

СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 2, 2021

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Ультразвук терапевтического диапазона влияет на формирование микрочастиц льда
Д.Г. Садикова, А.А. Андреев 213
- Роль вирусов и вирусного лизиса в изменении оптических свойств водной среды их обитания
С.А. Шоларь, О.А. Степанова 219
- Влияние связывания кофактора на внутримолекулярную динамику глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы
А.А. Кошкарлов, О.Н. Макшакова 230
- Исследование повреждений молекулы ДНК, вызванных облучением протонами и гамма-квантами
О.М. Котб, Д.С. Брожек, В.Н. Вербенко, Е.П. Гулевич, В.Ф. Ежов, Д.Л. Карлин, Ф.А. Пак, С.В. Пастон, А.М. Поляничко, А.И. Халиков, Е.В. Чихиржина 240
- Математическое моделирование поведения транскрипционного пузыря в плазмиде рPF1 и ее модификациях. Связь между энергетическим профилем плазмиды и направлением транскрипции
А.А. Гриневич, И.С. Масулис, Л.В. Якушевич 248
- Доноры оксида азота как потенциальные противоопухолевые агенты
Д.Б. Корман, Л.А. Островская, А.Ф. Ванин 259
-

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

- Транспорт глицерина в митохондриях
А.И. Даль, Н.Л. Векшин 271
- Воздействие индукторов ферроптоза на мембраны митохондрий сердца крысы
А.С. Феллер, М.В. Иванова, К.Б. Шумаев, Э.К. Рууге 277
- Кинетическое моделирование работы митохондриально-ретикулярной сети
Г.В. Кудрявцева, Ю.А. Маленков, В.В. Шишкин, В.И. Шишкин, А.А. Картунен 285
- Ресвератрол предотвращает дисфункцию митохондрий в условиях стресса
В.И. Бинюков, И.В. Жигачева, Е.М. Миль, Н.И. Крикунова, М.М. Расулов 294
- Физико-химические свойства мембран эритроцитов при взаимодействии с полиеновыми антибиотиками в поле действия ультразвуковых волн
Г.Г. Султанова, Х.М. Касумов 302
- Мембранная проницаемость, вызванная переменным магнитным полем, в магнитолипосомах эритромицина: потенциальное решение проблемы устойчивости к антибиотикам
Б.М. Салах, М. Ради, М. Абдель-Халим, Х.М. Фахми, Н.С. Эль-Дин, М.Х. Габер 312

Фототоксическое действие водорастворимых порфиринов на клетки светлоклеточной карциномы почки человека Sak1-1	
<i>А.Ф. Арутюнян, Л.Л. Тевонян, А.Д. Бениаминов, Е.Е. Егоров, Д.Н. Калюжный</i>	323
Липосомальный препарат с карнозином и липоевой кислотой: получение, антиоксидантные и антиагрегантные свойства	
<i>В.А. Щелконогов, Е.С. Дарнотук, А.В. Чеканов, О.А. Баранова, К.Д. Казаринов, Н.С. Шастина, С.Л. Стволинский, Т.Н. Федорова, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин, Г.М. Сорокоумова</i>	329

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Связь индукционных изменений флуоресцентных показателей листьев сои <i>Glycine max</i> (L.) Мегг. с биохимическими характеристиками и продуктивностью	
<i>Д.Р. Шафигуллин, А.А. Байков, М.С. Гинс, Е.П. Пронина, В.Ф. Пивоваров, А.В. Солдатенко, Е.В. Романова</i>	338
Гипотезы об адаптации водорослей к периодическим факторам среды	
<i>В.Г. Ильичев, О.А. Ильичева</i>	350
Температурная зависимость механических характеристик демембранных медленных мышечных волокон кролика	
<i>С.Р. Набиев, С.Ю. Бершицкий, А.К. Цатурян, Н.А. Кубасова</i>	358
Уровни циркулирующих ДНК в сыворотке крови и повреждения ДНК лейкоцитов здоровых доноров разного пола и возраста	
<i>И.Ю. Митрошина, Н.П. Сирота, В.Н. Прокофьев, Е.А. Кузнецова</i>	365
Подстройка эхоимпульсов, отраженных от расположенных на разных дистанциях объектов, под слуховую чувствительность у дельфинов: модельные исследования	
<i>Л.К. Римская-Корсакова, А.А. Родионов, М.П. Иванов</i>	372
Непрерывная модель трех сценариев инфекционного процесса при факторах запаздывания иммунного ответа	
<i>А.Ю. Переварюха</i>	384
Принцип замкнутой петли обратной связи от эндогенных ритмов человека в современных технологиях нейробиоуправления и адаптивной нейростимуляции	
<i>А.И. Федотчев, С.Б. Парин, С.А. Полевая</i>	408
Изменения реакции перекисного окисления липидов при воздействии электромагнитного излучения нетепловой интенсивности в пренатальном периоде	
<i>Ж.М. Ибрагимова, А.М. Гаджиев, А.Ш. Ибрагимов</i>	412

Contents

Vol. 66, No. 2, 2021

Molecular Biophysics

The Effect of Therapeutic Ultrasound on the Formation of Ice Microparticles <i>D.G. Sadikova and A.A. Andreev</i>	213
The Role of Viruses and Viral Lysis in Alteration of the Optical Properties of Aquatic Environment as the Habitat of Viruses <i>S.A. Sholar and O.A. Stepanova</i>	219
The Influence of Cofactor Binding on the Intramolecular Dynamics of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase <i>A.A. Koshkarov and O.N. Makshakova</i>	230
Investigation of DNA Damage Induced by Proton and Gamma Radiation <i>O.M. Kotb, D.S. Brozhik, V.N. Verbenko, E.P. Gulevich, V.F. Ezhov, D.L. Karlin, F.A. Pak, S.V. Paston, A.M. Polyanchko, A.I. Khalikov, and E.V. Chikhirzhina</i>	240
Mathematical Modeling of the Behavior of the Transcription Bubble in the pPF1 Plasmid and Its Modified Versions. A link between the Plasmid Energy Profile and the Direction of Transcription <i>A.A. Grinevich, I.S. Masulis, and L.V. Yakushevich</i>	248
Nitric Oxide Donors as Potential Antitumor Agents <i>D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, and A.F. Vanin</i>	259

Cell Biophysics

Glycerol Transport in Mitochondria <i>A.I. Dal and N.L. Vekshin</i>	271
Effect of Ferroptosis Inductors on Rat-Heart Mitochondrial Membranes <i>A.S. Fefler, M.V. Ivanova, K.B. Shumaev, and E.K. Ruuge</i>	277
Kinetic Modeling of Mitochondrial-Reticular Network Dynamics <i>G.V. Kudryavtseva, Yu.A. Malenkov, V.V. Shishkin, V.I. Shishkin, and A.A. Kartunen</i>	285
Resveratrol Prevents Stress-Related Dysfunction of Mitochondria <i>V.I. Binyukov, I.V. Zhigacheva, E.M. Mil', N.I. Krikunova, and M.M. Rasulov</i>	294
Physico-Chemical Properties of Erythrocyte Membranes in the Presence of Polyene Antibiotics in an Ultrasound Exam <i>G.G. Sultanova and Kh.M. Kasumov</i>	302
Alternating Magnetic Field-Induced Membrane Permeability in Erythromycin Magnetoliposomes: a Potential Solution to Antibiotic Resistance <i>B.M. Salah, M. Rady, M. Abdel-Halim, H.M. Fahmy, N.S. El-Din, and M.H. Gaber</i>	312
Phototoxic Effect of Water-Soluble Porphyrins on Caki-1 Cells of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma <i>A.F. Arutyunyan, L.L. Tevonyan, A.D. Beniaminov, Y.E. Yegorov, and D.N. Kaluzhny</i>	323

Complex Systems Biophysics

Relationship of Inductional Changes of Fluorescent Leaf Indices of *Glycine max* (L.) Merr. with Biochemical Characteristics and Productivity

D.R. Shafigullin, A.A. Baykov, M.S. Gins, E.P. Pronina, V.F. Pivovarov, A.V. Soldatenko, and E.V. Romanova

338

Hypotheses Concerning Algal Adaptation to Periodic Environmental Factors

V.G. Ilyichev and O.A. Ilyicheva

350

Temperature Dependence of Mechanical Characteristics of Demembranized Rabbit Slow Muscle Fibres

S.R. Nabiev, S.Y. Bershitsky, A.K. Tsaturyan, and N.A. Koubassova

358

Levels of Circulating DNA in Blood Serum and DNA Damage in Leukocytes of Healthy Donors of Different Gender and Age

I.Yu. Mitroshina, N.P. Sirota, V.N. Prokofiev, and E.A. Kuznetsova

365

Distance-Dependent Gain Control of Echo-Pulses to Auditory Sensitivity in Dolphins: Simulation Experiments

L.K. Rimskaya-Korsakova, A.A. Rodionov, and M.P. Ivanov

372

Continuous Model for the Three Scenarios of the Infection Routes Given Delayed Immune Response Factors

A.Yu. Perevaryukha

384

The Principle of a Closed Feedback Loop of Human Endogenous Rhythms in Modern Technologies of Neurofeedback and Adaptive Neurostimulation

A.I. Fedotchev, S.B. Parin, and S.A. Polevaya

408

Changes in Lipid Peroxidation Resulting from Exposure to Electromagnetic Radiation of Nonthermal Intensity in the Prenatal Period

J.M. Ibragimova, A.M. Gadjiev, and A.Sh. Ibragimov

412

УДК 577.3

УЛЬТРАЗВУК ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА ВЛИЯЕТ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА

© 2021 г. Д.Г. Садикова, А.А. Андреев

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

E-mail: sdg7@list.ru

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 25.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Изучено образование микрочастиц льда при замерзании водных криозащитных растворов. Форма и размер частиц зависела от состава замороженного раствора. В процессе замерзания растворов при облучении ультразвуком частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см² изменяется форма микрочастиц льда. Происходит формирование более округлых микрочастиц. В многокомпонентных растворах эффективность воздействия ультразвука с данной частотой и интенсивностью на процессы замерзания растворов и формирование микрочастиц льда заметно снижается.

Ключевые слова: криозащитные растворы, криомикроскопия, микрочастицы льда, растрескивание льда, ультразвук.

DOI: 10.31857/S0006302921020010

При охлаждения водных растворов возникновение точки зарождения вызывает рост кристаллов льда по всему объему этого раствора и замерзание [1].

После замерзания всего объема жидкости дальнейшее ее охлаждение до сверхнизких температур приводит к формированию растрескиваний за счет термомеханических напряжений в массиве льда [2]. Наличие растворенных примесей изменяет как температуру начала образования кристаллов льда [3], так и температуру начала растрескивания и формирования микрочастиц льда [4]. От формы частиц льда может зависеть степень повреждения живых клеток, подвергаемых замораживанию [5].

Внешние условия существенно изменяют формирование частиц льда при замерзании, что позволяет улучшать эффективность криозащитных растворов, используя дополнительные физические воздействия.

Использование ультразвука при замораживании водных растворов приводит к возникновению дополнительных точек зарождения кристаллов льда, в результате чего появляется возможность изменять процесс криоконсервации

различных биологических материалов в зависимости от параметров ультразвука [6, 7].

Из физической и коллоидной химии нам известно, что воздействие ультразвука высокой мощности излучения может привести к разрушению ковалентных связей в воде и водных растворах, в частности, молекула воды может распасться на ионы H⁺ и OH⁻, в дальнейшем образуя соединение H₂O [8–10]. Однако интенсивность используемого нами ультразвукового излучения не выходит за терапевтический диапазон, поэтому разрушение ковалентных связей в нашем случае маловероятно. В то же время при распространении ультразвуковой волны происходит колебательное движение молекул среды, в результате которого, возможно, происходит изменение параметров среды и снижается скорость охлаждения растворов.

Ранее нами было показано, что скорость охлаждения раствора влияет на форму и размер микрочастиц льда, образующихся при их замерзании [4]. При этом при уменьшении скорости охлаждения увеличивались как периметр, так и площадь микрочастиц льда. Мы предположили, что использование ультразвука при охлаждении раствора приведет также к изменению площади, периметра и фактора формы микрочастиц льда [11].

Сокращения: ФР – физиологический раствор, Me₂SO – диметилсульфоксид, ЯЖ – яичный желток, ДВ – дистиллированная вода.

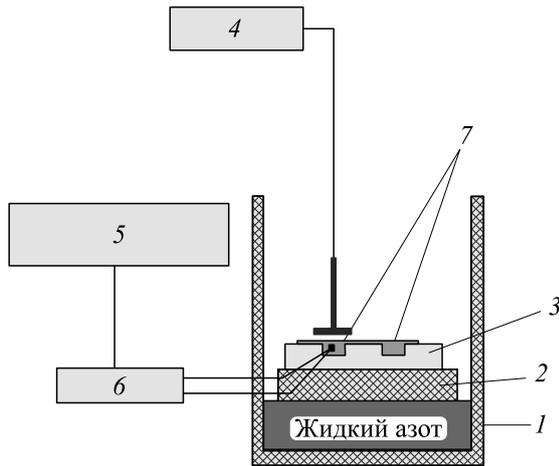


Рис. 1. Экспериментальная установка: 1 – пенопластовая коробка объемом $8 \cdot 10^3 \text{ см}^3$; 2 – пенопластовый плотик; 3 – кварцевая камера Фукса–Розенталя; 4 – ультразвуковой генератор УЗД 1.01Ф (Россия), частота 0.88 МГц; 5 – компьютер; 6 – АТТ-2006 – электронный термометр с термопарой (медь/константан, диаметр 0.1 мм), термопара в опытном образце, на периферии; 7 – опытный и контрольный образцы.

МЕТОДЫ

Используемые растворы. Все рабочие растворы готовили на дистиллированной воде. Использовали следующие образцы: физиологический раствор для осетровых рыб [12] (ФР), 10% диметилсульфоксида на физиологическом растворе (ФР + Me_2SO), 10% диметилсульфоксида и 10% яичного желтка (ЯЖ) на физиологическом растворе (ФР + Me_2SO + ЯЖ). Состав физиологического раствора (в мМ): NaCl – 84, KCl – 3, CaCl_2 – 3, NaHCO_3 – 23, pH 7.6.

Для сравнения брали дистиллированную воду (ДВ).

Экспериментальная установка. Для замораживания с использованием ультразвука использовали установку (рис. 1), которая состоит из пенопластового бокса для замораживания образцов в парах жидкого азота до -150°C . После того как температура среды достигала -150°C , образец помещали в жидкий азот (-196°C). Для регистрации использовали микроскоп Orthoplan (Carl Zeiss, Германия) с видеоокуляром ВР–32 (Россия).

Раствор замораживали при направленном воздействии ультразвуковой волны частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см^2 . В качестве источника излучения использовали аппарат для ультразвуковой терапии УЗТ 1.01Ф (Россия).

Источник излучения находился на расстоянии 2 см от образца все время замораживания в тонком слое (0.2 мм). Объем образца – 10 мкл. В качестве контроля брали образцы, которые замора-

живали синхронно с опытными, но без ультразвуковой обработки.

Для замораживания растворов использовали кварцевые камеры Фукса–Розенталя. Контролем являлись пробы, замораживаемые без ультразвукового излучения.

С помощью видеоокуляра криомикроскопа регистрировали сформированные микрочастицы льда при температуре -196°C . Размер частиц льда определяли при обработке изображения программой Trace 1.24b. Для характеристического описания частиц в плоскости использовали изопериметрический фактор.

Изопериметрический фактор определяли по полученным данным площади и периметра, характеризующим форму микрочастиц льда (фактор формы, параметр F_f). Значение данного фактора можно вывести из изопериметрического равенства:

$$4\pi S \leq P^2, \quad (1)$$

где S – площадь, P – периметр.

Равенство достигается, когда кривая является идеальной окружностью. Доказательство этого неравенства было приведено в работе [13]. Если мы имеем замкнутую кривую, то фактор формы будет выражен как

$$F_f = 4\pi S/P^2, \quad (2)$$

где P – длина периметра замкнутой кривой, S – площадь круга с тем же периметром.

Обычно $F_f \leq 1$, но в случае, если кривая является идеальным кругом, $F_f = 1$. Таким образом, фактор F_f выражает степень отклонения формы данной фигуры от окружности. Данный фактор мы использовали для описания микрочастиц льда, которые образуются при глубоком охлаждении льда, полученного из криозащитных растворов. Площадь и периметр частиц льда измеряли по полученным экспериментальным микрофотографиям. Используя эти данные, мы рассчитывали безразмерный коэффициент, характеризующий степень округлости.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 13 (Demo). Результаты были представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка ($M \pm m$) для $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 можно увидеть изображения микрочастиц льда. Видно, что при облучении замораживаемого раствора ультразвуком размер микрочастиц льда уменьшается. Также заметно, что микрочастицы для раствора «ФР + Me_2SO » становятся более округлыми с размытыми граница-

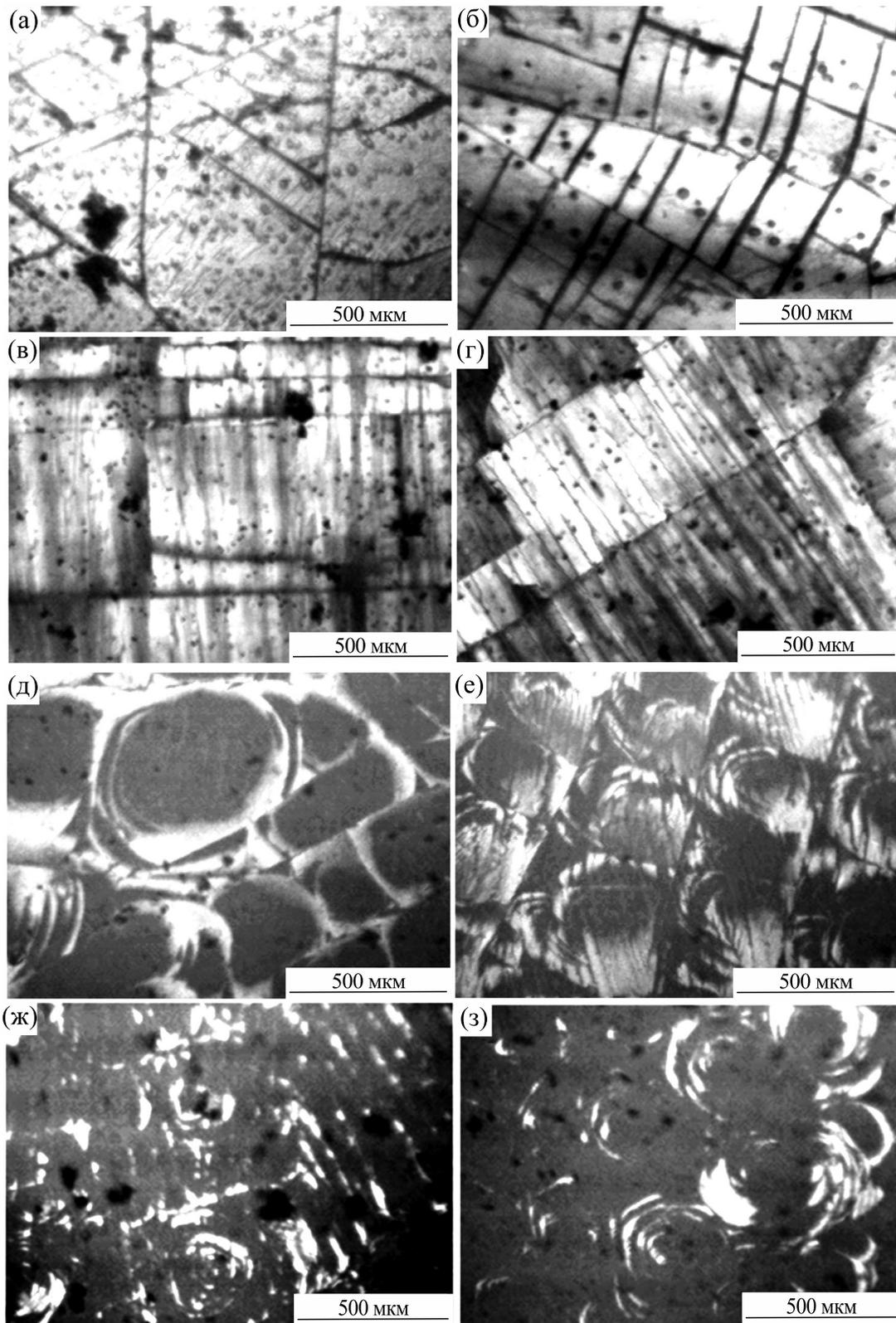


Рис. 2. Микрочастицы льда (температура -196°C): (а) – дистиллированная вода; б – ДВ + ультразвук, (в) – физ. раствор для осетровых рыб, (г) – ФР + ультразвук; (д) – Me_2SO (10%) + ФР; (е) – Me_2SO (10%) + ФР + ультразвук; (ж) – Me_2SO (10%) + ФР + яичный желток, (з) – Me_2SO (10%) + ФР + ЯЖ + УЗ.

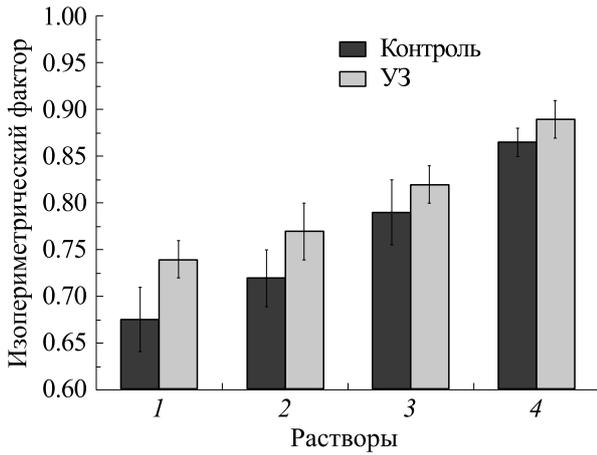


Рис. 3. Изопериметрический фактор для микрокристаллов льда растворов в контроле и с использованием ультразвука (температура -196°C): 1 – ДВ, 2 – ФР, 3 – Me_2SO + ФР, 4 – Me_2SO + ФР + 10% ЯЖ.

ми. При облучении криозащитного раствора с добавлением яичного желтка границы микрокристаллов стираются.

В результате обработки данных был определен основной параметр для анализа изменения характера образования льда – фактор формы (рис. 3, таблица).

Показано, что ультразвук оказывает влияние на формирование микрокристаллов льда. Из рис. 3 видно, что при облучении ультразвуком фактор формы микрокристаллов увеличивался. Это говорит о том, что под воздействием ультразвуковой волны формируются микрокристаллы льда более округлой формы. Это согласуется с экспериментами, описанными в работе [14], которые показали, что в среднем округлость микрокристаллов льда 10%-го раствора маннита увеличивается под воздействием ультразвука и при увеличении акустической мощности.

Образование льда, в котором при прочих равных условиях формируются более округлые частицы, способствует повышению выживаемости клеток в процессе криоконсервации–оттаивания [15].

Видно, что по мере усложнения состава раствора за счет антифризных компонентов (Me_2SO) и липидно-белкового комплекса (яичный желток) увеличивается форм-фактор и одновременно снижается эффект ультразвука.

Процесс замерзания растворов при воздействии ультразвукового облучения сложен и зависит от многих факторов. Нами было показано [16], что воздействие ультразвука на раствор в начале охлаждения убирает низкотемпературный скачок, который происходит из-за эффекта переохлаждения. Вероятно, это происходит из-за постоянного акустического давления ультразвуковой волны на замораживаемый раствор, влияя на температуру и вязкости раствора, что приводит к образованию дополнительных точек зарождения. После достижения замораживаемого раствора низких температур, физические свойства раствора изменяются таким образом, что нужно учитывать влияние ультразвука на упругость и механическое напряжение образующихся волн и, как следствие, изменение общей скорости деформации среды под действием ультразвука.

Авторы работы [17] показали зависимость образования микротрещин при замерзании криопротекторов в тонких слоях от общей скорости деформации среды, которая является суммой скорости упругой деформации, скорости вязкой деформации и скорости термической деформации:

$$\varepsilon = \frac{1}{E} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{3\eta} + \beta \frac{dT}{dt}, \quad (3)$$

где σ – механическое напряжение, E – модуль упругости, η – вязкость, β – коэффициент теплового расширения, T – температура, t – время.

Так как в нашей работе замерзание растворов происходит в тонком слое, можно сказать, что мы имеем только продольное распространение ультразвуковой волны. Поэтому исходя из того, что скорость распространения продольных волн имеет зависимость от модуля упругости и плотности среды, модуль упругости можно выразить через плотность (ρ) и скорость продольной волны (c) как $E = c^2\rho$.

Величина изопериметрического фактора для микрокристаллов льда исследованных растворов

ДВ		ФР		ФР + Me_2SO		ФР + Me_2SO + ЯЖ	
F_k	F_{us}	F_k	F_{us}	F_k	F_{us}	F_k	F_{us}
0.67 ± 0.03	0.74 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.89 ± 0.02

В нашем случае при замерзании водных растворов образование микротрещин приблизительно начинается после -50°C (для воды) и ниже [4]. Авторы работы [17] указывают, что при низких температурах вклад вязкости в скорость упругой деформации невелика. Также можно сказать, что при использовании ультразвука с параметрами 1 Вт/см^2 при низких температурах вклад ультразвука в термическую деформацию будет невелик. В результате в выражении (3) значимым останется только первый компонент.

