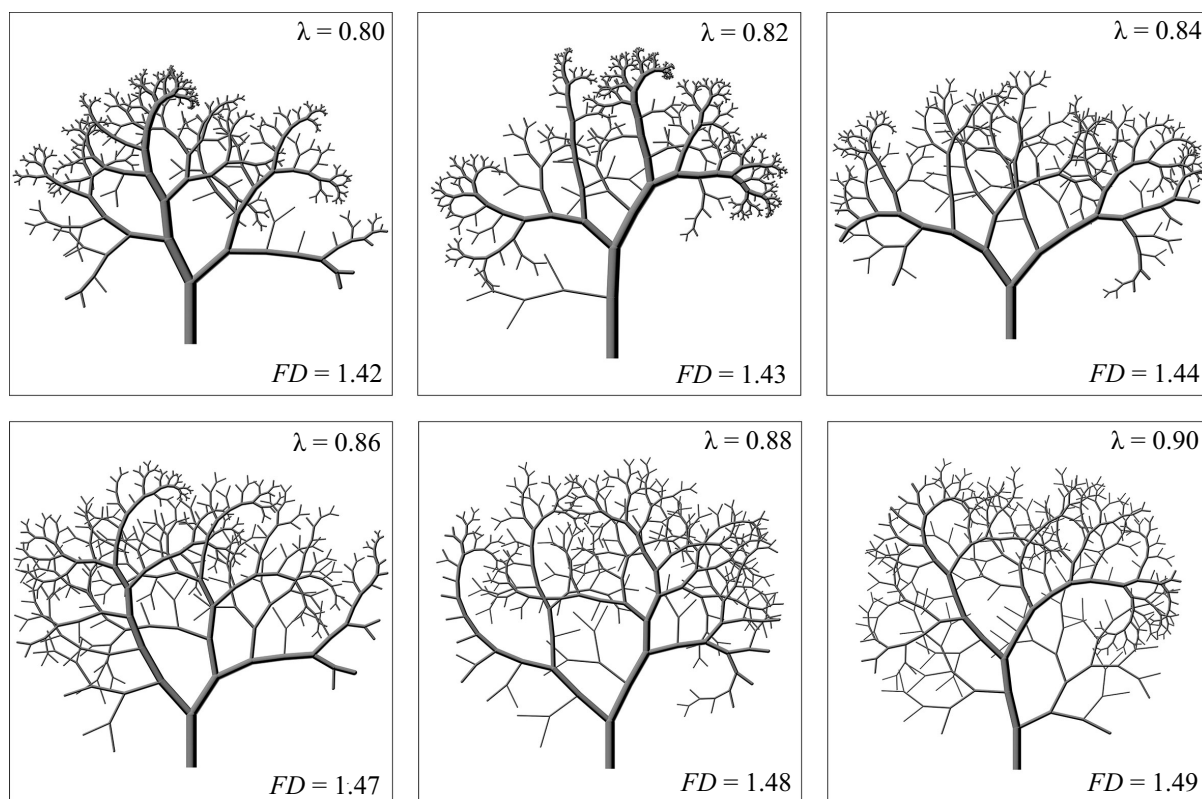


Рис. 5. Двумерные сосудистые деревья, построенные при различных значениях показателя затухания длины ветви (λ). Величина показателя ветвления (γ) принималась равной 3.0. Приведенные значения фрактальной размерности получены методом «Box-counting» по центральной линии сосудов.

параметров модели для трехмерного артериального дерева мозга крысы (рис. 8). Как видно из приведенного графика, при значениях показателя бифуркации, близких к трем, фрактальная размерность превышает 2.05 в случае оценки по центральной линии сосуда (FD_{line}). Несмотря на то

что изменение показателя ветвления влияет в первую очередь на разветвленность сети и, как следствие, на величину фрактальной размерности, увеличение калибров дочерних сосудов при росте γ является существенным. Кроме того, средние и модальные значения относительной

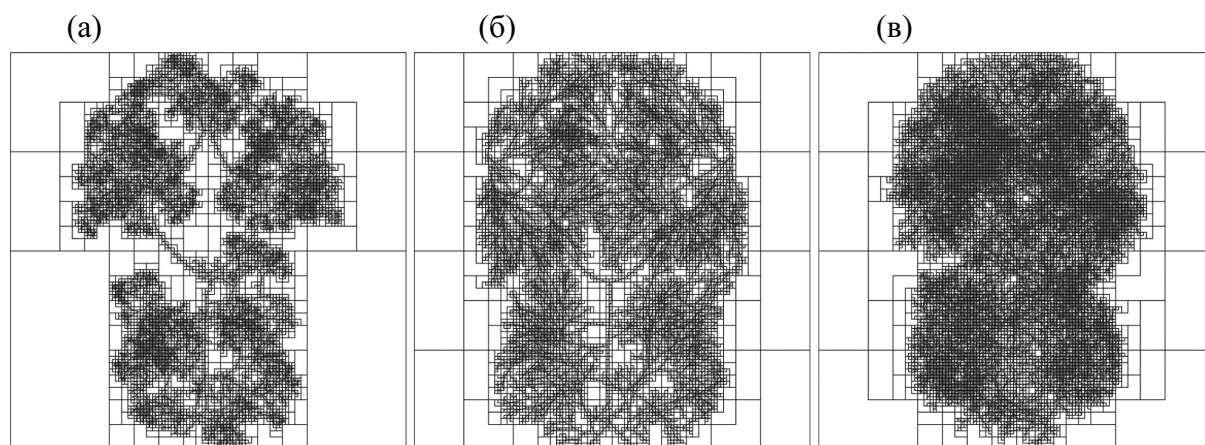


Рис. 6. Пример применения алгоритма «Box-counting» для расчета фрактальной размерности аксиальной проекции модельных артериальных систем мозга крысы при различных значениях ключевых параметров: (а) — $\gamma = 3.0$, $\lambda = 0.80$; (б) — $\gamma = 2.3$, $\lambda = 0.90$; (в) — $\gamma = 3.0$, $\lambda = 0.90$.

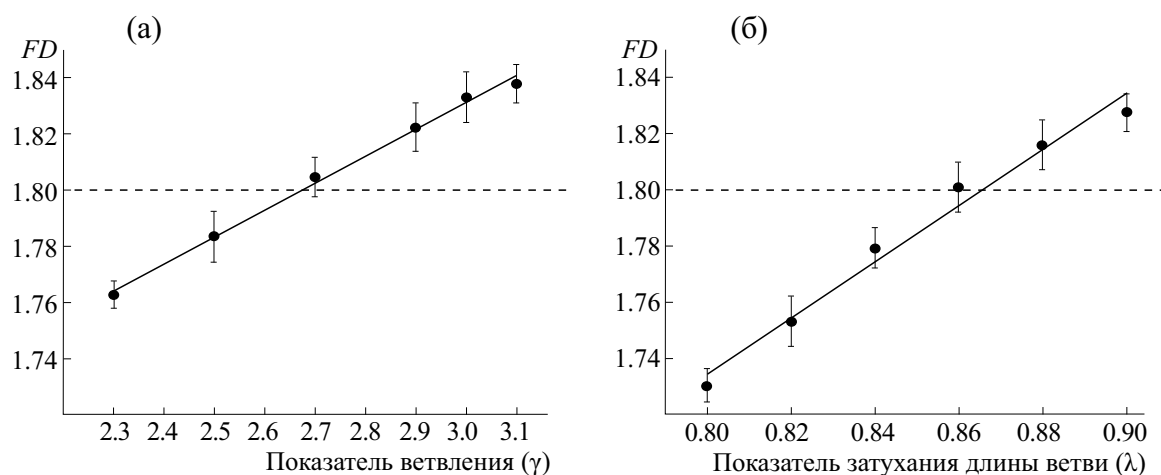


Рис. 7. (а) — Зависимость фрактальной размерности аксиальной проекции артериального дерева от показателя ветвления (γ); (б) — зависимость фрактальной размерности аксиальной проекции артериального дерева от показателя затухания длины ветви (λ). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо сгенерированных артериальных систем мозга крысы для каждого из расчетов.

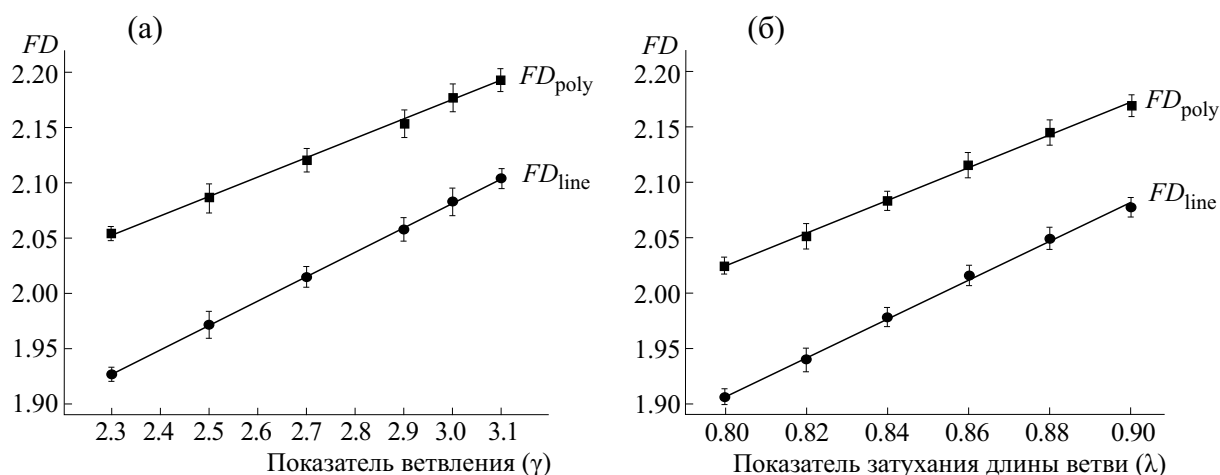


Рис. 8. (а) — Зависимости фрактальной размерности трехмерного артериального дерева от показателя ветвления (γ); (б) — зависимости фрактальной размерности трехмерного артериального дерева от показателя затухания длины ветви (λ). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо сгенерированных артериальных систем мозга крысы для каждого из расчетов.

длины сосудов для артериальной системы мозга крысы составляют 16 и 10 соответственно [28]. Это говорит о том, что для большого количества сосудов линейная аппроксимация не является эффективной, а недооценка величины фрактальной размерности при расчете по центральной линии существенна. Для оценки влияния радиуса сосуда на сложность такой системы поверхность каждого сосуда была представлена в виде совокупности полигонов. Для всех зависимостей характерно увеличение FD_{poly} , а средняя разница при оценке фрактальной размерности между двумя методами расчета составляет 0.11. Полученные значения фрактальной размерности в полной ме-

ре отражают влияние параметров артериального дерева с учетом точной геометрии сосудов, и предлагается использовать их для оценки трехмерных сосудистых сетей.

Как было показано ранее, для максимального соответствия бифуркационной модели артериального дерева мозга крысы пространство параметров $\{\gamma, \lambda\}$ должно быть строго ограничено снизу. Системы с низким значением показателя бифуркации ($\gamma < 2.9$) показывают недостаточную разветвленность, степень симметричности и не обеспечивают необходимого объема артериальной крови [29, 30]. В свою очередь, артериальная система, эффективная с точки зрения топологии

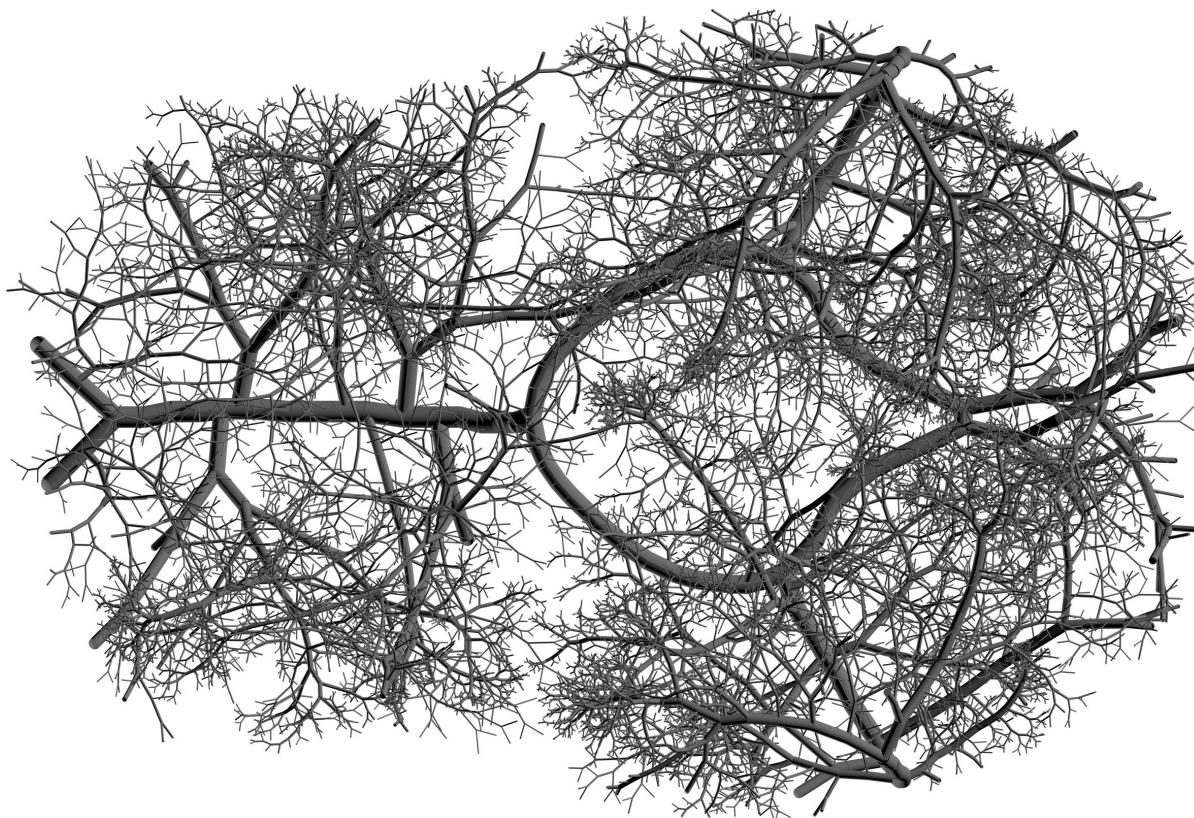


Рис. 9. Модель артериального дерева мозга крысы, построенная на основе оптимальных значений бифуркационных параметров ($\gamma = 3.0$, $\lambda = 0.90$). Минимальный радиус сосудов ограничен 8 мкм, что соответствует уровню терминальных артериол.

сосудов, может быть получена только при оптимальном значении обоих ключевых параметров ($\gamma = 3.0$; $\lambda = 0.90$) [28]. Ограничение радиуса сосудов на уровне метартериол связано с тем фактом, что микрокапиллярные русла, как правило, не подчиняются бифуркационным законам ветвления и представляют собой хаотические сетеподобные структуры [31]. Пример оптимального артериального дерева приведен на рис. 9.

Приведенные выше результаты позволяют оценить как значения фрактальных размерностей для различных артериальных деревьев в целом, так и учитывать влияние основных бифуркационных параметров на сложность системы. В свою очередь, внутри одной артериальной системы фрактальная размерность локальных участков может существенно различаться несмотря на тот факт, что и законы ветвления (разделение материнской ветви строго на два дочерних сосуда) и ключевые параметры внутри одного дерева остаются неизменными.

Для артериального дерева с оптимальными значениями обоих параметров был проведен анализ зависимости фрактальной размерности от порядка ветвления для двух вариантов представления сосудов (рис. 10). Как видно из приведенных

графиков, с увеличением порядка ветвления величина FD возрастает, причем максимальной рост сложности системы наблюдается на первых пятнадцати порядках бифуркации в обоих случаях. Однако при методике расчета по центральной линии диапазон изменения фрактальной размерности существенно больше (от 1.42 до 2.08), тогда как при использовании полигонального представления — от 1.77 до 2.18. Следует также отметить, что граничному порядку ветвления, разделяющему артериальную систему на «распределяющие» и «доставляющие» сосуды [32, 28], соответствует рост сложности в 61 и 55% для линейного и полигонального представления соответственно.

Калибр сосудов не зависит напрямую от порядка ветвления, так как при увеличении порядка бифуркации симметричность сосудов значительно возрастает [33, 29]. Это связано с различными функциями двух типов сосудов: сосуды с преимущественно асимметричными бифуркациями дают относительно небольшой поток в боковые ветви при делении и, следовательно, способны переносить кровь на большие расстояния; более симметричная бифуркационная структура распадается на многочисленные мелкие ветви, которые

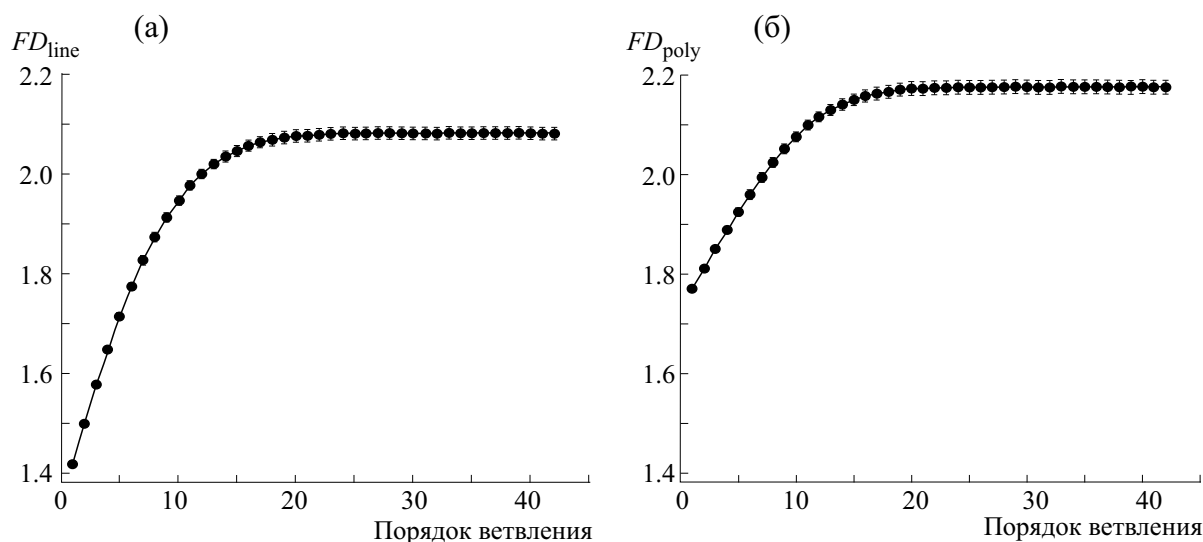


Рис. 10. Зависимости фрактальной размерности трехмерного артериального дерева мозга крысы от порядка ветвления: (а) — расчет FD по центральной линии сосуда; (б) — расчет FD на основе полигонального представления сосуда.

снабжают окружающие ткани кровью. Был проведен анализ зависимости фрактальной размерности от радиуса сосуда (рис. 11). Минимальный радиус соответствует радиусу терминальных артериол, который в предложенной модели равняется 8 мкм, а максимальное значение — артериям. С помощью полученных зависимостей можно оценить фрактальную размерность артериального дерева различной степени сложности. Так, например, фрактальная размерность системы, состоящей только из артерий, радиус которых составляет 50 — 80 мкм, варьируется от 1.78 до 1.87 (таблица). Как и в случае предыдущего анализа,

большой разброс значений FD позволяет сделать вывод о недооценке сложности системы при расчете по центральной линии, особенно для низких порядков бифуркации и крупных сосудов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве критерия оценки структуры построенного сосудистого дерева была использована методика расчета фрактальной размерности, позволяющая количественно определять эффективность заполнения пространства. Данный подход получил широкое распространение для выяв-

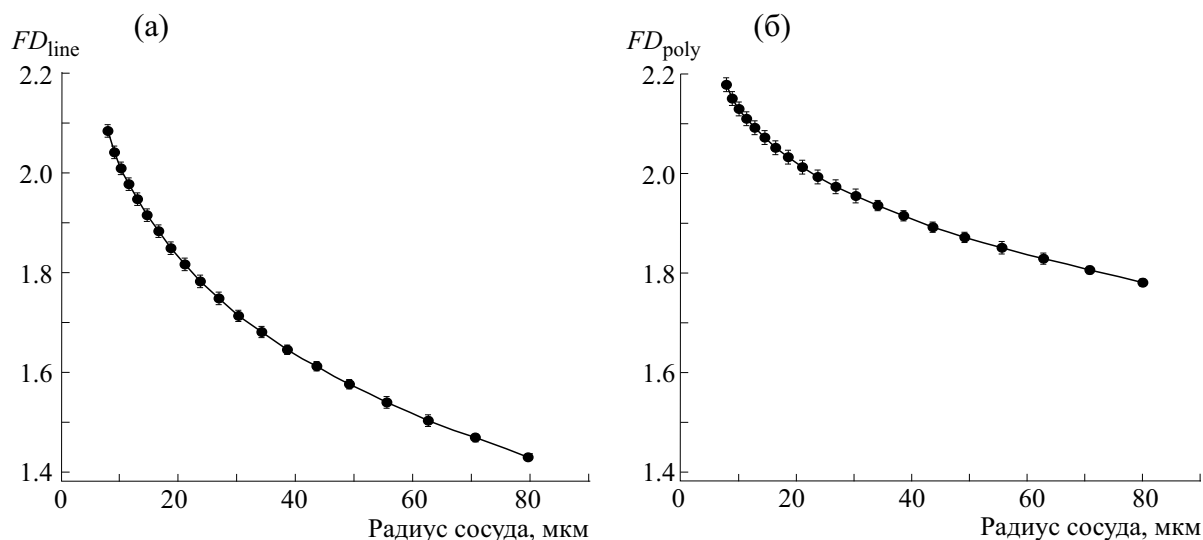


Рис. 11. Зависимости фрактальной размерности трехмерного артериального дерева мозга крысы от радиуса сосуда: (а) — расчет FD по центральной линии сосуда; (б) — расчет FD на основе полигонального представления сосуда.