Известно, что механическое напряжение можно выразить через силу, действующую на единицу площади $\sigma = F/S$. В нашем случае F — это сила радиационного давления, которую можно записать как $F = 2IS/c$, где I — интенсивность ультразвука, S — площадь сечения, c — скорость звука в среде.

В результате преобразования получаем:

$$\varepsilon = \frac{2I}{c^3\rho}$$

Видно, что в нашем случае основной вклад в образование микротрещин вносит скорость и интенсивность звука, и плотность среды.

При изменении состава замораживаемой среды скорость звука и плотность существенно изменяются в зависимости от солевых или органических включений. Из выражения (4) мы видим, что скорость деформации среды значительно уменьшается с ростом скорости звука и плотности среды.

Как было сказано ранее, с увеличением концентрации солей и органических добавок при облучении ультразвуком фактор формы продолжает увеличиваться. В это же время вклад ультразвука при формировании микрочастиц льда снижается. На рис. 3 показано, что чем более сложный раствор используется, тем меньший вклад ультразвука при формировании микрочастиц. В то же время увеличивающаяся размытость границ микрочастиц при ультразвуковом воздействии, вероятно, связана с уменьшением скорости деформации среды во время ее замерзания.

Предполагается что стеклование криозащитного раствора также увеличивает шансы получить качественный материал после криоконсервации—оттаивания [18]. В нашем случае (рис. 2ж,з) наблюдается тенденция к стиранию границ микрочастиц льда. Возможно, используя ультразвуковое воздействие на замерзание растворов при других режимах (например, используя другие частоты), мы сможем приблизиться к эффекту полного стирания границ микрочастиц или к стеклованию в будущем, что является следующим этапом нашей работы.

Можно предположить, что воздействие ультразвука в ходе замораживания криозащитных растворов будет способствовать лучшей сохран-

ности замораживаемых клеток. Одним из повреждающих факторов при криоконсервации живых организмов является разрушение клеток микрочастицами льда. Как видно из нашего исследования, использование ультразвука может быть перспективным для модификации образующихся микрочастиц в сторону формирования более округлых и менее травмирующих биоматериал форм при криоконсервации. Мы предполагаем, что использование ультразвука может быть эффективным инструментом при создании новых способов и методов криоконсервации генетического материала.

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. A. I. Zhmakin, *Fundamentals of Cryobiology: Physical Phenomena and Mathematical Models* (Springer, Berlin, 2008).
2. 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.
3. А. Г. Стромберг и Д. П. Семченко, *Физическая химия* (Высш. шк., М., 1999).
4. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Н. А. Ивличева и А. В. Борода, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
5. F. W. Kleinhans, J. F. Guenther, D. M. Roberts and P. Mazur, *Cryobiology* **52** (1), 128 (2006).
6. R. Chow, R. Blindt, R. Chivers, and M. Povey, *Ultrasonics* **43**, 227 (2005).
7. R. Chow, R. Blindt, A. Kamp, and P. Grocutt, *Ultrason. Sonochem.* **11**, 245 (2004).
8. A. Hottot, K. Nakagawa, and J. Andrieu, *Chem. Eng. Res. Des.* **86**, 193 (2008).
9. В. И. Кабачный и др., *Физическая и коллоидная химия* (Изд-во НФАУ, Харьков, 2001).
10. Н. В. Попова и С. А. Фатева, *Вестн. ЮУрГУ. Сер. «Пищевые и биотехнологии»* **2** (1), 30 (2014).
11. Д. Г. Садикова и А. А. Андреев, *Евразийское научное объединение*, № 6-3 (52), 162 (2019).
12. E. Burzawa-Gerard, B. F. Goncharov, A. Dumas, and Y. A. Fontaine, *Gen. Comp. Endocrinol.* **29** (4), 498 (1976).
13. E. Schmidt, *Die Brunn-Minkowskische I. Math. Nachr.* **1**, 81 (1948).
14. M. Saclier, R. Peczalski, and J. Andrieu, *Chem. Enginer. Sci.* **65**, 3064 (2010).
15. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, E. N. Gakhova, et al., *Biophysics* **54** (5), 612 (2009).

16. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Е. Н. Пономарева и др., Патент на изобретение RU 2540598 С2, 10.02.2015. Заявка № 2013125414/13 от 31.05.2013.
17. Y. Rabin, P. S. Steif, K. C. Hess, et al., *Cryobiology* **53**, 75 (2006).
18. Дж. Фаррант, *Криобиология*, № 2, 12 (1988).

The Effect of Therapeutic Ultrasound on the Formation of Ice Microparticles

D.G. Sadikova and A.A. Andreev

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

In this work, the formation of ice microparticles during freeze-drying of aqueous cryoprotective solutions has been studied. The shape and size of particles depended on the composition of the frozen solution. As aqueous cryoprotective solution freezes under the action of ultrasound at a frequency of 0.88 MHz and intensity of 1 W/cm², the shapes of ice microparticles tend to change and become more rounded. In multicomponent solutions, the application of ultrasound during freeze-drying of cryoprotective solutions and the formation of ice microparticles displayed a remarkable decrease in the efficiency of exposure at the said frequency and intensity.

Keywords: cryoprotective solutions, cryomicroscopy, ice microparticles, ice fracture, ultrasound

УДК 535.8; 574.583; 578.4; 577.3

РОЛЬ ВИРУСОВ И ВИРУСНОГО ЛИЗИСА В ИЗМЕНЕНИИ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОДНОЙ СРЕДЫ ИХ ОБИТАНИЯ

© 2021 г. С.А. Шоларь*, О.А. Степанова**

**Морской гидрофизический институт РАН, 299011, Севастополь, ул. Капитанская, 2*

E-mail: sa.sholar@mail.ru

***Институт природно-технических систем РАН, 299011, Севастополь, ул. Ленина, 28*

E-mail: solar-ua@ya.ru

Поступила в редакцию 30.03.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 11.01.2021 г.

В обзоре представлены данные о роли вирусов гидросферы и вызываемого ими вирусного лизиса одноклеточных хозяев в изменении оптических свойств воды. В ранних работах считалось, что вирусы водоемов как представители наноразмерной фракции микропланктона не оказывают существенного влияния на оптические свойства воды. Однако в дальнейших экспериментах зарубежных коллег и собственных исследованиях авторов было выявлено, что вирусный лизис представителей бактерио- и фитопланктона приводит к многочисленным последствиям, итогом которых является изменение оптических характеристик воды как жидкой среды их обитания. Предполагается, что обнаруженное явление можно использовать в практических целях.

Ключевые слова: оптика моря, вирусы гидросферы и их хозяева, вирусный лизис, показатель ослабления света.

DOI: 10.31857/S0006302921020022

Океаническая вода, как и вода любого водоема, представляет собой сложную физико-химико-биологическую систему, включающую растворенные вещества, взвесь и множество разнообразных живых организмов. Основными факторами, определяющими ее оптические свойства, как указано в работе К.С. Шифрина «Введение в оптику океана» [1], являются оптические компоненты – чистая вода, растворенные вещества (неорганические и органические) и взвесь – минеральная и органическая. Множество разнообразных органических веществ в водной среде находятся в двух формах – входят в состав частиц взвеси, в частности, в планктон (микропланктон), либо молекулярно растворены в океанической воде [1]. Состав фитопланктонного сообщества является важным источником оптической изменчивости в океане [2]. При этом виروпланктон, увеличивающаяся сезонная численность которого отмечается в периоды «цветения» его хозяев – представителей бактерио- и фитопланктона, также является составной частью микропланктона [3]. Следовательно, являясь частью планктона, виропланктон, вызывающий вирусный лизис оп-

тически значимых частиц (бактерий, представителей фитопланктона), может быть рассмотрен учеными и оценен как фактор, приводящий к изменениям в составе и численности оптически активных компонентов. Иными словами, вирусы водоемов, как самые многочисленные и наименее изученные, но играющие ключевую роль в глобальной экосистеме [4, 5], могут быть значимы и в физике водоемов, в том числе в оптике моря и гидросферы в целом.

Влияние различных факторов биотического и абиотического происхождения на вирусы гидросферы в настоящее время находится еще в стадии активного исследования и осмысления. Логичное предположение, что высокая численность вирусов в водоемах и те процессы, за которые вирусы ответственны, могут отражаться на изменениях некоторых физических параметров водной среды их обитания, пока еще не получило достаточных подтверждений в силу слабой изученности. Такая ситуация связана в первую очередь со сравнительно недавней активизацией исследований в области молодой науки – морской (водной) вирусологии, произошедшей лишь в конце XX столетия, когда впервые для прямого счета вирусов в пробах воды использовали электронную микроскопию [6].

Сокращения: РОВ – растворенное органическое вещество, ПОС – показатель ослабления света.

Бурное развитие нового научного направления — морской (водной) вирусологии — поставило перед учеными множество проблем, среди которых можно отметить следующие:

- контаминация гидросферы и ее обитателей вирусами суши с проистекающими последствиями вплоть до их адаптации к новым условиям среды и возникновение так называемых «новых» вирусов;
- значение морских вирусов в инфекционной патологии гидробионтов и их возможная роль в патологии организмов суши, в том числе человека;
- изучение сезонности, численности, морфологии и размерного спектра сообществ виروпланктона и виробентоса как отражение экологии их хозяев;
- роль вирусов в круговороте органического углерода, в биоразнообразии, в процессах функционирования пищевых цепей в водоемах, а также влияние вирусов и вирусного лизиса на физические параметры водной среды их обитания;
- изучение воздействий глобальных и региональных экологических факторов на вирусную составляющую гидросферы, в том числе на отдельных представителей;
- поиск, изоляция и изучение отдельных представителей вирусов гидросферы и их геномов, в том числе альговирюсов, ответственных за лизис первичных продуцентов органической материи, диметилсульфида и кислорода в Мировом Океане, что влияет на атмосферу и климат нашей планеты;
- практическое применение вирусов гидросферы (в изучении сезонности и географии распространения и распределения хозяев-микроорганизмов, в определении видов неизвестных микроводорослей, в фармакологии, в биологических способах борьбы с обрастателями и коррозией, а также и в других направлениях нанотехнологий).

По мере развития водной вирусологии круг проблем только расширяется. Определенную лепту в решение проблем водной вирусологии внесли результаты и наших исследований, как и результаты других российских ученых-исследователей из Лимнологического института СО РАН (Иркутск) [7–13] и Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина (пос. Борок Ярославской области) [14–20].

Анализ доступной литературы свидетельствует о слабой исследовательской заинтересованности и активности отечественных ученых и ученых стран бывшего СССР в получении знаний о вероятной роли вирусов гидросферы и вызываемого ими лизиса одноклеточных хозяев (представителей бактерио- и фитопланктона) в изменениях некоторых физических параметров водной среды

их обитания [21, 22]. Одной из причин слабой заинтересованности специалистов по физике и биофизике моря в изучении влияния вирусов и вирусного лизиса на некоторые физические параметры водной среды их обитания в лабораторных и естественных (природных) условиях может быть недостаточная информированность в этом направлении (по этому вопросу). Проведенный литературный поиск выявил ряд работ зарубежных коллег по подробному изучению вирусного лизиса как морских бактерий и цианобактерий, так и микроводорослей в условиях эксперимента, а также и его влияния на оптические свойства водной среды [2, 23–29].

Публикации отечественных исследователей свидетельствуют о значении хозяев морских вирусов, например представителей фитопланктона, в оптике моря [30–32], а также в изменении оптических характеристик в жидкой среде наращиваемых культур микроводорослей в лабораторных условиях [33]. Есть сведения и о влиянии представителей морской микробиоты, в частности бактерий, водорослей и простейших одноклеточных, на «электрическую энергию» в гидросфере, что «проявляется на акватории макроскопически — в виде локального электрического эффекта» [34]. С учетом недостаточной изученности и освещенности в публикациях проблемы влияния вирусов и вирусного лизиса на физические характеристики водной среды, в том числе значения черноморской микробиоты в этом явлении, нами были выполнены некоторые исследования. Результаты наших первых экспериментальных работ с использованием черноморской микробиоты (разные штаммы альговирюсов и культур разных видов микроводорослей) свидетельствовали об изменении электрической проводимости морской воды при вирусном лизисе [35, 36]. Также наши исследования в лабораторных экспериментах, как и работы зарубежных коллег, выявили значение вирусного лизиса в изменении оптических свойств водной среды обитания вирусов гидросферы [36–39].

Цель представленной работы — проанализировать имеющуюся информацию о роли вирусов и вирусного лизиса в гидросфере в изменении оптических свойств воды, как среды их обитания, на уровне экспериментальных и полевых исследований. При этом были поставлены следующие задачи — выявить теоретические предпосылки значения вирусного лизиса в оптике гидросферы, описать некоторые эксперименты по изучению вирусного лизиса и набор используемых при этом материалов и методов, представить результаты собственных исследований на основе черноморской микробиоты, выдвинуть предположения о возможном использовании альговирюсов и вирусного лизиса в практических целях.

Первый этап в изучении роли вирусов и вирусного лизиса в изменении оптических свойств воды, как среды их обитания, в качестве теоретических предпосылок. Основание в 1892 г. вирусологии как науки, принадлежащее нашему отечественному ученому Д.И. Ивановскому, привело к тому, что уже к началу XX века (с 1926 г.) исследователи занимались выделением вирусов (бактериофагов) из морской воды к ряду патогенных микроорганизмов. В середине XX века наши отечественные исследователи — гидробиологи А.Е. Крисс и Е.А. Рукина проводят изоляцию вирусов (бактериофагов) к морским бактериям из материала (воды и ила), отобранного из экосистемы Черного моря [40, 41]. При этом используются методики, позволяющие накопить морские вирусы в жидкой культуре бактерий, что в случае присутствия вирусов наблюдалось в виде просветления и повышения прозрачности жидкой среды за счет контакта бактериофагов со своими хозяевами (клетками культур бактерий) и последующего вирусного лизиса. Иными словами, вирусный лизис одноклеточных хозяев в жидкой среде наблюдается в виде повышения прозрачности этой среды, что давно известно специалистам в области вирусологии и используется в ряде вирусологических методик, в том числе и в авторских [42, 43].

Высокая оценка учеными водных вирусов как главных игроков в глобальной экологии обусловлена их влиянием на функционирование водных экосистем за счет активного участия в круговороте органического углерода, углекислого газа, кислорода, диметилсульфида (биоактивный газ, участвующий в образовании облаков), в биоразнообразии своих хозяев, в процессах функционирования пищевых цепей и пр. [3–5, 44–48]. А одно из важнейших и крайне актуальных значений вирусов гидросферы — их потенциальная роль в патологии организмов суши, в том числе и людей [49–51].

Однако для расширения знаний об экологии водных вирусов необходимо также уделять внимание изучению вопросов, связанных с ролью вирусов, как самых многочисленных гидробионтов, и вызываемого ими вирусного лизиса в изменении оптических характеристик водной среды их обитания для дальнейшего учета этого явления в теории и практике оптики моря и гидросферы в целом. Полученные при изучении значения вирусного лизиса в оптике водной среды результаты помогут при объяснении наблюдаемых аномалий оптических свойств воды в разных океанических регионах и послужат оригинальным дополнением к выдвигаемым разными учеными предположениям и объяснениям [52].

Эксперименты и набор используемых материалов и методов при изучении влияния вирусов и вирусного лизиса на оптические свойства водной сре-

ды по данным зарубежных исследователей. В ранних работах по изучению оптических свойств вирусов, средний размер которых составляет 0.07 мкм (70 нм), была определена их слабая роль в рассеивании и преломлении света по сравнению с такими оптически активными компонентами, как их хозяева — представители бактерио- и фитопланктона [53]. К заключению о том, что водные вирусы, хотя и очень распространены в море, не являются основным источником обратного рассеяния, пришли и исследователи, использующие в экспериментах лазерный нефелометр [23, 24]. Тем не менее ими было показано, что вирусная инфекция и лизис гетеротрофных бактерий резко изменяют форму индикатрисы рассеяния, делая ее более плоской как в прямом, так и в обратном направлениях. Однако, несмотря на высокую численность водных вирусов, учеными в ранних работах высказывались предположения, что морские вирусы играют второстепенную роль в оптике океана из-за их малого размера и рассеивающего поперечного сечения.

В исследованиях отмечается, что фундаментальные изменения в рассеянии света связаны с заражением морских бактерий, а именно основное влияние вирусов на оптические свойства водной среды связано с вирусным лизисом их хозяев [24]. В этой работе эксперименты проводились в 100-литровых автоклавируемых полиэтиленовых пакетах, при этом в схему эксперимента кроме емкости с зараженными вирусом бактериями входил и контроль (емкость с бактериями без вируса). Неполаризованное объемное рассеяние света на длине волны 514 нм от бактериальных/вирусных суспензий измеряли с помощью лазерного нефелометра (Dawn Wyatt Technologies, США). Источник света этого прибора представляет собой аргон-ионный лазер с вертикально поляризованным световым лучом. В работе впервые количественно описано два оптических изменения, связанных с инфицированием и лизисом морских бактерий бактериофагом: 1) быстрые, сильные сдвиги в величине и форме индикатрисы рассеяния света; 2) быстрое увеличение концентрации окрашенного растворенного органического материала («желтого вещества», именуемого также РОВ). Высказано предположение, что вызванные вирусом (вирусным лизисом) изменения обратного рассеяния будут обнаруживаться с помощью спутниковых или авиационных методов дистанционного зондирования, что позволит определять локализацию наведенной вирусами гибели их хозяев. Так, согласно работе [54], в зоне, где произошел вирусный лизис, по спутниковым данным отмечалась повышенная отражательная способность поверхности. Появление области с высокой отражательной способностью в западном Ла-Манше, наблюдаемой со спутника, по мнению исследователей было вызвано прекра-

шением цветения микроводоросли *Emiliana huxleyi*. В экспедиционных исследованиях на четырех станциях были взяты пробы воды, причем одна станция была снаружи и три станции — в зоне высокой отражательной способности. Для мониторинга численности фитопланктона, кокколитов, бактерий и вирусов в этом исследовании использовали аналитическую проточную цитометрию. Было выявлено, что внутри зоны концентрации вирусов была выше, численность клеток *E. huxleyi* ниже, число кокколитов и бактерий выше. Эти данные были интерпретированы учеными как вызванный вирусом лизис клеток *E. huxleyi* в период цветения, вызывающий отделение больших концентраций кокколитов, что приводит к высокой отражательной способности, наблюдаемой на спутниковых снимках. Эта интерпретация была подтверждена выделением двух вирусов, Eh V84 и Eh V86, из области высокой отражательной способности.

Таким образом, ученые приходят к выводу о том, что вирусная инфекция оптически значимых биологических частиц представляет собой еще один процесс, который может быстро трансформировать клетки микропланктона в новые типы оптически значимого материала, т. е. окрашенное растворенное органическое вещество и обломки клеток. Следовательно, вирусы и вызываемый ими процесс вирусного лизиса оказывают значительное влияние на оптические свойства вод океана.

В работе [27] в лабораторных условиях изучались оптические изменения, сопровождающие распад популяции нитчатых цианобактерий из мелкого эвтрофного озера. В экспериментальных условиях было обнаружено резкое разрушение доминирующих видов водорослей или цианобактерий, что, в свою очередь, по мнению авторов, может быть связано с вирусной активностью. В течение двух недель непрерывного добавления богатой питательными веществами среды отмечалось почти полное разрушение доминирующей популяции за несколько дней. При этом разрушение происходило неоднократно и характеризовалось заметным повышением прозрачности воды. Рассеяние света уменьшилось на 80%, поглощение — на 20–80%. Наблюдалось большое сходство в оптических изменениях между несколькими экспериментами, проведенными в разные сезоны года. Во время разрушения хозяев вирусов отмечали увеличение количества РОВ и частиц субмикронного размера, спектр поглощения которых соответствовал поглощению хлорофилла *a*. Отношение фикоцианина к хлорофиллу *a* и отношение феопигмента к хлорофиллу *a* оказались хорошими показателями наблюдаемого разрушения клеток. Спектры отражения, которые были смоделированы с использованием индикатрисы объемного рассеяния излучения, показали, что

массовая клеточная смертность таких масштабов может быть обнаружена в природных системах с помощью современных дистанционных датчиков. В работе использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии, что позволяло наблюдать повышенное количество вирусоподобных частиц. В серии экспериментов проводили описание изменений оптических свойств жидкой среды при распаде клеток доминирующего вида в результате вирусного лизиса. Исследователи высказали мнение, что после лизиса доминирующих видов собственные оптические свойства (поглощение и рассеяние) водоема резко изменятся и наблюдаемые изменения в оптических свойствах исследуемого объема будут обусловлены разрушением (лизисом) инфицированных клеток, который вызывает высвобождение растворимых и нерастворимых веществ в окружающую среду.

Таким образом, во время фазы вирусного лизиса популяции хозяина, рассеяние и поглощение живыми клетками или их колониями в большинстве случаев изменяются на поглощение света малыми частицами и РОВ. Кроме того, можно ожидать положительный отклик со стороны гетеротрофных бактерий, инфузорий, нанофлагеллят и других представителей микропланктона в результате высвобождения свежего органического материала, вызывающего дальнейшие изменения, наблюдающиеся в окраске воды. Описание обнаруженных в ходе работы оптических изменений при массовом лизисе может, по мнению исследователей, в будущем использоваться для идентификации вирусолитических событий в природе по данным оптического дистанционного зондирования, получаемого со спутников или датчиков на буях и судах. В связи с этим исследователи основное внимание уделили описанию прелизиса или пику цветения фитопланктона после лизиса. Полученные результаты свидетельствуют о самых больших оптических изменениях, которые могут произойти в полевых условиях в описываемые в работе периоды. Иными словами, выполненные исследования и интерпретация полученных данных могут быть экстраполированы на природные условия, в гидросферу.

В работе [25] описаны изменения в экспериментах с течением времени концентраций одноклеточного хозяина и вируса, наряду с соответствующими изменениями первичных гидрооптических характеристик, когда четыре штамма цианобактерий *Synechococcus* были заражены вирусами, выделенными и очищенными от бактерий из воды залива Мэн. При этом отмечались сильные оптические сдвиги до и после лизиса на временных масштабах, соизмеримых с процессом вирусной инфекции. В частности, обратное рассеяние и поглощение (особенно в области видимых длин волн) немного увеличились после зара-

жения, но заметно уменьшились после вирусного лизиса. Наиболее быстрые изменения наблюдались во флуоресценции хлорофилла. Замечено было незначительное увеличение флуоресценции в течение двух суток после первоначального заражения. Такие изменения, вероятно, по мнению исследователей, отражают фундаментальные сдвиги в фото физиологии хозяина после заражения. После лизиса хозяина наблюдалось значительное снижение флуоресценции хлорофилла a , синхронно со значительным увеличением количества свободных вирусов на клетку хозяина. Эти оптические изменения сопровождались и значительными изменениями в спектрах размеров субмикронных частиц по мере лизиса клеток и высвобождающегося при этом их внутриклеточного содержимого. В ходе работы для каждого образца измеряли три оптических параметра: объемное рассеяние на 514 нм, флуоресценцию хлорофилла и спектральное поглощение, которое измеряли с помощью спектрофотометра CamSpec (США), оборудованного интегрирующей сферой с односантиметровой кварцевой кюветой с жидкостным образцом, размещенной в сфере и установленной на пути луча. Оптические эффекты вирусной инфекции на оптическое рассеяние были исследованы с помощью нефелометра Wyatt Technologies Dawn-F (США), оснащенного аргон-ионным лазером. Этот прибор измерял функцию объемного рассеяния (при 514 нм) на 15 углах.

Результаты изучения временной динамики распределения частиц по размерам и связанной с этим оптической изменчивости, вызванной вирусной инфекцией морских гетеротрофных бактерий, в проведенном лабораторном эксперименте, описаны в работе [29]. Распределение частиц по размерам в диапазоне от < 50 нм до 200 нм измерялось параллельно со спектральными показателями поглощения частиц и ослабления света, из которых был определен показатель рассеяния частицами — $b_p(\lambda)$.

Так, в течение 12 ч после заражения бактериальная популяция хозяина разрушилась, численность вирусов увеличилась, и при этом появились субмикронные частицы, поскольку бактерии были разрушены с высвобождением содержимого клетки, что привело к большому снижению $b_p(\lambda)$, замеченному как почти полная очистка (просветление) смеси используемых суспензий частиц. На протяжении оставшейся части эксперимента значительные изменения распределения частиц по размерам происходили главным образом в пределах диапазона размеров относительно крупных частиц (4 мкм), вероятно, в результате агрегации частиц меньшего размера, происходящей при лизисе хозяина. Полученные результаты распределения частиц по размерам были использованы в

качестве входных данных при расчете рассеяния Ми, проводившегося для оценки эффектов динамики этих частиц в терминах относительных вкладов различных классов размеров частиц в показатели рассеяния и обратного рассеяния. Этот анализ выявил значительное увеличение влияния агрегации частиц на рассеяние света в течение вторых и третьих суток после заражения. Авторы выполненного эксперимента приходят к выводу, что вирусный лизис бактерий и последующая наблюдаемая динамика частиц ведут к большой колебательной их распределения в широком диапазоне размеров и в масштабе времени от нескольких часов до нескольких дней, и такие процессы приводят к соответственно большим изменениям оптических свойств исследуемой суспензии.

В одной из работ [26] изучали воздействие вирусного лизиса на культуру микроводоросли *Micromonas pusilla* в стадии роста. При этом определяли влияния вирусного лизиса на концентрацию и состав растворенного органического углерода. Это оценивали по получению из лизата прозрачных экзополимерных частиц и двух фракций флуоресцентного РОВ: ароматических аминокислот (возбуждение/эмиссия, 280/320 нм, $F(280/320)$) и морского гуминового флуоресцентного РОВ (320/410 нм, $F(320/410)$). Концентрация растворенного органического углерода увеличилась в 4.5 раза быстрее, и конечная концентрация в инфицированной культуре достигала в 2.6 раза больших значений по сравнению с неинфицированной. Производство $F(280/320)$ и $F(320/410)$ было соответственно в 4.1 и 2.8 раза выше в зараженных культурах, а повышенное соотношение между $F(280/320)$ и $F(320/410)$ в лизатах свидетельствовало о более высоком вкладе лабильных (белковых) компонентов в продуцируемый вирусами РОВ, чем в водорослевых экссудатах. Производство прозрачных экзополимерных частиц было в 1.8 раза быстрее и достигало уровня в 1.5 раза выше у инфицированных вирусом клеток культуры *M. pusilla* в сравнении с незараженными клетками. Измеренное увеличение концентраций растворенного органического углерода и прозрачных экзополимерных частиц свидетельствовало о том, что вирусный лизис имеет множественный и противоположный характер последствий для производственных и экспортных процессов в пелагическом океане. Таким образом, влияя на микробную пищевую сеть путем увеличения производства как лабильного, так и рефрактерного растворенного органического углерода и окрашенного РОВ, вирусный лизис изменяет оптическую сигнатуру РОВ, а также оказывает влияние на агрегацию частиц посредством усиленного производства прозрачных экзополимерных частиц. Итоги вирусной активности многочисленны и имеют противоположные последствия для производства и экспортных про-

цессов в пелагическом (открытом) океане и поэтому, по мнению авторов процитированной работы, очень важно расширять знания об относительно значимом вкладе этих процессов для получения лучшего понимания механизмов функционирования океанических биогеохимических циклов.

Таким образом, анализ информации, полученной при обзоре ряда публикаций зарубежных исследователей, посвященных изучению роли вирусов гидросферы в изменении оптических характеристик главным образом в ходе экспериментов в лабораторных условиях, выявил, что:

- вирусы, как самостоятельные частицы, являясь самыми многочисленными среди гидробионтов, тем не менее, не оказывают существенного влияния на оптику моря из-за их малого размера и поперечного сечения рассеяния;

- вирусный лизис представителей бактерио- и фитопланктона приводит к многочисленным последствиям (обломки клеток, свободные кокколиты, РОВ, и т.д.), итогом которых является изменение оптических характеристик жидкой среды их обитания, что было зафиксировано и в экспериментах, и по спутниковым данным;

- в составе материалов и методов, которые используют зарубежные исследователи в экспериментах по выявлению роли вирусов в изменении оптических свойств водной среды, необходимо отметить применение в основном двух резервуаров (колб, туб, полиэтиленовых мешков и других емкостей), заполняемых водой и биотическими составляющими; один из резервуаров служит в качестве контроля (рост культур бактерий, цианобактерий, микроводорослей без вирусного лизиса), второй – в качестве опытного (с добавлением в культуру хозяина вирусной суспензии); в ходе экспериментов используются методы и комплекс приборов, необходимых для определения изменения в динамике численности вирусов и их хозяев и оптических свойств исследуемой в экспериментах жидкой среды;

- изменения обратного рассеяния, обусловленные вирусным лизисом, можно обнаружить с помощью спутниковых или авиационных методов дистанционного зондирования, что позволит определять локализацию наведенной вирусами гибели их хозяев;

- вирусная инфекция оптически значимых биологических частиц бактерио- и фитопланктона представляет собой еще один, пока малоизученный процесс, который может быстро трансформировать клетки микропланктона в новые типы оптически значимого материала, в том числе и в окрашенное растворенное органическое вещество;

- в соответствии с мнением исследователей очень важно расширять знания об относительно

значимом вкладе процессов вирусного лизиса для получения лучшего понимания механизмов функционирования океанических биогеохимических циклов.

Первые результаты собственных исследований по изучению роли вирусного лизиса в изменении оптических характеристик черноморской воды (2018–2019 гг.). Проведенные нами исследования были обусловлены отсутствием данных о роли вирусного лизиса в изменениях оптических свойств черноморской воды при использовании черноморской микробиоты (культуры микроводорослей и штаммы альговирюсов), при этом были учтены результаты, полученные в ходе исследований данной проблемы зарубежными коллегами, применявшими микробиоту в основном из тихоокеанского региона.

Использованные в проведенных экспериментах культуры микроводорослей были получены из коллекции живых культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН». Штаммы альговирюсов были выделены из различных проб (вода, донные осадки, гидробионты), отобранных из экосистемы Черного моря в акватории у побережья Севастополя. Изоляцию альговирюсов проводили при помощи запатентованных авторских способов [42, 43]. Свойства выделенных вирусов, в том числе и анализ их секвенированных геномов, описаны в работах [55, 56].

Первые эксперименты по изучению роли вирусной инфекции в изменении оптических характеристик проводили с использованием универсальной лабораторной установки, схематическое изображение которой представлено на рис. 1а. Устройство созданной лабораторной установки, как и полученные при этом результаты, подробно изложены в наших опубликованных работах [35–37]. Было зафиксировано (рис. 1б) влияние вирусного лизиса (двух штаммов черноморских альговирюсов – TvV-S1 и PtV-S18 при контакте с культурами двух видов черноморских микроводорослей – *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricorutum*) на снижение значений показателя ослабления света (ПОС) по данным малогабаритного спектрального измерителя показателя ослабления направленного света (прозрачномера), разработанного в отделе оптики и биофизики моря Морского гидрофизического института РАН [57]. Однако в использованной лабораторной установке имелась лишь одна емкость, которая и служила в эксперименте в качестве опыта, результаты которого представлены в виде графика на рис. 1б, что не позволяло одновременно получать сведения об изменениях ПОС в контроле – роста и развития культур микроводорослей.

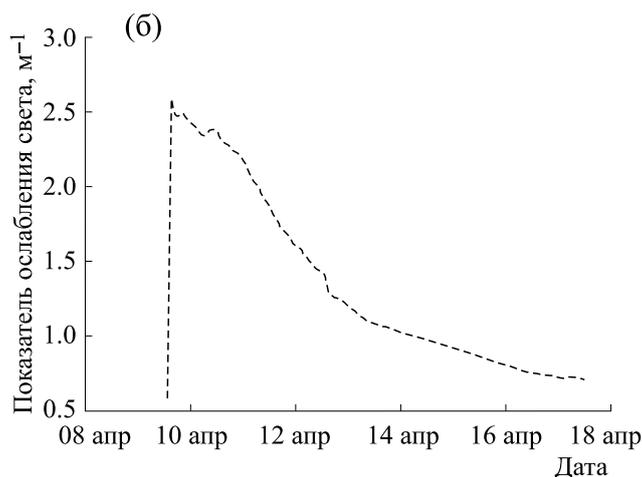
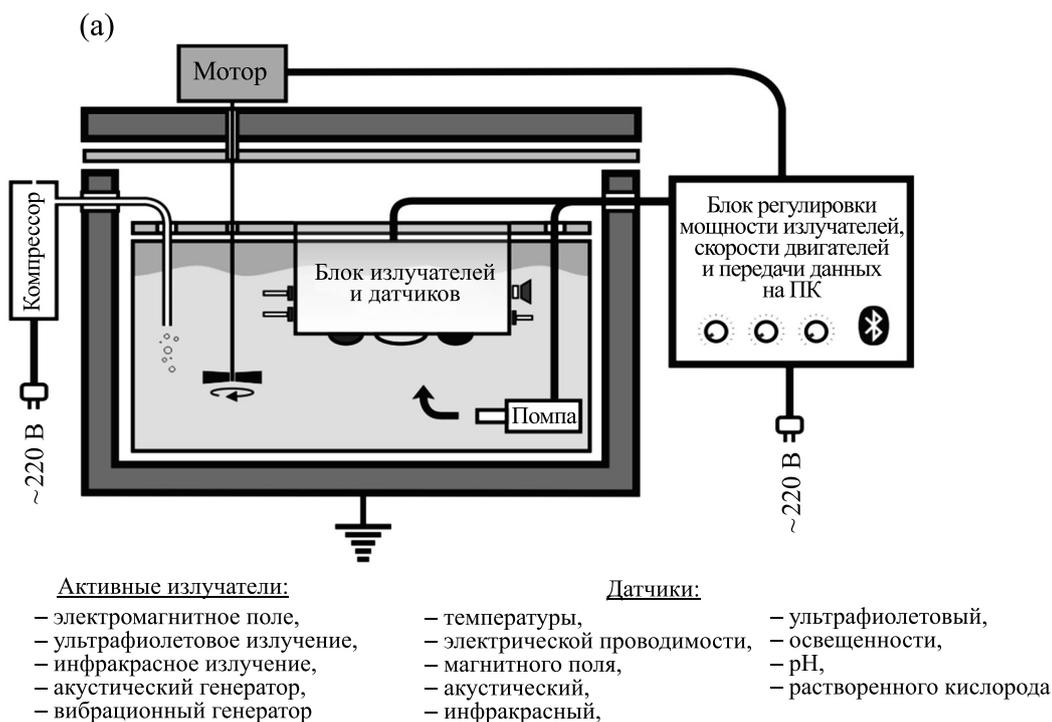


Рис. 1. (а) – Схема универсальной лабораторной установки контроля и мониторинга изучаемой жидкой среды [21]; (б) – изменение показателя ослабления света под действием вирусного лизиса (альгровирусы TvV-S1и PtV-S18) микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum* [22].

дорослей без вирусного лизиса. Для дальнейших исследований и их оценки необходимо было проведение экспериментов в двух емкостной установке или стенде, где помимо опыта были бы условия и для контроля.

В ходе экспериментов по изучению оптических свойств водной среды (черноморской воды) в присутствии черноморской микробиоты был разработан и адаптирован простой и доступный экспериментальный лабораторный стенд (рис. 2), подробное описание которого представлено в работе [38]. Для создания стенда были использова-

ны два идентичных пластиковых сосуда (диаметром 28 см и высотой 30 см), в которых можно было размещать до 15 л изучаемых жидких модельных биологических систем на основе морской воды. Одна из емкостей служила для контроля, другая для опыта. Апробирование созданного экспериментального лабораторного стенда было проведено в нескольких исследованиях, в которых в качестве модельных биологических систем использовали как монокультуры черноморских микроводорослей, так и их смесь, которые подвергали воздействию альгровирусов в опыте,

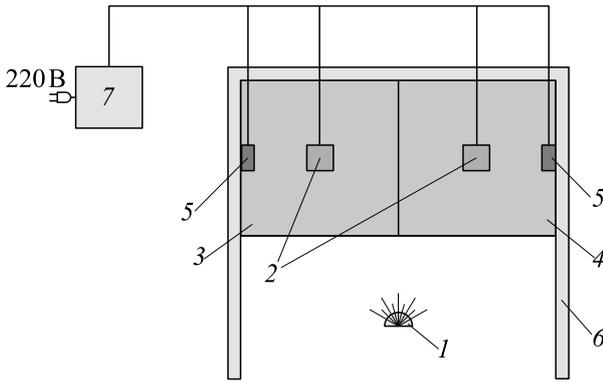


Рис. 2. Схема экспериментального лабораторного стенда для изучения изменения оптических свойств водной среды под влиянием микробиоты и вирусного лизиса [24]: 1 – источник искусственного освещения (светодиодная лампа ЕСО А60, 11 Вт 4000 К); 2 – рабочая зона, где размещается прозрачномер и датчик температуры; 3 – контрольная емкость (модель биологической системы без альговирюсов); 4 – емкость для опыта (модель биологической системы с альговирюсом); 5 – аквариумные насосы для перемешивания содержимого; 6 – светоотражающая поверхность; 7 – блок регулировки интенсивности работы насосов и передачи данных на персональный компьютер.

сравнивая показатели ПОС с контролем – без вирусного лизиса.

Выполненные эксперименты выявили влияние черноморской микробиоты на оптические свойства водной среды – наблюдалось повышение ПОС в результате роста культур микроводорослей (в контроле) и его снижение вследствие вирусного лизиса культур (в опыте), что представлено на рис. 3 в виде графиков изменения величин ПОС в динамике. Результаты, полученные на примере одной из черноморских культур под воздействием альговирюса в опыте и без вирусного лизиса в контроле, подробно описаны в работе [39]. Как можно видеть из графиков на рис. 3в, в инфицированной культуре в первые сутки опыта ПОС выше, что отчасти не противоречит и данным экспериментов, описанных в работе [25]. При этом между данными измерений ПОС на длине волны 625 нм и численностью клеток культуры микроводоросли, используемой в этом эксперименте, с учетом контроля и опыта была выявлена тесная связь, описанная линейным регрессионным уравнением с высоким коэффициентом детерминации (рис. 4).

Таким образом, полученные результаты являются первыми в плане экспериментального изучения роли черноморской микробиоты и вирусного лизиса в изменении оптических характеристик черноморской воды по данным ПОС и с учетом изменения численности клеток хозяев черноморских альговирюсов.

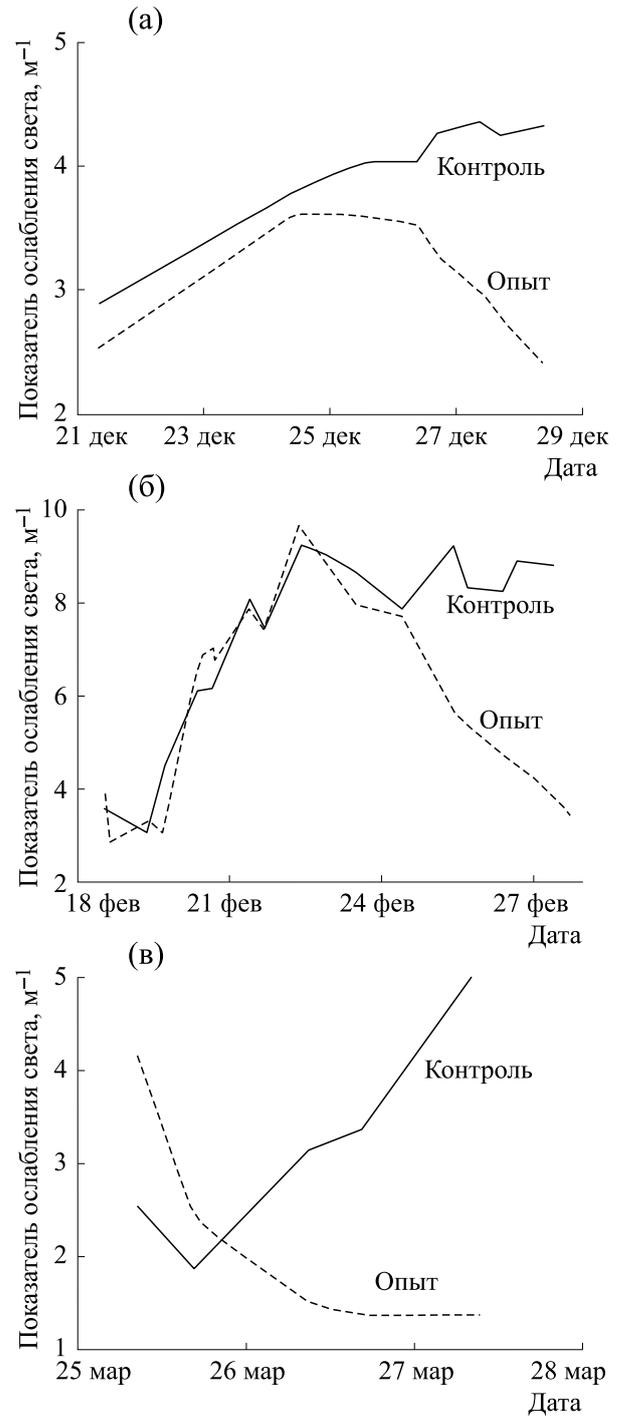


Рис. 3. Изменение показателя ослабления света в смеси морской воды и культур микроводоросли *Tetraselmis viridis* (а), смеси микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Dunaliella tertiolecta* (б), микроводоросли *Dunaliella viridis* (в) с добавлением вирусной суспензии альговирюсов TvV-S11 (а, б) и DvV-S11 (в) в опыте и в контроле. Эксперименты выполнены в 2019 г. [24].

Возможное практическое применение альговирюсов и вирусного лизиса. Известно, что вирусы широко используются в практике нанотехнологий

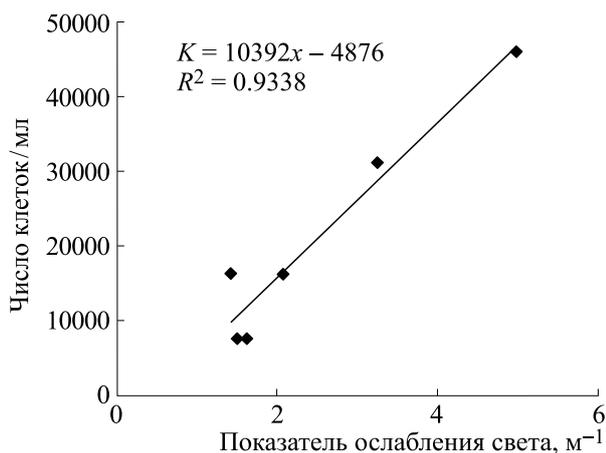


Рис. 4. Линейная зависимость значений ПОС и численности клеток культуры микроводоросли *Dunaliella viridis* на длине волны 625 нм по данным контроля (без вируса) и опыта (с вирусом DvV-SI1) [24].

[58]. Так, в одной из публикаций [59] приведены современные данные о применении вирусов в качестве эффективных инструментов в нанобиотехнологии и наномедицине (биочипы, латексные частицы, рекомбинантные вирусы-химеры, сорбенты вирусов на основе полианилина и наноалмазов и др.). Описано их использование для фундаментальных исследований и в различных сферах нанотехнологий, включая электронику.

С учетом полученных данных как в экспериментах зарубежных коллег, так и в наших исследованиях логично предположить, что альговирussy и вирусный лизис могут использоваться в профилактике и/или в борьбе с такими широко распространенными явлениями в гидросфере, как биокоррозия и биообрастание, где основную роль играют и микроводоросли.

По нашему мнению, возможно применение альговирussy и вызываемого ими вирусного лизиса в марихозайствах в качестве «природного фермента» для расщепления (трансформации) живого органического вещества на легко усваиваемый коктейль макро- и микромолекулярной органической субстанции [60]. В таком виде РОВ поглощается и утилизируется различными гидробионтами, что способствует их росту и развитию [3, 60–63]. Это свойство альговирussy может использоваться в технологиях для растворения посредством лизиса культур микроводорослей с целью выделения из них белков, ферментов, витаминов и др. биологически активных веществ без их повреждения.

Альговирussy и вызываемый ими вирусный лизис, с нашей точки зрения, можно применять в методиках по обработке кожи (при обрастании микроводорослями) обитаемых в неволе дельфи-

нов, а также и для снижения явления обрастания в замкнутых местах их содержания (бассейнах).

Перспективно использование альговирussy и вирусного лизиса для профилактики и/или устранения явления «цветения воды» в различных водоемах (бассейнах, водохранилищах, каналах, городских бухтах), что улучшит их эстетический вид.

Однако все представленные предположения для использования альговирussy и вызываемого ими вирусного лизиса нуждаются в дополнительных исследованиях, экспериментах и практических изучениях, что одновременно будет являться и расширением знаний в области молодой науки — морской (водной) вирусологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведенный литературный обзор доступной информации о роли вирусов гидросферы, самых многочисленных и наименее изученных среди гидробионтов, в изменении оптических свойств воды водоемов, с учетом собственных результатов, полученных в ходе экспериментов с использованием черноморской микробиоты, выявил следующее.

1. Самые многочисленные среди гидробионтов вирусы водоемов как самостоятельные частицы по мнению исследователей не оказывают существенного влияния на оптические свойства воды, что объясняют их нано размером и малым поперечным сечением рассеяния.

2. По данным экспериментов зарубежных коллег при использовании как опытных, так и контрольных емкостей вирусный лизис представителей бактерио- и фитопланктона приводит к многочисленным последствиям, итогом которых является изменение оптических характеристик жидкой среды. Эти изменения при экстраполяции на природные водоемы было предложено определять дистанционно как показатели наведенной (вызванной) вирусами гибели их одноклеточных хозяев.

3. Вирусная инфекция оптически значимых биологических частиц бактерио- и фитопланктона представляет собой еще один пока малоизученный процесс, который может быстро трансформировать клетки микропланктона в новые типы оптически значимого материала. Причем это свойство может быть использовано в практике, в том числе и в нанотехнологиях.

4. По мнению ученых, назрела актуальность и необходимость расширения знания о вкладе процессов вирусного лизиса в физико-химико-биологическую составляющую гидросферы для получения лучшего понимания механизмов функционирования океанических биогеохимических циклов.

5. Сведений, особенно в работах отечественных ученых, о роли вирусного лизиса в изменении оптических характеристик водной среды в гидросфере на уровне экспериментов или полевых исследований недостаточно, и они не учитываются в теории и практике оптики моря.

Дальнейшие исследования по изучению роли черноморской микробиоты в изменении физических характеристик морской среды будут направлены на использование в экспериментах более широкого спектра черноморских альговирюсов (в авторской коллекции имеются альговирюсы к семи видам микроводорослей), как и круга их хозяев. В опытах предполагается использовать влияние таких физических факторов, как магнитное и электрическое поля, ультрафиолетовое облучение и некоторые другие абиотические воздействия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы ФИЦ МГИ РАН (тема № 0827-2019-0001, № госрегистрации АААА-А18-118012690119-7) и Государственного задания ИПТС (тема № 0012-2019-0003, № госрегистрации АААА-А19-119040590054-4).

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. К. С. Шифрин, *Введение в оптику океана* (Гидрометеоздат, Л., 1983).
2. D. Stramski, A. Bricaud, and A. Morel, *Appl. Optics* **40** (18), 2929 (2001).
3. K. E. Wommack and R. R. Colwell, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **64** (1), 69 (2000).
4. M. Middelboe and C. Brussaard, *Viruses*, **9** (10), 302 (2017).
5. C. A. Suttle, *Nature Rev. Microbiol.* **5**, 801 (2007).
6. J. McN. Sieburth, V. Smetacek, and J. Lenz, *Limnol. Oceanogr.* **23** (6), 1256 (1978).
7. В. В. Дрюккер и Н. В. Дутова, Докл. РАН **410** (6), 847 (2006).
8. В. В. Дрюккер и Н. В. Дутова, Докл. РАН **427** (2), 277 (2009).
9. В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова, А. С. Ковадло и др., в сб. *Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем* (Изд-во РГУ, Ростов-на-Дону, 2006), сс. 118–121.
10. В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова, А. С. Ковадло и Т. Я. Косторнова, *Изв. ИрГУ. Науки о Земле* **1** (1), 189 (2008).
11. В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова и А. С. Ковадло, Докл. РАН **440** (2), 282 (2011).
12. Н. В. Дутова и В. В. Дрюккер, *Гидробиол. журн.* **45** (4), 82 (2009).
13. Н. В. Дутова и В. В. Дрюккер, Докл. РАН **450** (4), 468 (2013).
14. А. И. Копылов, *Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология* **6** (4), 354 (2013).
15. А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов и Е. А. Заботкина, *Микробиология* **76** (6), 879 (2007).
16. А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов и Е. А. Заботкина, *Биол. внутренних вод*, № 1, 49 (2008).
17. А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов, Е. А. Заботкина и В. Страшкрабова, *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 6, 661 (2010).
18. А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов и Е. А. Заботкина, *Микробиология* **80** (2), 241 (2011).
19. А. И. Копылов, А. Ф. Сажин, Е. А. Заботкина и Н. Д. Романова, *Океанология* **55** (4), 620 (2015).
20. А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов и Е. А. Заботкина, *Поволжский экологич. журн.*, № 2, 128 (2017).
21. О. А. Степанова, *Системы контроля окружающей среды*, № 12 (32), 99 (2018).
22. С. А. Шоларь и М. Е. Ли, *Системы контроля окружающей среды*, № 14 (34), 17 (2018).
23. W. M. Balch, J. M. Vaughn, J. F. Novotny, et al., *Limnol. Oceanogr.* **45** (2), 492 (2000).
24. W. M. Balch, J. M. Vaughn, J. F. Novotny, et al., *Limnol. Oceanogr.* **47** (5), 1554 (2002).
25. W. M. Balch, J. M. Vaughn, J. I. Goes, et al., *Limnol. Oceanogr.* **52** (2), 727 (2007).
26. C. Lønborg, M. Middelboe, and C. P. D. Brussaard, *Biogeochemistry* **116** (1–3), 231 (2013).
27. S. G. H. Simis, M. Tjidsens, H. L. Hoogveld, et al., *J. Plankton Res.* **27** (9), 937 (2005).
28. S. G. H. Simis, M. Tjidsens, H. L. Hoogveld, et al., *Limnol. Oceanogr.* **52**, 184 (2007).
29. J. Uitz, D. Stramski, A. C. Baudoux, et al., *Limnol. Oceanogr.* **55**, 2317 (2010).
30. В. И. Маньковский, *Морской гидрофизич. журн.* **5**, 78 (1999).
31. В. И. Маньковский, *Морской гидрофизич. журн.* **5**, 14 (2011).
32. V. I. Man'kovsky and E. V. Man'kovskaya, *Phys. Oceanography* **1**, 41 (2017).
33. Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков, П. Е. Гаврилов и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **1** (1), 77 (2016).
34. В. В. Александров, *Электрофизика пресных вод* (Гидрометеоздат, Л., 1985).
35. О. А. Степанова и П. В. Гайский, *Системы контроля окружающей среды* **11** (31), 48 (2018).
36. О. А. Степанова, П. В. Гайский и С. А. Шоларь, *Системы контроля окружающей среды* **13** (33), 19 (2018).
37. С. А. Шоларь, П. В. Гайский и О. А. Степанова, в кн. *Мезомасштабные и субмезомасштабные процессы в гидросфере и атмосфере*, под ред. Ю. В. Воро-