Фрактальные свойства основных типов сосудов артериальной системы мозга крысы

Тип	Функции	Радиус, мкм	FD_{line}	FD_{poly}
Артерии	Перенос крови от сердца и снабжение различных участков мозга кровью	50–80	1.43–1.57	1.78–1.87
Артериолы	Регуляция артериального давления и распределения крови по капиллярному руслу	10–50	1.57–2.01	1.87–2.13
Метартериолы	Регуляция снабжения отдельных групп капилляров	8–10	2.01–2.08	2.13–2.18

ления патологических отклонений сосудистых сетей при различных заболеваниях. Ранее было установлено, что даже незначительное снижение фрактальной размерности является негативным фактором при прогнозе течения целого ряда заболеваний [34]. В данной работе было показано, что при увеличении показателя ветвления (γ) и показателя затухания длины ветви (λ) происходит увеличение значения фрактальной размерности. Результаты указывают на то, что построение модели артериальной сети в ткани на основе оптимальных значений обоих ключевых параметров является обоснованным не только физико-химическими, но и физиологическими особенностями разветвленных структур. Для оценки фрактальных свойств артериальных систем наиболее часто используется метод «Вох-counting» на основе расчетов по центральной линии сосуда. Данный метод является простым с точки зрения вычислительной сложности, однако линейное представление сосудов не позволяет учитывать различия между уровнями бифуркации системы, характеризующимися разными калибрами сосудов. В данной работе был предложен подход, позволяющий избежать недооценки сложности системы для низких порядков бифуркации и крупных сосудов, которая на уровне крупных артерий может превышать 20%. Полученные значения фрактальной размерности наиболее полно отражают свойства артериального дерева с учетом реальной геометрии сосудов и позволяют оценить как фрактальную размерность артериального дерева различной степени сложности, так и сделать вывод о наличии сосудистых патологий при проведении медицинских исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J.-J. Li, *Dynamics of the vascular system* (World Scientific Publishing Co., 2004).
2. B. R. Masters, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**, 427 (2004).
3. E. Gaudio, S. Chaberek, A. Montella, et al., *J. Anat.* **207** (2), 107 (2005).
4. M. Zamir, *J. Theor. Biol.* **212** (2), 183 (2001).
5. S. Lorthois and F. Cassot, *J. Theor. Biol.* **262** (4), 614 (2010).
6. T. Takahashi, *Microcirculation in fractal branching networks* (Springer Japan, 2014).
7. D. J. Gould, T. J. Vadakkan, R. A. Poche, et al., *Microcirculation* **18** (2), 136 (2011).
8. H. A. Crystal, S. Holman, Y. W. Lui, et al., *PLoS One* **11** (5), e0154858 (2016).
9. V. Goh, B. Sanghera, D. M. Wellsted, et al., *Eur. Radiol.* **19** (6), 1358 (2009).
10. S. Lang, B. Muller, M. D. Dominietto, et al., *Microvasc. Res.* **84** (3), 314 (2012).
11. M. Helmberger, M. Pienn, M. Urschler, et al., *PLoS One* **9** (1), e87515 (2014).
12. S. Haitao, L. Ning, G. Lijun, et al., *Korean J. Radiol.* **12** (3), 289 (2011).
13. S. Moledina, A. de Bruyn, S. Schievano, et al., *Heart* **97** (15), 1245 (2011).
14. R. Kawasaki, M. Z. Che Azemin, D. K. Kumar, et al., *Neurology* **76** (20), 1766 (2011).
15. B. J. West, *Front. Physiol.* **1**, 12 (2010).
16. G. S. Kassab, C. A. Rider, N. J. Tang, et al., *Am. J. Physiol.* **265**, H350 (1993).
17. V. S. Kopylova, S. E. Boronovskiy and Y. R. Nartsissov, *Biochem. Soc. Trans.* **45** (3), 839 (2017).
18. C. D. Murray, *J. Gen. Physiol.* **9** (6), 835 (1926).

19. R. Karch, F. Neumann, M. Neumann, et al., *Ann. Biomed. Eng.* **28** (5), 495 (2000).
20. M. Zamir, *The physics of pulsatile flow* (Springer, New York, 2000).
21. M. Ge and Q. Lin, *Geo-spatial Information Science* **12** (4), 265 (2009).
22. Y. T. Ong, D. A. De Silva, C. Y. Cheung, et al., *Stroke* **44** (8), 2121 (2013).
23. C. Y. Cheung, Y. T. Ong, M. K. Ikram, et al., *Alzheimers Dement.* **10** (2), 135 (2014).
24. N. Popovic, M. Radunovic, J. Badnjar, et al., *Microvasc. Res.* **118**, 36 (2018).
25. S. Kido, K. Kuriyama, M. Higashiyama, et al., *J. Comput. Assist. Tomogr.* **27** (1), 56 (2003).
26. Y. Gazit, D. A. Berk, M. Leunig, et al., *Phys. Rev. Lett.* **75** (12), 2428 (1995).
27. N. Tsafnat, G. Tsafnat and T. D. Lambert, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **1**, 683 (2004).
28. V. Kopylova, S. Boronovskiy and Y. Nartsissov, *Phys. Biol.* **16** (5), 056002 (2019).
29. V. S. Kopylova, S. E. Boronovskiy and Y. R. Nartsissov, *J. Physics: Conf. Ser.* **1141**, 012027 (2018).
30. V. S. Kopylova, S. E. Boronovskiy and Y. R. Nartsissov, *Math. Biosci.* **315**, 108237 (2019).
31. F. Cassot, F. Lauwers, C. Fouard, et al., *Microcirculation* **13** (1), 1 (2006).
32. M. Zamir, *J. Gen. Physiol.* **91** (5), 725 (1988).
33. A. Kaimovitz, Y. Huo, Y. Lanir, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294** (2), H714 (2008).
34. A. D. Hughes, *Artery Res.* **10** (Iss. C), 1 (2015).

Application of Fractal Analysis to Estimation of the Rat Brain Arterial System

V.S. Kopylova, S.E. Boronovskiy, and Ya.R. Nartsissov

Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, ul. 6-ya Radialnaya 24/14, Moscow, 115404 Russia

Vascular networks have the properties of self-similarity, that makes it possible to consider them stochastic fractals. Based on calculations concerning the vessel's centre line, the traditional box-counting method is commonly used to assess the parameters of the fractal structure. Using this algorithm, structural differences between various bifurcation levels of the system, characterized by the natural property to change blood vessel diameter, are not taken into account. Furthermore, the discrepancy between the fractal dimension values may exceed 20%. In this paper we propose an approach that can be used to avoid underestimation of the system complexity for low bifurcation orders and large vessels. With the constructed rat brain arterial tree, it is shown that the value of fractal dimension increases, when there is an increase in the branching exponent and the length coefficient. The obtained values better demonstrate the properties of the arterial tree, taking into account the real vascular geometry, and it is advisable to use these data for evaluation of three-dimensional vascular networks.

Keywords: arterial system, bifurcation of blood vessels, computer modelling, fractal dimension

ИЗМЕНЕНИЕ БОЛЕВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ

© 2020 г. Е.Н. Чуян, Э.Р. Джелдубаева, Н.С. Трибрат

*Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского,
295007, Республика Крым, Симферополь, просп. Вернадского, 4*

E-mail: delviza@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 10.02.2020 г.

Принята к публикации 16.02.2020 г.

Исследовано изменение болевой чувствительности крыс при изолированном и комбинированном действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (7.1 мм, 0.1 мВт/см²; локализация — затылочно-воротниковая область, экспозиция 30 мин, продолжительность — 21 сутки) и умеренного электромагнитного экранирования (коэффициент экранирования постоянной компоненты магнитного поля по вертикальной составляющей — 4.4 раза, по горизонтальной — 20 раз; экспозиция 22 ч/сутки, продолжительность — 21 сутки). Оценку болевой чувствительности животных проводили с использованием комплекса алгометрических тестов — «горячая пластина», «отдергивания хвоста», «алгезиметр—щипцы», — которые позволяют рассмотреть проведение болевого импульса на разных уровнях регуляции. Показаны алгологические эффекты изолированного и комбинированного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового и умеренного электромагнитного экранирования. При комбинированном воздействии данных физических факторов показана способность низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона оказывать антиноцицептивное действие и модулирующий эффект при гипералгезии, вызванной экранированием. В то же время экранирование уменьшает выраженность антиноцицептивного действия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона.

Ключевые слова: болевая чувствительность, электромагнитное излучение миллиметрового диапазона, экранирование.

DOI: 10.31857/S0006302920030205

Большинство абиотических факторов среды имеет электромагнитную природу, а любая область спектра электромагнитных излучений (ЭМИ) играет определенную роль в эволюции живой природы и обязательно принимает участие в процессах жизнедеятельности [1]. Для подтверждения этих данных важное значение имеют сведения о высокой чувствительности биологических систем к слабым ЭМИ даже нано- и пикотесловых интенсивностей [2–4]. Однако закономерности электромагнитных воздействий

при низких интенсивностях воздействующих факторов практически не изучены.

Среди электромагнитных факторов низкой интенсивности в настоящее время широко исследуется биологическое действие ЭМИ миллиметрового диапазона (ЭМИ ММ), которые, не вызывая структурных изменений в организме, полностью поглощаясь в коже, сопровождаются выраженными биологическими ответами [5–11]. В связи с доказанной биологической эффективностью ЭМИ ММ широко применяются в медицинской практике с целью коррекции расстройств различного генеза [12, 13]. Однако многие вопросы, связанные с механизмом действия низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона на биологические объекты, остаются открытыми.

Развитию концепции экологической роли ЭМИ естественного происхождения должны

Сокращения: ЭМИ — электромагнитные излучения, ЭМИ ММ — электромагнитные излучения миллиметрового диапазона, ЭМЭ — электромагнитное экранирование, ЛПБРтох — латентный период болевой реакции в тесте отведения хвоста, Гтащ — болевой порог механической болевой чувствительности, ЛПБРтгп — латентный период болевой реакции в тесте «горячая пластина».

способствовать не только разнообразные эксперименты с активным их воздействием, но и исследования эффектов депривации. Между тем эксперименты с электромагнитным экранированием (ЭМЭ) проводятся в основном при значительных ослаблениях как статического, так и переменного магнитных полей различных диапазонов [14–16], тогда как эффекты слабого ЭМЭ не изучены. Вопрос о биологической роли ослабленных ЭМИ является актуальным, поскольку они широко распространены, что оказывает неблагоприятное действие на все элементы биосферы. Исследование эффектов ЭМЭ привлекает внимание ученых различного профиля. Это связано как с необходимостью решения ряда фундаментальных проблем, в частности, доказательства важной экологической роли геомагнитного поля, выяснения факторов, ответственных за эффекты экранирования, так и с решением прикладных задач, заключающихся в выяснении неблагоприятных последствий пребывания в таких условиях, а также их предупреждения и коррекции.

В реальных условиях редко наблюдается изолированное действие одного какого-то фактора, как правило, имеет место комбинированное воздействие различных факторов, суммарный эффект воздействия которых может быть различным. Кроме того, при комбинированном действии этих факторов, реакции биологических систем на действие этих систем значительно модифицируются.

Таким образом, для решения актуальных проблем современной физиологии и биофизики, касающихся изучения биологического действия микродоз ЭМИ, необходимо выявление механизмов действия комбинированных магнитных полей, модификации эффектов сверхслабых факторов, что позволит экспериментально доказать способность слабых ЭМИ влиять на функции организма и решить фундаментальную научную задачу — сформулировать непротиворечивую общую концепцию механизма действия слабых электромагнитных факторов на организм.

В связи с этим целью данной работы явилось выявление эффектов модификации болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии Крымского федерального университета им. В.И.

Вернадского на 120 взрослых лабораторных крыс-самцов линии Вистар (Питомник лабораторных животных «Рапполово», Рапполово Всеволожского района Ленинградской области) со средним уровнем двигательной активности и низким уровнем эмоциональности. Для определения уровня двигательной активности и эмоциональности животных использовали специализированную рабочую станцию размером 45 × 45 см с прозрачными полипропиленовыми стенками высотой 20 см, представляющую собой актиметр (IR Actimeter, Pan Lab Harvard Apparatus, Испания) с двумя инфракрасными рамками, выполняющими роль датчиков движений. Для управления рабочей станцией и сбора данных использовали программное обеспечение Actitrack 2.0 (Pan Lab Harvard Apparatus, Испания).

Животных, участвующих в эксперименте, содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–22°C на подстиле «Рехофикс МК 2000» (на основе початков кукурузы) с естественным двенадцатичасовым свето-темновым циклом, свободным доступом к воде (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур») и полноценному гранулированному корму (ГОСТ Р-50258-92).

Ввиду того, что регуляция болевой чувствительности обеспечивается интегративным комплексом механизмов, имеющих избирательную, динамически изменяющуюся нейрохимическую и нейроморфологическую структуру, которая определяется видом действующего фактора, объективную оценку болевой чувствительности целесообразно получить, используя комплекс алгометрических тестов.

В тесте «tail-flick» (тест «отдергивания хвоста») оценивали перцептуальный компонент боли. Основным показателем данного теста служил латентный период болевой реакции отведения хвоста (ЛПБРтох) в ответ на светотермальное раздражение, который определяли по времени проявления реакции отдергивания хвоста. Измерения проводили на приборе LE7106 Tail-flick Meter (Pan Lab Panlab Harvard Apparatus, Испания). На хвост каждой крысы, сидящей в фиксаторе, осуществляли три предъявления свето-термального раздражителя с последующим расчетом среднего значения ЛПБРтох в секундах для каждого животного. Данный тест основан на спинальном флексорном рефлекс, возникающем в ответ на локальное воздействие на хвост высокой температуры, и позволяет судить о болевой чувствительности животных преимущественно на спинальном уровне [17–19].

Тест «алгезиметр—щипцы» (тест Рэндалла-Селитто) на экспериментальной установке BIO-RP-

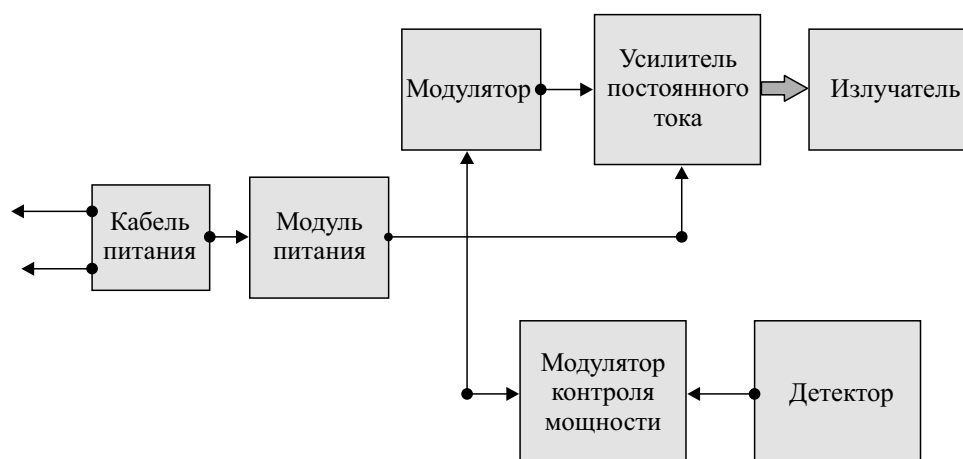


Рис. 1. Электрическая схема аппарата «РАМЕД ЭКСПЕРТ-01».

R Rodent pincher – analgesia meter (Bioseb, Франция) отображает приложенную силу в граммах (Fтащ) – болевой порог механической болевой чувствительности, при котором происходит ответная реакция животного на постепенно увеличивающееся по силе сдавливание хвоста щипцами [19]. Осуществляли по три механических сжатия щипцами хвоста каждой крысы, сидящей в фиксаторе, с последующим расчетом среднего значения болевого порога в граммах для каждого животного.

В тесте «hot plate» (тест «горячая пластина») на экспериментальной установке Cold and hot plate СНР (Bioseb, Франция) регистрировали латентный период болевой реакции (ЛПБРтгп) животного, который определяли по значению времени проявления реакции отдергивания и лизания конечностей и/или вокализации (в секундах). Тест

позволяет судить о болевой чувствительности животных на супраспинальном уровне [19, 20].

Были проведены три серии экспериментов с применением вышеперечисленных тестов. В каждой серии экспериментов животных разделяли на четыре группы по десять особей в каждой. Первая группа животных представляла собой биологический контроль и находилась в стандартных лабораторных условиях. Вторую экспериментальную группу крыс подвергали воздействию низкоинтенсивного ЭМИ ММ с помощью аппарата «РАМЕД-ЭКСПЕРТ – 01» (Центр радиофизических методов диагностики и терапии «РАМЕД» Института технической механики НАНУ, г. Днепропетровск, регистрационное свидетельство № 783/99 от 14.07.14, выданное КНМТ МОЗ Украины о праве на применение в медицинской практике в Украине), применяя длину волны 7.1 мм (частота излучения – 42.3 ГГц) и плотность потока мощности – 0.1 мВт/см². Для воздействия миллиметрового излучения экспериментальных животных фиксировали в прозрачном пенале из оргстекла. Длину и ширину камеры регулировали в зависимости от размеров крысы. Излучатель подводили к облучаемой области животного через отверстие в пенале, соответствующее размеру излучателя, и пластырем плотно фиксировали на затылочно-воротниковой области, т.е. осуществляли облучение контактным способом. Схема устройства и облучения животных приведена на рис. 1 и 2. Воздействие осуществляли с экспозицией по 30 мин на затылочно-воротниковую область [10], ежедневно в течение 21 суток наблюдения.

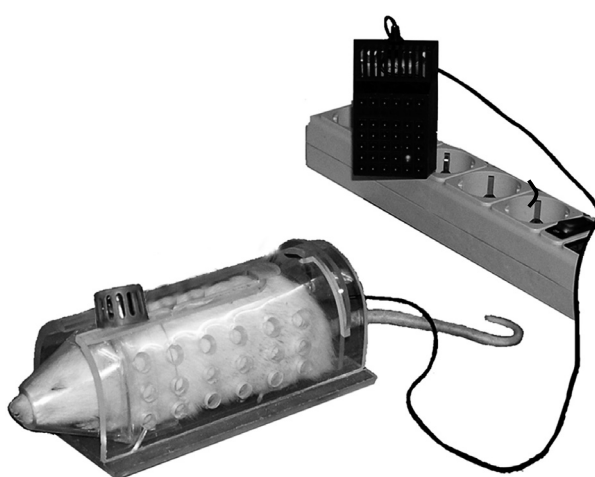


Рис. 2. Экспериментальное воздействие низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на животных.

Третья группа животных (ЭМЭ-группа) находилась в течение 21 суток по 23 ч/сутки в камере, экранирующей влияния фоновых магнитных полей. Экранирующая камера размером 2 × 3 × 2 м была

Зависимость коэффициента экранирования камеры от частоты переменного магнитного поля

f , Гц	S_B	f , Гц	S_B	f , Гц	S_B	f , Гц	S_B
16	3,7	50	2,5	95	3,8	160	1,0
20	2,4	51	2,3	100	2,9	200	1,0
25	1,9	70	2,4	102	2,8	250	1,0
30	2,6	75	2,8	105	2,8	255	1,8
35	2,3	80	2,5	125	2,2	350	0,9
40	2,7	85	2,4	130	1,6	400	1,1
45	2,4	90	2,7	152	1,4	500	1,0

Примечание. S_B — коэффициент экранирования камеры, f — частота переменного магнитного поля. Камера была изготовлена из двухслойного железа марки «Динамо».