- бьева (Изд. Инст. океанол. им. П. П. Ширшова РАН, М., 2018), сс. 410–412.
38. С. А. Шоларь, О. А. Степанова и Л. В. Стельмах, Системы контроля окружающей среды **2** (36), 13 (2019).
 39. С. А. Шоларь, О. А. Степанова, Л. В. Стельмах и др., в кн. *Современные проблемы оптики естественных вод* (Химиздат, Спб., 2019), сс. 156–160.
 40. А. Е. Крисс, *Морская микробиология (глубоководная)* (АН СССР, М., 1959).
 41. А. Е. Крисс и Е. А. Рукина, ДАН СССР, **57** (8), 833 (1947).
 42. О. А. Степанова, Патент Украины на изобретение № 2003065499, Бюл. № 4 (2003).
 43. О. А. Степанова, Патент Украины на изобретение № 201003881, Бюл. № 2 (2010).
 44. Е. В. Лихошвай, Наука из первых рук **70** (4), 88 (2016).
 45. N. Guixa-Boixereu, C. Pedros-Alio, J. I. Calderón-Paz, et al., in *Ecology of Marine Viruses* (CIESM Workshop Monographs, Banyuls, 2003), pp. 41–44.
 46. S. Wilhelm, M. Weinbauer and C. Suttle, *Manual of Aquatic Viral Ecology* (ASLO, Waco, 2010).
 47. Proposal for SCOR WG to investigate the role of viruses in marine ecosystems, in *Proc. Sci. Comm. Ocean. Res.* (Baltimore, 2005), v. 40, pp. 66–70 (Annex 4).
 48. P. Hyman and T. Stephen, *Viruses of Microorganisms* (Caister Acad. Press, Ashland, 2018).
 49. O. A. Stepanova, Y. A. Solovyova, and A. V. Solovyov, *Ukr. Bioorg. Acta* **2**, 53 (2011).
 50. M. S. Petro, I. V. Agarkova, and T. M. Petro, *J. Neuroimmunol.* **297**, 46 (2016).
 51. R. H. Yolken, L. Jones-Brando, and D. D. Dunigan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (45), 16106 (2014).
 52. E. Organelli, H. Claustre, A. Bricaud, et al., *Geophys. Res.-Oceans.* **122** (5), 3542 (2017).
 53. D. Stramski and C. D. Mobley, *Limnol. Oceanogr.* **42**, 538 (1997).
 54. W. H. Wilson, G. A. Tarran, and D. Schroeder, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **82** (3), 369 (2002).
 55. O. A. Stepanova, A. L. Воїко, and I. S. Shcherbatenko, *Mikrobiologich. Zh.* **75** (5), 76 (2013).
 56. O. A. Stepanova, *Russ. J. Mar. Biol.* **42** (2), 123 (2016).
 57. М. Е. Ли, Системы контроля окружающей среды **17**, 7 (2012).
 58. P. Singh, M. Gonzales, and M. Manchester, *Drug Develop. Res.* **67** (1), 23 (2006).
 59. Л. В. Урываев, С. В. Альховский, Е. И. Самохвалов и др. Вопросы вирусологии **1**, 52 (2012).
 60. O. A. Stepanova, *Russ. J. Mar. Biol.* **43** (2), 127 (2017).
 61. E. Beretta and Y. Kuang, *Math. Biosci.* **149** (1), 57 (1998).
 62. I. Hewson, J. M. O’Neil, C. A. Heil, et al., *Aquat. Microb. Ecol.* **25** (1), 1 (2001).
 63. A. G. Murray and P. M. Eldridge, *J. Plankton. Res.* **16** (6), 627 (1994).

The Role of Viruses and Viral Lysis in Alteration of the Optical Properties of Aquatic Environment as the Habitat of Viruses

S.A. Sholar* and O.A. Stepanova**

*Marine Hydrophysical Institute, Russian Academy of Sciences, Kapitanskaya ul. 2, Sevastopol, 299011 Russia

**Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 28, Sevastopol, 299011 Russia

This review has its focus on the role of hydrosphere viruses and hydrosphere virus-induced viral lysis of single-celled hosts in alteration of the optical properties of water. Our earlier research showed that viruses of reservoirs as representatives of the nano-sized fraction of microplankton have no significant effect on the optical properties of water. However, further experiments conducted by foreign researchers and our current study include reports that viral lysis of the representatives of bacterio- and phytoplankton leads to numerous effects ultimately altering the optical characteristics of the aquatic environment as the habitat of viruses. It is assumed that the discovered phenomenon can be used for practical purposes.

Keywords: sea optics, hydrosphere viruses and their hosts, viral lysis, light beam attenuation coefficient

ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ КОФАКТОРА НА ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИНАМИКУ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

© 2021 г. А.А. Кошкар, О.Н. Макшакова

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН»,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: olga.makshakova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 26.07.2020 г.

Принята к публикации 09.11.2020 г.

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа является одним из ключевых ферментов гликолиза, кроме того, белок вовлечен в регуляцию широкого ряда клеточных функций, включая индукцию апоптоза. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа также участвует в развитии ряда патологических состояний, нейродегенеративных и раковых заболеваний. Новые подходы к регуляции активности фермента требуют детального понимания организации его пространственной и динамической структуры. В данной работе проведено исследование взаимодействия кофактора никотинамидадениндинуклеотида с димерами, составляющими тетрамер соматического глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека, методом молекулярной динамики. Охарактеризовано влияние связывания кофактора на внутримолекулярную динамику белка. Показано, что димеры связывают кофактор с разными энергиями, что связано с подвижностью S-петли и ее способностью взаимодействовать с молекулой кофактора. В димере ОР, стабилизированном обширными контактами протяженных бета-структур, обнаружены группы остатков в смежных субъединицах, которые движутся согласованно, при этом показано, что связывание кофактора модулирует характер коррелированных движений в димере.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, связывание лиганда, кооперативность, аллостерия, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302921020034

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, КФ 1.2.1.12) является одним из ключевых ферментов гликолиза, который катализирует окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат при восстановлении кофактора НАД⁺ до НАД(Н). Кроме того, белок задействован в широком ряде других клеточных функций, включая такие процессы, как клеточная адгезия, экспорт тРНК, репарация ДНК и регуляция экспрессии генов [1, 2]. К тому же ГАФД вовлечен в процессы индукции апоптоза [3] и развития нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [4]. При отклонениях от нормы, например в клетках меланомы, наблюдается экспрессия тканенеспецифичной формы ГАФД, что сопряжено с развитием злокачественных образований [5]. В связи с разнообразием дисфункций организма, в кото-

рые вовлечен ГАФД, актуальной задачей становится поиск способов регуляции его активности [3, 6].

Основные успехи и неудачи в поисках ингибиторов ГАФД, в том числе селективных ингибиторов изоферментов из разных источников, отражены в недавнем обзоре [6]. С 90-х годов прошлого века стратегия селективного ингибирования ГАФД, направленная на некоторые паразитарные и спермо-специфические белки млекопитающих (ГАФДс), была основана на конкурентном связывании ингибиторов в области активного центра белка [7–9]. Селективность по отношению к целевому ферменту достигалась за счет слабых различий в НАД-связывающем кармане этого белка по сравнению с соматическим ГАФД человека. Однако высокая консервативность активного центра ГАФД серьезно ограничивает такой подход, что подталкивает исследователей к поиску новых путей решения этой проблемы [6]. В качестве альтернативного подхода в разработке ингибиторов предлагается использование удаленных участков белка, которые аллостерически связаны с актив-

Сокращения: ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, rmsf – среднеквадратичная флуктуация (root mean square fluctuation).

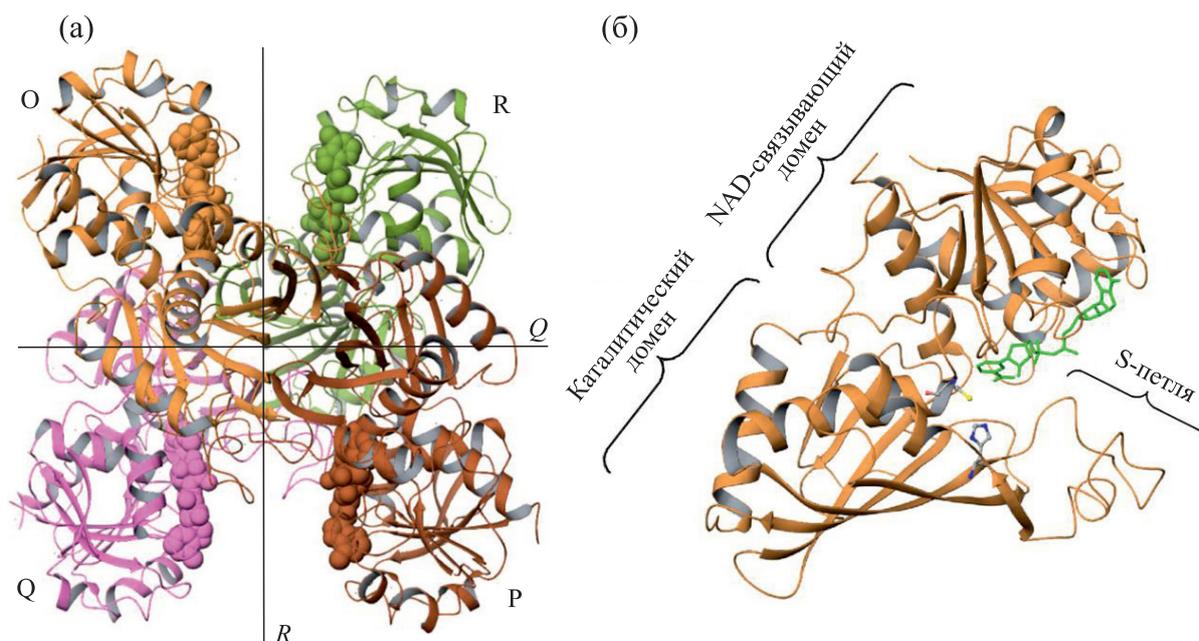


Рис. 1. (а) – Тетрамер глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с кофактором НАД (указаны сферами). Буквенные обозначения субъединиц соответствуют их конвенциональной аннотации в pdb файле, оси симметрии Q и R указаны линиями и подписаны курсивом. (б) – Домены субъединицы ГАФД со связанным кофактором (показан зеленым цветом) и остатки каталитического центра (атомы углерода – серым, азота – синим, кислорода – красным и серы – желтым цветом).

ным центром ГАФД; рациональное развитие такого подхода требует детального понимания особенностей динамической структуры изоферментов ГАФД [10]. В данной работе мы попытались приблизиться к пониманию организации динамической структуры соматического ГАФД человека.

ГАФД – природный гомотетрамер (рис. 1). Каждая его субъединица состоит из двух доменов, каталитического (aa 151–316) и НАД-связывающего (aa 1–150 и 317–335). ГАФД имеет три оси двукратной симметрии. Ось P определяет область контакта между O - и P - (Q - и R -) субъединицами. Этот контакт имеет наибольшую площадь среди трех типов димеров и образуется протяженными участками β -слоев каталитических доменов соседних субъединиц. Ось R определяет НАД-связывающую бороздку между O - и R - (P - и Q -) субъединицами, которые взаимодействуют главным образом посредством S -петли. Контакты по оси Q являются самыми слабыми, поэтому ГАФД может быть представлен как димер димеров относительно оси Q .

Известно, что в зависимости от источника ГАФД обладает отрицательной или положительной кооперативностью по связыванию кофактора. В частности, соматический ГАФД демонстрирует отрицательную кооперативность [11, 12]. Кооперативность изучалась с помощью различных экспериментальных подходов на протяжении десятилетий, предлагались модели от предсуществующей

асимметрии в тетрамере до индуцированных изменений конформации при связывании кофактора, согласованных или последовательных [11–17]. Позже данные рентгеноструктурного анализа показали, что субъединицы в составе тетрамера ГАФД имеют одинаковую пространственную организацию, причем она слабо меняется при связывании кофактора [9, 18]. Одним из подходов для определения вклада межсубъединичных контактов в кооперативность ГАФД является изучение этого явления в димерах белка. Экспериментально было показано, что из трех возможных типов димеров ГАФД из *Bacillus stearothermophilus* только два формируют стабильные надмолекулярные структуры, а именно димеры типа OP и OR [19]. Оба димера оставались способными связывать НАД, но кооперативность проявлял только димер типа OP . Понимания механизмов кооперативности ГАФД на атомном уровне добавляют данные, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза на примере человеческого ГАФДс [20]. Было установлено, что кооперативность тетрамера можно «выключить» путем замены лишь одного аминокислотного остатка (D311N), который располагается вблизи OP -контакта. Это указывает на ключевую роль данного остатка в передаче сигнала между активными центрами субъединиц. Методами молекулярной динамики было показано, что данный остаток вовлечен в динамическую сеть, в которой остатки движутся коррелировано [10]. В

рамках концепции динамически-управляемой аллоsterии [21] можно предположить, что внутри-молекулярная динамика ГАФД играет ключевую роль в регуляции передачи сигнала как между субъединицами, так и по молекуле белка в целом.

Метод молекулярной динамики позволяет охарактеризовать эволюцию энергетических и геометрических характеристик молекулярной системы во времени и получить описание взаимодействий всех ее компонент на атомном уровне с учетом динамики, что делает метод незаменимым для решения обозначенной задачи. Однако, насколько нам известно, коррелированность движений остатков в ГАФД до сих пор изучалось лишь для небольшого фрагмента белка, не более семи остатков [10, 22], а исследований влияния связывания кофактора на динамику белка расчетными методами не проводилось вовсе. Поскольку задача исследования динамической организации тетрамера ГАФД комплексная, рационально разбить ее на подзадачи. В данной работе мы исследовали организацию динамической структуры ГАФД, изучая отдельные димеры, составляющие тетрамер, а именно ОР и ОР; мономер белка использовали в качестве референсной системы.

Полученные результаты будут способствовать пониманию влияния связывания НАД на динамическую структуру ГАФД и заложит базис для разработки аллоsterических ингибиторов белка.

МЕТОДЫ

Исходные 3D-структуры белка. Исходные структуры мономера и ОР- и ОР-димеров со связанным кофактором НАД были получены с использованием координат кристаллической структуры тетрамерного белка соматического ГАФД человека, доступных в базе данных Кембриджского университета (pdb код: 1znq). Апо-формы соответствующих моно- и олигомеров были получены путем удаления молекул кофактора из холо-формы белка. Всего было получено шесть исходных систем: мономер, ОР-димер и ОР-димер, каждый в апо-форме и в холо-форме. В случае холо-формы каждая субъединица содержала одну молекулу кофактора.

Расчет траекторий молекулярной динамики и их анализ. Системы помещали в прямоугольный бокс с водой с периодическими граничными условиями по всем трем направлениям, граница бокса располагалась на удалении как минимум 1 нм от края белка. Воду задавали в явном виде. Для нейтрализации заряда добавляли необходимое для каждой системы количество ионов Cl^- . Далее проводили минимизацию энергии системы. Фаза уравнивания состояла из двух последовательных процедур — уравнивание при постоянной температуре и уравнивание при постоянном давлении.

Для поддержания постоянной температуры 300 К использовали термостат V-rescale [23], где регуляция температуры была распределена между двумя группами или так называемыми «ваннами», а именно воды с ионами и белка с кофактором (если последний присутствовал в системе) с временной константой 0.1 пс. Поддержание давления в 1 бар контролировали баростатом Берендсена [24], значение сжимаемости задавалось равным $3 \cdot 10^{-4} \text{ бар}^{-1}$, а период релаксации давления — равным 5 пс. Осцилляции ковалентных связей с участием атомов водорода ограничивали по алгоритму Lincs, благодаря чему временной шаг интегрирования при численном решении уравнений движения составлял 2 фс. Использовали интегратор leap-frog. Электростатические взаимодействия рассчитывали с помощью алгоритма Particles Mesh Ewald, обрезку взаимодействий проводили на расстоянии 1 нм, расчет соседей проводили каждые 20 фс. Траектории молекулярной динамики были получены в прт-ансамбле, длина одной траектории составляла от 300 до 600 нс. Все расчеты траекторий молекулярной динамики были выполнены в программном пакете GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) с использованием силового поля GROMOS. Оценку кулоновских и вандерваальсовых компонентов энергии парных взаимодействий, а также анализ значений среднеквадратичного отклонения и среднеквадратичных флуктуаций (root-mean-squared fluctuations, *rmsf*) Са-атомов белка проводили с помощью инструментов GROMACS. Динамические кросс-корреляционные матрицы строили в программе Gamma [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице приведены расчетные значения энергии взаимодействия кофактора с мономером и двумя димерами ГАФД. Результаты показывают, что энергия взаимодействия молекулы кофактора с субъединицей в димере зависит от типа пространственной организации последнего. Так, для димера типа ОР энергии связывания кофактора сравнимы с энергиями связывания молекулы НАД с мономером. Однако для димера типа ОР величины этих энергий существенно выше (по абсолютному значению), т.е. связывание энергетически более выгодно, чем с мономером и димером ОР. Подобные различия связаны с пространственной организацией S-петли и ее динамикой в димерах.

Как видно из рис. 1б, молекула кофактора локализуется в области НАД-связывающего домена, а также стабилизируется взаимодействиями с S-петлей. S-петля представляет собой неструктурированный участок цепи длиной 27 остатков (aa 180–206). В мономере петля обладает высокой подвижностью, что демонстрирует диаграмма среднеквадратичных флуктуаций (*rmsf* > 1.2 нм), представленная на рис. 2. Сравнение значений *rmsf* Са-

Электростатическая ($E_{эл}$) и вандерваальсова ($E_{вдв}$) компоненты энергии взаимодействия субъединиц ГАФД с кофактором в мономере и димерах

	$E_{эл}$, кДж/моль		$E_{вдв}$, кДж/моль	
	О	P(R)	О	P(R)
мономер	-443 ± 43		-197 ± 23	
ОР-димер	-345 ± 56	-447 ± 61	-167 ± 21	-207 ± 23
OR-димер	-1144 ± 67	-1304 ± 100	-206 ± 19	-33 ± 5

Примечание. Значения энергии усреднены по траектории молекулярной динамики, первые 100 нс не учитывались.

атомов белка в апо- и холо-форме показывает, что связывание кофактора уменьшает подвижность ряда остатков НАД-связывающего домена и остатков S-петли (рис. 2б). Однако подвижность последней все еще остается довольно высокой ($rmsf > 0.6$ нм). Энергия взаимодействия кофактора с мономером ГАФД выходит на насыщение в первые 100 нс траектории, на плато наибольший вклад в стабилизацию комплекса дают остатки НАД-связывающего кармана Arg13, Arg16 и Asp35 и остатки S-петли Ile181, Thr182, Thr184 и Gln185 (рис. 3).

В ОР-димере межсубъединичные контакты образованы взаимодействием протяженных бета-

слоев. S-петля частично вовлечена во взаимодействие через фрагмент aa 196–206. Однако большая часть S-петли, включая фрагменты, которые могут взаимодействовать с кофактором, остается значительно подвижной, $rmsf > 0.6$ нм (рис. 4). Связывание кофактора не приводит к существенной стабилизации петли, на что указывает сохранение высоких значений $rmsf$ в холо-форме димера. В димере OR, в отличие от ОР-димера и мономера, субъединицы ориентированы таким образом, что формируется максимальное количество контактов между S-петлями двух субъединиц (для более детального описания взаимодействующих остатков в димере см. работу [10]). При такой взаимной ориентации

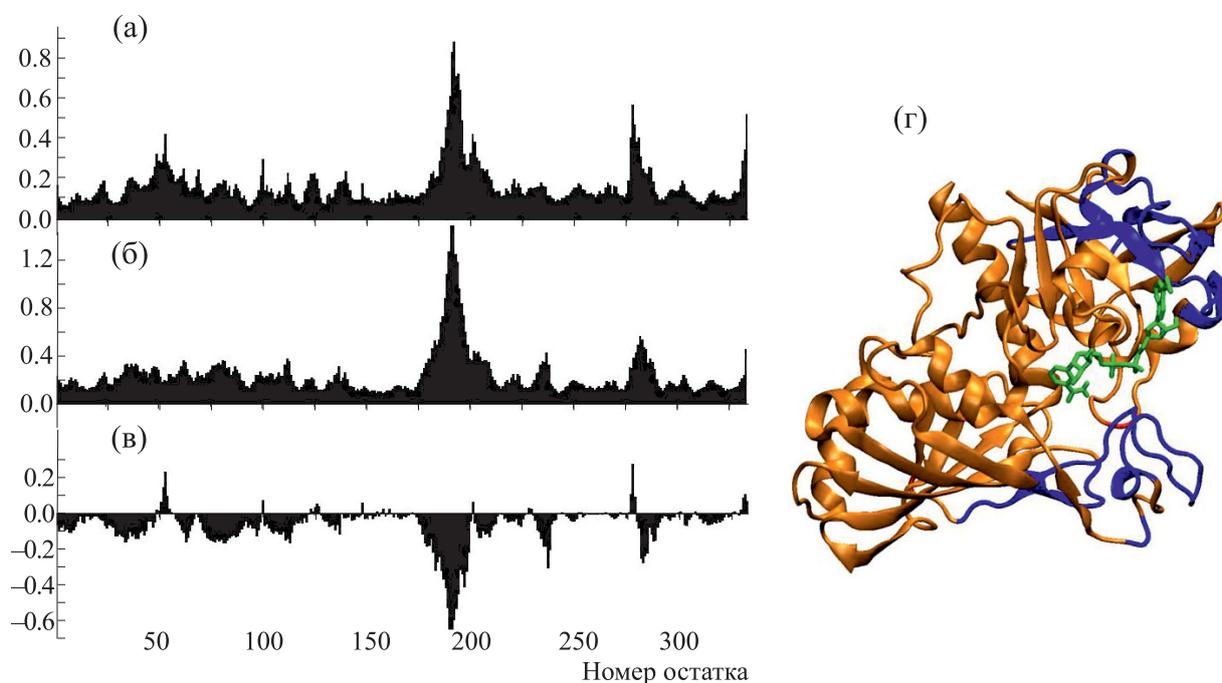


Рис. 2. Среднеквадратичные флуктуации ($rmsf$) Cα-атомов в холо-форме (а) и апо-форме (б) мономера ГАФД, а также их разностные значения (в) как функция от номера остатка. Пространственная структура мономера ГАФД со связанной молекулой кофактора НАД (показан зеленым цветом), остатки с пониженной подвижностью в холо-форме белка окрашены в синий цвет.

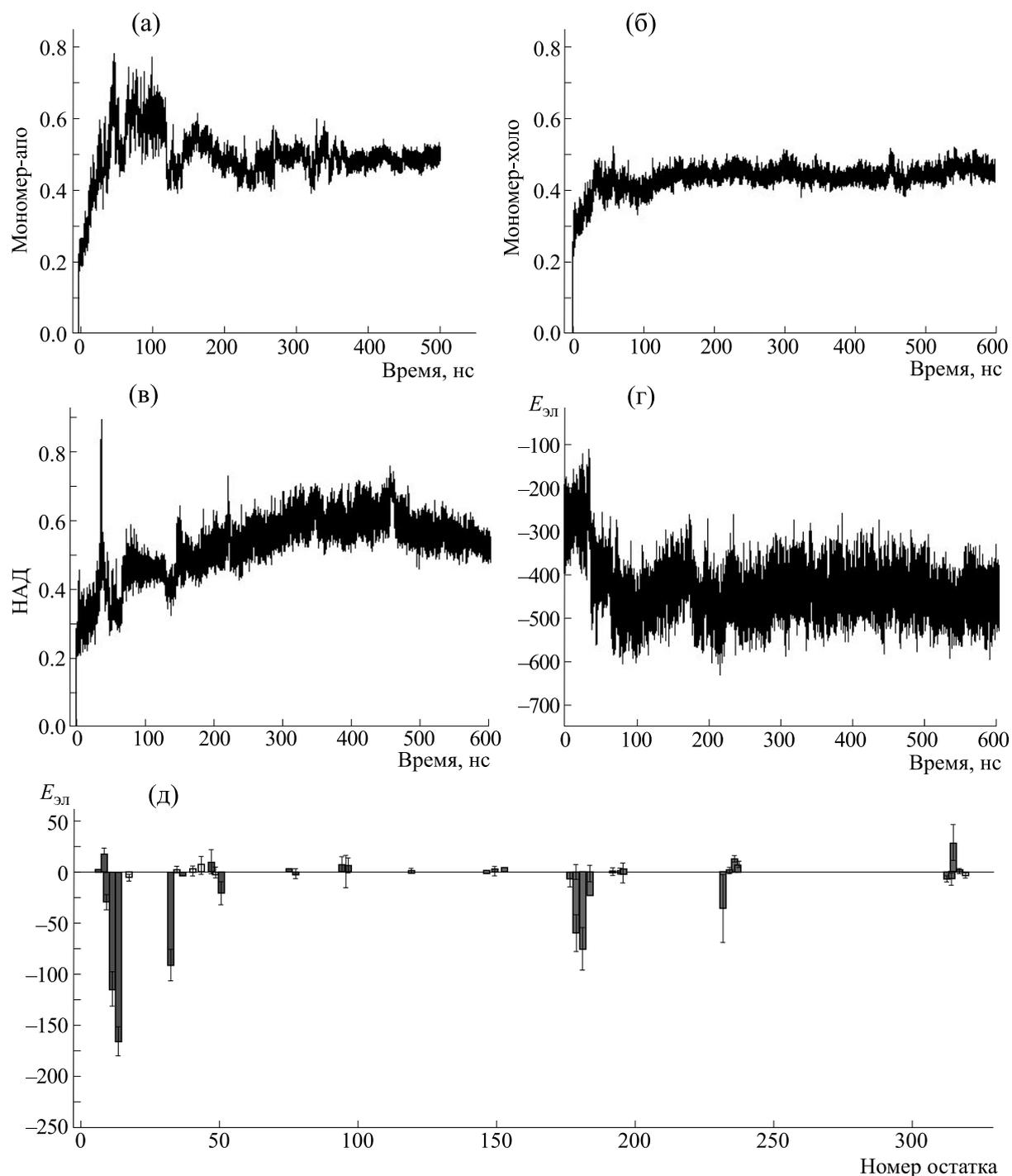


Рис. 3. Среднеквадратичные отклонения Са-атомов мономера ГАФД в апо-форме (а) и холо-форме (б) как функция от времени. Среднеквадратичные отклонения кофактора в холо-форме мономера ГАФД (в). Энергия взаимодействия кофактора с мономером ГАФД как функция от времени (г). Средние значения и стандартные отклонения вклада в энергию взаимодействия кофактора с отдельными остатками мономера ГАФД (д).

субъединиц остатки S-петли оказываются иммобилизованы, по сравнению с мономером и ОР-димером, максимальные значения *rmsf* остатков петли в апо-форме ОР-димера находятся на уровне 0.4 нм (рис. 4). Иммобилизация петли в межсубъ-

единичном контакте влечет компенсаторное увеличение подвижности остатков aa 270–280 ОР-димера. Связывание молекул кофактора субъединицами в димере типа ОР ведет к дополнительному уменьшению подвижности остатков S-петли.

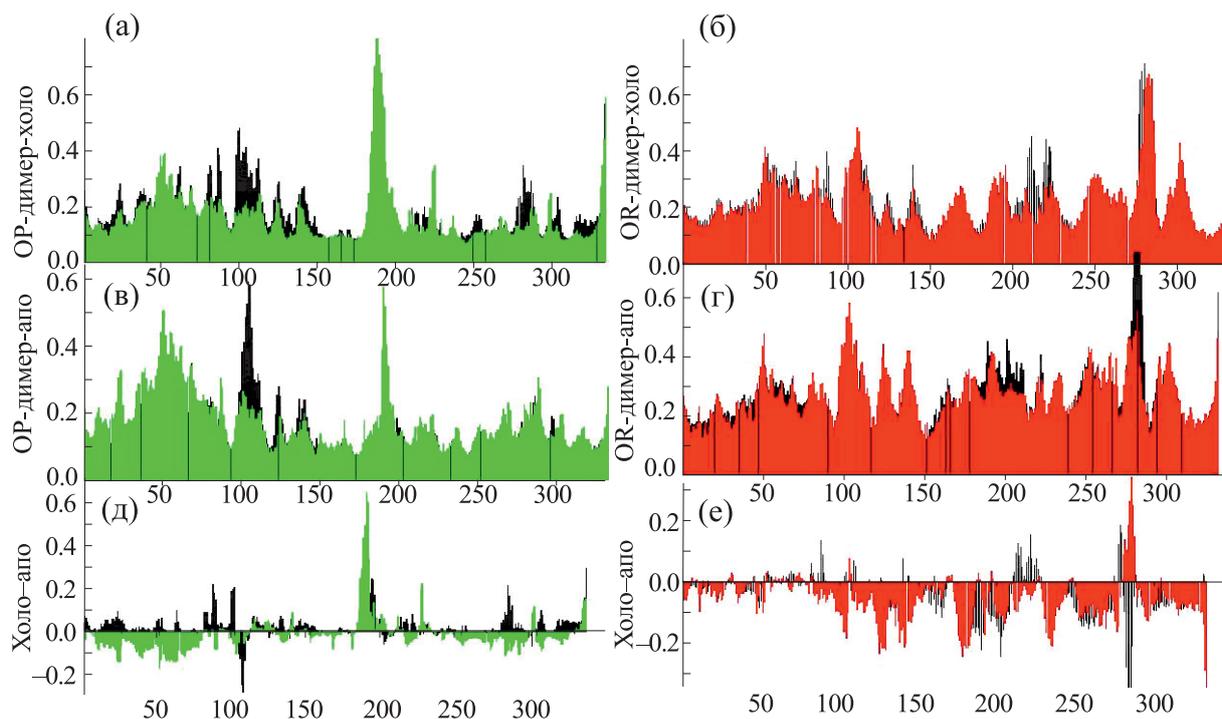


Рис. 4. Среднеквадратичные флуктуации (*rmsf*) Са атомов ОР-димеров (а, в, д) и ОР-димеров (б, г, е) ГАФД в холо-форме (а, б) и апо-форме (в, г), а также их разностные значения (д, е) как функция от номера остатка. Цветом обозначены данные: для субъединиц О – черным, Р – зеленым, R – красным.

Таким образом, пространственная стабилизация S-петли в межсубъединичных контактах типа OR способствует увеличению энергии связывания молекул кофактора (энтальпийной части свободной энергии) за счет возможности установления более обширных и более стабильных контактов с остатками петли в дополнение к взаимодействиям с остатками связывающего кармана. Следует отметить, что наблюдаемая разница в энергии связывания кофактора димерами ОР и OR, видимо, не будет столь драматичной в тетрамере ГАФД, поскольку там S-петля принимает участие в стабилизации всего комплекса межсубъединичных контактов и обладает меньшей подвижностью.

В ОР-димере расчетная энергия связывания молекул кофактора как в части электростатической энергии, так и в части вандерваальсовых взаимодействий меньше (по абсолютному значению) для субъединицы О, чем для субъединицы Р на протяжении всей траектории молекулярной динамики. При этом энергии связывания кофактора с Р-субъединицей сравнимы с теми, что наблюдаются в мономере, а связывание кофактора с О-субъединицей в димере оказывается менее выгодным. Такое отклонение в меньшую сторону является ожидаемым в связи с отрицательной кооперативностью соматического ГАФД. В то же время в димере OR разница в электростатической энергии компенсируется различиями в вандерваальсо-

вой компоненте (в первом приближении мы не применяли масштабирующих коэффициентов). Принимая во внимание это, а также экспериментальные свидетельства о том, что в бактериальном ГАФД кооперативность сохраняется именно в ОР-димере, мы проанализировали динамическую структуру димера ОР с привлечением метода кросс-корреляционных динамических матриц.

Сравнивая кросс-корреляционные матрицы для апо- и холо-формы ОР-димера (рис. 5а,б), можно отметить, во-первых, обеднение общего количества кросс-пиков при связывании кофактора. Это свидетельствует об уменьшении доли остатков, движущихся согласованно. Кстати, такая же тенденция наблюдалась и для мономера при связывании молекулы кофактора (данные не показаны). Вторая серия отличий заключается в изменении межсубъединичных корреляционных кросс-пиков. На кросс-корреляционной карте соответствующие коэффициенты корреляции среднеквадратичных отклонений для остатков из разных субъединиц вдоль молекулярно-динамической траектории представлены в верхнем левом и симметричном нижнем правом квадрантах. Области, которые соответствуют изменениям, вызванным связыванием кофактора, на карте обведены в синие рамки. При связывании кофактора серия кросс-пиков, присутствующих в апо-форме (рис. 5а в синей рамке), пропадает, а другая серия

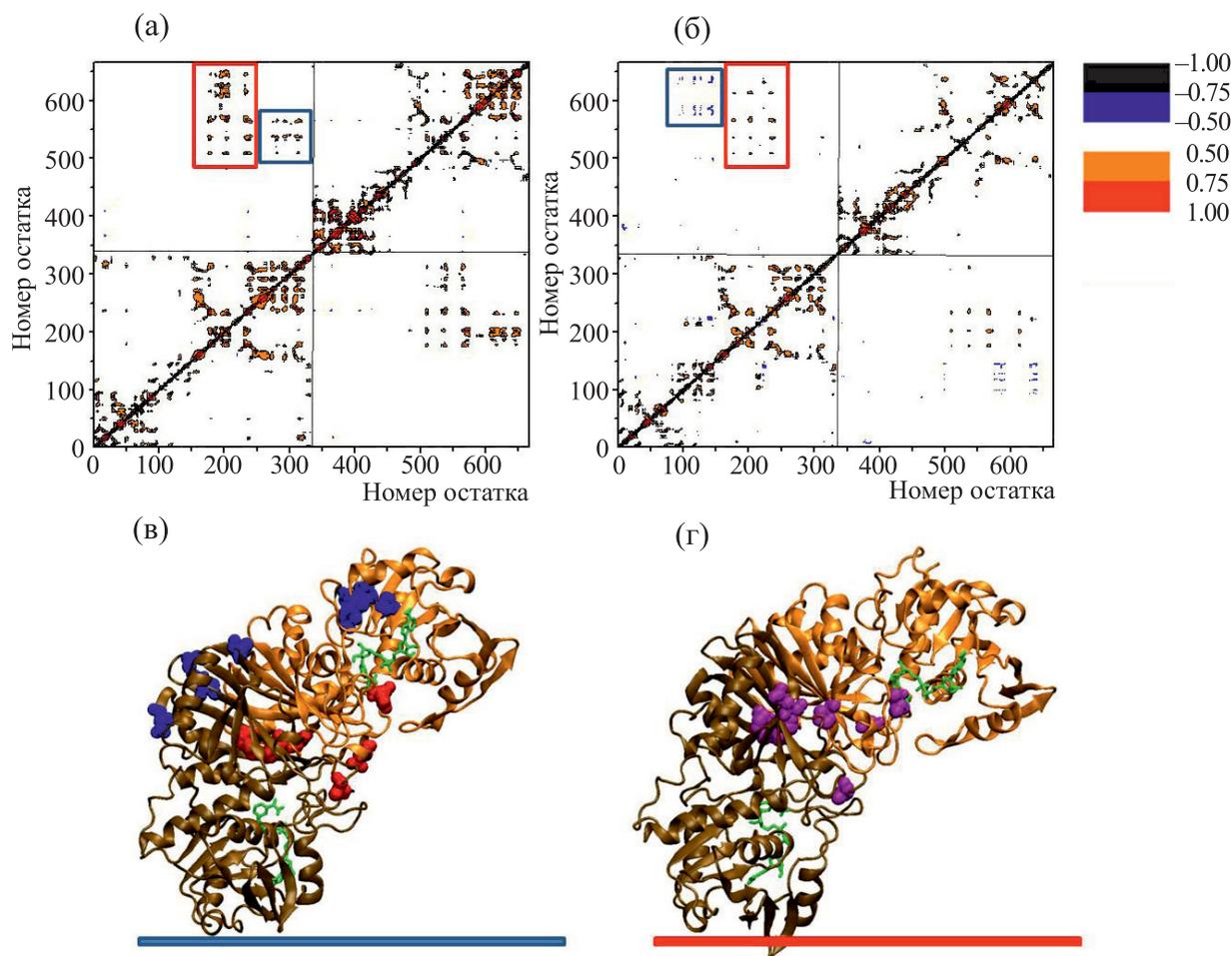


Рис. 5. Динамические кросс-корреляционные матрицы, построенные по Са-атомам ОР-димера ГАФД в апо- (а) и холо- (б) форме. Пространственная структура ОР-димера ГАФД со связанными молекулами кофактора (показаны зеленым цветом) и остатки, коррелированность движений которых меняется при связывании кофактора. Красным цветом обозначены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамкой синего цвета на матрице апо-формы, а синим цветом отмечены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамкой синего цвета на матрице холо-формы (в). Пространственная структура ОР-димера ГАФД со связанными молекулами кофактора (зеленым цветом) и остатки, коррелированность движений которых не меняется при связывании кофактора, пурпурным цветом обозначены остатки, которые соответствуют кросс-пикам, заключенным рамками красного цвета на матрицах апо- и холо-формы белка.

пиков на картах холо-формы (рис. 5б в синей рамке) появляется. Остатки, соответствующие данным областям кросс-пиков и зависящие от связывания кофактора, отмечены на трехмерной структуре ОР-димера (рис. 5в). Данные остатки располагаются преимущественно на поверхности глобулы, причем остатки, движущиеся согласованно в апо-форме, локализованы в районе S-петли, а остатки, приобретающие согласованность при связывании молекул кофактора, находятся на поверхности глобулярной части в области ОР-контакта субъединиц и НАД-связывающего кармана.

В то же время, существуют кросс-пики, которые присутствуют на обеих матрицах как апо-, так и холо-формы ОР-димера. Область субъединич-

ных контактов в ОР-димере связывает остатки двух субъединиц и приводит к их согласованному динамическому поведению независимо от того, связана молекула кофактора или нет. Однако при связывании кофактора меняется интенсивность этих кросс-пиков. Эти кросс-пики оконтурены на обеих картах красной рамкой. Данные остатки находятся внутри глобулярной структуры субъединиц (рис. 5г). Данная согласованность в динамике остатков может лежать в основе кооперативности, передавая сигнал от связывания кофактора одной субъединицей через межсубъединичный контакт на другую субъединицу. Однако это утверждение требует более детального анализа, который находится за пределами задач данной статьи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Олигомерная организация ферментов широко распространена в природе, благодаря этому увеличивается стабильность белка и осуществляется регуляция его биологической активности. Регуляция активности может осуществляться через изменяемое сродство к лиганду изначально структурно эквивалентных субъединиц олигомера, т. е. кооперативность. При отрицательной кооперативности связывание лиганда одной субъединицей приводит к менее выгодному связыванию лиганда остальными субъединицами, примером чего является соматический ГАФД из ряда источников [11, 12, 26]. При положительной кооперативности последовательное связывание лиганда становится более выгодным, как, например, происходит в дрожжевой ГАФД [27, 28] и в сперматозоидном ГАФД млекопитающих [20]. Неэквивалентность субъединиц олигомера по отношению к связыванию лиганда может быть описана в рамках предложенных моделей. Концепция «induced fit» [17] предполагает последовательные изменения структуры субъединиц и, как следствие, сродства к лиганду при связывании НАД. Аллостерическая (согласованная) модель [13, 16] предполагает наличие в апо-форме белка конформационного равновесия, которое сдвигается при связывании лиганда, увеличивая населенность состояния с большим или меньшим сродством к лиганду. Считается, что положительная кооперативность поддерживает последовательную модель, а отрицательная – согласованную модель [29]. Тем не менее положительная кооперативность может укладываться в рамки согласованной модели, что было продемонстрировано при описании кривых связывания НАД с ГАФДс [20].

Четвертичная структура не является необходимым условием для активности ГАФД, что было показано на иммобилизованных димерах [30] и мономерах белка [31]. Более того, димерной организации ГАФД достаточно для проявления кооперативности. На примере ГАФД из *Bacillus stearothermophilus* было продемонстрировано, что ОР- и ОР-димеры, переведенные в водорастворимую форму посредством одиночных или двойных мутаций в области межсубъединичных контактов, связывают кофактор, но кооперативность сохраняется только у первого из них [19]. В димере ОР (D282G) две субъединицы имеют одинаковые константы диссоциации НАД. Однако в тетрамере того же мутанта (D282G) вновь появляется отрицательная кооперативность, как и в ферменте дикой формы. Примечательно, что димер ОР, для которого представлено несколько вариантов с парными мутациями Y46G/S48G, D186G/ E276G и Y46G/R52G [19], проявляет положительную кооперативность. Однако остается неясным, происходит ли смена типа кооперативности из-за

диссоциации тетрамера или же это следствие мутаций. Микроскопическая константа диссоциации K_1 увеличивается на порядок в ряду тетрамер – димер ОР – димер ОР (среднее значение 0.06 – 0.6 – 5.5 мкМ); качественно такая же зависимость наблюдается и для константы K_2 . Таким образом, связывание кофактора в димере ОР происходит более выгодно, чем в ОР. Это согласуется с оценками, сделанными на основании наших расчетов, где энергии связывания кофактора в димере ОР выше, чем в димере ОР и мономере. Результаты расчетов показывают, что эта разница объясняется, главным образом, вкладом S-петли. В ОР-димере S-петля зафиксирована в межсубъединичном контакте и взаимодействует со связанным НАД. В ОР-димере, как и в мономере, S-петля подвижна и слабо взаимодействует с кофактором. S-петля участвует во взаимодействии не только с кофактором, но также может быть вовлечена во взаимодействия с другими лигандами и белками. Роль S-петли в активности белка обсуждалась в работе [32] в отношении ГАФД из *Escherichia coli*. По данным рентгеноструктурного анализа, петля тетрамера в апо-форме обладает относительно высокой подвижностью, тогда как связывание НАД или трегалозы стабилизирует ее. Также автор работы [32] отмечает, что связывание трегалозы S-петлей сопровождается конформационными изменениями в активном центре, которые будут предотвращать связывание НАД, хотя центры связывания двух молекул различаются [32].

Современные методы исследования, основанные на подходе сайт-направленного мутагенеза, показывают, что регуляция кооперативности достигается тонкой подстройкой взаимодействий между субъединицами. Так, например, единичная замена остатка D311N устраняет кооперативность ГАФДс. Примечательно, что при этом константа диссоциации комплекса ГАФДс и НАД уменьшается на порядок (с 10^{-6} до 10^{-7} М), что приводит ее в соответствие с минимальным значением константы диссоциации для фермента дикого типа [20]. Остаток D311 находится на небольшом удалении от межсубъединичных контактов и от активного центра (~ 10 Å), но не принимает прямого участия в образовании контактов или в связывании кофактора. Несмотря на это, его замена приводит к блокировке передачи сигнала между субъединицами. Ранее нами было показано, что данная замена в ГАФДс влияет на коррелированность флуктуаций ближнего окружения остатка [10]. В соматическом ГАФД этому остатку соответствует N239. Как показывают кросс-корреляционные матрицы димера ОР, N239 попадает в область остатков, которые движутся коррелированно с остатками соседней субъединицы, а также с остатками активного центра собственной субъединицы. В целом эти согласованно флуктуирующие остатки форми-

руют путь, соединяющий остатки активного центра двух субъединиц через ОР-контакт (рис. 5г).

Как показывают расчеты, связывание кофактора ОР-димером ГАФД сопряжено с существенными изменениями в динамике белка. В целом связывание НАД приводит к уменьшению доли остатков флуктуирующих коррелированно. В то же время некоторые остатки в периферической области ОР контакта начинают двигаться коррелированно с остатками НАД-связывающего кармана (остатки синего цвета на рис. 5в). Динамическая согласованность остатков ГАФД может лежать в основе передачи информации между активными центрами субъединиц, как это было ранее показано, например, для галектина-7 [33], и между активным и аллостерическим центром белка [21]. В литературе имеются сообщения об ингибирующем влиянии НАД на связывание РНК, для чего была предложена гипотеза об аллостерическом механизме действия. РНК предположительно связывается вдоль ОР-контакта. Однако на сегодняшний день прямых подтверждений этому нет, поэтому гипотеза об аллостерическом влиянии остается равновероятной гипотезе о конкурентном связывании [34].

Таким образом, сложная динамическая организация олигомера ГАФД может в дальнейшем способствовать разработкам аллостерических регуляторов связывания кофактора. Ингибирование гликолиза с помощью аллостерических регуляторов представляет особый интерес. Известно, что в опухолевых тканях увеличивается экспрессия ГАФД [35], а, например, в клетках меланомы происходит тканеспецифичная экспрессия ГАФДс [5]. Активный центр и НАД-связывающий карман изоферментов ГАФД и ГАФДс практически идентичны, следовательно, различия в остатках, которые формируют аллостерический центр на периферии белка, могут использоваться для селективного воздействия на определенный тип изофермента ГАФД, что будет предметом наших дальнейших исследований.

Настоящая работа вносит вклад в понимание организации динамической структуры димеров ГАФД. В то же время следует иметь в виду, что в тетрамере обоюдное влияние субъединиц становится более сложным [30], и чтобы определить, в какой степени обнаруженные в димерах корреляции могут быть перенесены на тетрамер, предстоит провести дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено молекулярно-динамическое исследование связывания кофактора структурными единицами ГАФД, а именно двумя типами димеров – ОР и ОР. Результаты анализа внутримолекулярной динамики *in silico* показали, что связыва-

ние кофактора в ОР-димере оказывается более энергетически выгодным из-за прямого участия S-петли во взаимодействиях с кофактором. Показано, что связывание кофактора существенно модифицирует характер коррелированных движений в обеих субъединицах и приводит к образованию областей на поверхности белка флуктуирующих согласованно с участком НАД-связывающего кармана. Понимание структурно-динамических особенностей, лежащих в основе связывания кофактора, усилит фундамент понимания организации динамической структуры белка и послужит базой для разработки новых способов регуляции активности ГАФД.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при использовании оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и оборудования Центра коллективного пользования вычислительными ресурсами МСЦ РАН – филиала ФНЦ НИИСИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 18-44-160026 (в части анализа связывания кофактора и согласованных движений остатков). Получение траекторий молекулярной динамики для ОР-димеров осуществлено за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Zheng, R. G. Roeder, and Y. S. Luo, *Cell* **114**, 255 (2003).
2. S. Kim, J. Lee, and J. Kim, *Biochem. J.* **404**, 197 (2007).
3. M. Sirover, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH): The Quintessential Moonlighting Protein in Normal Cell Function and in Human Disease* (Academic Press, MA (Massachusetts), USA, 2017).

4. V. I. Muronetz, K. V. Barinova, Y. Y. Stroylova, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **100**, 55 (2017).
5. I. A. Sevostyanova, K. V. Kulikova, M. L. Kuravsky, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 649 (2012).
6. В. И. Муронец, А. К. Мельникова, К. В. Баринова и др., *Биохимия* **84**, 1578 (2019).
7. D. H. F. Souza, R. C. Garratt, A. P. U. Araújo, et al., *FEBS Lett.* **424**, 131 (1998).
8. S. Van Calenbergh, C. L. Verlinde, J. Soenens, et al., *J. Med. Chem.* **38**, 3838 (1995).
9. P. V. Danshina, W. Qu, B. R. Temple, et al., *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 410 (2016).
10. O. N. Makshakova, P. I. Semenyuk, M. L. Kuravsky, et al., *J. Struct. Biol.* **190**, 224 (2015).
11. J. J. de Vijlder and E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 23 (1968).
12. A. Conway and D. E. Jr. Koshland, *Biochemistry* **7**, 4011 (1968).
13. K. Kirschner, M. Eigen, R. Bittman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1661 (1966).
14. Y. I. Henis and A. Levitzki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5055 (1980).
15. A. Levitzki and D. E. Koshland, *Curr. Top. Cell. Regul.* **10**, 140 (1976).
16. J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
17. D. E. Jr. Koshland, G. Nemethy, and D. Filmer, *Biochemistry* **5**, 365 (1966).
18. W. J. Cook, O. Senkovich, and D. Chattopadhyay, *BMC Struct. Biol.* **9**, 9 (2009).
19. O. Roitel, P. Vachette, S. Azza, et al., *J. Mol. Biol.* **326**, 1513 (2003).
20. M. L. Kuravsky, K. V. Barinova, R. A. Asryants, et al., *Biochimie* **115**, 28 (2015).
21. N. Popovych, S. Sun, R. H. Ebricht, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 831 (2006).
22. A. T. P. Machado, M. Silva, and J. Iuleka, *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* **1866**, 581 (2018).
23. G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, *J. Chem. Phys.* **126**, 014101 (2007).
24. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. Di Nola, et al., *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
25. N. M. Glykos, *J. Comput. Chem.* **27**, 1765 (2006).
26. F. Seydoux, S. Bernhard, O. Pfenninger, et al., *Biochemistry* **12**, 4290 (1973).
27. K. Kirschner, E. Gallego, I. Schuster, et al., *J. Mol. Biol.* **58**, 29 (1971).
28. K. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **58**, 51 (1971).
29. N. W. Seidler, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Ed. by I. R. Cohen, I. A. Lajtha, J. D. Lambris and R. Paoletti (Springer, Dordrecht, 2013), v. 985, pp.1–293.
30. Н. К. Наградова, *Биохимия* **51**, 2030 (1986).
31. И. В. Дуженкова, Р. А. Асриянц, В. И. Муронец и др., *Биохимия* **51**, 1899 (1986).
32. Y. Ju Kim, *Acta Cryst.* **F74**, 277 (2018).
33. E. E. Ermakova, M. C. Miller, I. V. Nesmelova, et al., *Glycobiology* **23**, 508 (2013).
34. E. D. Garcin, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **86**, 162 (2019).
35. F. Revillion, V. Pawlowski, L. Hornez, et al., *Eur. J. Cancer* **36**, 1038 (2000).

The Influence of Cofactor Binding on the Intramolecular Dynamics of Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

A.A. Koshkarov and O.N. Makshakova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is one of the key enzymes of glycolysis and, also, this protein is implicated in the regulation of a wide range of cellular functions, including induction of apoptosis. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is also involved in the development of a number of pathological states, neurodegenerative and cancerous diseases. Novel approaches to regulating enzyme activity require detailed knowledge of enzyme spatial organization and structural dynamics. In this work, we have performed molecular dynamics simulations to study the interaction of nicotinamide adenine dinucleotide which served as a cofactor with dimers assembled into the tetrameric form of human somatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The effect of cofactor binding on the intramolecular dynamics of the protein is described. It was shown that dimers can bind the cofactor in different interaction energies; this occurs due to the mobility and ability of the S-loop to interact with the cofactor molecule. Some groups of residues in the adjacent subunits that concordantly move have been found in the OP dimmer. Furthermore, it was shown that cofactor binding modulates the nature of correlated motions in the dimer.