изготовлена из двухслойного железа марки «Динамо».

Измерение коэффициента экранирования камеры, связанного с ослаблением магнитного поля (S_B), ввиду небольшой величины S_B было проведено экспериментальным путем.

Для этого осуществляли измерение величины магнитного поля вне камеры и внутри нее. Измерения проводили как с помощью феррозондового магнитометра, так и с помощью индукционной катушки. Коэффициент экранирования магнитного поля на частоте f вычисляли как отношение значения магнитной индукции вне камеры на значение магнитной индукции внутри нее (таблица).

Для измерения в области низких частот (от 10^{-4} Гц до 100 Гц) использовали однокомпонентный и двухкомпонентный феррозондовые магнитометры, позволяющие одновременно производить измерение двух взаимно перпендикулярных проекций вектора магнитного поля. Порог чувствительности магнитометров составляет 1 нТл по каждой компоненте, точность измерения $\pm 3\%$.

Измерения гипомангнитного поля в области высоких частот (от 15 Гц до 100 кГц) проводили в лаборатории в экранирующей камере с помощью измерительной катушки со следующими характеристиками: 500 витков, внутренний диаметр 10 см, внешний — 10.6 см, совместно с селективным усилителем У2-8. Коэффициент экранирования постоянной составляющей магнитного поля, измеренный с помощью феррозондового магнитометра, составлял по вертикальной составляющей 4.375, по горизонтальной составляющей — 20.0.

Измеряли также как в области ультранизких частот, так и в области радиочастот спектральную плотность магнитного шума в экранирующей камере (рис. 3).

Четвертую группу животных подвергали комбинированному действию низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования (ЭМЭ+ММ) в течение 21 суток, аналогично животным второй и третьей групп соответственно.

Для оценки модифицирующего действия слабого ЭМЭ среды на воздействие миллиметрового излучения использовали коэффициент модификации:

$$KM_{ЭМЭ} = \frac{H_{ЭМЭ+ММ} - H_{ММ}}{H_{ММ}}, \quad KM_{ММ} = \frac{H_{ЭМЭ+ММ} - H_{ЭМЭ}}{H_{ЭМЭ}},$$

где KM — коэффициент модификации, H — показатели ноцицепции при воздействии слабого ЭМЭ и низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона соответственно. Коэффициент модификации равен нулю, если модифицирующее влияние изучаемого фактора отсутствует.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Достоверность различий средних величин независимых выборок между экспери-

ментальными группами оценивали с помощью непараметрического критерия Краскелла—Уоллиса. Для статистического анализа результатов исследования использовали программу Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показали результаты исследования, при регистрации фоновых значений болевой чувствитель-

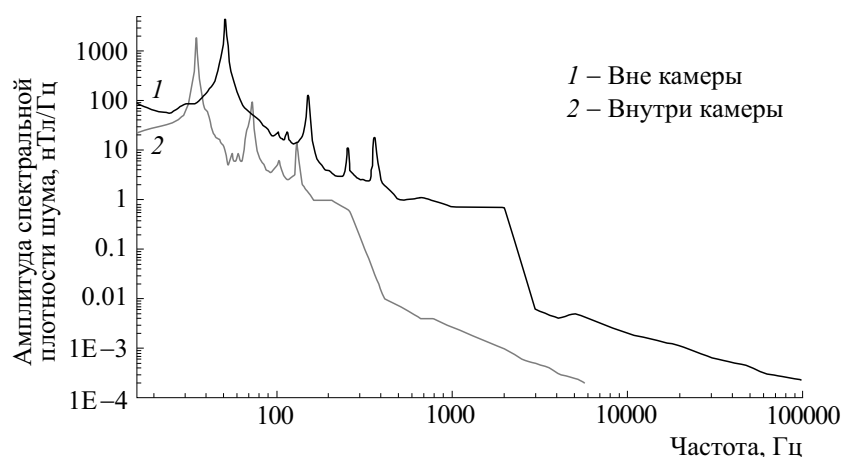


Рис. 3. Зависимость спектральной плотности магнитного шума вне камеры и внутри камеры от частоты в области частот от 15 Гц до 100 кГц.

ности межгрупповые различия у крыс не были обнаружены. Показатели ноцицепции в контрольной группе животных на протяжении 21 суток наблюдения изменялись незначительно и составили в среднем в тесте «hot plate» 3.48 ± 0.20 с, в тесте «tail-flick» — 4.00 ± 0.23 с, в тесте «алгезиметр—щипцы» — 353.96 ± 64.31 г.

У животных второй группы, подвергнутых воздействию низкоинтенсивного ЭМИ ММ, на протяжении наблюдаемого периода отмечалось значительное повышение уровня антиноцицепции по сравнению с соответствующими значениями, зарегистрированными у крыс контрольной группы, что свидетельствует о развитии выраженной гипоалгезии при воздействии низкоинтенсивного физического фактора.

Так, в тесте «hot plate» у крыс выявлен выраженный анальгетический эффект, выражавшийся в увеличении ЛПБР_{тп} относительно контроля в течение всего периода наблюдения, что свидетельствует, согласно работам [19, 20], об участии супраспинальных механизмов в регуляции болевой чувствительности. Так, его максимальный прирост был зарегистрирован на седьмые и одиннадцатые сутки воздействия данного физического фактора и составил 53.93% ($p < 0.01$) и 81.92% ($p < 0.005$) соответственно в сравнении со значениями этого показателя, зарегистрированными в контрольной группе животных (рис. 4а).

В тесте «tail-flick», являющимся термической моделью острой боли [17–19], также был выявлен выраженный анальгетический эффект. Наиболее высокие показатели ЛПБР_{тох} были зарегистрированы на первые, седьмые и пятнадцатые сутки воздействия миллиметрового излучения — отмечалось увеличение на 30,56% ($p < 0,05$), на 37.94% ($p < 0.05$) и на 38.54 % ($p < 0.05$) соответственно,

относительно значений у животных, зарегистрированных в контроле (рис. 4б). Это свидетельствует об участии перцептуального компонента и спинального механизма в регуляции болевой чувствительности под влиянием миллиметровых волн.

В тесте Рэндалла-Селитто (тест «алгезиметр—щипцы»), служащем для определения порогов механической болевой чувствительности [19], регистрировался ответ на болевое механическое воздействие и отмечалась аналогичная динамика показателей болевой чувствительности, как и в других алгометрических тестах при воздействии миллиметровых волн. Максимальное увеличение $F_{тащ}$ было зарегистрировано на одиннадцатые сутки эксперимента (на 68.75%, $p < 0.005$) относительно значений соответствующих показателей, зарегистрированных у животных контрольной группы (рис. 4в).

Таким образом, по данным различных моделей острой боли низкоинтенсивное миллиметровое излучение проявляет анальгезирующее действие, что согласуется с нашими предыдущими исследованиями [10] и дополняют их тем, что антиноцицептивный эффект ЭМИ ММ проявляется в условиях многократного воздействия в течение 21-х суток.

У животных третьей группы, находившихся в условиях длительного ЭМЭ, в отличие от животных, ежедневно подвергавшихся воздействию ММ-излучения, отмечались фазные изменения уровня болевой чувствительности в разных алгологических тестах.

Так, в тестах «tail-flick», «hot plate» и «алгезиметр—щипцы» с первых по седьмые сутки экранирования отмечалось снижение показателей болевой чувствительности относительно соответ-

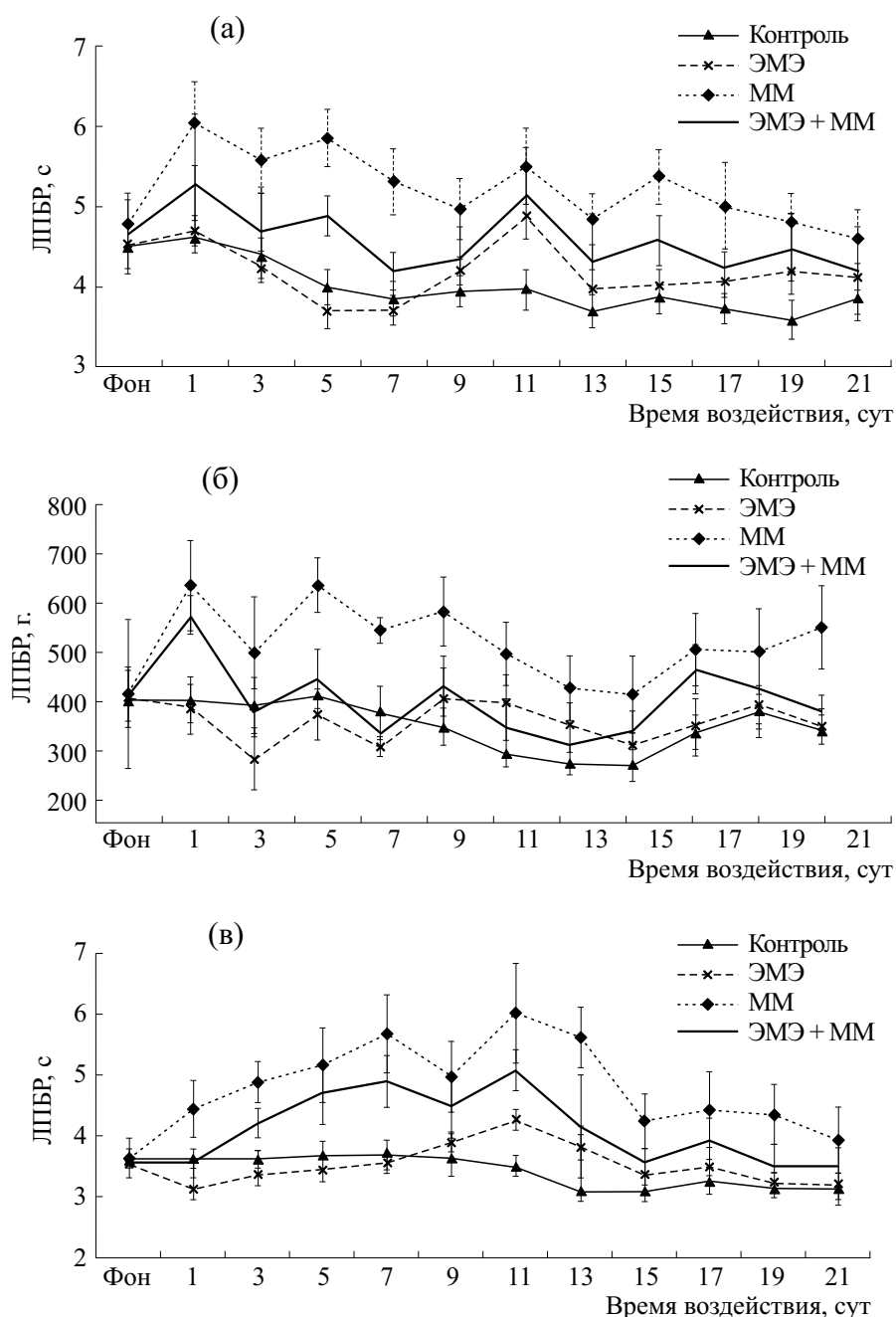


Рис. 4. Динамика показателей ноцицепции (ЛПБР — латентного периода болевой реакции) при изолированном и комбинированном воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (ММ) и электромагнитного экранирования (ЭМЭ) у крыс в тестах «горячая пластина» (а), «отдергивание хвоста» (б), «алгезиметр—щипцы» (в).

ствующих значений у крыс контрольной группы (рис. 4), что свидетельствует о снижении болевого порога и развитии гипералгезии в сравнении с контролем. Максимальное снижение в тесте «hot plate» отмечалось на первые сутки (на 13.81%, $p < 0.05$), в тесте «алгезиметр—щипцы» зарегистрировано на третьи сутки (на 27.90%, $p < 0.05$ соответственно), в тесте «tail-flick» — на пятые

сутки (на 7.30%, $p > 0.05$) воздействия гипомангнитной среды относительно значений у животных в контроле.

С девятых суток воздействия ЭМЭ отмечалось нивелирование болевой реакции в исследуемых болевых тестах. Так, наблюдалось постепенное увеличение показателей ноцицепции относительно фоновых значений и значений соответ-

ствующих показателей, зарегистрированных в контрольной группе животных, что свидетельствует о возрастании болевого порога и развитии гипоалгезии: максимальное увеличение ЛПБР_{тпп}, ЛПБР_{тох} и $F_{\text{тащ}}$ зарегистрировано на одиннадцатые сутки экранирования, что выше на 23.12% ($p < 0.01$), на 22.71% ($p < 0.01$) и на 35.35% ($p < 0.01$) соответственно относительно значений данных показателей у животных контрольной группы.

С пятнадцатых суток нахождения животных в гипомангнитной среде зарегистрирована тенденция к постепенному снижению показателей ноцицепции и приближению их к значениям соответствующих показателей, зарегистрированных у крыс контрольной группы.

Таким образом, у крыс, подвергнутых воздействию слабого ЭМЭ, отмечалось трехфазное изменение болевой чувствительности, где после первой гипералгетической фазы (1-е – 7-е сутки) развивался антиноцицептивный эффект – вторая фаза (11-е – 15-е сутки). В третьей фазе показатели ноцицепции постепенно снижались (17-е – 21-е сутки), приближаясь к значениям ноцицепции, зарегистрированным в контрольной группе животных.

Полученные нами данные о развитии фазных изменений болевой чувствительности в условиях ЭМЭ согласуются с результатами исследований других авторов [21, 22]. Однако продолжительность выделенных нами фаз изменений болевой чувствительности крыс гораздо больше, что может быть объяснено меньшим ослаблением как статического, так и переменного магнитных полей в наших исследованиях в сравнении с литературными данными.

Результаты исследования у животных, находящихся в условиях комбинированного действия ЭМЭ и миллиметрового излучения показали, что уровень ноцицепции у крыс данной группы (ЭМЭ+ММ) был выше показателей болевой чувствительности у животных контрольной группы и группы ЭМЭ и ниже при сравнении с данными, полученными у крыс, подвергнутых воздействию изолированного ЭМИ ММ.

Так, уже с третьих суток эксперимента в группе животных ЭМЭ+ММ отмечалось значимое увеличение ЛПБР_{тпп} относительно значений у крыс контрольной группы. Максимальное увеличение зарегистрировано на седьмые и тринадцатые сутки наблюдения (на 32.79%, $p < 0.01$ и на 45.14% $p < 0.01$ соответственно). Максимальное увеличение ЛПБР_{тох} отмечается на одиннадцатые сутки (на 29.72%, $p < 0.01$), $F_{\text{тащ}}$ – на первые (на 42.94%, $p < 0.01$) и семнадцатые (на 37.41%, $p < 0.01$) сутки наблюдения относительно соответствующих значений у крыс контрольной группы (см. рис. 4).

Данные показатели статистически значимо изменялись и при сравнении с соответствующими значениями у животных второй (ММ) и третьей (ЭМЭ) групп. Так, показания ЛПБР_{тпп} максимально увеличились на пятые (на 36.23%, $p < 0.01$) и седьмые (на 37.64%, $p < 0.01$), ЛПБР_{тох} – на пятые (на 32.36%, $p < 0.01$), $F_{\text{тащ}}$ – на первые (на 45.57%, $p < 0.01$) и семнадцатые (на 33.45%, $p < 0.01$) сутки наблюдения относительно показателей, зарегистрированных у животных, подвергнутых изолированному ЭМЭ.

По сравнению с данными у животных второй группы (ММ), напротив, отмечалось значимое уменьшение значений: ЛПБР_{тпп} – на тринадцатые сутки (на 26.16%, $p < 0.05$), ЛПБР_{тох} – на седьмые сутки (на 21.15%, $p < 0.05$), $F_{\text{тащ}}$ – на седьмые сутки (на 38.78%) наблюдения.

При рассмотрении динамики коэффициента модификации при комбинированном воздействии ЭМЭ и ММ-излучения (рис. 5) в разных болевых тестах наглядно демонстрируется способность низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона оказывать антиноцицептивное действие и модулирующий эффект при гипералгезии, вызванной экранированием. В то же время экранирование уменьшает выраженность антиноцицептивного действия ЭМИ ММ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о том, что у животных при воздействии низкоинтенсивных электромагнитных факторов (ЭМИ ММ и ЭМЭ, а также их комбинация) отмечаются изменения болевой чувствительности, которые, в зависимости от действующего фактора и длительности его применения, выражены в разной степени. Выявлены эффекты модификации болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования: применение ЭМИ ММ в комбинации с ЭМЭ нивелирует экраниндуцированные изменения болевой чувствительности, а применение ЭМЭ в комбинации с ЭМИ ММ снижает антиноцицептивную активность изолированного ЭМИ ММ.

Сопоставление полученных в настоящей работе данных с результатами наших предыдущих экспериментов и исследований, опубликованных в литературе, позволило выделить особенности последствий пребывания животных в условиях умеренного ослабления статической и переменной компонент геомагнитного поля, действия ЭМИ ММ и их комбинации, а также предположить основные физиологические механизмы, лежащие в основе действия данных физических

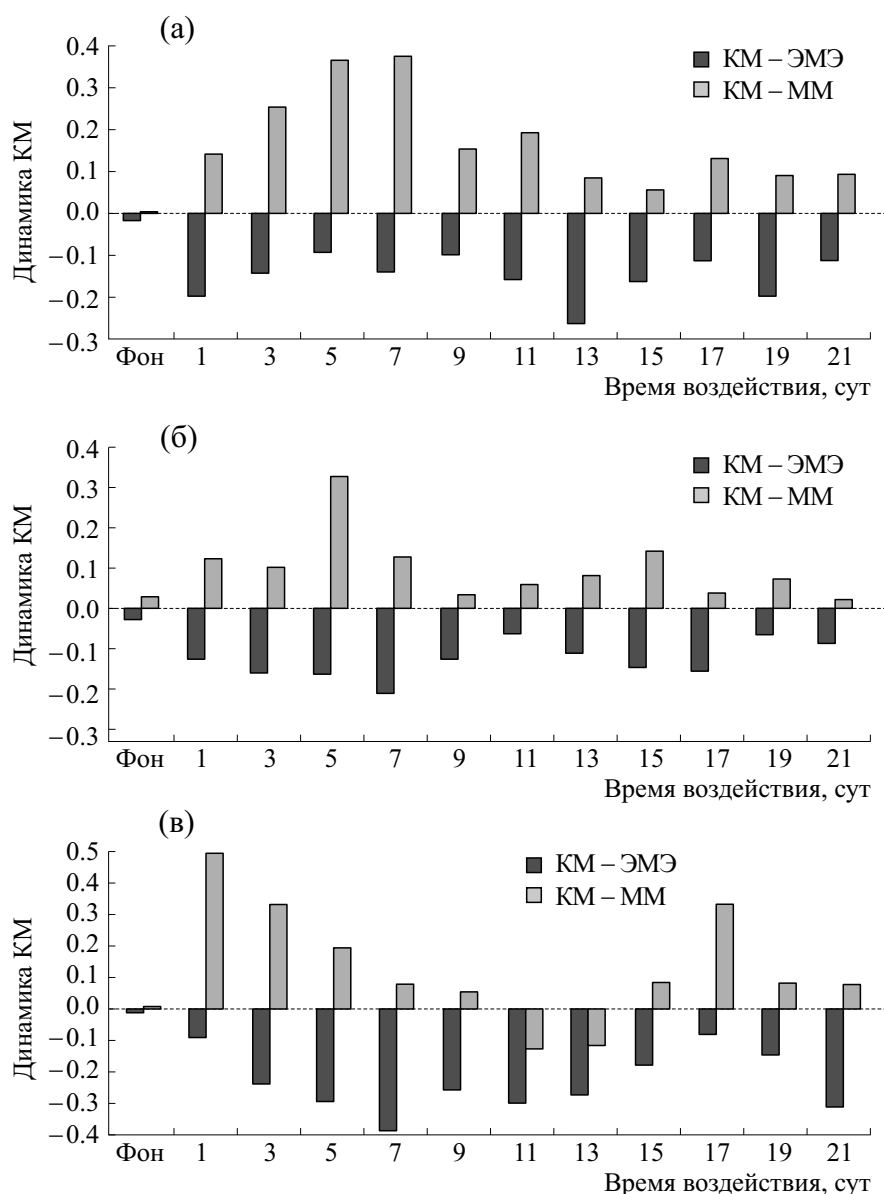


Рис. 5. Динамика коэффициента модификации электромагнитного экранирования (ЭМЭ) и низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (ММ) при комбинированном воздействии данных физических факторов в тестах «горячая пластина» (а), «отдергивания хвоста» (б) и «алгезиметр—щипцы» (в).

факторов на болевую чувствительность животных.