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ligand binding, cooperativity, allostery, molecular dynamics simulations

УДК 577.346

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ОБЛУЧЕНИЕМ ПРОТОНАМИ И ГАММА-КВАНТАМИ

© 2021 г. О.М. Котб*, **, Д.С. Брожик***, В.Н. Вербенко***, Е.П. Гулевич***,
В.Ф. Ежов***, Д.Л. Карлин***, Ф.А. Пак***, С.В. Пастон*, А.М. Поляничко*,
А.И. Халиков***, Е.В. Чихиржина****

*Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета,
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, 1

**Faculty of Science, Zagazig University, Sharkia Gov Zagazig, Egypt

***Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», 188300, Гатчина Ленинградской области, мкр. Орлова роща, 1

****Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: s.v.paston@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Проведено сравнение радиационного эффекта гамма-излучения и протонов высоких энергий (1000 МэВ) при облучении ДНК дозами 30 и 50 Гр в водно-солевых растворах (5 и 150 мМ NaCl). Использовали спектральные методы (спектроскопия УФ-поглощения, метод Спирина, спектрофотометрическое плавление ДНК, круговой дихроизм), которые позволяют оценить количество разрушенных азотистых оснований и повреждение вторичной структуры ДНК. Обнаружено, что при указанных условиях протонное излучение вызывает более сильные разрушения азотистых оснований и вторичной структуры ДНК, чем такая же доза гамма-излучения. В ДНК, облученной протонами, предположительно образуются сшивки; вероятность их появления увеличивается с ростом ионной силы облучаемого раствора.

Ключевые слова: радиационная онкология, протонная терапия, ДНК, гамма-излучение, разрушение оснований, плавление ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302921020046

Ионизирующие излучения вызывают повреждения в структуре ДНК, которые запускают каскад биологических процессов в клетке. Результатом может быть мутация и/или гибель клетки. Еще на раннем этапе развития радиобиологии был сформулирован закон радиочувствительности клеток: клетки тем более радиочувствительны, чем менее они дифференцированы и чем интенсивнее они делятся (правило Бергонье и Трибондо) [1]. Именно по этим параметрам и отличаются клетки злокачественной опухоли от окружающих здоровых клеток, и именно повышенная радиочувствительность опухолевых клеток дает возможность применять ионизирующее излучение для лечения рака. В настоящее время разработано множество методик лучевой терапии, направленных на усиление избирательности повреждения раковых клеток и ослабления ради-

ационной нагрузки на здоровые ткани [2–4]. Применяются, например, инкорпорированные источники ионизирующего гамма-излучения, которые внедряются непосредственно в опухоль (брахитерапия) [2]. При внешнем облучении пациента очень важно учитывать зависимость линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения от глубины проникновения в организм. Эта зависимость определяется природой излучения. Для фотонов она имеет максимум в самом начале пробега частицы (для излучения ^{60}Co с энергией фотонов 1.3 МэВ на глубине около 2 см в воде) [1, 2, 5] и затем медленно спадает. Такое распределение поглощенной энергии неблагоприятно для лечения опухолей, локализованных глубоко внутри организма, так как доза радиации, полученная здоровыми тканями, оказывается выше, чем полученная опухолью. Для преодоления этой проблемы используются разнообразные варианты стереотаксического облучения (3D-, радиохирургия), например, гамма-нож [2, 6–8]. В случае же

Сокращения: ЛПЭ – линейная передача энергии, КД – круговой дихроизм.

тяжелых заряженных частиц (протонов, α -частиц, ядер углерода) зависимость ЛПЭ от длины пробега в ткани имеет характерный максимум в конце трека (пик Брэгга), положение которого можно подобрать, варьируя начальную энергию частицы, чтобы максимальная плотность ионизаций пришлась на опухоль [1–5]. В этом случае радиационная нагрузка на окружающие здоровые ткани оказывается существенно меньше. На этом эффекте основана адронная терапия – весьма перспективное, интенсивно развивающееся направление радиационной онкологии. Дополнительным преимуществом терапевтического воздействия излучения с высокой ЛПЭ является то, что в этом случае значительная часть повреждений ДНК возникает за счет так называемого прямого действия радиации: инактивация происходит в результате поглощения энергии излучения самой молекулой ДНК [1]. При этом снижается коэффициент кислородного усиления и нивелируется повышенная резистентность опухолевой ткани вследствие ее гипоксии [2–5]. Существенными недостатками метода адронной терапии, которые тормозят его внедрение в широкую лечебную практику, являются большой размер и весьма высокая стоимость установок – ускорителей заряженных частиц [2–4, 8–15]. В ряде случаев оказывается возможным использовать в медицинских целях исследовательские ускорители [4, 10, 11, 13].

Пучок заряженных частиц с точки зрения лечебного применения имеет и другие преимущества по сравнению с потоком фотонов, а именно возможность более точной фокусировки. В радиационной терапии широко применяются линейные ускорители электронов [2–4, 6–8]. Они существенно дешевле и компактнее адронных ускорителей. Для облучения пациента может применяться как непосредственно пучок электронов, так и тормозное рентгеновское излучение [2, 3]. Индивидуальный подбор системы коллиматоров, принцип стереотаксического облучения с прецизионным позиционированием луча под контролем рентгеновской или томографической визуализации опухоли позволяют добиваться весьма удовлетворительной избирательности поражения опухолевой ткани [2, 3, 8, 16]. Однако при прохождении в тканях пучок электронов заметно рассеивается, повреждая здоровые клетки. Пучок адронов высокой энергии (вдали от пика Брэгга) также может быть очень точно сфокусирован и, в отличие от электронов, траектория массивных адронов в биологических тканях не искривляется, а пучок не рассеивается, даже пройдя насквозь через тело пациента [1–4]. Это свойство может быть использовано для поражения неоперабельных (либо труднооперабельных) опухолей небольшого размера. Подобный метод лечения успешно применяли в течение десятков

лет в «Комплексе лучевой терапии «на пролет» на базе ускорителя протонов СЦ-1000» в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» (так называемый «Гатчинский метод») [4, 17, 18]. На счету специалистов «Комплекса лучевой терапии» – более 1300 излеченных больных. Протоны высоких энергий имеют низкую ЛПЭ, сравнимую с ЛПЭ гамма-излучения [2]. Однако взаимодействие этих ионизирующих частиц с веществом существенно различается: гамма-кванты вызывают первичную ионизацию атомов в результате фотоэффекта и комптоновского эффекта, возникшие при этом быстрые электроны в свою очередь производят ионизацию и возбуждение окружающих атомов за счет электромагнитного взаимодействия с электронными оболочками. Треки этих электронов в веществе искривлены, длина пробега варьирует от 1 до 1000 мкм в зависимости от энергии фотона, переданной электрону. Протоны высоких энергий непосредственно вызывают множественные ионизации и возбуждение атомов в результате электромагнитного взаимодействия с электронными оболочками [1]. Повреждения ДНК в организме, клетках и модельных системах, вызванные гамма-облучением, исследуются очень давно, и в целом эти эффекты и их биологические последствия очень подробно изучены [1, 19, 20]. Воздействие адронов, в частности, протонов высоких энергий на биологические системы изучено гораздо меньше, однако в последние годы наблюдается рост числа исследований на эту тему, связанный с развитием адронной терапии [21–24]. Кроме того, протоны высоких энергий – основная составляющая космических лучей, действию которых подвергаются космонавты [25], и это также делает проблему повреждения генетического аппарата протонным излучением весьма актуальной.

В настоящей работе проводится сравнение повреждений ДНК в водно-солевых растворах, вызванных воздействием одинаковых доз гамма-излучения и протонного излучения с энергией протонов 1000 МэВ. Исследовали количество разрушенных азотистых оснований, используя метод Спирина [26–28], степень нативности ДНК – по значениям молярного коэффициента экстинкции и гиперхромного эффекта [29], кривые плавления ДНК, а также спектры кругового дихроизма, которые позволяют получить информацию о вторичной структуре макромолекулы [29–31]. Изучение спектральных параметров ДНК позволяет в ряде случаев оценить радиационный эффект и определить влияние радиомодифицирующих агентов в процессе облучения [32–34].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали натриевую соль ДНК из тимуса теленка (Sigma, США) с молекулярной массой $M = (6.3 \pm 0.5) \cdot 10^6$ Да, химически чистые NaCl, HClO₄, деионизированную воду. Растворы NaCl необходимой концентрации готовили из насыщенного раствора.

Условия облучения. Облучение протонами с энергией 1000 МэВ проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» в «Комплексе лучевой терапии «на пролет» на базе ускорителя протонов СЦ-1000». Интенсивность пучка составляла 4 Гр/мин. Гамма-облучение проводили в аэробных условиях при комнатной температуре на установке «Исследователь» (⁶⁰Co) в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова. Мощность дозы составляла 85 Гр/мин. Концентрация ДНК в облучаемых растворах составляла $1.39 \cdot 10^{-4}$ М нуклеотидов.

Спектрофотометрическое плавление. Измерения кривых плавления ДНК в исследуемых растворах проводили на приборе Specord 200 plus (Analytik Jena, Германия) с приставкой Пельтье, с шагом 1°, скорость нагрева 1°/мин. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. В экспериментах измеряли оптическое поглощение раствора в максимуме поглощения ДНК (D_{260}) в зависимости от температуры (T). Сбор данных и управление экспериментом осуществляли с помощью программы WinASPECT (Analytik Jena, Германия). Обработку данных проводили в пакете OriginPro. Значение температуры плавления ДНК ($T_{пл}$) определяли по положению максимума на дифференциальной кривой плавления $dD_{260}(T)/dT$ [31]. Прежде чем приступить к плавлению, регистрировали спектр поглощения ДНК в ультрафиолетовой области при температуре 25°C $D_{\lambda}(25^{\circ})$. После завершения плавления регистрировали спектр при максимальной температуре $D_{\lambda}(95^{\circ})$. Далее проводили охлаждение раствора до 25°C в течение 10 мин и регистрировали спектр ДНК $D_{\lambda}(25^{\circ*})$. Используя полученные спектры поглощения, определяли величину гистерезисного эффекта [35]:

$$\delta = \frac{D_{260}(95^{\circ}) - D_{260}(25^{\circ})}{D_{260}(25^{\circ})} 100\%,$$

а также степень спиральности ДНК после плавления и последующего охлаждения (степень ренатурации) [30]:

$$\vartheta_R = \left(1 - \frac{D_{260}(25^{\circ*}) - D_{260}(25^{\circ})}{D_{260}(95^{\circ}) - D_{260}(25^{\circ})} \right) 100\%.$$

Концентрацию азотистых оснований ДНК в необлученных и облученных растворах определяли, пользуясь методом Спирина [26]. Для этого проводили гидролиз ДНК: к 1 мл раствора ДНК добавляли 3 мл 6%-й HClO₄, затем выдерживали на водяной бане при 100°C в течение 20 мин с последующим быстрым охлаждением при 0°C. Спектр гидролизованного раствора регистрировали при комнатной температуре. Концентрацию азотистых оснований (C) определяли по формуле [26]:

$$C = \frac{10.1(D_{270} - D_{290})V_2}{0.19 V_1},$$

где D_{270} и D_{290} – оптические плотности гидролизата при $\lambda_1 = 270$ нм и $\lambda_2 = 290$ нм, V_1 – объем исходного раствора ДНК, V_2 – объем гидролизата. Используя полученное значение C и интенсивность в максимуме спектра поглощения исходного раствора ДНК $D_{260}(25^{\circ})$, измеренную перед началом эксперимента по плавлению, определяли молярный коэффициент экстинкции ДНК [29]:

$$\varepsilon_{260}(P) = \frac{31D_{260}(25^{\circ})}{0.099Cl},$$

где l – длина оптического пути (1 см), 0.099 – содержание фосфора в ДНК (9.9%), 31 г/моль – молярная масса фосфора.

Круговой дихроизм (КД) ДНК регистрировали на дихрографе Mark V (Jobin Ivon, Франция) при комнатной температуре в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0.5 см. Спектры снимали в диапазоне от 220 до 320 нм с шагом в 1 нм. На каждой длине волны проводили усреднение сигнала КД по 1000 измерений. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца записывали три раза с последующим усреднением. Сглаживание спектров проводили методом Савитского–Голея с рамкой сглаживания в пять точек. Спектры КД представлены в работе в виде разницы поглощений лево- и правополяризованного света, $\Delta A = A_L - A_R$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучали спектральные параметры высокомолекулярной ДНК, облученной гамма-излучением и протонами с энергией 1000 МэВ в растворах с двумя ионными силами – $\mu_1 = 5$ мМ NaCl и $\mu_2 = 150$ мМ NaCl. На рис. 1 приведены примеры спектров поглощения ДНК в ультрафиолетовой области в контрольных (необлученных) растворах и в растворах, облученных в дозе 50 Гр. Спектры были зафиксированы при разных температурах в процессе плавления ДНК и после

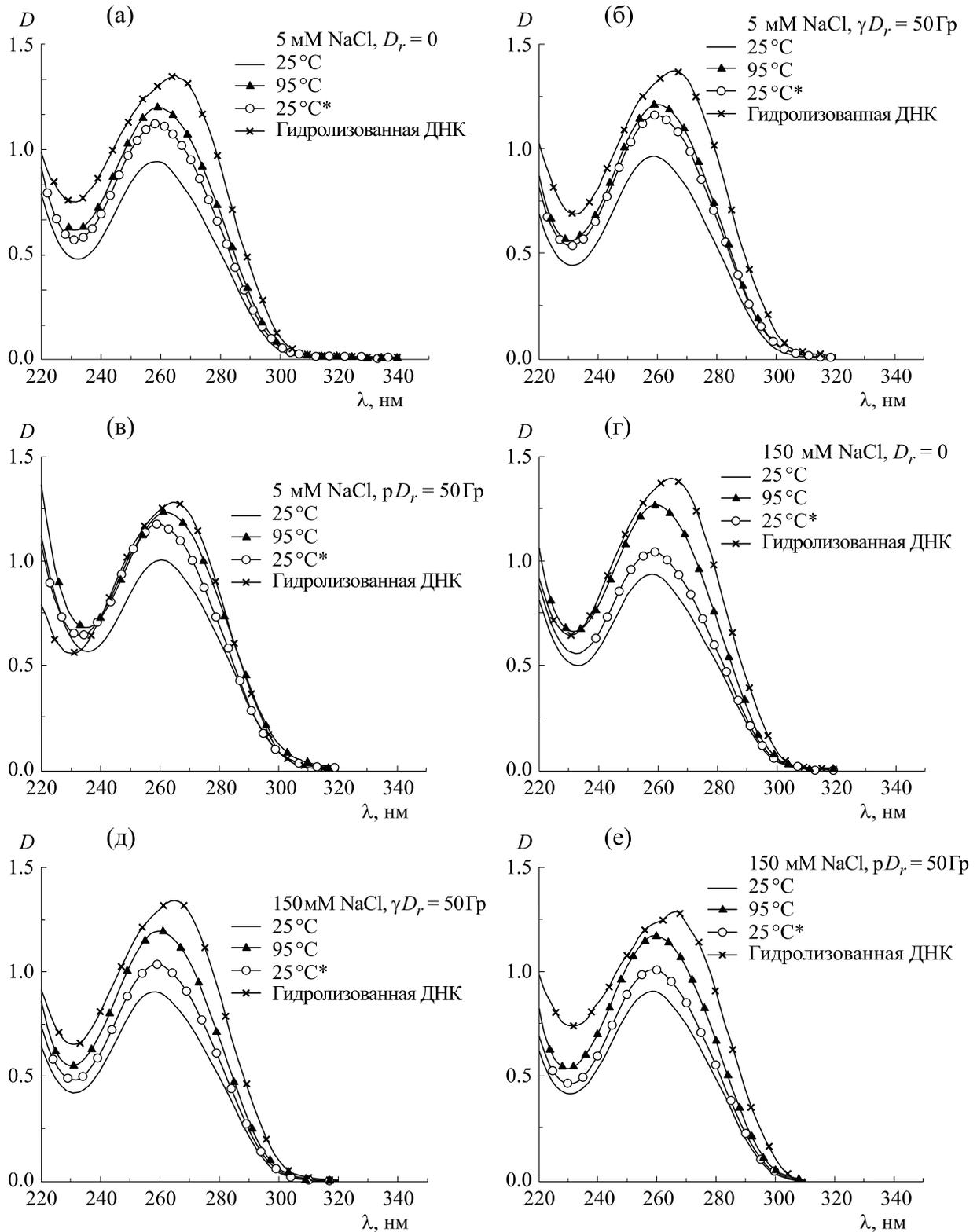


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения ДНК в растворах с разной ионной силой ($\mu_1 = 0.005$, $\mu_2 = 0.150$), необлученной и облученной в дозе 50 Гр протонным и гамма-излучением. Ионная сила раствора, вид излучения и температура, при которой измерялись спектры, указаны на графиках. 25°C* – спектры, измеренные после плавления и быстрого охлаждения раствора ДНК.

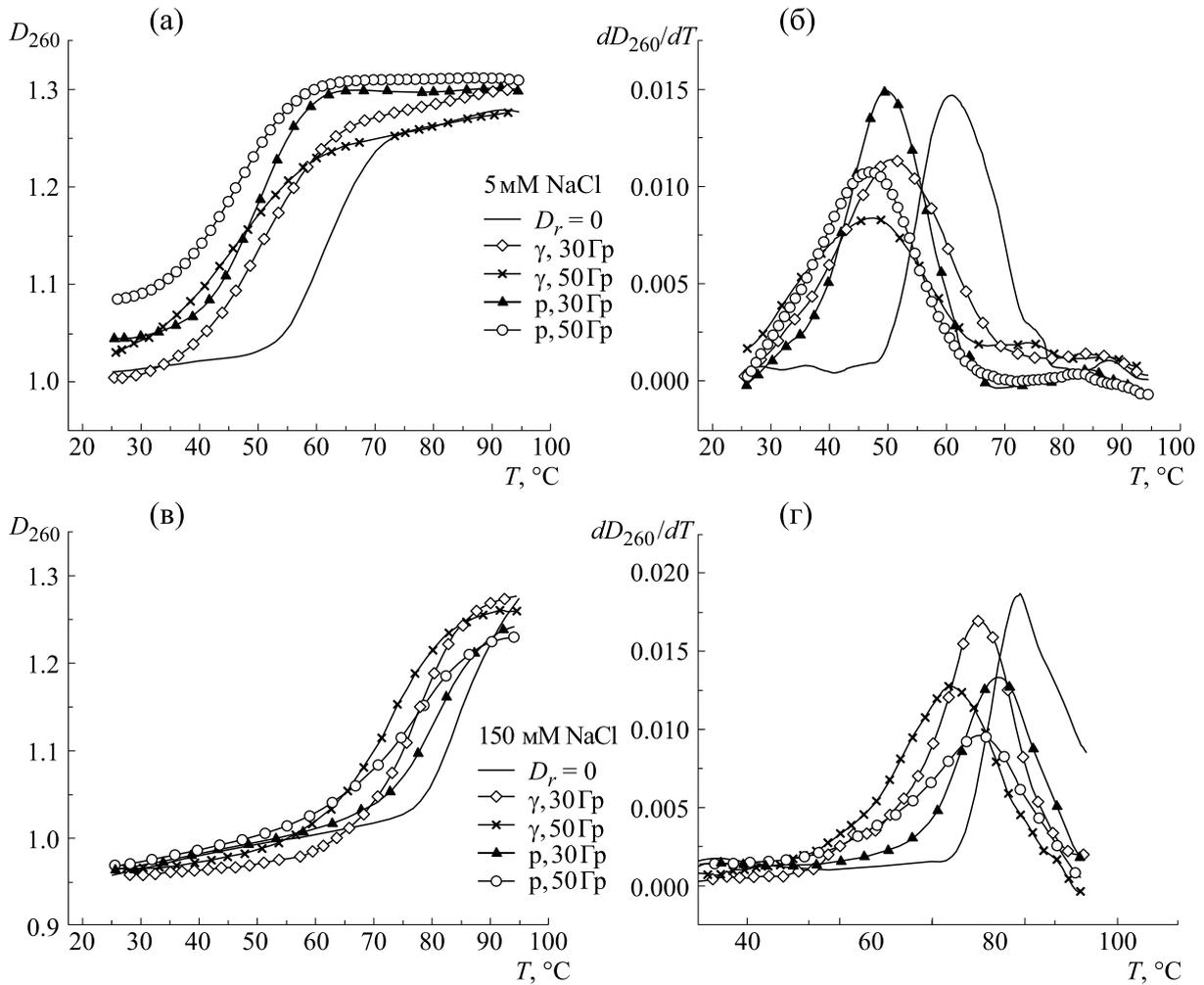


Рис. 2. Кривые плавления ДНК (а, в) и их первые производные (б, г), в растворах, облученных протонным и гамма-излучением в дозах 30 Гр и 50 Гр. Ионная сила раствора и условия облучения указаны на графиках.

охлаждения раствора, а также после гидролиза. При нагревании раствора ДНК от 25°C до 95°C возникает хорошо известный гиперхромный эффект вследствие денатурации двойной спирали. При последующем охлаждении раствора ДНК наблюдается неполное восстановление поглощения, которое объясняется частичной ренатурацией комплементарных участков ДНК, принадлежащих как разным одноцепочечным молекулам, так и одной нити (в последнем случае образуются «шпильки») [29–31]. Для высокомолекулярной ДНК полная ренатурация не происходит даже при очень медленном отжиге из-за трудности взаимного проникновения двух одноцепочечных клубков и сближения комплементарных последовательностей [29]. В результате частичной ренатурации ДНК в растворе образуются двухспиральные участки, перемежающиеся одноцепочечными, причем они могут принадлежать нескольким разным нитям. При гидролизе про-

исходит не только полное разделение цепей ДНК, но и их частичная фрагментация [26], поэтому спектры поглощения гидролизованной ДНК демонстрируют более сильный гиперхромный эффект, чем спектры ДНК при 95°C (рис. 1). Кроме того, в спектрах гидролизованной ДНК наблюдается батохромный сдвиг вследствие протонирования азотистых оснований в кислой среде [36].

Кривые плавления нативной и облученной ДНК приведены на рис. 2. Основные структурные параметры ДНК, определенные из спектров, представленных на рис. 1, и кривых плавления (рис. 2) приведены в таблице. С ростом ионной силы раствора вторичная структура нативной ДНК стабилизируется, что отражается в росте гиперхромного эффекта, увеличении температуры плавления ДНК и сужении интервала перехода «спираль–клубок» [29, 30]. Степень ренатурации ДНК (ϑ_R), которая выражает степень спиральности ДНК, восстановленную при отжиге, также

Параметры ДНК, облученной разными видами излучения (гамма- и протонного) в растворах с разной ионной силой

Вид и доза излучения	$(\Delta C \pm 0.02) \cdot 10^{-5}, \text{ M}$	$(T_m \pm 1), ^\circ\text{C}$	$(\vartheta_R \pm 0.5), \%$	$(\delta \pm 0.5), \%$	$(\epsilon_{260} \pm 50), \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$\mu = 5 \text{ mM NaCl}$					
0	0	61	31.1	28.2	6340
$\gamma, 30 \text{ Гр}$	0.30	51	22.4	30.0	6980
$\gamma, 50 \text{ Гр}$	0.91	47	20.7	26.2	6990
$p, 30 \text{ Гр}$	1.21	50	40.5	24.3	7790
$p, 50 \text{ Гр}$	1.52	47	23.0	22.5	7660
$\mu = 150 \text{ mM NaCl}$					
0	0	84	67.8	36.7	6300
$\gamma, 30 \text{ Гр}$	0.61	78	56.6	35.6	6360
$\gamma, 50 \text{ Гр}$	0.61	73	54.3	33.1	6390
$p, 30 \text{ Гр}$	0.91	81	63.0	29.4	7010
$p, 50 \text{ Гр}$	2.12	78	90.9	30.2	7190

увеличивается с ростом ионной силы вследствие более эффективной экранировки отрицательно заряженных фосфатных групп противоионами.

Облучение протонами и гамма-квантами вызывает разрушение хромофоров (азотистых оснований) и снижение температуры плавления (см. таблицу). По спектру поглощения ДНК при 25°C и скорректированной концентрации хромофоров был определен молярный коэффициент экстинкции ДНК (ϵ_{260}), по величине которого можно судить о степени нативности макромолекулы. Сравнение величин ΔC , ϵ_{260} и гиперхромного эффекта для необлученных и облученных систем (см. таблицу) показывает, что протонное облучение более эффективно разрушает основания и вторичную структуру ДНК при $\mu_1 = 5 \text{ mM NaCl}$ и $\mu_2 = 150 \text{ mM NaCl}$.

КД-спектры ДНК в изучаемых системах показаны на рис. 3. Видно, что облученная ДНК сохраняет В-форму. Гамма-облучение в дозе 50 Гр практически не влияет на вид КД-спектра ДНК, тогда как протонное облучение в той же дозе вызывает снижение интенсивности положительной и отрицательной полос. Подобный эффект может быть следствием разрушения хромофоров, а также дестабилизации вторичной структуры ДНК [37]. Аналогичные изменения в спектре КД наблюдаются и при облучении ДНК гамма-радиацией, но в дозах, в несколько раз больших, чем использованные в настоящей работе [28, 34]. Данные, полученные методом КД, также указывают, что при равных поглощенных дозах высокоэнергетичные протоны производят более сильные повреждения в структуре ДНК, чем гамма-излучение.