В механизмах действия факторов электромагнитной природы, в том числе ЭМЭ и низкоинтенсивного ЭМИ ММ, на болевую чувствительность важную роль играет опиоидная система, что обнаружено в экспериментах с применением неселективного блокатора опиоидных рецепторов налоксона. В частности, введение налоксона крысам приводило к уменьшению антиноцицептивного эффекта ЭМИ ММ при тонической, висцеральной и острой термической боли [10]. Однако на разных этапах продолжительного действия

ЭМИ ММ активность этой системы неодинакова. Так, при действии этого фактора на моллюсков с дополнительным введением налоксона в течение первых-третьих суток наблюдался эффект гипералгезии, что указывает на зависимость антиноцицептивного действия ЭМИ ММ в этот временной период от опиоидов. С четвертых по восьмые сутки гипоалгетический эффект ЭМИ ММ полностью блокируется налоксоном, т.е. также обусловлен опиодергической системой. С девятого дня эффект лишь частично опиодобусловлен, так как он редуцируется, но не аннулируется неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов. Следовательно, роль опиоидов

уменьшается с увеличением числа воздействий, что, по-видимому, связано с развитием толерантности опиоидной системы к продолжительному действию ЭМИ ММ [22]. Аналогичный эффект описан и при действии ЭМИ других диапазонов [23]. Введение налоксона животным, находившимся в течение 21 суток в электромагнитном экране, до каждого воздействия ЭМИ ММ усиливало гипералгетический эффект ЭМЭ, но на уровне тенденции, в течение первых трех суток эксперимента, а затем его гипералгетическая активность снижалась. На девятые-одиннадцатые сутки развивающийся гипоалгетический эффект комбинированного действия ЭМЭ и ЭМИ ММ полностью нивелировался налоксоном, т.е. был обусловлен опиоидной системой, а начиная с двенадцатых суток прогрессивно снижался, но не ликвидировался, т.е. гипоалгетический эффект лишь частично был связан с опиоидной системой [22].

Таким образом, опиоидобусловленность снижалась с увеличением продолжительности воздействия электромагнитных факторов, что, по-видимому, связано с развитием толерантности опиоидной системы к этим воздействиям. По-видимому, в этот период обезболивающий эффект электромагнитных факторов обеспечивается другими антиноцицептивными системами организма. Этот вывод подтверждают наши более ранние исследования [10], согласно которым гипоалгетическое действие ЭМИ ММ обеспечивается различными эндогенными системами. В частности, ведущую роль в механизмах антиноцицептивного действия ММ-излучения играет мелатонин. Впервые нами было установлено, что при действии ЭМИ ММ увеличивается содержание мелатонина в сыворотке крови животных [24]. Известно, что опиоидные пептиды выступают в качестве физиологических медиаторов эпифизарного и экстрапинеального мелатонина [25], ответственны за универсальную координацию нервных, эндокринных и иммунных механизмов, а также за обеспечение замкнутых циклических связей между ними и эпифизом [25]. Кроме этого, нами установлено, что низкоинтенсивное ЭМИ ММ и экзогенный мелатонин оказывают сходное действие на экраноиндуцированные изменения ноцицепции у моллюсков, заключающиеся в нивелировании гипералгетического эффекта [22]. Эти данные согласуются с мелатониновой теорией действия электромагнитных факторов, согласно которой последние в начальный период своего действия угнетают секрецию нейрого르몬а [26]. Это влечет за собой уменьшение продукции β -эндорфина и чувствительности опиоидных рецепторов [27], т.е. снижение активности опиоидной системы. Следствием этого является развитие гипералгезии, что имеет место и в проведенных исследованиях в условиях изолированного ЭМЭ.

Можно предположить, что при комбинированном действии двух электромагнитных факторов (ЭМЭ и ЭМИ ММ) не происходит снижения секреции мелатонина благодаря модифицирующему действию ММ-излучения, что и является причиной нивелирования экранобусловленной гипералгезии с помощью дополнительного воздействия на животных ЭМИ ММ, что и выявлено в настоящем исследовании.

Исходя из приведенных фактов, можно утверждать, что физиологические механизмы действия низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона на организмы, находящиеся в условиях ослабленного электромагнитного поля, связаны с изменением состояния опиоидергической системы и содержания мелатонина. Поэтому естественно предположить, что активация данных эндогенных систем является неспецифической реакцией организма на низкоинтенсивные воздействия физических факторов.

Таким образом, результаты данного исследования позволили выявить эффекты модификации болевой чувствительности крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования, проверить и существенно дополнить гипотезу о корригирующем действии ЭМИ ММ на экраниндуцированные процессы, а также экспериментально подтвердить теоретические представления об основных физиологических механизмах, лежащих в основе биологического действия данных физических факторов.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены эффекты модификации болевой чувствительности у крыс с помощью низкоинтенсивного миллиметрового излучения и электромагнитного экранирования: применение ЭМИ ММ в комбинации с ЭМЭ нивелирует экраниндуцированные изменения болевой чувствительности; применение ЭМЭ в комбинации с ЭМИ ММ снижает антиноцицептивную активность изолированного ЭМИ ММ.

2. При воздействии низкоинтенсивных электромагнитных факторов (ЭМИ ММ и ЭМЭ и их комбинации) у животных отмечаются изменения болевой чувствительности, степень выраженности которых зависит от действующего фактора и длительности его применения.

3. У крыс, подвергнутых воздействию слабого электромагнитного экранирования, отмечалось трехфазное изменение болевой чувствительности во всех используемых в настоящем исследовании алгометрических тестах: первая фаза — гипералгезия (1–7 сутки), вторая фаза — гипоалгезия (11–15 сутки), третья фаза — нормализация и приближе-

ние показателей ноцицепции к контрольным значениям (17–21 сутки).

4. У животных, подвергнутых воздействию низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, на протяжении наблюдаемого периода во всех алгометрических тестах отмечалось значительное повышение уровня антиноцицепции по сравнению с соответствующими значениями, зарегистрированными у крыс контрольной группы и группы животных, находившейся в условиях слабого экранирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках инициативной части государственного задания № 6.5452.2017/8.9 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Временная организация физиологических систем человека и животных: феноменология и механизмы генерации и регуляции микро- и мезоритмов».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Парин, Космическая биология и медицина **2** (1), 3 (1968).
2. R. Sandyk, Int. J. Neurosci. **77** (304), 243 (1994).
3. C. Qin, J. M. Evans, and W. S. Yamanashi, Neuromodulation **8**, 79 (2005).
4. В. В. Леднев, в сб. *Моделирование геофизических процессов* (ОИФЗ им. О.Ю. Шмидта РАН, М., 2003), сс. 130–136.
5. Е. Б. Бурлакова, А. А. Кондратов и Е. Л. Мальцева, Биофизика **49** (4), 551 (2004).
6. О. В. Бецкий, В. В. Кислов и Н. Н. Лебедева, *Миллиметровые волны и живые системы* (Наука: М., 2004).
7. Н. Д. Девятков, М. Б. Голант и О. В. Бецкий, *Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн* (ИРЭ РАН, М., 1994).
8. A. A. Radziewsky, O. V. Gordienko, and S. Alekseev, Bioelectromagnetics **29**, 284 (2008).
9. Е. Н. Чуян, Н. А. Темурьянц, О. Б. Московчук и др., *Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ* (ЧП «Эльиньо», Симферополь, 2003).
10. Е. Н. Чуян и Э. Р. Джелдубаева, *Механизмы антиноцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения* (ДИАЙПИ, Симферополь, 2006).
11. S. I. Alekseev, O. V. Gordienko, and A. A. Radziewsky, Bioelectromagnetics **31**, 180 (2010).
12. S. A. Eccles, Curr. Opin. Genet. Dev. **15** (1), 77 (2005).
13. D. Wang, Z. G. Liu, J. Zhao, et al., Sci. Rep. **7** (1), 11346 (2017).
14. M. Asashima, K. Shimada, and C. J. Pfeiffer, Bioelectromagnetics **12** (4), 215 (1991).
15. K. A. Jenrow, C. H. Smith, and A. R. Liboff, Bioelectromagnetics **17**, 467 (1996).
16. A. M. Koziak, D. Desjardins, and L. D. Keenlside, Bioelectromagnetics **27**, 10 (2006).
17. A. Gulati, S. Bhalla, G. Matwyshyn, et al., Pharmacology **83**, 45 (2011).
18. F. Xu, B. Zhang, and T. Li, Pharmacology **27** (4), 427 (2013).
19. А. Н. Миронов, А. Д. Бунатян, А. Н. Васильев и др., *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств* (Гриф и К, М., 2012).
20. Л. А. Северьянова, И. И. Бобынцев, М. Е. Долгинцев и Н. А. Кирьянова, Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», № 2, 44 (2005).
21. F. S. Prato, J. A. Robertson, D. Desjardins, et al., Bioelectromagnetics **26** (2), 109 (2005).
22. Н. А. Темурьянц, Е. Н. Чуян, А. С. Костюк и др., *Эффекты слабых электромагнитных факторов у беспозвоночных животных (регенерация планарий, ноцицепция моллюсков)* (Информационно-издательский отдел Таврического национального университета имени В.И. Вернадского, Симферополь, 2012).
23. A. W. Thomas, M. Kavaliers, F. S. Prato, et al., Peptides **18**, 703 (1997).
24. Е. Н. Чуян, Н. А. Темурьянц, О. Б. Московчук и др., *Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ* (ЧП «Эльиньо», Симферополь, 2003).
25. Э.Б. Арашунян, Русский медицинский журнал **13** (26), 1755 (2005).
26. R. J. Reiter, D. X. Tan, B. Poeggeler, et al., Bioelectromagnetics **19** (5), 318 (1998).
27. S. R. Srinivasan and G. S. Berenson, Lancet **358** (9298), 2012 (2001).

Changes of Pain Sensitivity in Rats after Exposure to Low-Intensity Millimeter-Wave Radiation with the Use of Electromagnetic Shielding

E.N. Chuyan, E.R. Dzheldubaeva, and N.S. Tribat

Vernadsky Crimean Federal University, prosp. Vernadskogo 4, Simferopol, Republic of Crimea, 295007 Russia

This study focuses on the detection of changes in pain sensitivity in rats after exposure to single low-intensity electromagnetic radiation (7.1 mm, 0.1 mW/cm²; location – the occipital-collar region, exposure time 30 minutes, duration of exposure 21 days) in the millimeter range and after exposure to the combined action of the abovementioned radiation and moderate electromagnetic shielding (EMS; screening coefficient of the constant component of the magnetic field along the vertical component of the magnetic field – 4.4 times, horizontal field component – 20 times; exposure time 22 hours/day, duration of exposure 21 days). The pain sensitivity of animals was evaluated using a complex of algometric tests: “hot plate”, “tail pulling”, “tongs-algesimeter”, that made it possible to consider the pain impulse at different levels of regulation. Algological effects from single low-intensity electromagnetic radiation in the millimeter range and after combination of it with moderate electromagnetic shielding are shown. After exposure to the combined action of these physical factors it was shown that low-intensity electromagnetic waves in the millimeter range exert an antinociceptive effect and modulating effect in hyperalgesia caused by screening. At the same time, shielding reduces the severity of the antinociceptive action of the electromagnetic radiation in the millimeter range.

Keywords: pain sensitivity, millimeter-wave electromagnetic radiation, electromagnetic shielding

СПЕКТРАЛЬНО-СЕЛЕКТИВНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СОЛНЕЧНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ФОТОПРИЕМНИКАМИ СЕТЧАТКИ ПРИ УПРАВЛЕНИИ ЦИРКАДИАНЫМ РИТМОМ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА В 11-ЛЕТНЕМ ЦИКЛЕ СОЛНЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. А.В. Леонидов

E-mail: avleonidoff@mail.ru

Поступила в редакцию 21.05.2019 г.

После доработки 21.05.2019 г.

Принята к публикации 25.12.2019 г.

Рассмотрено суточное воздействие солнечного излучения на фотоприемники сетчатки глаза при управлении циркадианной ритмикой организма человека в пределах произвольного 11-летнего цикла солнечной активности. Приведены расчетные данные, описывающие изменение в течение цикла солнечной активности спектральных и энергетических характеристик солнечного излучения, достигшего земной поверхности. На этой основе получено обобщенное аналитическое выражение, моделирующее спектрально-селективную обработку палочками и синевоспринимающими колбочками сетчатки суммы прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения. Полученное выражение позволяет провести рассмотрение раздельной спектрально-селективной обработки прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения палочками и синевоспринимающими колбочками сетчатки, в том числе в случае фатального поражения одного из нейронных каналов, связывающих палочки или синевоспринимающие колбочки с супрахиазмными ядрами гипоталамуса. Показано, что эффективный спектр, полученный в результате спектральной селекции составляющих солнечного излучения и используемый для управления циркадианной активностью организма человека, определяется исключительно спектральной чувствительностью палочек и синевоспринимающих колбочек. Эффективный спектр не зависит от суточных вариаций спектра солнечного излучения при изменении угловой высоты Солнца; суточные энергетические характеристики эффективного спектра, изменяющиеся в пределах каждого цикла солнечной активности, сохраняют зависимость от суточной угловой высоты Солнца и текущей фазы цикла солнечной активности. Значительные изменения характеристик солнечного излучения в пределах цикла солнечной активности позволили сделать вывод о необходимости их учета при исследовании и моделировании процессов управления циркадианной активностью организма человека солнечным излучением.

Ключевые слова: циркадианная активность, палочки, синевоспринимающие колбочки, сетчатка, относительная спектральная циркадианная эффективность, спектральная селекция, цикл солнечной активности, излучение, коэффициенты пропускания атмосферы, спектральная плотность облученности, облученность.

DOI: 10.31857/S0006302920030217

Основным физическим фактором, осуществляющим управление циркадианной активностью на уровне целостного организма человека, являются суточные изменения характеристик естественной энергетической освещенности (облученности) земной поверхности, создаваемой солнечным излучением [1].

Суточные изменения характеристик облученности обусловлены также отчетливо проявляю-

щими себя циклическими изменениями солнечной активности (цикл Швабе [2–4]) с периодом, равным 11 годам. Циклические изменения солнечной активности, связанные с изменением числа пятен (число Вольфа W [2]) на видимой поверхности фотосферы Солнца, приводят к циклическим изменениям эффективной термодинамической температуры $T_{\text{эфф}}$ солнечного излучения, изменениям абсолютных значений спектральной плотности светимости и собственно светимости фотосферы. Максимальные изменения параметров излучения фотосферы в преде-

Сокращение: СПО – спектральная плотность облученности.

лах одного цикла солнечной активности могут достигать $\sim 35\%$. Очевидно, что в любых фазах цикла солнечной активности эти изменения оказывают влияние на управление и характеристики циркадианной активности человека.

До настоящего времени совместное влияние суточных и циклических 11-летних изменений характеристик облученности при исследованиях и моделировании процессов управления циркадианной активностью человека солнечным излучением не учитывалось.

Целью работы является представляющее интерес для биологии, хронобиологии и светотехники описание спектрально-селективных преобразований, производимых приемниками оптического излучения тракта управления циркадианной активностью, при совместном воздействии суточных и 11-летних изменений спектральных и энергетических характеристик солнечного излучения.

Солнечное излучение, достигшее земной поверхности, воздействует на аналоговые приемники оптического излучения в виде некоторой совокупности синевоспринимающих колбочек и палочек, расположенных в периферических зонах сетчатки глаза [5]. Палочки и синевоспринимающие колбочки представляют собой начальное звено тракта управления циркадианной активностью человека [1]. На этой стадии в тракте управления циркадианной активностью осуществляется собственно прием и спектрально-селективная аналоговая обработка солнечного излучения, заключающаяся в выделении из спектра солнечного излучения его циркадианной области и обеспечивающая собственно управление циркадианной активностью человека.

Результатом этой обработки является сформированные ганглиозными (выходными) клетками сетчатки нейронные сигналы, содержащие в бинарной форме информацию о спектральной

плотности облученности (СПО), принятой и обработанной аналоговыми приемниками оптического излучения [5].

Сформированные ганглиозными клетками выходные сигналы сетчатки доставляются к супрахиазменным ядрам гипоталамуса, в которых происходит формирование сигналов управления суточной активностью эпифиза, секретирующего в плазму крови гормон мелатонин. Суточные изменения концентрации мелатонина в плазме крови приводят в конечном счете к управлению циркадианной активностью человека.

Выходные бинарные сигналы сетчатки являются взаимно однозначным и взаимно непрерывным, гомеоморфным отображением СПО, воздействующей на сетчатку. Поэтому дальнейшее описание преобразований сигналов в тракте управления циркадианной активностью для наглядности и удобства представления проводится с использованием аналоговых эквивалентов бинарных сигналов с соответствующими этому описанию понятиями и терминологией.

Функция $m_{eS}(\lambda, T)$ спектральной плотности энергетической светимости фотосферы Солнца описывается функцией Планка излучения черного тела [6, 7]:

$$m_{eS}(\lambda, T) = C_1 \lambda^{-5} \left(\exp \frac{C_2}{\lambda T} - 1 \right)^{-1}, \quad (1)$$

где λ — длина волны излучения, T — термодинамическая температура равновесного излучения черного тела, $C_1 \approx 3.742 \cdot 10^{-16}$ Вт $\cdot$ м² и $C_2 \approx 1.439 \cdot 10^{-2}$ м $\cdot$ К.

Спектральная плотность облученности при нормальном падении солнечного излучения на площадку, расположенную на верхней границе земной атмосферы, имеет следующий вид:

$$e_{eS}(\lambda, T_{\text{эфф}}) = \left(\frac{r}{R} \right)^2 m_{eS}(\lambda, T_{\text{эфф}}) = \left(\frac{r}{R} \right)^2 C_1 \lambda^{-5} \left(\exp \frac{C_2}{\lambda T_{\text{эфф}}} - 1 \right)^{-1}, \quad (2)$$

где $T_{\text{эфф}}$ — эффективная (усредненная по фотосфере) термодинамическая температура солнечного излучения, $r = 6.96 \cdot 10^5$ км — экваториальный радиус Солнца, $R = 1.496 \cdot 10^{12}$ км — радиус круговой орбиты Земли [8, 9].

Значение $T_{\text{эфф}}$ в соотношении (2), согласно действующим рекомендациям Международной комиссии по радиации [10], принимается равным

постоянному значению, что не позволяет выявить зависимость $e_{eS}(\lambda, T_{\text{эфф}})$ от номера года n в пределах цикла солнечной активности.

Очевидно, что в соотношении (2) $T_{\text{эфф}} = T_{\text{эфф}}(n)$. В качестве основы при определении зависимости $T_{\text{эфф}}(n)$ использовано значение солнечной постоянной

$$E_{\text{СП}}(T_{\text{эфф}}) = \int_0^\infty e_{eS}(\lambda, T_{\text{эфф}}) d\lambda = \left(\frac{r}{R} \right)^2 \int_0^\infty m_{eS}(\lambda, T_{\text{эфф}}) d\lambda, \quad (3)$$

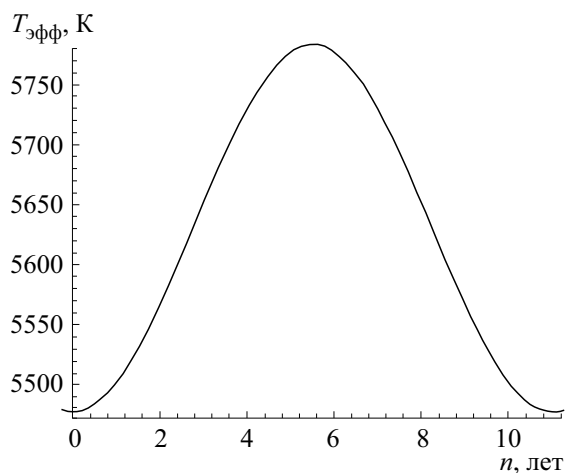


Рис. 1. Изменение эффективной термодинамической температуры излучения фотосферы Солнца в произвольном 11-летнем цикле солнечной активности.

представляющей собой энергетическую освещенность (облученность) при нормальном паде-

$$E_{\text{СП}}(T_{\text{эфф}}) = 683 \int_{350 \cdot 10^{-9}}^{770 \cdot 10^{-9}} e_{eS}[\lambda, T_{\text{эфф}}] V(\lambda) d\lambda = \left(\frac{r}{R}\right)^2 683 \int_{350 \cdot 10^{-9}}^{770 \cdot 10^{-9}} m_{eS}[\lambda, T_{\text{эфф}}] V(\lambda) d\lambda, \quad (4)$$

представляющей собой освещенность площадки, расположенной на верхней границе земной атмосферы, при нормальном падении солнечного излучения в условиях минимума солнечной активности. В условиях минимальной солнечной активности значение $E_{\text{СП}, \min} = 135110$ лк [12]. Указанному значению $E_{\text{СП}, \min}$ по результатам вычислений с использованием соотношений (2) и (4) соответствуют значения $E_{\text{СП}, \min} = 1106 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ и $T_{\text{эфф}, \min} = 5480 \text{ К}$.