Для выяснения характера и степени повреждения структуры ДНК ее температура плавления является неоднозначным параметром [28]. Разные виды радиационных повреждений могут оказывать на $T_{пл}$ противоположное влияние. Одно- и двухнитевые разрывы, разрушение, модификация и отрыв азотистых оснований приводят к дестабилизации вторичной структуры и понижают температуру плавления ДНК [1, 19, 28–30], тогда как межнитевые сшивки повышают $T_{пл}$ [38]. Сравнивая $T_{пл}$ ДНК, облученной протонами и гамма-квантами (см. таблицу), можно заметить, что при $\mu_1 = 5 \text{ mM NaCl}$ эти значения при равных поглощенных дозах совпадают в пределах погрешности эксперимента, а при $\mu_2 = 150 \text{ mM NaCl}$ $T_{пл}$ ДНК, облученной протонами, выше, чем $T_{пл}$ ДНК, облученной гамма-квантами в той же дозе. При этом в ДНК, подвергнутой протонному облучению, количество разрушенных азотистых оснований больше и степень спиральности ниже, чем в ДНК, облученной гамма-радиацией в той же дозе. Можно предположить, что повышенные значения $T_{пл}$ ДНК, облученной протонами, объясняются появлением сшивок. Отметим, что вероятность межнитевых сшивок удаленных по цепи участков ДНК повышается с ростом ионной силы (при $\mu_2 = 150 \text{ mM NaCl}$), так как вследствие более эффективной экранировки фосфатных групп противоионами объем клубка ДНК в этих условиях существенно меньше, чем при $\mu_1 = 5 \text{ mM NaCl}$ [39].

Степень ренатурации ϑ_R ДНК после гамма-облучения понижается монотонно с ростом дозы при μ_1 и μ_2 (см. таблицу). Действительно, разрушение азотистых оснований должно препятство-

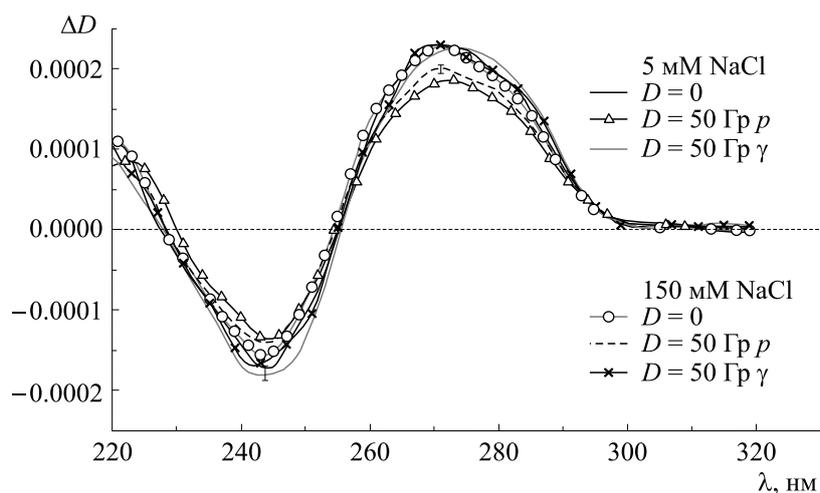


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма ДНК, облученной в дозе 50 Гр протонным и гамма-излучением в растворах с разной ионной силой ($\mu_1 = 5$ мМ, $\mu_2 = 150$ мМ).

вать восстановлению вторичной структуры при отжиге. Однако в растворах, облученных протонами, значения ϑ_R ДНК выше, чем в растворах, получивших такую же дозу гамма-облучения. Более того, в большинстве случаев степень ренатурации ДНК после протонного облучения оказывается выше, чем для необлученной ДНК (см. таблицу). Этот эффект, который, как и повышенные значения $T_{пл}$ ДНК, более ярко выражен в растворах большой ионной силы, также можно объяснить, предположив, что протонное облучение вызывает сшивки в молекуле ДНК.

ВЫВОДЫ

Гамма-кванты и протоны высоких энергий относятся к излучениям с низкими значениями ЛПЭ, однако первичные процессы передачи энергии веществу-поглотителю у них различны. Сравнение радиационного эффекта этих двух видов излучения на ДНК в водно-солевых растворах показало, что при дозах до 50 Гр протоны вызывают более сильные разрушения азотистых оснований и вторичной структуры ДНК. Кроме того, в ДНК, облученной протонами, наблюдаются признаки межнитевых сшивок, вероятность которых повышается с ростом ионной силы раствора.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Нанофотоника».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01500).

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. Ю. Б. Кудряшов, Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) (Физматлит, М., 2004).
2. H. Murshed, Fundamentals of radiation oncology, physical, biological and clinical aspects (Elsevier Inc., London, 2019).
3. M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit, and C. Ebruli, Basic Radiation Oncology (Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg, 2010).
4. Г. Е. Труфанов, М. А. Асатурян и Г. М. Жаринов, Лучевая терапия (ГЭОТАР-Медиа, М., 2010), т. 2.
5. O. Desouky and G. Zhou, J. Taibah University for Science **10**, 187 (2016).
6. C. Cao, D. Wang, C. Chung, et al., J. Thoracic Cardiovasc. Surg. **157** (1), 362 (2019).
7. R. W. Gao, K. R. Olivier, S. S. Park, et al., Adv. Radiat. Oncol. **4**, 314 (2019).
8. S. Falk, Surgery **27**, 4 (2009).
9. А. П. Черняев, Г. И. Клёнов, А. Ю. Бушманов и др., Мед. радиология и радиац. безопасность **64** (2), 11 (2019).

10. А. С. Самойлов, Ж. Ж. Смирнова, В. А. Климанов и др., Мед. радиология и радиац. безопасность **64** (2), 41 (2019).
11. В. С. Хорошков, Мед. радиология и радиац. безопасность **64** (2), 52 (2019).
12. И. А. Гулидов, Радиационная онкология и ядерная медицина **1**, 34 (2013).
13. V. E. Balakin, A. E. Shemyakov, S. I. Zaichkina, et al., Biophysics **62** (1), 138 (2017).
14. L. L. Gol'din, V. P. Dzheleпов, M. F. Lomanov, et al., Soviet Physics Uspekhi **16** (3), 402 (1973).
15. M. Durante and N. Paganetti, Rep. Prog. Phys. **79**, 096702 (2016).
16. L. Brewster, R. Mohan, G. Mageras, et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **33**, 1081 (1995).
17. Н. К. Абросимов, А. А. Воробьев, В. А. Елисеев и др., Мед. радиология **32** (8), 10 (1987).
18. N. K. Abrosimov, Yu. A. Gavrikov, E. M. Ivanov, et al., J. Phys.: Conf. Ser. **41**, 424 (2006).
19. Н. И. Рябченко, Радиация и ДНК (Атомиздат, М., 1979).
20. J. E. Coggle, Biological Effects of Radiation (Taylor & Francis Ltd., London, 1983).
21. C. Allen, T. B. Borak, H. Tsujii, and J. A. Nickoloff, Mutat. Res. **711**, 150 (2011).
22. E. Surdutovich, E. Scifoni, and A. V. Solov'yov, Mutat. Res. **704**, 206 (2010).
23. R. A. Mitteer Jr, Y. Wang, J. Shah, and S. Gordon, Sci. Rep. **5**, 13961 (2015).
24. J. Kobiarski and E. Lipiec, J. Mol. Struct. **1178**, 162 (2019).
25. T. K. Gaisser, Astroparticle Phys. **35**, 801 (2012).
26. А. С. Спиринов, Биохимия **23**, 656 (1958).
27. S. A. Tankovskaia, O. M. Kotb, O. A. Dommes, and S. V. Paston, J. Physics: Conf. Series **1038**, 012027 (2018).
28. S. A. Tankovskaia, O. M. Kotb, O. A. Dommes, and S. V. Paston, Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy **200**, 85 (2018).
29. C. R. Cantor and P. R. Schimmel, Biophysical Chemistry (W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980), Part 2 and 3.
30. А. А. Веденов, А. М. Дыхне и М. Д. Франк-Каменецкий, Успехи физ. наук **107** (3), 479 (1971).
31. D. Y. Lando, A. S. Fridman, C.-L. Chang, et al., Anal. Biochem. **479**, 28 (2015).
32. D. S. Ershov, S. V. Paston, L. A. Kartsova, et al., Struct. Chem. **22** (2), 475 (2011).
33. S. V. Paston and V. V. Zamotin, J. Struct. Chem. **50** (5), 970 (2009).
34. S. V. Paston, O. A. Dommes, and A. E. Tarasov, in Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy, Ed. by D. S. Rodgers (Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011), pp. 301–319.
35. E. V. Chikhirzhina, T. Yu. Starkova, E. I. Kostyleva, et al., Cell Tissue Biol. **5**, 536 (2011).
36. Н. А. Касьяненко, С. Ф. Бартошевич и Э. В. Фришман, Молекуляр. биология **19** (5), 13, (1985).
37. E. I. Ramm, V. I. Vorob'ev, T. M. Birshtein, et al., Eur. J. Biochem. **25**, 245 (1972).
38. D. Y. Lando, A. S. Fridman, A. G. Kabak, and A. A. Akhrem, J. Biomol. Structure and Dynamics **15**, 141 (1997).
39. N. A. Kas'yanenko, J. Struct. Chem. **47**, 163 (2006).

Investigation of DNA Damage Induced by Proton and Gamma Radiation

O.M. Kotb*, **, D.S. Brozhik***, V.N. Verbenko***, E.P. Gulevich***, V.F. Ezhov***, D.L. Karlin***, F.A. Pak***, S.V. Paston*, A.M. Polyanichko*, A.I. Khalikov***, and E.V. Chikhirzhina****

*Faculty of Physics, St. Petersburg State University, Ulyanovskaya ul. 1, Stary Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia

**Faculty of Science, Zagazig University, Sharkia Gov Zagazig, Egypt

***Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute», mkr. Orlova roshcha 1, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia

****Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

In this study, we compared the effects of gamma and high-energy proton (1000 MeV) radiation on DNA in aqueous saline solutions (5 mM and 150 mM NaCl) at doses of 30 Gy and 50 Gy. We used spectral methods (ultraviolet absorption method, spectrophotometric methods for nucleic acid quantification, spectrophotometric DNA melting, circular dichroism) for the estimation of the number of damaged nitrogenous bases and damage of a secondary DNA structure. It was found that under these conditions, proton radiation causes more severe destruction of nitrogenous bases and the secondary DNA structure than an exposure to gamma rays at the same dose. In DNA irradiated with protons, the formation of crosslinks is possible, the probability for crosslinking increases with the rise of the ionic strength of the irradiated solution.

Keywords: radiation oncology, proton therapy, DNA, gamma radiation, destruction of nucleobases, DNA melting

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ПУЗЫРЯ В ПЛАЗМИДЕ rPF1 И ЕЕ МОДИФИКАЦИЯХ. СВЯЗЬ МЕЖДУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ ПРОФИЛЕМ ПЛАЗМИДЫ И НАПРАВЛЕНИЕМ ТРАНСКРИПЦИИ

© 2021 г. А.А. Гриневич, И.С. Масулис, Л.В. Якушевич

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

E-mail: grin_aa@mail.ru

Поступила в редакцию 06.11.2020 г.

После доработки 26.01.2021 г.

Принята к публикации 29.01.2021 г.

С использованием нелинейного уравнения синус-Гордона и его решения – кинка – моделировали и изучали динамику транскрипционного пузыря в плазмиде rPF1. На основе рассчитанного энергетического профиля плазмиды rPF1 и ее модификаций было показано, что минимальная потенциальная энергия формирования кинка или нуклеации транскрипционного пузыря соответствует области между генами белков Egfr и mCherry. Вставка в область между Egfr и mCherry однородных последовательностей показала, что кинк с большей вероятностью активируется в polyT или polyC по сравнению с polyA или polyG, что свидетельствует о зависимости нуклеации транскрипционного пузыря от физической массы оснований. В случае вставок в область между Egfr и mCherry небольших фрагментов природной последовательности *Escherichia coli* модель позволяет выявить нити ДНК с наибольшей вероятностью нуклеации транскрипционного пузыря и соответственно определить направление (в сторону гена Egfr или mCherry) транскрипции, что говорит о связи между направлением транскрипции и энергетическим профилем плазмиды.

Ключевые слова: математическое моделирование, нелинейное уравнение синус-Гордона, кинк, солитоны, плаزمиды rPF1, ДНК, транскрипционный пузырь.

DOI: 10.31857/S0006302921020058

Математическое моделирование с использованием методов нелинейной математики и теоретической физики – один из наиболее простых и эффективных инструментов изучения динамики сложных биологических систем. Постановка и реализация компьютерных экспериментов, заменяющих и дополняющих эксперименты с реальными системами, все более широко и активно осуществляется исследователями из-за целого ряда преимуществ: они дешевле, быстрее и обладают предсказательными возможностями. В настоящей работе методы математического моделирования применяются для изучения особенностей динамики транскрипционного пузыря в плазмиде rPF1 и предсказания с их помощью – в какой области плазмиды с наибольшей вероятностью произойдет нуклеация транскрипционного пузыря и в каком направлении пойдет процесс транскрипции.

Сокращение: п.о. – пары оснований.

Плазмиды представляют собой кольцевые молекулы ДНК. Они являются удобными объектами для искусственных манипуляций с генетическим материалом. Векторная плаزمиды rPF1 – типичный представитель этого класса биологических объектов (рис. 1). Она была получена из плазмиды pET-28b [1] и дополнена двумя генами, кодирующими зеленый и красный флуоресцентные белки Egfr и mCherry [2]. Данный вектор, как репортерная конструкция, позволяет одновременно регистрировать транскрипцию в двух направлениях, инициированную на участках последовательности между генами флуоресцентных белков.

Начало процесса транскрипции определяется взаимодействием РНК-полимеразы с промоторными областями ДНК. В результате происходит локальное расплетание двойной спирали ДНК, формирование открытого транскрипционного комплекса (транскрипционного пузыря) протяженностью ~ 13 пар оснований (п.о.) и последующее движение этого пузыря вдоль молекулы ДНК в процессе элонгации транскрипции [3].

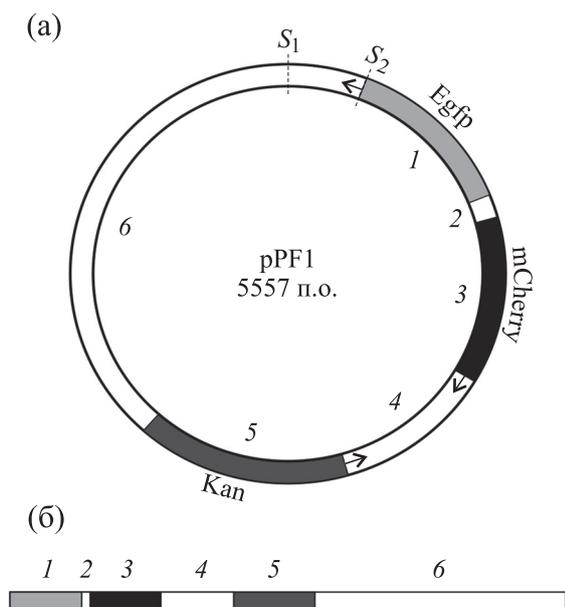


Рис. 1. Кольцевая (а) и линейная (б) схемы плазмиды рPF1. Ген зеленого белка *Egfr* (участок 1) и ген устойчивости к канамицину *Kan* (участок 5) транскрибируются по комплементарной нити. Ген красного белка *mCherry* (участок 3) транскрибируется по основной нити. S_1 – точка, указывающая начало последовательности; S_2 – точка, указывающая начало первого участка.

Направление синтеза РНК задается конфигурацией транскрипционного пузыря и ориентацией матричной и нематричной нитей в полости РНК-полимеразы (рис. 2), а скорость элонгации зависит от нуклеотидной последовательности транскрибируемого участка [4]. Кинетика формирования пузыря и скорость его движения вдоль молекулы ДНК в процессе транскрипции являются ключевыми факторами, обуславливающими вариацию в уровне экспрессии различных генов в диапазоне 10000 раз [5]. Механо-динамические и энергетические свойства нуклеотидов играют важную роль при формировании транскрипционного пузыря. Известно, что это многостадийный процесс, сопровождающийся образованием промежуточных состояний и вращательной динамикой отдельных оснований [6–9].

Внутренняя (конформационная) лабильность ДНК и ее способность реагировать на точечные возмущения в упорядоченной структуре могут рассматриваться в качестве физической основы для реализации ее основной функции – хранения и экспрессии генетической информации. С этой точки зрения одним из наиболее перспективных направлений является использование математического моделирования конформационной подвижности кольцевых ДНК для предсказания динамического поведения локальных возмущений



Рис. 2. Транскрипционный пузырь.

структуры двойной спирали с учетом механохимических свойств.

Одним из инструментов, используемых для математического моделирования конформационной подвижности ДНК, является аппарат нелинейной математики и, в частности, свойства нелинейного уравнения синус-Гордона и его односолитонных решений – кинков [10, 11]. Движение кинков можно рассматривать как движение квазичастиц в потенциальном поле молекулы. Ранее движение транскрипционного пузыря в плазмиде рТТQ18 моделировалось нами как движение кинка в потенциальном поле этой плазмиды [12]. Поведение кинка в такой модели полностью определялось энергетическим профилем потенциального поля плазмиды. Аналогичный математический аппарат применялся для расчета потенциального поля плазмиды рBR322 в работе [13]. В настоящей работе мы используем этот аппарат для расчета энергетического профиля плазмиды рPF1 и различных ее модификаций, полученных путем интегрирования в область, расположенную между двумя генами белков *Egfr* и *mCherry*, однородных последовательностей и небольших фрагментов *Escherichia coli*, взятых из так называемых промоторных островов – областей, высоко насыщенных промотороподобными участками [14]. Цель данной работы – рассчитать энергетические профили плазмиды рPF1 и ее модификаций и использовать полученные результаты для предсказания поведения кинка, что в свою очередь позволит сделать выводы о том, в какой области плазмиды с наибольшей вероятностью произойдет нуклеация транскрипционного пузыря и в каком направлении (в сторону гена *Egfr* или *mCherry*) пойдет процесс транскрипции.

СТРУКТУРА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЛАЗМИДЫ pPF1

Полная последовательность нуклеотидов плазмиды pPF1 приведена на рис. 3. Общая длина последовательности равна 5557 п.о. Она содержит три гена: ген зеленого белка Egfp с координатами (333–1049), помеченный на рис. 3 светло-серым маркером, ген красного белка mCherry с координатами (1134–1841), помеченный черным маркером, и ген устойчивости к канамицину Kan с координатами (2569–3381), помеченный темно-серым маркером. Жирным шрифтом белого цвета на темно-сером фоне показан сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BglIII (AGATCT) с координатами (1089–1094).

Кроме генов белков, последовательность плазмиды pPF1 содержит три промежуточные участка. Назовем их вторым (1050–1133), четвертым (1842–2568) и шестым участками (3382–5557) + (1–332).

Основное внимание при генетических манипуляциях уделяется второму участку, так как он расположен между генами белков Egfp и mCherry и имеет удобный для манипуляций нуклеотидный состав. На рис. 4 показана структура этого участка. В центре последовательности находится сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BglIII AGATCT длиной 6 п.о. Слева и справа от него находятся короткие последовательности длиной 39 п.о. каждая, причем короткая последовательность справа от рестриктазного сайта является обратно комплементарной к короткой последовательности слева от рестриктазного сайта.

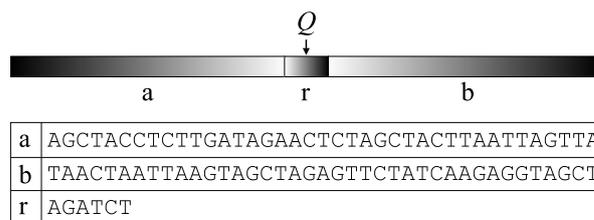


Рис. 4. Схематическое изображение последовательности второго участка. Q – точка, указывающая место, куда будут встроены небольшие модельные последовательности в компьютерных экспериментах.

Как и в экспериментах по искусственным генетическим манипуляциям *in vitro*, в наших компьютерных экспериментах мы будем встраивать во второй участок небольшие модельные последовательности. Сначала для отработки метода в качестве модельных будут использованы однородные последовательности: polyA, polyT, polyG, polyC, а затем – небольшие фрагменты последовательности *Escherichia coli*.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Для математического описания конформационной подвижности некоторого фрагмента молекулы ДНК, которое включало бы возможность образования открытых состояний, воспользуемся системой из 2N связанных нелинейных дифференциальных уравнений, имитирующих угловые отклонения азотистых оснований в обеих полинуклеотидных цепочках [15]:

$$\begin{aligned}
 & I_{n,1} \frac{d^2 \varphi_{n,1}(t)}{dt^2} - K'_{n,1} [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] + \\
 & + k_{n,1-2} R_{n,1} (R_{n,1} + R_{n,2}) \sin \varphi_{n,1} - k_{n,1-2} R_{n,1} R_{n,2} \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = \\
 & = -\beta_{n,1} \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + M_0,
 \end{aligned} \tag{1}$$

$$\begin{aligned}
 & I_{n,2} \frac{d^2 \varphi_{n,2}(t)}{dt^2} - K'_{n,2} [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] + \\
 & + k_{n,1-2} R_{n,2} (R_{n,1} + R_{n,2}) \sin \varphi_{n,2} - k_{n,1-2} R_{n,1} R_{n,2} \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = \\
 & = -\beta_{n,2} \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + M_0.
 \end{aligned} \tag{2}$$

Здесь $\varphi_{n,i}(t)$ – угловое отклонение n-го азотистого основания i-й цепочки; $I_{n,i}$ – момент инерции n-го азотистого основания i-й цепочки; $R_{n,i}$ – расстояние от центра масс n-го азотистого основания i-й цепочки до сахаро-фосфатного остова; $K'_{n,i} = KR_{n,i}^2$; K – константа,

характеризующая жесткость (на растяжение) сахаро-фосфатного остова; $\beta_{n,i} = \alpha R_{n,i}^2$; α – коэффициент диссипации; $k_{n,i}$ – константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар; M_0 – постоянный внешний момент; $i = 1, 2$; $n = 1, 2, \dots, N$, N – число

пар оснований в рассматриваемом фрагменте. Уравнения (1) и (2) упрощаются, если усреднить коэффициенты $I_{n,i}$, $R_{n,i}$, $K_{n,i}$, $k_{n,1-2}$ и $\beta_{n,i}$ методом концентраций [16]:

$$\begin{aligned} I_{n,i} &\rightarrow \bar{I}_i = I_A C_{A,i} + I_T C_{T,i} + I_G C_{G,i} + I_C C_{C,i}, \\ R_{n,i} &\rightarrow \bar{R}_i = R_A C_{A,i} + R_T C_{T,i} + R_G C_{G,i} + R_C C_{C,i}, \\ K_{n,i} &\rightarrow \bar{K}_i = K_A C_{A,i} + K_T C_{T,i} + K_G C_{G,i} + K_C C_{C,i}, \\ k_{n,1-2} &\rightarrow \bar{k}_{1-2} = k_{A-T} (C_{A,1} + C_{T,2}) + k_{G-C} (C_{G,1} + C_{C,2}), \\ \beta_{n,i} &\rightarrow \bar{\beta}_i = \beta_A C_{A,i} + \beta_T C_{T,i} + \beta_G C_{G,i} + \beta_C C_{C,i}, \end{aligned} \quad (3)$$

где $C_{j,i} = N_{j,i}/N$ – концентрация оснований j -го типа ($j = A, T, G, C$) в i -й цепи ($i = 1, 2$); $N_{j,i}$ – количество азотистых оснований j -го типа в i -й последовательности.