Ранее определенным для максимума солнечной активности значениям $E_{\text{СП}, \max} \approx 1370 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ и $T_{\text{эфф}, \max} = 5780 \text{ К}$ соответствует значение световой солнечной постоянной $E_{\text{ССП}} = 173600$ лк.

Зависимость эффективной термодинамической температуры излучения фотосферы Солнца $T_{\text{эфф}}(n)$ при указанных выше значениях $T_{\text{эфф}, \min}$ и $T_{\text{эфф}, \max}$ для произвольного цикла солнечной активности, временные характеристики которого получены усреднением известных 25 циклов солнечной активности [2–4], описывается соотношением:

$$T_{\text{эфф}}(n) = T_{\text{эфф}, \text{средн}} \left[1 + 0.027 \sin\left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2}\right) \right], \quad (5)$$

где $T_{\text{эфф}, \text{средн}} = 0.5(T_{\text{эфф}, \min} + T_{\text{эфф}, \max})$.

нии солнечного излучения на площадку, расположенную на верхней границе земной атмосферы [11].

По данным спутниковых актинометрических измерений, относящихся к максимальным значениям 20 и 21 циклов солнечной активности [2–4], наиболее вероятное значение $E_{\text{СП}}(T_{\text{эфф}})$ заключено в интервале $1368\text{--}1377 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ при отсутствии регулярности изменения во времени. Это позволяет использовать термин «солнечная постоянная». В качестве стандартного значения солнечной постоянной, соответствующего максимуму солнечной активности, принято значение по Международной пиргелиометрической шкале 1956 г., равное $E_{\text{СП}, \max}(T_{\text{эфф}}) \approx 1370 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ [9, 10]. Этому значению $E_{\text{СП}, \max}(T_{\text{эфф}})$, согласно соотношениям (2) и (3), соответствует значение $T_{\text{эфф}, \max} = 5780 \text{ К}$.

Значения $T_{\text{эфф}, \min}$ и $E_{\text{СП}, \min}$ определялись с использованием так называемой световой солнечной постоянной $E_{\text{ССП}, \min}(T_{\text{эфф}})$ (в диапазоне длин волн $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 770 \cdot 10^{-9} \text{ м}$):

График зависимости по соотношению (5) приведен на рис. 1.

Минимальные и максимальные значения так называемой солнечной и световой солнечной «постоянной» в различных спектральных диапазонах приведены в таблице.

Зависимости $E_{\text{СП}}(n)$, определенные по соотношению (3) при вычисленных значениях $E_{\text{СП}, \min}$ и $E_{\text{СП}, \max}$ для спектрального диапазона $0 \leq \lambda \leq \infty \text{ м}$, для спектрального окна прозрачности атмосферы $300 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 1200 \cdot 10^{-9} \text{ м}$ и циркулярной области спектра $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 570 \cdot 10^{-9} \text{ м}$ имеют следующий вид:

$$E_{\text{СП}}(n) = E_{\text{СП}, \text{средн}} \left[1 + 0.1062 \sin\left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2}\right) \right], \quad (6)$$

при $0 \leq \lambda \leq \infty \text{ м}$,

$$E_{\text{СП}}(n) = E_{\text{СП}, \text{средн}} \left[1 + 0.1153 \sin\left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2}\right) \right], \quad (7)$$

при $300 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 1200 \cdot 10^{-9} \text{ м}$,

$$E_{\text{СП}}(n) = E_{\text{СП}, \text{средн}} \left[1 + 0.1485 \sin\left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2}\right) \right], \quad (8)$$

при $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 570 \cdot 10^{-9} \text{ м}$. (8)

Значения $E_{\text{СП}, \text{средн}}$ для каждого спектрального диапазона приведены в последней строке таб-

Значения солнечной постоянной $E_{СП}$ в различных спектральных диапазонах, а также значения световой солнечной постоянной $E_{ССП}$ в видимой области спектра при минимуме и максимуме солнечной активности

Характер солнечной активности	$E_{СП}, \text{Вт} \cdot \text{м}^{-2},$ при $0 \text{ нм} \leq \lambda \leq \infty \text{ нм}$	$E_{СП}, \text{Вт} \cdot \text{м}^{-2},$ при $300 \text{ нм} \leq \lambda \leq 1200 \text{ нм}$ (спектральное окно прозрачности атмосферы [13])	$E_{СП}, \text{Вт} \cdot \text{м}^{-2},$ при $350 \text{ нм} \leq \lambda \leq 570 \text{ нм}$ (циркадианная область спектра)	$E_{ССП}, \text{лк},$ при $350 \text{ нм} \leq \lambda \leq 770 \text{ нм}$ (видимая область спектра)
Минимум	1106.3	838.7	272.6	135110
Максимум	1369.2	1057.4	367.7	173600
Среднее	1237.7	948.1	320.1	154355

лицы. Графики зависимостей (6)–(8) приведены на рис. 2.

После распространения в земной атмосфере солнечное излучение содержит в своем составе прямую и рассеянную составляющие.

Прямая $e_{П,еS}(\lambda, h)$ и рассеянная $e_{Р,еS}(\lambda, h)$ составляющие СПО на земной поверхности после распространения в спектральном окне прозрачности атмосферы описываются соотношениями

$$e_{П,еS}[\lambda, T_{эфф,П}(h)] = \left(\frac{r}{R}\right)^2 m_{eS}[\lambda, T_{эфф,П}(h)] \tau_{П}(h), \quad (9)$$

$$e_{Р,еS}[\lambda, T_{эфф,Р}(h)] = \left(\frac{r}{R}\right)^2 m_{eS}[\lambda, T_{эфф,Р}(h)] \tau_{Р}(h), \quad (10)$$

где $\tau_{П}(h)$ и $\tau_{Р}(h)$ — зависимости интегральных коэффициентов пропускания атмосферы прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения от угловой высоты Солнца в спектральном окне прозрачности земной атмосферы $300 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 1200 \cdot 10^{-9} \text{ м}$.

Очевидно, что характер функций $\tau_{П}(h)$ и $\tau_{Р}(h)$ существенно зависит от текущего состояния земной атмосферы и определяется наличием или от-

сутствием облачного покрова и степенью покрытия неба облаками.

Использованные в дальнейшем функции $\tau_{П}(h)$ и $\tau_{Р}(h)$ определены на основе экспериментальных данных [12]. Данные, приведенные в работе [12], в настоящее время представляют собой наиболее полный свод сведений, позволяющих определить зависимости облученности и освещенности земной поверхности от угловой высоты Солнца.

В качестве примера далее рассмотрим случай безоблачного неба. В этом случае функции $\tau_{П}(h)$ и $\tau_{Р}(h)$ описываются следующими соотношениями:

$$\tau_{П}(h) = \tau_{П}(90^\circ) 0.5[1 + \sin(0.035h - 1.47)], \quad (11)$$

$$\tau_{Р}(h) = \tau_{Р}(90^\circ) 0.5[1 + \sin(0.029h - 1.09)]. \quad (12)$$

В соотношениях (11) и (12) значения коэффициентов $\tau_{П}(90^\circ) = 0.729$ и $\tau_{Р}(90^\circ) = 0.205$ представляют собой интегральные коэффициенты пропускания атмосферы (при безоблачном небе) на экваторе при нормальном падении солнечного излучения на земную поверхность в сутки весеннего или осеннего равноденствия.

Суточные зависимости прямой $T_{П}(h)$ и рассеянной $T_{Р}(h)$ составляющих термодинамической температуры солнечного излучения на земной поверхности с учетом 11-летнего цикла солнечной активности равны:

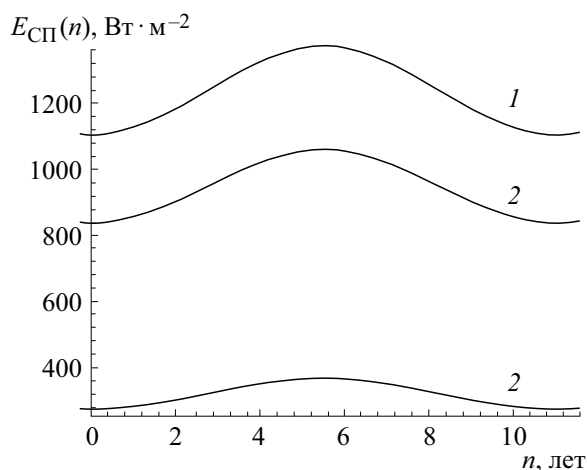


Рис. 2. Изменение солнечной постоянной для различных спектральных диапазонов (в нм) излучения Солнца в произвольном цикле солнечной активности: 1 — $0 \leq \lambda \leq \infty$, 2 — $300 \leq \lambda \leq 1200$, 3 — $350 \leq \lambda \leq 770$.

$$T_{\text{эфф},\Pi}(h,n) = [-3780 \exp(-0.2444h) + T_{\text{эфф}}(n)], \quad (13)$$

$$T_{\text{эфф},\text{P}}(h,n) = [8950 \exp(-0.2084h) + T_{\text{эфф}}(n)]. \quad (14)$$

Первые слагаемые в соотношениях (13) и (14) представляют собой определенные на основе независимых экспериментальных данных [14] зависимости термодинамической температуры прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения на земной поверхности в светлый период произвольных суток года, вторые слагаемые в соотношениях (13) и (14) описываются выражением (5).

Подстановка в соотношения (9) и (10) выражений (13) и (14), а также численных значений $\tau_{\Pi}(90^\circ)$ и $\tau_{\text{P}}(90^\circ)$ позволяет получить развернутые соотношения для зависимостей СПО прямой $e_{\Pi,eS}(\lambda,h,n)$ и рассеянной $e_{\text{P},eS}(\lambda,h,n)$ составляющих солнечного излучения от длины волны λ в спектральном окне прозрачности земной атмосферы и от угловой высоты Солнца в произвольной точке земной поверхности при фиксированном значении n в цикле солнечной активности:

$$e_{\Pi,eS}(\lambda,h,n) = \left(\frac{r}{R}\right)^2 C_1 \lambda^{-5} \left\{ \exp \frac{C_2}{\lambda \left[-3780 \exp(-0.2444h) + 5630 \left[1 + 0.027 \sin \left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2} \right) \right] \right]} - 1 \right\}^{-1} 0.729 \times \times 0.5 [1 + \sin(0.035h - 1.47)], \quad (15)$$

$$e_{\text{P},eS}(\lambda,h,n) = \left(\frac{r}{R}\right)^2 C_1 \lambda^{-5} \left\{ \exp \frac{C_2}{\lambda \left[8950 \exp(-0.2084h) + 5630 \left[1 + 0.027 \sin \left(\frac{2\pi n}{11} - \frac{\pi}{2} \right) \right] \right]} - 1 \right\}^{-1} 0.205 \times \times 0.5 [1 + \sin(0.029h - 1.09)]. \quad (16)$$

Значения $n = 0$ и $n = 5.5$ в соотношениях (15) и (16) относятся к минимуму и максимуму солнечной активности соответственно. Разности соотношений (15) при $n = 0$ и $n = 5.5$, а также соотношений (16) при $n = 0$ и $n = 5.5$ определяют максимальные изменения СПО $e_{\Pi,eS}(\lambda,h)$ и $e_{\text{P},eS}(\lambda,h)$ на земной поверхности в пределах одного цикла активности Солнца.

Солнечное излучение, достигшее земной поверхности и описываемое СПО прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения (соотношения (15), (16)) или их суммой, воздейству-

ет на синевоспринимающие колбочки и палочки сетчатки глаза и подвергается этими фотоприемниками спектрально-селективной обработке функцией относительной спектральной циркадианной эффективности $c(\lambda)$ [5], полученной с использованием результатов независимых экспериментальных исследований [15–17]. Функция $c(\lambda)$ может быть описана нормированной суммой взвешенных функций относительной спектральной чувствительности $c_1(\lambda)$ синевоспринимающих колбочек и $c_2(\lambda)$ палочек сетчатки [5]:

$$c(\lambda) = c_1(\lambda) + c_2(\lambda) = \frac{\alpha_1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_{1\max})^2}{2\sigma_1^2} \right] + \frac{\alpha_2}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_{2\max})^2}{2\sigma_2^2} \right], \quad (17)$$

где $\alpha_1 = 72.56 \cdot 10^{-9}$ м, $\sigma_1 = 28.99 \cdot 10^{-9}$ м, $\lambda_{1\max} = 445 \cdot 10^{-9}$ м, $\alpha_2 = 25.89 \cdot 10^{-9}$ м, $\sigma_2 = 21.21 \cdot 10^{-9}$ м, $\lambda_{2\max} = 505 \cdot 10^{-9}$ м.

График функции (17) изображен на рис. 3.

Аналоговые эквиваленты бинарных сигналов, сформированных ганглиозными клетками сетчатки и зависящих от угловой высоты h Солнца, представляются произведением прямой $e_{\Pi,eS}(\lambda,h,n)$ и рассеянной $e_{\text{P},eS}(\lambda,h,n)$ составляю-

щих солнечного излучения или их суммы на функцию относительной спектральной циркадианной эффективности $c(\lambda)$. Функция $c(\lambda)$, как и ее слагаемые $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$, могут рассматриваться в качестве характеристик узкополосных спектральных фильтров, выделяющих из широкополосного спектра солнечного излучения (в спектральном окне прозрачности земной атмосферы) узкополосные участки в спектральных диапазонах существования функций $c_1(\lambda)$, $c_2(\lambda)$ и $c(\lambda)$,

осуществляя тем самым узкополосную спектральную селекцию солнечного излучения [18].

Очевидно, что в реальном процессе управления циркадианной активностью солнечным излучением на синевоспринимающие колбочки и палочки сетчатки в подавляющем большинстве случаев воздействует сумма прямой $e_{\Pi, eS}(\lambda, h, n)$ и рассеянной $e_{P, eS}(\lambda, h, n)$ составляющих солнечного излучения. В норме, при отсутствии фатальных повреждений нейронных трактов от синевоспринимающих колбочек и палочек сетчатки до супрахиазмальных ядер гипоталамуса, прямая и рассеянная составляющие солнечного излучения подвергаются спектральной селекции суммой функций $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$.

Теоретический и практический интерес представляют также варианты раздельной обработки прямой $e_{\Pi, eS}(\lambda, h, n)$ и рассеянной $e_{P, eS}(\lambda, h, n)$ составляющих СПО функциями $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$ по отдельности, а также их возможными сочетаниями.

В этом случае появляется возможность составления композиций произведений $e_{i, eS}(\lambda, h, n) \cdot c_j(\lambda)$, (индекс $i = 1, 2$ обозначает прямую или рассеянную составляющие СПО, а индекс $j = 1, 2$ определяет функцию $c_1(\lambda)$ либо $c_2(\lambda)$) и выявления особенностей раздельной обработки прямой $e_{\Pi, eS}(\lambda, h, n)$ и рассеянной $e_{P, eS}(\lambda, h, n)$ составляющих СПО функциями $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$ или их суммой $c(\lambda)$, а также описать различные варианты спектральной селекции солнечного излучения при управлении циркадианной активностью человека.

Области определения функций $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$ лежат в спектральных диапазонах $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 435 \cdot 10^{-9}$ м и $435 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 570 \cdot 10^{-9}$ м соответственно, а их сумма $c(\lambda) = c_1(\lambda) + c_2(\lambda)$ — в спектральном диапазоне $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 570 \cdot 10^{-9}$ м [5].

Спектральные функции $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$ образуют два перекрывающихся спектральных канала обработки солнечного излучения — соответственно коротковолновой и длинноволновой.

Варианты обработки солнечного излучения только функцией $c_1(\lambda)$ или только функцией $c_2(\lambda)$ описывают случаи фатального поражения ней-

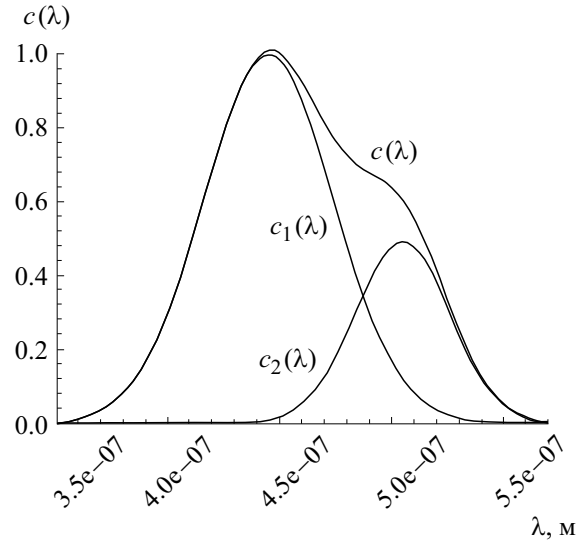


Рис. 3. Функция относительной спектральной циркадианной эффективности: 1, 2 — графики функций $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$ соответственно, 3 — график функции $c(\lambda)$.

ронного пути от палочек или от синевоспринимающих колбочек сетчатки до супрахиазмальных ядер гипоталамуса соответственно.

При изменении угловой высоты Солнца в светлый период суток значения весовых коэффициентов α_1 и α_2 в соотношении (17) постоянны [19]. Очевидно, что спектральные характеристики функций $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$, а также спектральные характеристики произведений $e_{i, eS}(\lambda, h, n) \cdot c_j(\lambda)$, независимо от значений весовых коэффициентов α_1 и α_2 , остаются постоянными. При этом абсолютные значения функций $e_{i, eS}(\lambda, h, n) \cdot c_j(\lambda)$ сохраняют зависимость от угловой высоты Солнца.

В наиболее часто реализуемом случае воздействия суммы прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения одновременно на коротковолновой и длинноволновой спектральные каналы (функции (15)–(17)) соотношение для СПО, образованное в результате спектрально-селективной обработки солнечного излучения функцией $c(\lambda) = c_1(\lambda) + c_2(\lambda)$, имеет следующий вид:

$$\begin{aligned}
 e_{\Pi+P, KB+ДВ}(\lambda, h, n) &= [e_{\Pi, eS}(\lambda, h, n) + e_{P, eS}(\lambda, h, n)] \cdot [c_1(\lambda) + c_2(\lambda)] = \\
 &= \left(\frac{r}{R}\right)^2 C_1 \lambda^{-5} \left\{ \left[\exp \frac{C_2}{\lambda [-3780 \exp(-0.2444h) + T_{эфф}(n)]} - 1 \right]^{-1} 0.729 \cdot 0.5 [1 + \sin(0.035h - 1.47)] \right\} + \\
 &+ \left\{ \exp \frac{C_2}{\lambda [8950 \exp(-0.2084h) + T_{эфф}(n)]} - 1 \right\}^{-1} 0.205 \cdot 0.5 [1 + \sin(0.029h - 1.09)] \left\{ \right. \\
 &\quad \times \left\{ \frac{\alpha_1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_{1max})^2}{2\sigma_1^2} \right] + \frac{\alpha_2}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_{2max})^2}{2\sigma_2^2} \right] \right\} \left. \right\}, \quad (18)
 \end{aligned}$$

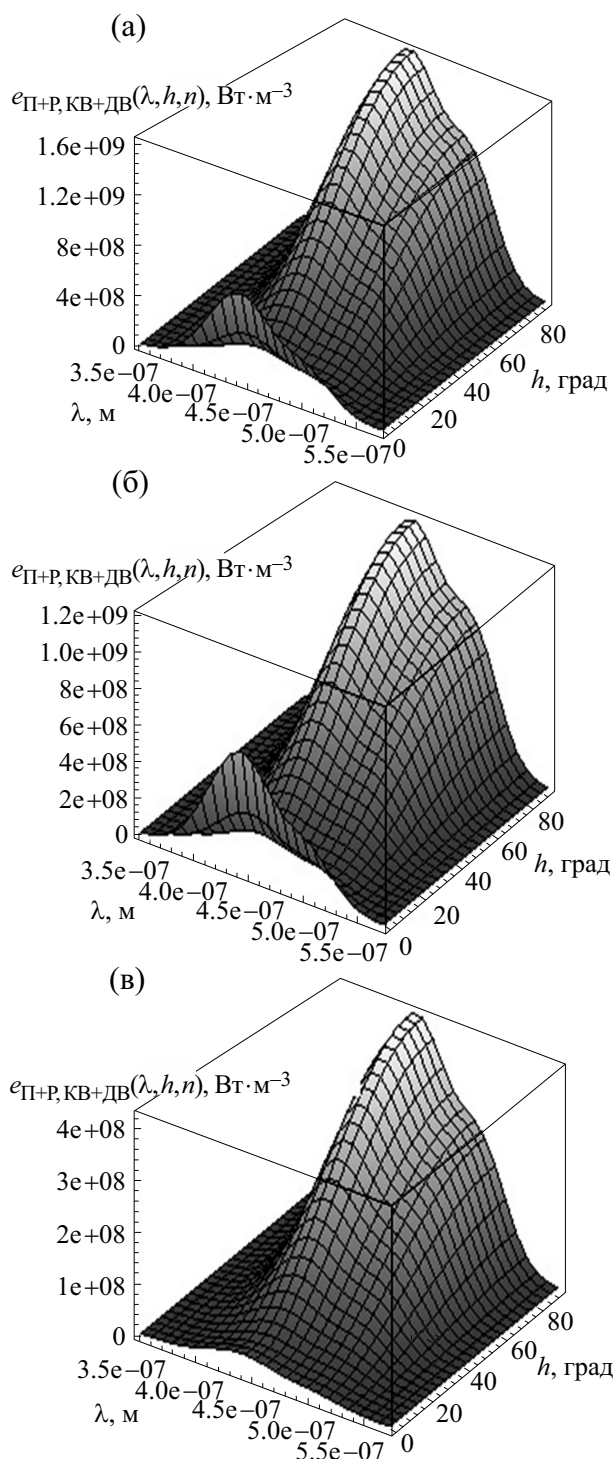


Рис. 4. Зависимости спектральной плотности облученности от угловой высоты Солнца и длины волны излучения, создаваемой суммой прямой и рассеянной составляющих солнечного излучения при одновременном воздействии на коротковолновой и длинноволновой спектральные каналы: (а) — при максимуме солнечной активности ($n = 5.5$, $T_{эфф} = 5780$ К); (б) — при минимуме солнечной активности ($n = 0$, $T_{эфф} = 5480$ К); (в) — разность спектральных плотностей облученности при максимуме и минимуме солнечной активности.

где функция $T_{эфф}(n)$ описывается соотношением (5).

Соотношение (18) позволяет получить возможные комбинации $e_{П,ес}(\lambda, h, n)$, $e_{Р,ес}(\lambda, h, n)$, $c_1(\lambda)$ и $c_2(\lambda)$, а также описать и исследовать особенности спектрально-селективной обработки солнечного излучения при различных сочетаниях функций (14)–(16).

Графики зависимости (18) в циркадианной области спектра излучения Солнца при максимуме $n = 5.5$ ($T_{эфф} = 5780$ К) и минимуме $n = 0$ ($T_{эфф} = 5480$ К) солнечной активности, а также график, иллюстрирующий различия абсолютных значений $e_{П+Р,КВ+ДВ}(\lambda, h, n)$ при максимуме и минимуме солнечной активности, полученные в результате спектрально-селективной обработки солнечного излучения палочками и колбочками сетчатки, приведены на рис. 4.

Из рис. 4а,б непосредственно следует, что после спектральной селекции солнечного излучения палочками и синевоспринимающими колбочками сетчатки глаза спектральные характеристики функций $e_{П,ес}(\lambda, h, n)$ и $e_{Р,ес}(\lambda, h, n)$ сохраняют свою форму независимо от угловой высоты Солнца. Напротив, их энергетические характеристики существенно зависят от длины волны солнечного излучения в циркадианной области спектра и текущей угловой высоты Солнца.

График, иллюстрирующий зависимость разности $\Delta e_{П+Р,КВ+ДВ}(\lambda, h, n)$ значений СПО в максимуме и минимуме солнечной активности на длине волны $\lambda = 445 \cdot 10^{-9}$ м, а также график зависимости разности значений СПО, отнесенных к СПО при минимуме солнечной активности $\frac{\Delta e_{П+Р,КВ+ДВ}(\lambda, h, n)}{e_{П+Р,КВ+ДВ}(\lambda, h, n)_{\min}}$ в интервале изменения угловой высоты Солнца $0^\circ \leq h \leq 90^\circ$, приведен на рис. 5.

Максимальное значение разности значений СПО в циркадианной области спектра излучения Солнца при максимуме и минимуме солнечной активности при $\lambda = 445 \cdot 10^{-9}$ м, $h = 90$ составляет $4.302 \cdot 10^8$ Вт · м⁻³.

Из рис. 5б следует, что относительные различия в значениях СПО при максимуме и минимуме солнечной активности имеют место в условиях небольших значений угловой высоты Солнца и находятся в пределах от 5 до 36% с последующей стабилизацией этого значения на уровне 36% при угловой высоте Солнца $h > 25^\circ$.

Использование приведенной выше методики позволяет на основе данных работы [12] аналогичным образом получить аналитические выражения, описывающие интегральные коэффициенты пропускания земной атмосферы и спек-

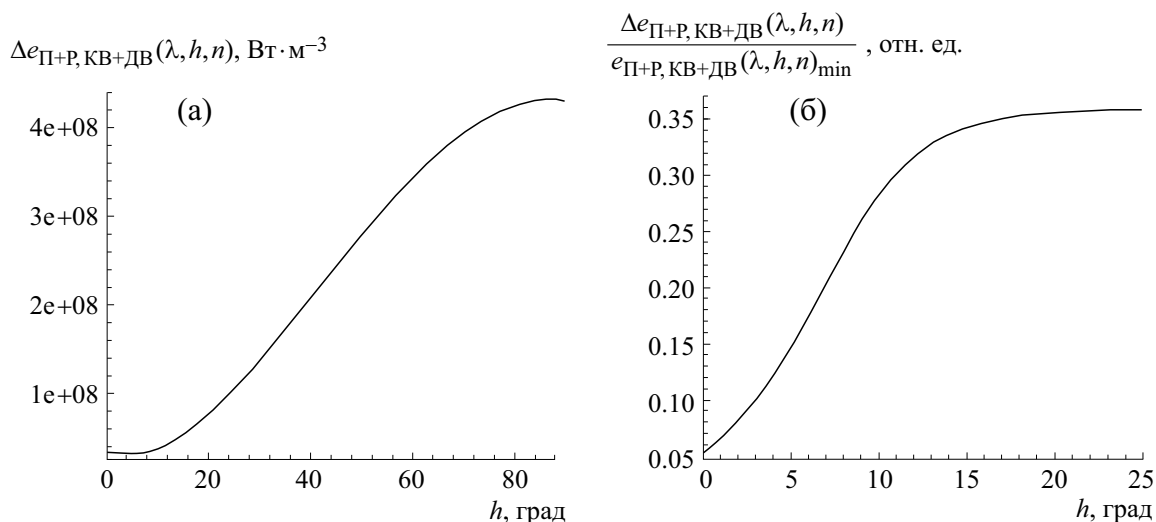


Рис. 5. (а) — Зависимость разности значений СПО при $\lambda = 445 \cdot 10^{-9}$ м в интервале изменения угловой высоты Солнца $0^\circ \leq h \leq 90^\circ$; (б) — зависимость разности значений СПО, отнесенной к СПО при минимуме солнечной активности.

трально-селективную обработку солнечного излучения, управляющего циркадианной активностью человека, при различных видах облачного покрова и различной степени покрытия неба облаками.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют также о том, что в спектре любого широкополосного источника оптического излучения спектр циркадианной активности определяется исключительно спектрально-селективными свойствами палочек и синевоспринимающих колбочек сетчатки. Однако в этом случае коэффициент использования воздействующего широкополосного излучения оказывается достаточно низким. Повышение коэффициента использования излучения может быть достигнуто в специализированных облучательных установках, предназначенных для предотвращения и/или купирования нарушений циркадианной активности человека, в которых используются узкополосные источники оптического излучения, суммарный спектр излучения которых соответствует спектральному диапазону $350 \cdot 10^{-9} \leq \lambda \leq 570 \cdot 10^{-9}$ м циркадианной активности человека.

Полученные в работе результаты указывают на необходимость учета при биологических, хронобиологических и светотехнических исследованиях изменений в течение произвольных суток влияния 11-летней цикличности оптического излучения Солнца. В частности, при проведении экспериментальных и теоретических исследований циркадианной активности, а также при моделировании процессов управления циркадианной активностью человека солнечным излучением учет циклической активности Солнца позволит получать более достоверные сведения о

существовании исследуемых явлений, обеспечит возможность адекватной интерпретации полученных результатов и формулирование достоверных выводов по результатам исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Леонидов, *Биофизика* **59** (4), 805 (2014).
2. Ю. И. Витинский, М. Копецкий и Г. В. Куклин, *Статистика пятнообразовательной деятельности Солнца* (Наука, М., 1986).
3. URL: <http://www.sidc.be/silso/ssngraphics> (SILSO data/image, Royal Observatory of Belgium, Brussels).
4. URL: http://cyclowiki.org/wiki/11-летний_цикл_солнечной_активности.
5. А. В. Леонидов, *Биофизика* **61** (6), 1208 (2016).
6. Р. М. Гальярди и Ш. Карп, *Оптическая связь*, под ред. А. Г. Шереметьева (Связь, М., 1978).
7. Э. Г. Пестов и Г. М. Лапшин, *Квантовая электроника* (Воениздат, М., 1972).
8. *Альфа и омега: Краткий справочник*, 2-е изд. (Валгус, Таллин, 1988).
9. К. У. Аллен, *Астрофизические величины. Справочное изд.* (Мир, М., 1977). 279 с.
10. А. А. Кмитов и Ю. А. Складов, *Пиргелиометрия* (Гидрометеониздат, Л., 1981).
11. *Физика космоса. Маленькая энциклопедия*, под ред. Р. А. Сюняева и др., 2-е изд. (Советская энциклопедия, М., 1986).
12. В. В. Шаронов, *Таблицы для расчета природной освещенности и видимости* (Изд-во АН СССР, 1945).
13. Э. В. Кононович и В. И. Мороз, *Общий курс астрономии: учеб. пособие*, под ред. В. В. Иванова, Изд. 2-е, испр. (Едиториал УРСС, М., 2004).

14. К. Шварцер, Освещение с управляемым цветом — исследование и оптимизация систем управления цветовым освещением. Заключительный отчет (2006), http://www.bocom.eu/rus/catalog/downloads/Farblichtstadie_rus.pdf.
15. Г. К. Брейнард и Г. Л. Гликман, Светотехника, № 1, 4 (2004).
16. K. Thapan, J. Arendt, and D. J. Skene, *J. Physiol.* **535**, 261 (2001).
17. G. C. Brainard and I. Provencio, in *2nd CIE Expert Symp. «Lighting and Health» CIE 031* (2006).
18. А. В. Леонидов и В. Г. Барышников, Светотехника, № 5, 12 (1983).
19. А. В. Леонидов, Светотехника, № 2, 66 (2012).

Spectral-Selective Transformations of Solar Radiation by Retinal Photoreceptors while Controlling the Circadian Rhythm of the Human Body in an 11-Year Cycle of Solar Activity

A.V. Leonidov

The daily effect of solar radiation on photoreceptors of the retina of the eye when controlling the circadian rhythm of the human body within an arbitrary 11-year cycle of solar activity is considered. The calculated data describing the change during the solar activity cycle of the spectral and energy characteristics of solar radiation that reached the earth's surface are given. On this basis, a generalized analytical expression has been obtained that simulates spectral-selective treatment with retinal rods and blue-sensitive cones of the sum of the direct and diffuse components of solar radiation. The expression obtained allows consideration of separate spectral-selective processing of the direct and diffuse components of solar radiation with rods and blue-sensitive cones of retina, including in the case of a fatal lesion of one of the neural channels connecting rods or blue-sensitive cones with suprachiasmatic hypothalamus nuclei. It is shown that the effective spectrum obtained as a result of spectral selection of the components of solar radiation and used to control the circadian activity of the human body is determined solely by the spectral sensitivity of rods and blue-sensitive cones. The effective spectrum does not depend on daily variations in the spectrum of solar radiation when the angular height of the sun varies; the daily energy characteristics of the effective spectrum, varying within each solar activity cycle, retain their dependence on the daily angular height of the Sun and the current phase of the solar activity cycle. Significant changes in the characteristics of solar radiation within the solar activity cycle have led to the conclusion that it is necessary to take them into account in the study and simulation of the control processes of the circadian activity of the human body by solar radiation.

Keywords: circadian activity, rods, blue-sensitive cones, retina, relative spectral circadian efficiency, spectral selection, solar activity cycle, radiation, atmospheric transmission coefficients, spectral density of irradiance, irradiance

ПЕРКОЛЯЦИОННАЯ РЕШЕТКА ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА КАК КОММУТАТОР ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ И СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОТОКЕ МУТАЦИЙ

© 2020 г. А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, Н.Т. Левашова, В.А. Твердислов

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

E-mail: sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2019 г.

После доработки 28.12.2019 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Рассмотрены основные модели мутационных процессов в ходе отбора и дрейфа. Представлена принципиально новая модель протекания мутаций через перколяционную решетку отбора на популяционном уровне. Естественный отбор оптимальных вариантов в эволюционном потоке мутаций рассмотрен в качестве перколяционного фильтра — физического инструмента, составляющего механизм отбора. Модель основана на представлениях о самоорганизации в иерархических структурах видообразования, где триггерные свойства ячейки (узла) как вентиля определяют детерминированную компоненту закрепления новых мутаций, а дрейф определяет элемент случайности в процесс закрепления новых мутаций в потоках мутаций. Получены режимы закрепления мутаций в зависимости от соотношения размера кластера носителей мутаций к общему размеру популяции, коэффициентов отбора и дрейфа в чередующихся поколениях на популяционном уровне. Определен нижний порог перколяционной решетки отбора как доля новых мутаций, зафиксированных под воздействием детерминированных процессов отбора для минимально воспроизводящей численности кластера.

Ключевые слова: естественный отбор, самоорганизация, флуктуации, бифуркации, перколяции, запрещающие и разрешающие мутации

DOI: 10.31857/S0006302920030229

Моделирование мутационных процессов в ходе отбора и дрейфа, как правило, базируется на анализе однотипных мутаций [1, 2] и в основном положительных [1, 3–6]. Снижению вероятности фиксации полезных мутаций способствуют взаимодействия между мутациями. Так, взаимодействие отрицательных мутаций [7] может нивелировать эффект положительных мутаций [1, 4, 8], а взаимодействия между полезными мутациями могут приводить к замедлению процесса адаптации и снижению усредненного эффекта полезных мутаций [9]. В целом клonalная интерференция между мутациями возможна между мутациями с различной направленностью [10], и ее вероятность увеличивается при увеличении численности популяции и частоты мутаций [11]. Распределение полезных мутаций в ряде работ связывается с эффектами плейотропности [12, 13], Хилла–Робертсона [14], «храповика Мюллера» [15], обратных мутаций [16], эпистаза (так, в популяциях с половым отбором эпистаз может способствовать или не способствовать рекомбинации [17–20]), которые при определенных условиях способствуют ускорению или замедлению

фиксации благоприятных мутаций. Новые мутации чаще возникают на клonalном фоне, и клonalное доминирование дает мутациям преимущество, особенно если оно сохраняется в течение длительного времени [21, 22]. Но, как показано Н.В. Тимофеевым-Ресовским [23], возможна фиксация единичной мутации с большим положительным эффектом, если она затрагивает ключевую функцию и поддержана ранее закрепившимися мутациями — принцип усиления. Адаптации могут способствовать как единичные положительные мутации с большим эффектом, так и множественные положительные мутации с небольшим эффектом, которые встречаются чаще, чем единичные мутации с большим эффектом и способны подавлять фиксацию мутаций с большим эффектом [11, 24, 25]. В первом случае речь идет об узкоспециализированных положительных мутациях, которые способны вытеснять менее полезные мутации [9, 26]. Однако необходимо учитывать, что узкоспециализированные положительные мутации с большим эффектом являются «удачными» на небольшом временном интервале, в отличие от широких адаптаций (ре-

зультата взаимодействия спектра мутаций) — более важных для процесса видообразования.

Многие модели мутаций с одинаковым эффектом рассматривают приспособленность как бегущую волну с постоянной скоростью (в соответствии с уравнением Фишера—Колмогорова—Петровского—Пискунова) [4, 16, 27–29], где в области действия отбора применяются детерминистические законы, а в области генетического дрейфа — законы случайных чисел [28, 30]. Модель бегущей волны также адекватно описывает обратные и компенсирующие мутации [27, 31] (в случае обратных или компенсирующих мутаций волна может двигаться либо вправо — храповик, либо влево — реверсия [16]), промежуточную область в профиле волны, определяемую параметрами отбора и дрейфа [16, 28], «стохастический порог» [11, 28, 32], стохастический скачок в «пространстве пригодности» [33] и динамику смещения приспособленности [28, 34], где приспособленность может контролироваться мутациями с достаточно слабым эффектом [33].

В ряде волновых моделей [35–37] рассматривается влияние на мутационный процесс «мутатора» и «антимутатора», наличие которых при определенных условиях может способствовать вероятности появления новой мутации [38, 39]. Вероятность фиксации аллеля определяется размером популяции, параметрами среды, клональной интерференцией, частотой «полезных» и «вредных» мутаций, а также «мутатора» и «антимутатора». В целом, естественный отбор способствует стабильной частоте мутаций в популяции, поэтому аллели «мутатора» и «антимутатора», частота которых больше стабильной частоты, как правило, не поддерживаются отбором [35]. Однако понимание механизмов действия «мутатора» и «антимутатора» в настоящее время остается неполным.

В значительной степени вероятность фиксации мутаций зависит от спектра ранее закрепившихся мутаций. Так, полезные мутации способны создавать блоки с вредными и нейтральными мутациями в других локусах, что способствует генетической дисперсии и увеличению частоты рекомбинации [40–43]. Поэтому эффект новых мутаций зависит от спектра ранее закрепившихся, а последовательность мутаций и их закрепление определяют «вектор отбора» после прохождения точки бифуркации — «критической» точки видообразования. С физической точки зрения мы имеем дело с кинетической необратимостью.

Естественный отбор можно сравнить с явлением перколяции [44], где перколяционный фильтр — составляющий физический инструмент отбора оптимальных вариантов в эволюционном потоке мутаций. Параметры структуры, через которую протекает поток подвижной среды, и поро-

га перколяции, определяемого долей занятых узлов, при которой возникает перколяционный кластер, — связанные элементы в модели протекания [45]. Перколяции могут наблюдаться в системах, состоящих из большого числа подобных элементов, если такие связанные элементы распределенных систем находятся подобно триггеру в одном из двух состояний — устойчивости и неустойчивости. В отсутствие детерминированных механизмов сеть неустойчивых перколяций стохастична и не может обеспечить устойчивое развитие системы, поэтому неустойчивые траектории мутационного процесса отфильтровываются отбором. Устойчивые (коррелированные) перколяции составляют траекторию эволюции вида или популяции. Выход популяции/вида на устойчивую траекторию эволюции — это динамическое единство генетического и популяционного уровней, связанных обратными связями [44]. По существу, естественный отбор определяет свойства протекания перколяционной решетки, т.е. определяет закономерность прохождения новых мутаций в зависимости от спектра мутаций, ранее зафиксированных в популяции. Давление для потока создает пул мутаций, аналогично давлению газа или жидкости через перколяционный фильтр, и в результате отбора-фильтра происходит выборка и фиксация мутаций. Иными словами, при наличии устойчивых (коррелированных) мутаций формируется устойчивая траектория эволюции.

Аналогично перколяциям (случайным и скоррелированным [45, 47–49]), мутационный процесс носит детерминированный (определяется генотипом и фенотипом в ходе отбора) и случайный характер (генетический дрейф), а выбор траектории развития на популяционном уровне зависит от спектра ранее закрепившихся «разрешающих» и «запрещающих» мутаций [50].

МОДЕЛЬ ПЕРКОЛЯЦИОННОЙ РЕШЕТКИ ОТБОРА В ПОТОКЕ МУТАЦИЙ ПОД УПРАВЛЕНИЕМ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ И СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ

В модели на популяционном уровне мутации рассматриваются вне зависимости от их направленности, так как вектор их направленности определяется их адаптивной пользой на кратком временном интервале и в дальнейшем, в зависимости от условий среды, может изменить знак. Узлы в перколяционной решетке (особи в популяции) работают как триггерная вентильная система в потоках мутаций, где особи — носители и преобразователи мутаций. Триггерные свойства ячейки (узла) как вентиля определяют детерминированную компоненту закрепления новых мутаций, а взаимодействие мутаций в чередѣ поко-

лений и случайные процессы дрейфа определяют коллективное поведение узлов и связей (мутаций) в пространстве перколяционной решетки.

В модели мутации (флуктуации) являются источником, обеспечивающим качественный переход популяции на новую ступень иерархической структуры видообразования. Самоорганизация в иерархических структурах видообразования поддерживается системой взаимодействий на горизонтальных уровнях. По мере накопления малых флуктуаций (мутаций) и формирования связей между мутациями, малые флуктуации преобразуются в гигантские, и система переходит на новый уровень — обретает новую структуру с новыми функциями. Поэтому формирование нового вида можно рассматривать как трехуровневый процесс. На первом уровне постоянного белого шума за счет наличия многочисленных случайных процессов процесс определяется точечными взаимодействиями особей — носителей мутаций. На этом уровне мутации для единичных особей могут являться обратимыми, но при наличии достаточного количества носителей новой мутации происходит формирование кластеров носителей мутаций. На втором уровне имеет место локальное взаимодействие кластеров, и начинаются специализация и дифференциация, которые получают завершение при образовании вида. На этом уровне взаимодействия кластеров также имеют место малые флуктуации, но конечный результат в значительной степени определяется детерминированными процессами. Переход со второго на третий уровень является точкой бифуркации: возможно формирование нового вида или элиминация носителей мутации. На третьем уровне взаимодействия между популяциями новая гигантская флуктуация связана с формированием новой структуры — нового вида. Это элементарный про-

цесс возникновения сложных структур с новыми параметрами из относительно простых элементов [51].

В модели для n поколений приняты следующие исходные характеристики.

Популяция — неоднородная среда, обладающая набором запрещающих, разрешающих и новых мутаций.

Рассматриваются мутации: новые мутации (M_C), закрепившиеся ранее мутации — запрещающие (M_R) и разрешающие (M_B) вне зависимости от их направленности.

В отличие от ранее рассмотренной модели [52] в данной случае популяция состоит из N особей, Ne — размер кластера носителей мутаций (запрещающих, разрешающих и новых) в долях от N , $N - Ne$ — количество особей-немутантов. В среднем минимальная величина размера кластера Ne составляет 30% от общей численности популяции [53], а максимальная величина варьирует в диапазоне 60–85% от общего числа особей в популяции [54]. Принимаем $0.3 < Ne < 0.80$.

Минимальное количество поколений n , необходимое для закрепления мутации, принимаем равным 10. Согласно работам [55, 56], вероятность фиксации мутаций в поколениях n сначала возрастает до $n = 10$, а затем мутации, лежащие в полосе $\pm 10\%$, ведут себя почти нейтрально, поэтому можно считать, что минимальное количество поколений, необходимое для закрепления мутации на втором популяционном уровне, равно 10. В случае фиксации мутации в течение 10 поколений она считается закрепившейся.

Скорость изменения общей численности популяции N равна

$$\frac{dN}{dn} = -r_1(N - Ne) + r_2(N - Ne) - r_3Ne + r_4Ne, \quad (1)$$

где r_1 — константа скорости смертности немутантов, r_2 — константа скорости рождаемости немутантов, r_3 — константа скорости смертности мутантов, r_4 — константа скорости рождаемости мутантов. Скорость изменения

Ne зависит только от скорости смерти и рождения мутантов:

$$\frac{dNe}{dn} = -r_3Ne + r_4Ne. \quad (2)$$

В каждом поколении изменение численности популяции равно

$$\Delta N = (N_n - N_{n-1}) = -r_1(N_{n-1} - Ne_{n-1}) + r_2(N_{n-1} - Ne_{n-1}) - r_3Ne_{n-1} + r_4Ne_{n-1}.$$

Следовательно, численность популяции в поколении n равна

$$N_n = -r_1(N_{n-1} - Ne_{n-1}) + r_2(N_{n-1} - Ne_{n-1}) - r_3Ne_{n-1} + r_4Ne_{n-1} + N_{n-1}. \quad (3)$$

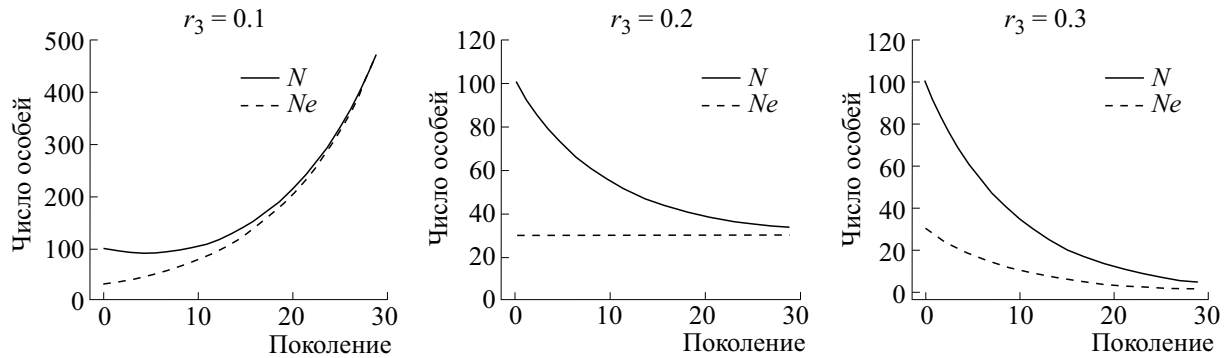


Рис. 1. График зависимости числа особей в популяции (N) и мутантов (Ne) от поколений при различных значениях констант рождаемости и смертности мутантов и немутантов: (а) $r_3 < r_4$, $r_1 > r_2$; (б) $r_3 = r_4$, $r_1 > r_2$; (в) $r_3 > r_4$, $r_1 > r_2$.

Для части популяции, имеющей мутацию, имеем:

$$\Delta Ne = (Ne_n - Ne_{n-1}) = -r_3 Ne_{n-1} + r_4 Ne_{n-1},$$

$$Ne_n = -r_3 Ne_{n-1} + r_4 Ne_{n-1} + Ne_{n-1}.$$

Рассмотрим зависимость числа особей в совокупной популяции N и мутантов Ne от поколений для следующих случаев:

1. Константа скорости смертности мутантов меньше, чем константа скорости смертности немутантов ($r_3 < r_4$), константа скорости смерти немутантов выше, чем константа их скорости рождения ($r_1 > r_2$). В этом случае рост численности популяции N происходит за счет роста численности мутантов Ne . В итоге к тридцатому поколению немутантов в популяции содержится менее 0.7% (рис. 1а).

2. Константа скорости смертности мутантов равна константе скорости смертности немутантов ($r_3 = r_4$) и константа скорости смертности немутантов выше, чем константа скорости их рождения ($r_1 > r_2$). В этом случае численность популяции падает за счет уменьшения численности немутантов, при этом численность мутантов остается неизменной. Популяция выходит на постоянный уровень $N = Ne_0 = 30$ (рис. 1б).

3. Константа скорости смертности мутантов больше константы скорости смерти немутантов ($r_3 > r_4$) и константа скорости смертности немутантов выше, чем константа скорости их рождения ($r_1 > r_2$). В этом случае происходит элиминация всей популяции (рис. 1в).

Исходно новая мутация M_C может быть передана конечному числу особей в популяции, в зависимости от соотношения Ne/N , наличия и соотношения разрешающих (M_R) и запрещающих (M_B) мутаций, значений коэффициентов отбора (s) и дрейфа (k). Скорость закрепления новой мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях определяется как

$$\frac{dM_C}{dt} = -\ln M_C \cdot p_C \frac{(p_R M_R - p_B M_B) Ne}{N} + kW, \quad (4)$$

где M_C — доля новых мутаций от общего количества мутаций (нормированных на 1); M_R — доля разрешающих мутаций (нормированных на 1); M_B — доля запрещающих мутаций (нормированных на 1), закрепившихся; Ne — эффективный размер популяции (доля особей от общей численности популяции, способных к размножению и являющихся носителями мутаций — кластер); p_C — вероятность фиксации новых мутаций; p_R — вероятность наличия поддерживающих мутаций; p_B — вероятность наличия запрещающих мутаций; kW — слагаемое, описывающее дрейф, где W — случайная величина, равномерно распределенная на отрезке $[-1, 1]$, k — коэффициент дрейфа. Начальные условия $M_R = M_B = 0.5$.

Для закрепления новой мутации необходимо выполнение условия $p_R M_R - p_B M_B > 0$, т.е. $p_R > 0.5$. Принимаем $p_R = 0.51$.

В окончательном виде уравнение (3) принимает следующий вид:

$$\frac{dM_C}{dt} = -\frac{Ne/Ns}{\{1 - \exp(-2Ne/Ns)\}} 0.51 Ne/Ns \cdot \ln(M_C) + kW. \quad (5)$$

При малых стохастических возмущениях ($kW \ll 0.51 p_C Ne$) уравнение (5) принимает вид

$$\frac{dM_C}{dt} = -0.51 p_C \frac{Ne}{N} \ln(M_C) + kW. \quad (6)$$

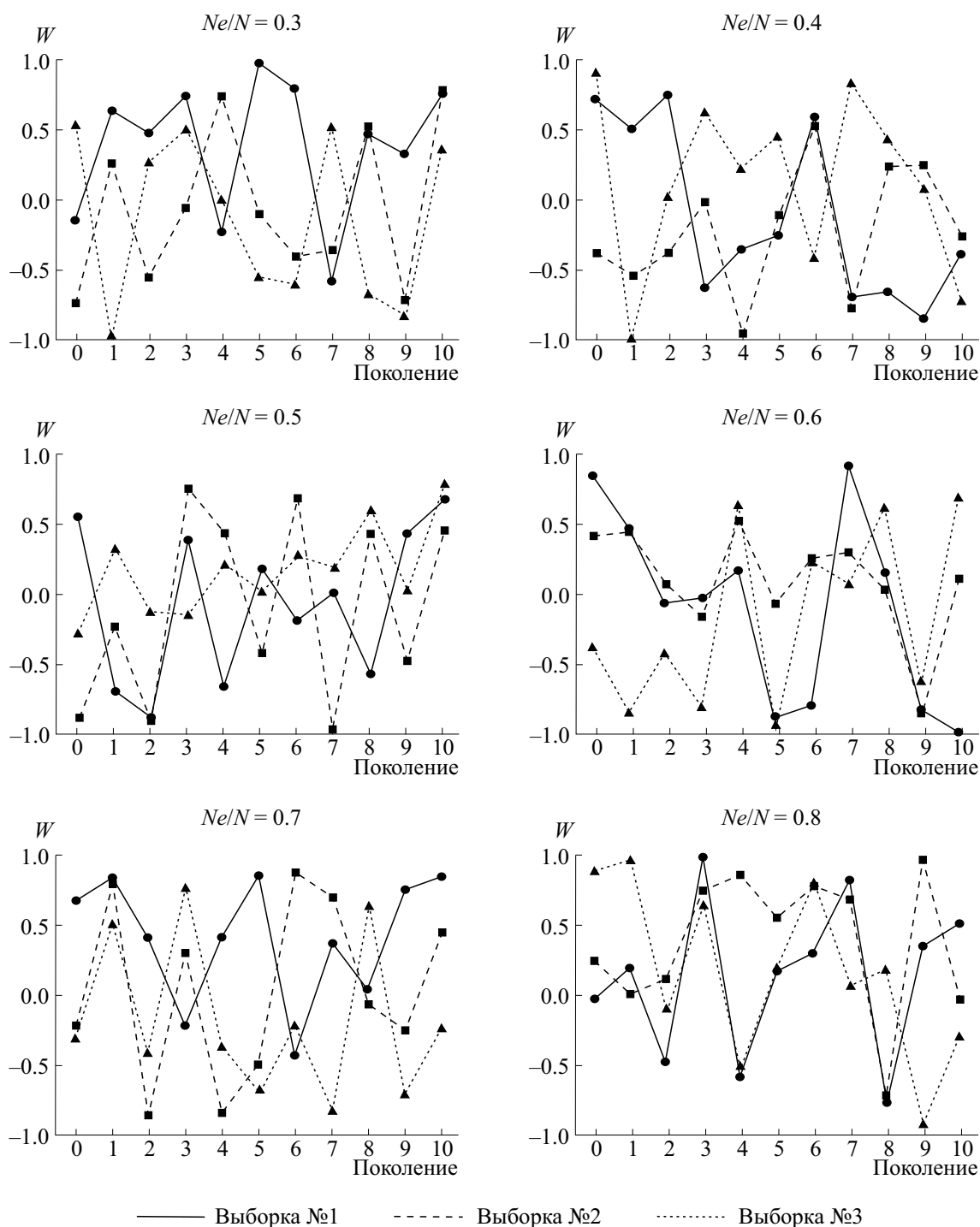


Рис. 2. Выборки из 11 случайных чисел для поколений (n) от 0 до 10 (ось x) при различных значениях Ne/N для трех выборок случайных чисел.

Согласно нашим расчетам, величина $0.51p_c Ne$ изменяется в пределах от $0.08 \approx 0.1$ до 0.23 , поэтому пороговым значением мы будем считать величину $k = 0.1$: при $k < 0.1$ в ходе закрепления мутаций доминирует детерминированная составляющая отбора, а при $k \geq 0.1$ — дрейф.

Для численного решения задачи скорости закрепления новых мутаций как доли общего количества мутаций по поколениям разделим интервал $t \in [0, t]$ (где $t = 10$ поколений) на 100 равных частей. Для решения уравнения применим одностадийную схему Розенброка с комплексным коэффициентом [57].

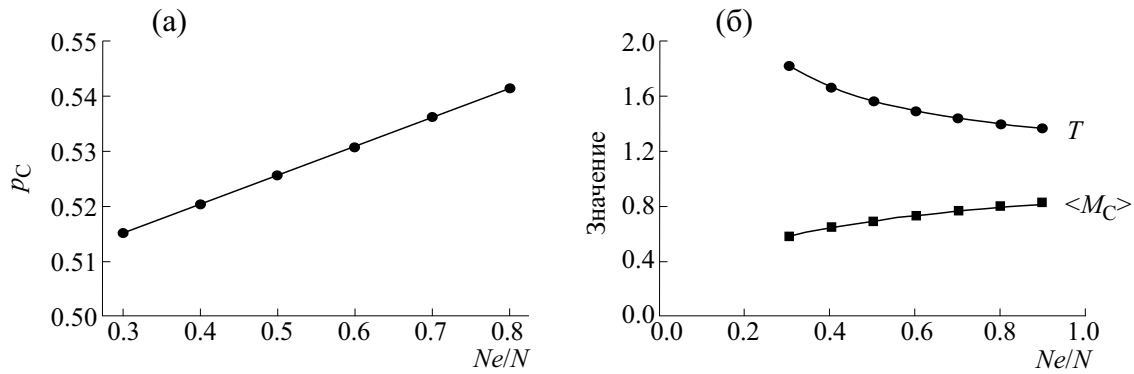


Рис. 3. Графики вероятности закрепления новых мутаций (p_C), минимального времени между фиксациями мутаций (T) и усредненной доли зафиксировавшихся мутаций ($\langle M_C \rangle$) при отсутствии дрейфа ($k = 0$): (а) – зависимость (p_C) от Ne/N ; (б) – зависимость T и $\langle M_C \rangle$ от Ne/N при фиксированных значениях коэффициента отбора ($s = 0.1$).

$$M_C[m+1] = M_C[m] + \tau \text{Re} \omega, m = \overline{0,99}. \quad (7)$$

Величина W изменяется каждые десять шагов по времени (раз в поколение). На рис. 2 показаны выборки случайных чисел, используемые при расчетах согласно уравнению (5).

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

При отсутствии дрейфа процесс закрепления мутаций определяется только закономерностями отбора, т.е. наличием в популяции поддерживающих и запрещающих мутаций и их взаимодействием с новыми мутациями. В этом случае вероятность закрепления новых мутаций при отсутствии дрейфа рассчитывается по формуле (8) (на основании данных работы [58]) и растет незначительно с ростом относительного размера клона при исключительно детерминированных процессах (рис. 3а):

$$p_C \approx \frac{Ne / N s}{\{1 - \exp(-2N_e s)\}}. \quad (8)$$

Минимальное время между последовательными фиксациями мутаций для детерминированных процессов в зависимости от относительного размера клона Ne/N , среднего значения доли зафиксированных мутаций $\langle M_C \rangle$ для заданного Ne/N , коэффициента отбора s и отсутствии дрейфа (на основании данных работы [58]) определяется как

$$T \approx \frac{\exp(2sNe/N) - 1}{2\langle M_C \rangle s Ne/N}. \quad (9)$$

Зависимость T и $\langle M_C \rangle$ от Ne/N при фиксированных значениях $s = 0.1$ и $k = 0$ демонстрирует, что при увеличении Ne/N растет средняя доля новых мутаций $\langle M_C \rangle$ и уменьшается время их фиксации (рис. 3б). При фиксированном значении $\langle M_C \rangle$ представлен трехмерный график зависимости времени фиксации T от Ne/N и s (рис. 4). На

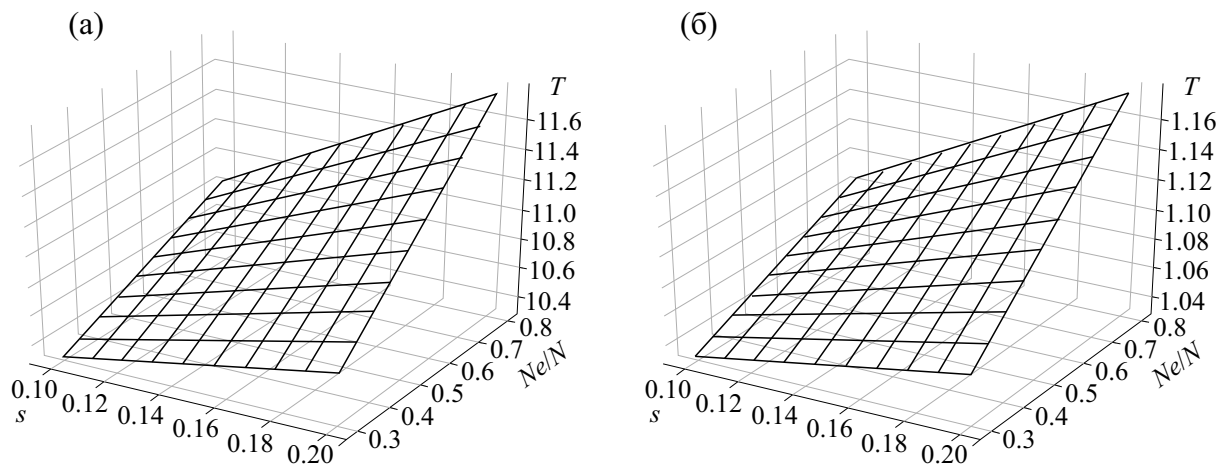


Рис. 4. Графики зависимости T от Ne/N и s при фиксированном значении $\langle M_C \rangle$: (а) $\langle M_C \rangle = 0.1$; (б) – $\langle M_C \rangle = 1.0$.

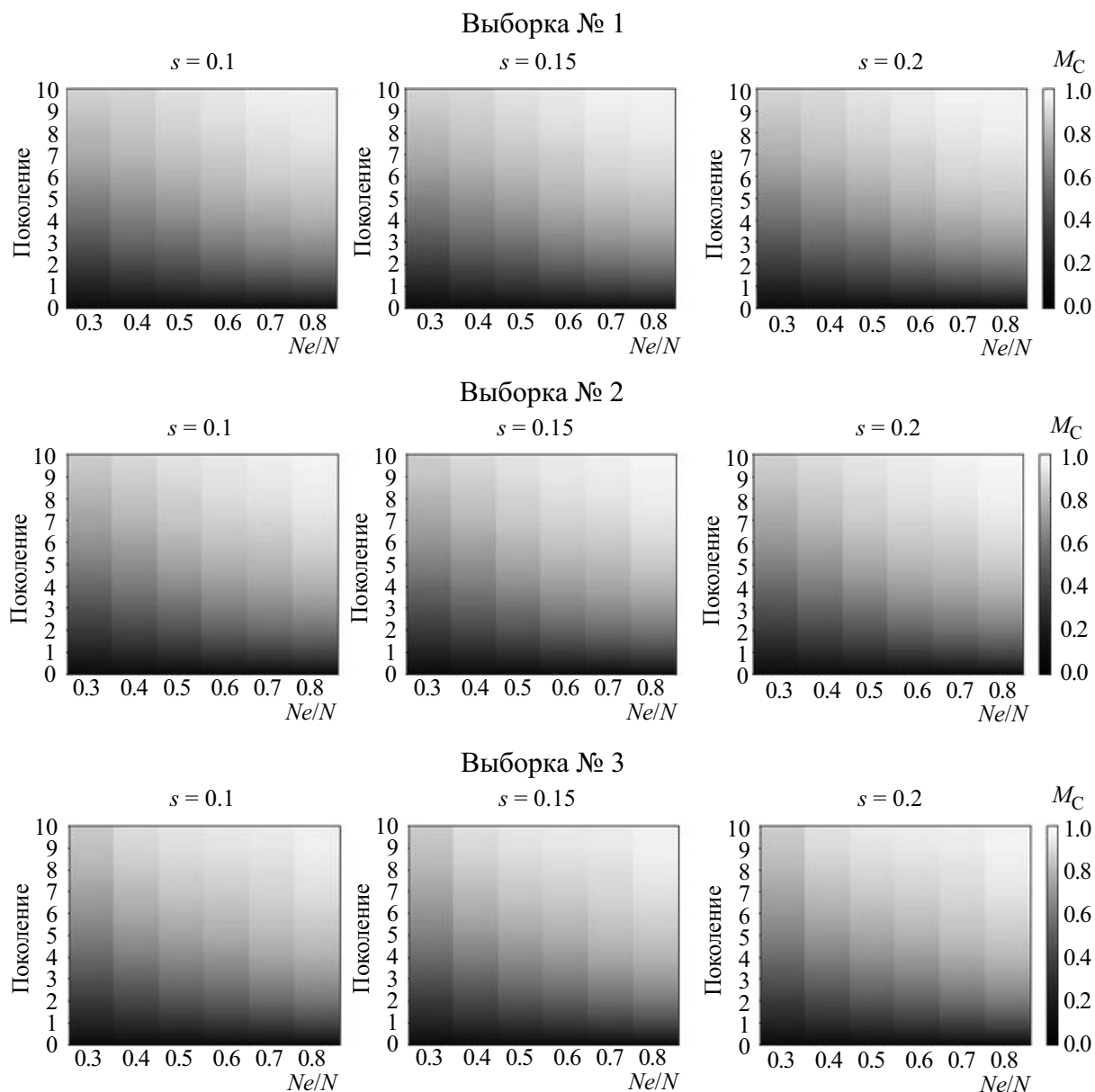


Рис. 5. Графики скорости закрепления новой мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях в зависимости от Ne/N при разных значениях коэффициента отбора и допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k = 0.01$): $s = 0.1$, $s = 0.15$ и $s = 0.2$. На легенде оттенками серого цвета обозначено возрастание доли новых мутаций (от черного до белого). Графики соответствуют выборкам случайных чисел № 1, 2 и 3.

графике видно, что при фиксированном $\langle M_C \rangle$ время фиксации практически не зависит от s и Ne/N . При $\langle M_C \rangle = 0.1$ T изменяется примерно на одно поколение, при $\langle M_C \rangle = 1$ — на 0.1 поколения. При этом время фиксации для $\langle M_C \rangle = 0.1$ и $\langle M_C \rangle = 1$ различается на порядок (время между последовательными фиксациями, когда все мутации из наличествующих фиксируются, на порядок меньше времени между последовательными фиксациями, когда только 10% от мутаций фиксируются).

При допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k = 0.01$) по мере увеличения коэффициента отбора (s) и соотношения Ne/N доля новых мутаций (M_C) аналогично возрастает по поколениям при всех выборках случайных чисел, что объясняется слабым воздействием дрейфа (рис. 5).

При достижении порогового значения коэффициента дрейфа ($k = 0.1$) для всех исследуемых значений коэффициента отбора отмечаются признаки зарождения хаотических процессов (рис. 6).

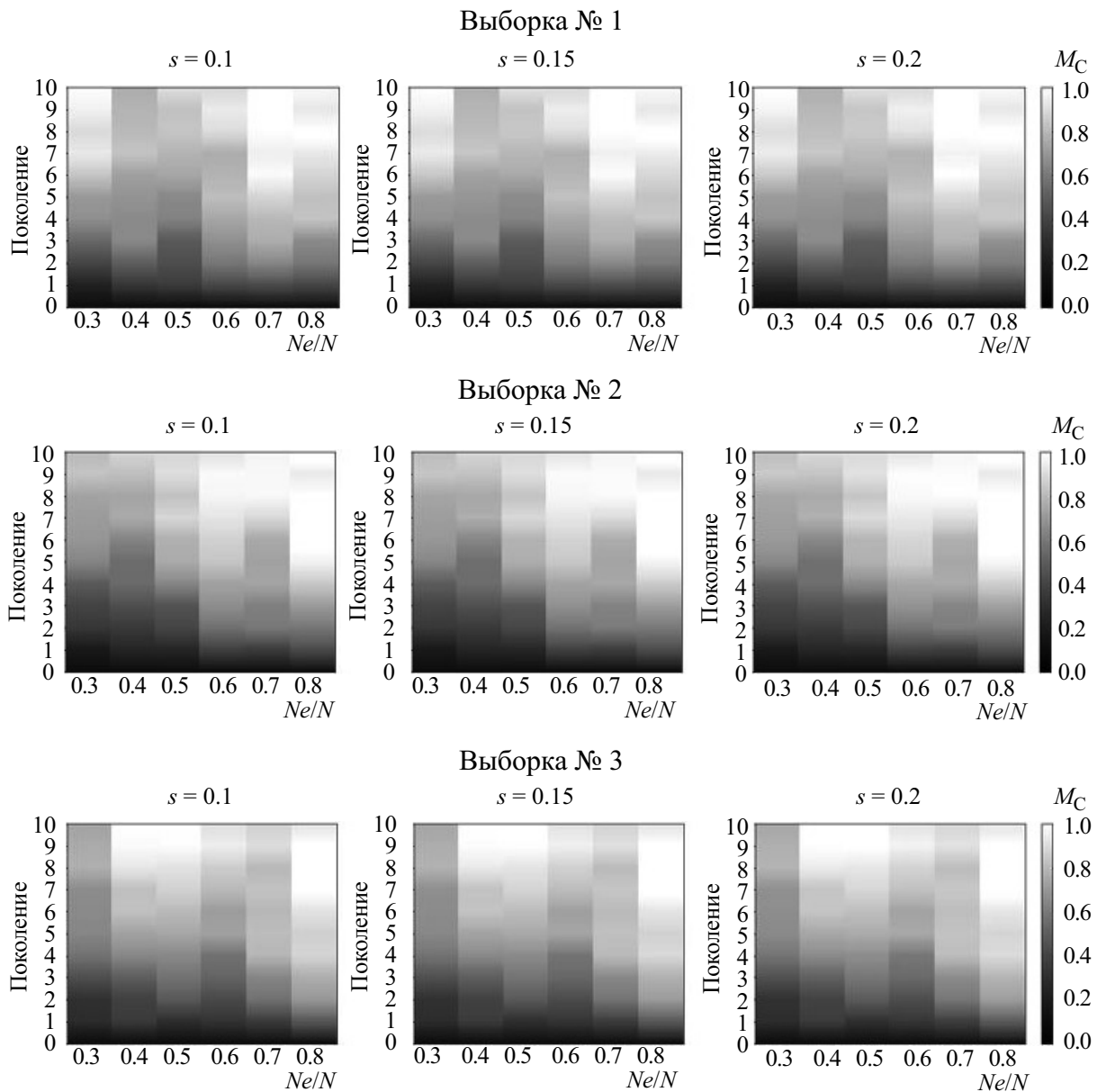


Рис. 6. Графики скорости закрепления новой мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях в зависимости от Ne/N при разных значениях коэффициента отбора и пороговом значении коэффициента дрейфа ($k = 0.1$): $s = 0.1$, $s = 0.15$ и $s = 0.2$. На легенде оттенками серого цвета обозначено возрастание доли новых мутаций (от черного до белого). Графики соответствуют выборкам случайных чисел № 1, 2 и 3.

При дальнейшем усилении дрейфа, т.е. при значении коэффициента дрейфа больше порогового ($k > 0.1$), процессы фиксации мутаций становятся хаотическими (рис. 7). В этом случае в зависимости от выборки случайных чисел возможно как максимальное количество закрепившихся мутаций (выборка №1), так и минимальное (выборка №3).

Состояние перколяционной решетки отбора, при котором формируется минимально достаточное количество носителей новой мутации (минимальный кластер), в нашей модели связано с фор-

мированием нижнего порога перколяционной решетки отбора — долей новых мутаций, которые фиксируются в популяции под воздействием детерминированных процессов отбора для минимально воспроизводящей численности кластера в популяции. В модели значение доли новых мутаций (M_C) для $Ne/N = 0.3$ при отсутствии дрейфа ($k = 0.1$) является нижним порогом перколяций (протекания). В этом случае в зависимости от значения коэффициента отбора в первом поколении значение нижнего порога перколяций меняется незначительно, а при увеличении Ne/N отме-

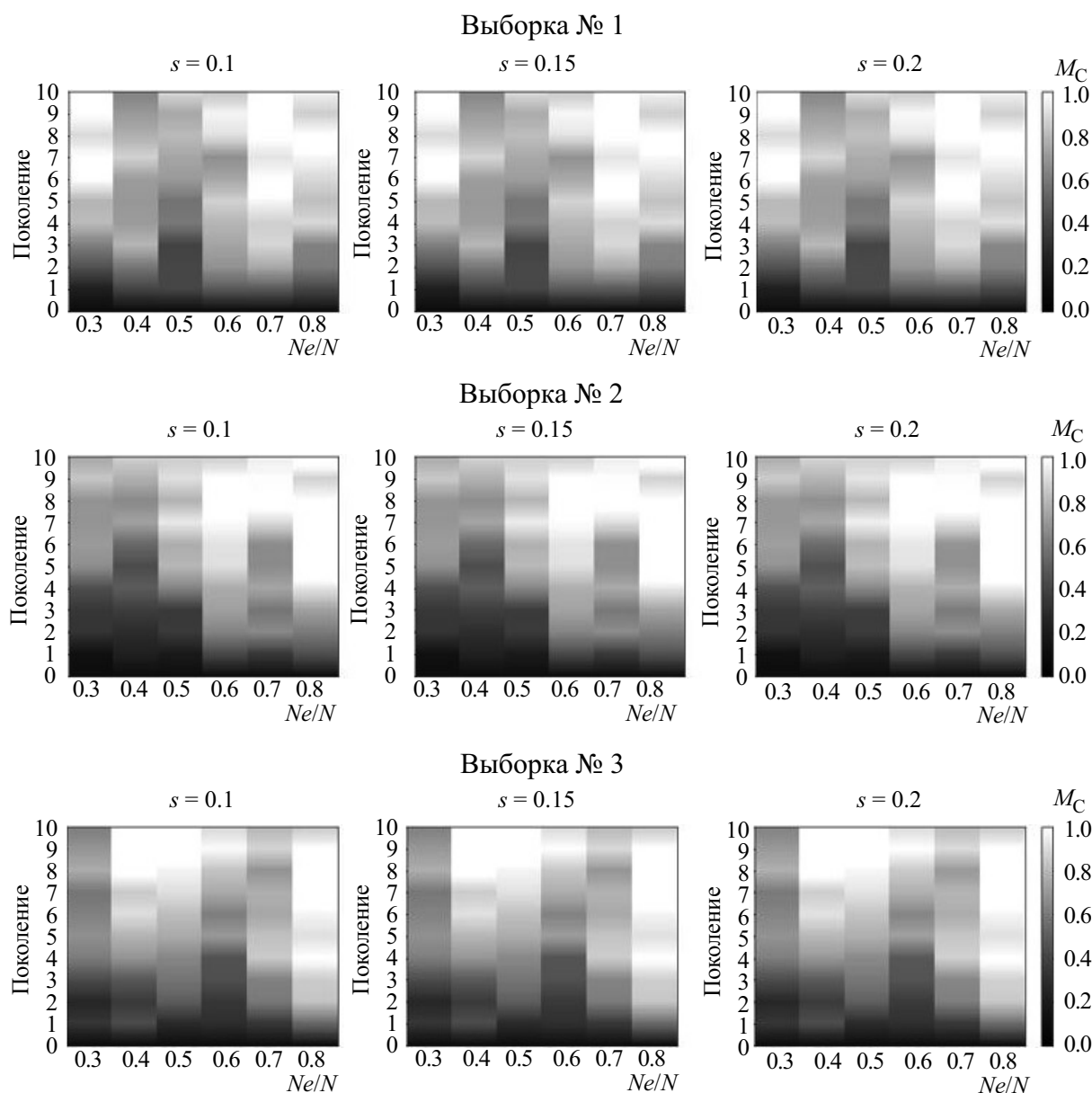


Рис. 7. Графики скорости закрепления новой мутации (в долях от общего количества мутаций) в поколениях в зависимости от Ne/N при разных значениях коэффициента отбора ($s = 0.1$, $s = 0.2$) и значении коэффициента дрейфа больше порогового ($k = 0.2$) в зависимости от выборки случайных чисел: $s = 0.1$, $s = 0.15$ и $s = 0.2$. На легенде оттенками серого цвета обозначено возрастание доли новых мутаций (от черного до белого). Графики соответствуют выборкам случайных чисел № 1, 2 и 3.

чается заметный рост доли новых мутаций уже в первом поколении.

ВЫВОДЫ

Представлена принципиально новая модель протекания мутаций через перколяционную решетку отбора на популяционном уровне. В модели мутации (положительные, отрицательные и нейтральные) рассматриваются вне зависимости от их направленности, так как вектор их направ-

ленности определяется их адаптивной пользой на кратком временном интервале и в дальнейшем, в зависимости от условий среды, может изменить знак. Узлы в перколяционной решетке (особи в популяции) работают как триггерная вентильная система в потоках мутаций, где особи — носители и преобразователи мутаций. Триггерные свойства ячейки (узла) как вентиля определяют детерминированную компоненту закрепления новых мутаций (пропустить/не пропустить). Взаимодействие мутаций в череде поколений и случайные

процессы дрейфа определяют коллективное поведение узлов и связей (мутаций) в пространстве перколяционной решетки.

При допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k < 0.1$) закрепление новых мутаций в основном определяется закономерностями их взаимодействия с поддерживающими (M_R) и запрещающими мутациями (M_B). При достижении и превышении порогового значения коэффициента отбора ($k = 0.1$) отмечаются признаки зарождения хаотических процессов. При значении коэффициента дрейфа больше порогового ($k > 0.1$) возможно возникновение гигантских флуктуаций и, как следствие, формирование качественно новой системы: формирование нового вида в иерархии видообразования) или вымирание популяции под воздействием неблагоприятных мутаций. Нижний порог протекания мутаций для перколяционной решетки отбора в модели — это доля новых мутаций, которые закрепляются в популяции под воздействием детерминированных процессов отбора для минимальной численности кластера носителей мутаций.

Нелинейные системы способны эволюционировать по разным траекториям, проходя через точки бифуркации, которые характеризуются неустойчивым состоянием систем. Вблизи бифуркационной точки неравновесная система оказывается особо чувствительной и к незначительным флуктуациям того или иного параметра, и флуктуации становятся «гигантскими». Так в процессе биологической микроэволюции происходит видообразование — разделение во времени и пространстве генетически открытой системы (популяции) на генетически закрытые самодостаточные системы — виды.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. H. Barton, *Genetics* **140** (2), 821 (1995).
2. D. A. Kessler, H. Levine, D. Ridgway, and L. Tsimring, *J. Stat. Phys.* **87** (3–4), 519 (1997).
3. H. A. Orr, *J. Theor. Biol.* **238** (2), 279 (2006).
4. M. M. Desai and D. S. Fisher, *Genetics* **176** (3), 1759 (2007).
5. J. H. Gillespie, *Theor. Popul. Biol.* **23** (2), 202 (1983).
6. H. A. Orr, *Nature Rev. Genetics* **6** (2), 119 (2005).
7. G. Martin, S. P. Otto, and T. Lenormand, *Genetics* **172** (1), 593 (2006).
8. M. Kimura, *Genetics Res.* **9** (1), 23 (1967).
9. P. J. Gerrish and R. E. Lenski, *Genetica* **102**, 127 (1998).
10. B. H. Good and O. Hallatschek, *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 203 (2018).
11. C. A. Fogle, J. L. Nagle, and M. M. Desai, *Genetics* **180** (4), 2163 (2008).
12. G. Martin and T. Lenormand, *Genetics* **179** (2), 907 (2008).
13. G. Martin, *Genetics* **197** (1), 237 (2014).
14. G. A. T. McVean and B. Charlesworth, *Genetics* **155** (2), 929 (2000).
15. I. M. Rouzine, É. Brunet, and C. O. Wilke, *Theor. Popul. Biol.* **73** (1), 24 (2008).
16. I. M. Rouzine, J. Wakeley, and J. M. Coffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2), 587 (2003).
17. N. H. Barton and S. P. Otto, *Genetics* **169** (4), 2353 (2005).
18. W. G. Hill and A. Robertson, *Genetics Res.* **8** (3), 269 (1966).
19. S. P. Otto and N. H. Barton, *Evolution* **55** (10), 1921 (2001).
20. M. De Visser, et al., *Science* **283** (5400), 404 (1999).
21. N. L. Komarova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (Suppl. 3), 10789 (2014).
22. L. Wagstaff, G. Kolahgar, and E. Piddini, *Trends Cell Biol.* **23** (4), 160 (2013).
23. Н. В. Тимофеев-Ресовский, *Избранные труды* (Наука, М., 2009).
24. J. B. S. Haldane, *Math. Proc. Cambridge Philosoph. Society* **23** (7), 838 (1927).
25. D. E. Rozen, J. A. G. M. De Visser, P. J. Gerrish, *Curr. Biol.* **12** (12), 1040 (2002).
26. H. A. Orr, *Genetics* **155** (2), 961 (2000).
27. O. Hallatschek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (5), 1783 (2011).
28. É. Brunet, I. M. Rouzine, and C. O. Wilke, *Genetics* **179** (1), 603 (2008).
29. D. S. Fisher, *J. Statistical Mechanics: Theory and Experiment* **2013** (1), P01011 (2013).
30. M. Kimura, et al., *Nature* **217** (5129), 624 (1968).
31. B. Charlesworth, M. T. Morgan, and D. Charlesworth, *Genetics* **134** (4), 1289 (1993).
32. I. M. Rouzine, A. Rodrigo, and J. M. Coffin, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65** (1), 151 (2001).
33. O. Hallatschek and L. Geyrhofer, *Genetics* **202** (3), 1201 (2016).
34. L. S. Tsimring, H. Levine, and D. A. Kessler, *Phys. Rev. Lett.* **76** (23), 4440 (1996).
35. B. H. Good and M. M. Desai, *Genetics* **204** (3), 1249 (2016).
36. J. M. J. Travis and E. R. Travis, *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* **269** (1491), 591 (2002).

37. A. C. Shaver, et al., *Genetics* **162** (2), 557 (2002).
38. J. B. André and B. Godelle, *Genetics* **172** (1), 611 (2006).
39. M. M. Desai and D. S. Fisher, *Genetics* **188** (4), 997 (2011).
40. B. Charlesworth, *Genetics Res.* **55** (3), 199 (1990).
41. N. H. Barton, *Genetics Res.* **65** (2), 123 (1995).
42. S. P. Otto and N. H. Barton, *Genetics* **147** (2), 879 (1997).
43. J. Hey, *Genetics* **149** (4), 2089 (1998).
44. A. E. Sidorova and V. A. Tverdislov, *Moscow University Physics Bull.* **67** (2), 213 (2012).
45. J. Balogh and B. G. Pittel, *Random Structures & Algorithms* **30** (1–2), 257 (2007).
46. H. Kesten, *Percolation theory for mathematicians* (Birkhäuser, Boston, 1982).
47. C. McDiarmid, in *Combinatorial Optimization II* (Springer, Berlin, Heidelberg, 1980), pp. 17–25.
48. H. L. Frisch and J. M. Hammersley, *J. Soc. Indust. Appl. Math.* **11** (4), 894 (1963).
49. N. Fountoulakis, *Internet Mathematics* **4** (4), 329 (2007).
50. T. N. Starr, L. K. Picton, and J. W. Thornton, *Nature* **549** (7672), 409 (2017).
51. P. W. Anderson, *Science* **177** (4047), 393 (1972).
52. A. E. Sidorova, N. T. Levashova, V. A. Tverdislov, and A. Y. Garaeva, *Moscow University Physics Bull.* **74** (5), 438 (2019).
53. M. Nei and Y. Imaizumi, *Heredity* **21**, 183 (1966).
54. J. F. Crow and N. E. Morton, *Evolution* **9** (2), 202 (1955).
55. W. Ebeling, A. Engel, and R. Feistel, in *Physik der Evolutionsprozesse* (Akademie-Verlag, Berlin, 1990), p. 63.
56. В. Эбелинг, А. Энгель и Р. Файстель, *Физика процессов эволюции* (УРСС, М., 2001).
57. H. H. Rosenbrock, *Comput. J.* **5** (4), 329 (1963).
58. E. Santiago and A. Caballero, *Genetics* **204** (3), 1267 (2016).

A Percolation Natural Selection Grid as a Deterministic and Random Processes Switch in the Mutation Flow

A.Ya. Garaeva, A.E. Sidorova, N.T. Levashova, and V.A. Tverdislov

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

The basic models of mutation processes during selection and drifting are reviewed. A fundamentally new model of mutation flow through the percolation lattice of selection at the population level is presented. The natural selection of optimal variants in the evolutionary flow of mutations is considered as a percolation filter – a physical tool that forms the selection mechanism. The model is based on concepts of self-organization in hierarchical structures of species formation, where trigger properties of a cell (node) as a valve determine the deterministic component of fixation of new mutations, and the drift determines the element of randomness in the process of fixation of new mutations in mutation flows. Modes of fixation of mutations depending on a ratio of the cluster size of mutation carriers to the general size of a population, selection and drift coefficients in a sequence of generations at a population level are obtained. The lower threshold of the percolation selection grid was determined as a share of new mutations fixed under the influence of deterministic selection processes for minimum reproducing cluster size.

Keywords: natural selection, self-organization, fluctuations, bifurcations, percolations, prohibiting and permitting mutations