После проведения процедуры усреднения (3) уравнения (1) и (2) преобразуются к виду:

$$\begin{aligned} \bar{I}_1 \frac{d^2 \varphi_{n,1}(t)}{dt^2} - \bar{K}_1 [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] + \\ + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,1} - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = \\ = -\bar{\beta}_1 \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + M_0, \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \bar{I}_2 \frac{d^2 \varphi_{n,2}(t)}{dt^2} - \bar{K}_2 [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] + \\ + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,2} - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = \\ = -\bar{\beta}_2 \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + M_0. \end{aligned} \quad (5)$$

В континуальном приближении эти уравнения приобретают следующий вид:

$$\begin{aligned} \bar{I}_1 \varphi_{1tt} - \bar{K}_1 a^2 \varphi_{1zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_1 - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_1 - \varphi_2) = \\ = -\bar{\beta}_1 \varphi_{1t} + M_0, \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \bar{I}_2 \varphi_{2tt} - \bar{K}_2 a^2 \varphi_{2zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_2 - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_2 - \varphi_1) = \\ = -\bar{\beta}_2 \varphi_{2t} + M_0. \end{aligned} \quad (7)$$

С помощью приближения среднего поля [17] два связанных уравнения (6) и (7) трансформируются в два независимых уравнения:

$$\bar{I}_1 \varphi_{1tt} - \bar{K}_1 a^2 \varphi_{1zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1^2 \sin \varphi_1 = -\bar{\beta}_1 \varphi_{1t} + M_0, \quad (8)$$

$$\bar{I}_2 \varphi_{2tt} - \bar{K}_2 a^2 \varphi_{2zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2^2 \sin \varphi_2 = -\bar{\beta}_2 \varphi_{2t} + M_0. \quad (9)$$

Односолитонные решения этих уравнений – кинки:

$$\begin{aligned} \varphi_{k,1}(z, t) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[(\gamma_{k,1} / d_{k,1}) (z - v_{k,1} t - z_{0,1}) \right] \right\}, \\ \varphi_{k,2}(z, t) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[(\gamma_{k,2} / d_{k,2}) (z - v_{k,2} t - z_{0,2}) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (10)$$

Кинки используют для имитации открытых состояний [18, 19]. Здесь $v_{k,i}$ – скорость движения кинка в i -й цепочке ($i = 1, 2$), $\bar{C}_i = (\bar{K}_i a^2 / \bar{I}_i)^{1/2}$ – скорость звука в i -й цепочке, $d_{k,i} = (\bar{K}_i a^2 / \bar{V}_i)^{1/2}$ – размер кинка в i -й цепочке, $\bar{V}_i = \bar{k}_{1-2} \bar{R}_i^2$, $\gamma_{k,i} = (1 - v_{k,i}^2 / \bar{C}_i^2)^{-1/2}$ – фактор Лоренца,

Минимальные значения энергии кинка $E_{0,i}$, рассчитанные для шести участков основной и комплементарной последовательностей плазмиды pPF1

Номер участка	Координаты участка, п.о.	$E_{0,1}$ (10^{-17} Дж)	$E_{0,2}$ (10^{-17} Дж)
1 (Egfp)	333–1049	0.1639	0.1658
2	1050–1133	0.1566	0.1566
3 (mCherry)	1134–1841	0.1673	0.1673
4	1842–2568	0.1585	0.1585
5 (Kan)	2569–3381	0.1596	0.1596
6	(3382–5557) + (1–332)	0.1631	0.1631

Полная энергия кинка в i -й цепочке E_i определяется следующей формулой [20]:

$$E_i = \frac{E_{0,i}}{\sqrt{1 - \frac{v_{k,i}^2}{\bar{C}_i^2}}}, \quad (11)$$

где $E_{0,i}$ – минимальное значение энергии, необходимое для образования кинка:

$$E_{0,i} = 8\sqrt{\bar{K}_i \bar{V}_i}, \quad (i = 1, 2). \quad (12)$$

В случае малых скоростей ($v_{k,i} \ll \bar{C}_i$) формула (11) приобретает вид:

$$E_i = \frac{E_{0,i}}{\sqrt{1 - \frac{v_{k,i}^2}{\bar{C}_i^2}}} = E_{0,i} + \frac{m_{k,i} v_{k,i}^2}{2} \quad (13)$$

где $m_{k,i} = \frac{E_{0,i}}{2\bar{C}_i^2}$ – масса кинка в i -й цепочке.

Формула (13) свидетельствует о том, что кинк можно моделировать как квазичастицу, обладающую массой $m_{k,i}$, скоростью $v_{k,i}$ и обладающую потенциальной энергией $E_{0,i}$. В следующем разделе мы воспользуемся квазиоднородным приближением и формулой (12) для расчета потенциальной энергии кинка внутри каждого из участков.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМИДЫ pPF1

При построении энергетического профиля плазмиды pPF1 использовались значения коэффициентов уравнений (1) и (2) из работы [12] и

формула (12) для расчета минимальных значений энергии $E_{0,i}$, необходимых для образования кинка в каждом из шести участков i -й цепочки ДНК ($i = 1, 2$): в трех участках, отвечающих генам (Egfp, mCherry, Kan) и трех участках, отвечающих промежуточным областям (второй, четвертый и шестой участки). Результаты расчета приведены в таблице. Построенные энергетические профили для основной и комплементарной последовательностей плазмиды pPF1 приведены на рис. 5.

Из рис. 5 видно, что самая глубокая потенциальная яма наблюдается во втором участке и основной (черная кривая), и комплементарной (серая кривая) последовательностей. Это говорит о том, что вероятность образования кинка во втором участке выше, чем в других. Видно также, что во втором участке черная и серая кривые совпадают. Это означает, что энергии активации кинка в основной и в комплементарной последовательностях одинаковые. Таким образом, с энергетической точки зрения кинку все равно, в какой из двух этих последовательностей активироваться. Какого-либо предпочтения нет.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛАЗМИД

Компьютерные эксперименты с однородными последовательностями, интегрированными в плазмиду pPF1. В первом компьютерном эксперименте плазида pPF1 модифицировалась вставкой во второй участок однородной модельной последовательности polyA длиной 183 п.о. Схематическое изображение последовательности второго участка со вставкой представлено на рис. 6.

Результаты расчета энергетических профилей основной и комплементарной последовательности

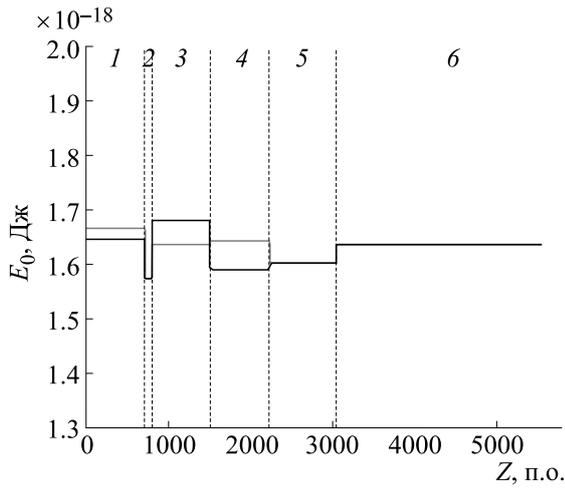


Рис. 5. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей плазмиды pPF1. Цифрами 1–6 обозначены участки последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

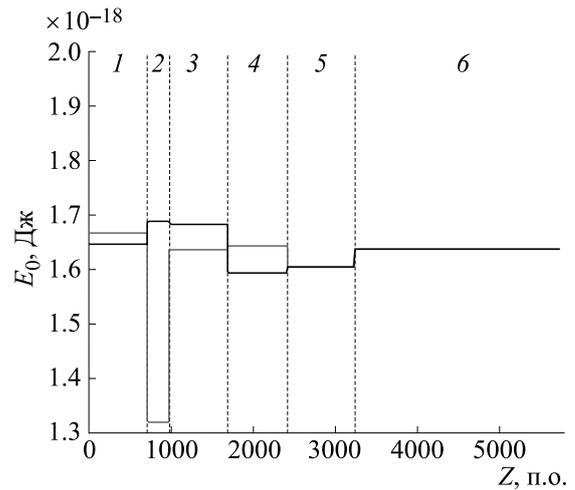


Рис. 7. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1 с однородной последовательностью polyA, интегрированной во второй участок. Цифрами 1–6 обозначены участки. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

стей модифицированной плазмиды представлены на рис. 7.

Из рис. 7 видно, что во втором участке комплементарной последовательности polyT (серая кривая) наблюдается самая глубокая потенциальная яма, а в том же участке основной последовательности polyA (черная кривая), напротив, наблюдается барьер. Это говорит о том, что вероятность активации кинка во втором участке комплементарной последовательности выше, чем в том же участке основной последовательности.

Во втором компьютерном эксперименте плазмиды pPF1 модифицировалась вставкой во второй участок другой однородной последовательности (polyG) той же длины (рис. 8).

Результаты расчета энергетических профилей основной и комплементарной последовательностей модифицированной плазмиды pPF1 с инте-

грированной в нее последовательностью polyG представлены на рис. 9.

Из рис. 9 видно, что самая глубокая потенциальная яма наблюдается во втором участке комплементарной последовательности polyC (серая кривая). В этом же участке основной последовательности polyG (черная кривая), напротив, наблюдается барьер. Таким образом, наибольшая вероятность локального расплетания ДНК будет наблюдаться в комплементарной последовательности второго участка.

Компьютерные эксперименты с неоднородными последовательностями, интегрированными в плазмиду pPF1. В следующем компьютерном эксперименте плазмиды pPF1 модифицировалась вставкой во второй участок небольшого фрагмента реальной последовательности *Escherichia coli*, взятого из так называемых промоторных островков – областей высоко насыщенных промотор-

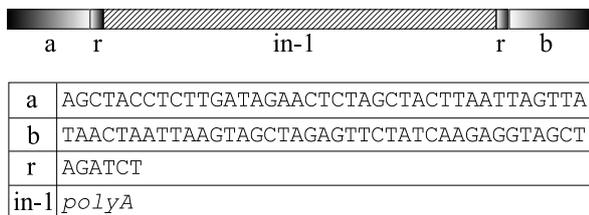


Рис. 6. Схематическое изображение последовательности второго участка с интегрированной в него последовательностью polyA.

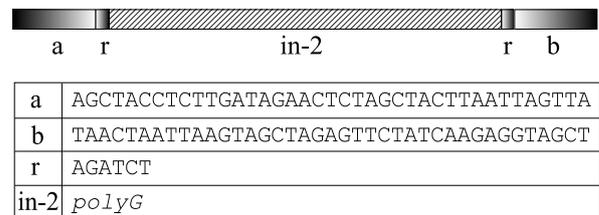


Рис. 8. Схематическое изображение последовательности второго участка плазмиды pPF1 с интегрированной в него модельной однородной последовательностью polyG.

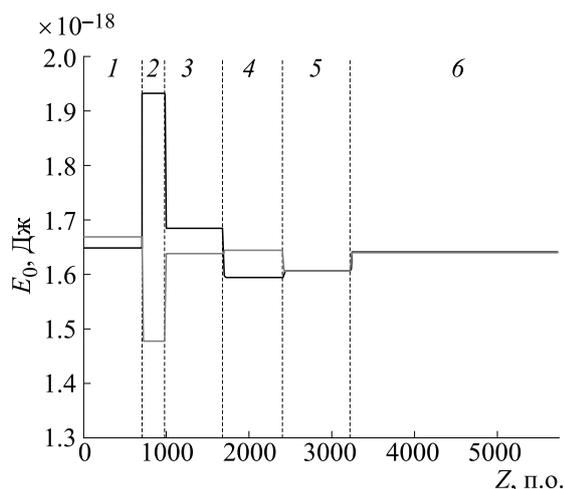


Рис. 9. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1, с однородной последовательностью *polyG*, интегрированной во второй участок. Цифрами 1–6 обозначены участки. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

подобными участками [14]. На рис. 10 представлена схема второго участка после модификации.

Результаты расчета энергетического профиля основной и комплементарной последовательностей модифицированной вышеуказанным способом плазмиды pPF1 представлены на рис. 11.

Из рис. 11 видно, что самая глубокая потенциальная яма приходится на второй участок основной последовательности (черная кривая). Это говорит о том, что наибольшая вероятность активации кинка будет наблюдаться во втором участке основной последовательности, соответствующей нематричной нити ДНК. В данном случае это можно трактовать следующим образом: именно второй участок ответственен за разрушение водородных связей и нуклеацию транскрипционного пузыря. Развитие нуклеации на основной последовательности указывает на направление движе-

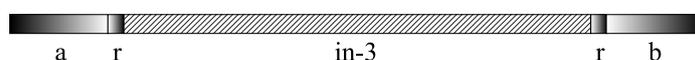
ния пузыря: от 5'- к 3'-концу. Такое движение соответствует движению в направлении гена красного белка. Можно ожидать, что в данном случае преимущественно будет синтезироваться белок mCherry.

В следующем компьютерном эксперименте во второй участок плазмиды pPF1 был встроено фрагмент последовательности обратного комплементарной к последовательности фрагмента, который встраивался во второй участок в предыдущем эксперименте. Последовательность второго участка, полученная в результате такой модификации, показана на рис. 12, а на рис. 13 представлены результаты построения энергетического профиля модифицированной плазмиды.

Из рис. 13 видно, что в отличие от предыдущего случая самая глубокая потенциальная яма приходится на второй участок комплементарной последовательности (серая кривая). Таким образом, с более высокой вероятностью кинк будет активироваться не в основной, а в комплементарной последовательности второго участка. С учетом того, что движение пузыря всегда происходит от 5'- к 3'-концу, можно ожидать, что с большей вероятностью пузырь будет двигаться в направлении гена зеленого белка, для которого в данной конструкции нематричной нитью является комплементарная последовательность. Таким образом, вероятность синтеза белка Egfp будет выше по отношению к mCherry.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной работе с помощью методов нелинейной математики были рассчитаны энергетические профили потенциальных полей плазмиды pPF1 и ее модификаций. Модификации плазмиды получали вставкой во второй участок, расположенный между генами зеленого и красного белков, небольших фрагментов однородных (синтетических) и неоднородных (природных) последовательностей.



a	AGCTACCTCTTGATAGAACTCTAGCTACTTAATTAGTTA
b	TAACATAATTAAGTAGCTAGAGTTCTATCAAGAGGTAGCT
r	AGATCT
in-3	TAATCAGGATGATGTGCATTTATATTTTTATACACAAAATTATAGTTTGCA AATTTTAATAAATTTTCATTTAAGATTTAAATATATATGATGTTGTTTTTTA TTCTAACTTATTTCAAAGTTACATTTTTCAACGCTTACTATGCTTTTTTAT AACATAAACTCACTACAACGCACCTGAA

Рис. 10. Схематическое изображение последовательности второго участка плазмиды pPF1 с интегрированным в него первым фрагментом реальной последовательности *Escherichia coli* (in-3).

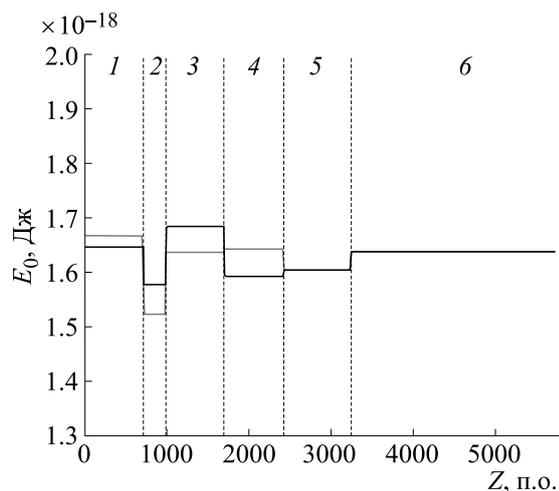


Рис. 13. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1, где во второй участок интегрирован небольшой фрагмент последовательности *Escherichia coli* (in-4). Цифрами 1–6 обозначены участки последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

жения и не учитываются продольные, поперечные и радиальные динамические степени свободы нуклеотидов. Используется приближение среднего поля, при котором явная динамика оснований одной нити описывается в среднем поле, формируемом комплементарной нитью. Не учитывается спиральность молекулы ДНК, и не рассматривается сам процесс инициации и образования транскрипционного пузыря, который формируется при взаимодействии РНК-полимеразы с ДНК. Несмотря на эти ограничения модели, она позволяет на основе расчета энергетических профилей рассматриваемых молекул ДНК сделать качественную оценку вероятности нуклеации пузыря и направления его движения, результаты которой согласуются с экспериментальными данными.

Результаты моделирования показали, что эффективность транскрипции в заданном направлении синтеза РНК зависит от энергии активации кинка в нематричной нити. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения расчетного метода на основе аппарата нелинейной динамики для прогнозирования биологических характеристик природных последовательностей ДНК.

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. Map of plasmid pET-28b [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-28b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28b(%2B)) (дата обращения: 01.11.2020).
2. I. S. Masulis, Z. Sh. Babaeva, S. V. Chernyshov, et al., *Sci. Rep.* **5**, 11449 (2015).
3. S. Borukhov and E. Nudler, *Trends Microbiol.* **16** (3), 126 (2008).
4. J. Y. Kang, T. V. Mishanina, R. Landick, et al., *J. Mol. Biol.* **431** (20), 4007 (2019).
5. M. T. Jr. Record, W. S. Reznikoff, M. L. Craig, et al., in *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, Ed. by F.C. Neidhardt (ASM Press, Washington, DC, USA, 1996), pp. 792–821.
6. H. Boyaci, J. Chen, R. Jansen, et al., *Nature* **565** (7739), 382 (2019).
7. J. Chen, C. Chiu, S. Gopalkrishnan, et al., *Mol Cell.* **78** (2), 275 (2020).
8. E. F. Ruff, M. T. Jr. Record, and I. Artsimovitch. *Biomolecules* **5** (2), 1035 (2015).
9. J. T. Winkelman, I. O. Vvedenskaya, Y. Zhang, et al., *Science* **351** (6277), 1090 (2016).
10. P. J. Caudrey, J. C. Eilbeck, and J. D. Gibbon, *Nuovo Cimento B* **25** (2), 497 (1975).
11. V. G. Ivancevic and T. T. Ivancevic, *J. Geometry and Symmetry in Physics* **31**, 1 (2013).
12. A. A. Grinevich, A. A. Ryasik, and L. V. Yakushevich, *Chaos, Solitons & Fractals* **75**, 62 (2015).
13. L. V. Yakushevich and L.A. Krasnobaeva, *Math. Biol. Bioinform.* **14** (1), 327 (2019).
14. K. S. Shavkunov, I. S. Masulis, M. N. Tutukina, et al., *Nucl. Acids Res.* **37** (15), 4919 (2009).
15. L. A. Krasnobaeva and L. V. Yakushevich, *J. Bioinform. Comput. Biol.* **13** (1), 1540002 (2015).
16. L. V. Yakushevich and L. A. Krasnobaeva, *Int. J. Non-linear Mech.* **43**, 1074 (2008).
17. L. V. Yakushevich, *J. Biol. Phys.* **43**, 113 (2017).
18. W. Englander, N. R. Kallenbach, A. J. Heeger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7222 (1980).
19. Л. В. Якушевич, Л. А. Краснобаева, А. В. Шаповалов и др., *Биофизика* **50**, 450 (2005).
20. Л. В. Якушевич и А. А. Рясик, *Компьютерные исследования и моделирование* **4** (1), 209 (2012).
21. Y. Zhang, Y. Feng, S. Chatterjee, et al., *Science* **338** (6110), 1076 (2012).
22. E. Heyduk, K. Kuznedelov, K. Severinov, et al. *J. Biol. Chem.* **281** (18), 12362 (2006).
23. M. E. Karpen and P. L. deHaseh, *Biomolecules* **5** (2), 668 (2015).
24. N. S. Roy, S. Debnath, A. Chakraborty, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20** (14), 9449 (2018).
25. F. Colizzi, C. Perez-Gonzalez, R. Fritzen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116** (45), 22471 (2019).

**Mathematical Modeling of the Behavior of the Transcription Bubble
in the pPF1 Plasmid and Its Modified Versions.
A link between the Plasmid Energy Profile and the Direction of Transcription**

A.A. Grinevich, I.S. Masulis, and L.V. Yakushevich

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

In this study, we use the kink solutions of the nonlinear sine-Gordon equation to apply the methods of mathematical modeling to investigate the dynamics of the transcription bubble in the pPF1 plasmid. Based on the calculated energy profile for the pPF1 plasmid and its modified versions, it was shown that the minimum potential energy of the kink formation or transcription bubble nucleation corresponds to the region between the genes of the Egfp and mCherry proteins. The insertion of homogeneous sequences into the region between Egfp and mCherry showed that the kink is more likely to be activated in polyT or polyC as compared to polyA or polyG, which indicates the dependence of nucleation of the transcription bubble on the molecular weight of base pairs. In the case of insertions into the region between Egfp and mCherry of small fragments of the native sequence of *Escherichia coli*, the model identifies DNA strands with the highest probability of nucleation of the transcription bubble, and, accordingly, determines the direction (towards the Egfp or mCherry gene) of transcription, indicating a link between the direction of transcription and the energy profile of the plasmid.

Keywords: mathematical modeling, nonlinear sine-Gordon equation, kink, solitons, pPF1 plasmid, DNA, transcription bubble

ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

© 2021 г. Д.Б. Корман*, Л.А. Островская*, А.Ф. Ванин**, ***

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

**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: larros@list.ru

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 09.12.2020 г.

Принята к публикации 15.12.2020 г.

Рассмотрена роль оксида азота как одного из универсальных регуляторов метаболических процессов в живых организмах. Представлены результаты экспериментальных исследований в области NO-онкологии. Описаны противоопухолевые и цитотоксические эффекты различных доноров оксида азота, обсуждаются механизмы их действия.

Ключевые слова: оксид азота, доноры оксида азота, экспериментальные модели опухолей животных, культуры клеток опухолей человека.

DOI: 10.31857/S000630292102006X

Начавшиеся в 70–80-е годы прошлого столетия исследования биологической активности одной из простейших химических молекул – монооксида азота, или, как сейчас говорят, оксида азота (NO), привели уже к концу 90-х годов к открытию уникальной роли этого агента практически для всех представителей живого мира – от бактерий до человека. Оказалось, что NO непрерывно ферментативным путем продуцируется во всех живых организмах, выполняя в них функции одного из универсальных регуляторов метаболических процессов, оказывая на эти организмы как положительное, так и негативное действие, т.е. соответственно усиливающее или ослабляющее их жизнедеятельность, в последнем случае – вплоть до гибели живых организмов [1]. К настоящему времени количество публикаций, обеспечивших со-

здание новой области биологии – биологии оксида азота, – превысило 100000 [2].

Естественно, что открытие важной роли NO в биологических процессах привлекло внимание медиков, поскольку, как это было очевидно, изучение механизмов биологического действия NO могло привести к более глубокому пониманию сути различных заболеваний и к созданию новых лекарств, которые могли бы купировать эти заболевания. В нашем обзоре мы попытались изложить последние достижения биологов и медиков, работающих в области NO-онкологии, используя главным образом материалы публикаций этих исследователей. В частности, именно в такой публикации сообщается о вышеприведенном количестве опубликованных к настоящему времени количестве статей по биологии NO [2].

Перед тем как перейти к описанию различных доноров оксида азота как потенциальных противоопухолевых агентов, остановимся на сведениях о химии и биохимии оксида азота, причем изложенных в публикациях специалистов-онкологов.

Согласно этим сведениям [3–7], NO представляет собой двухатомный радикал, легко проникающий через биологические мембраны вследствие своей липофильности. В организме в условиях нормоксии NO образуется в реакции окисления кислородом аминокислоты гуанидинового остатка в L-аргinine при каталитической активности

Сокращения: NOS – NO-синтеза, АФК – активные формы кислорода, РМЖ – рак молочной железы человека, РПЖ – рак предстательной железы человека, HIF-1 α – гипоксия-индуцибельный фактор 1 α , ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Г – комплекс ДНКЖ с глутатионом, DETA/NONOate – диэтиленetriаминNONOate, DEA/NONOate – диаэтиламинNONOate, PAPA/NONOate – пропиламинпропиламин/NONOate, JS-K – (O-(2,4-dinitrophenyl)-1-[(4-ethoxycarbonyl) piperazin-1-yl]diazene-1-ium-1,2-diolate), GST – глутатион-S-трансфераза, RRx-001 – bromoacetyl-3,3-dinitroazetidine, Saq-NO – Saquinavir-NO, GIT-27NO – модифицированный NO противовоспалительный препарат VGX-1027 ((S,R)-3-фенил-4,5-дигидро-5-изаксолуксусная кислота).

NO-синтаз (NOS), приводящего к превращению L-аргинина в другую аминокислоту — цитруллин. В условиях гипоксии при сниженной активности NOS образование NO происходит в результате каталитического восстановления неорганических нитратов и нитритов, получаемых с растительной пищей (в частности, при участии дезоксигемоглобина как гипоксия-специфической нитритредуктазы).

Уровень NO, необходимый для регулирования нормальных физиологических процессов путем участия в функционировании сигнальных путей, обеспечивается конститутивной экспрессией NOS в течение нескольких секунд или минут в наномолярных концентрациях в нейрональных клетках (nNOS, NOS1) и в эндотелиальных клетках (eNOS, NOS3). Более высокий уровень NO обеспечивается экспрессией индуцибельной NOS (iNOS, NOS2) в течение более длительного времени в микромолярных концентрациях.

Сам по себе оксид азота является короткоживущим радикалом, $t_{1/2}$ в водных растворах на воздухе составляет 0.1–5.0 с. Формой стабильного существования NO в крови являются S-нитрозотиолы (S-нитрозоглютацион, S-нитрозоальбумин), динитрозильные комплексы с железом, комплексы NO с гемоглобином. Эти соединения являются важными компонентами системы депонирования и транспортировки NO в организме. Наличие в электронной структуре NO неспаренного электрона обуславливает наличие у него химических и биохимических свойств, характерных для свободных радикалов, в первую очередь высокую реакционную способность. Это свойство NO, наряду со способностью легко проникать сквозь биологические мембраны и коротким временем жизни (порядка нескольких секунд) после его образования, обуславливает важную роль NO в качестве сигнальной молекулы для кратковременного аутокринного (внутри клетки) и паракринного (между клетками) обмена сигналами.

Функции NO в клетке могут быть как cGMP-зависимыми (вазодилатация, нейротрансмиссия, ингибирование агрегации тромбоцитов, расслабление гладкомышечной мускулатуры и т.п.), так и cGMP-независимыми и могут осуществляться в результате реакций NO с молекулярным кислородом, супероксидным радикалом, тиолами и переходными металлами с образованием его метаболитов, выступающих в роли активных форм азота.

Взаимодействие NO с активными формами кислорода (АФК), например с супероксидным анионом, ведет к нитрозативному стрессу в результате образования ряда высокорекреационно-способных активных форм азота, таких как пероксинитрит (ONOO^-), катион нитрозония

NO^+ , диоксид азота (NO_2^-), триоксид азота (N_2O_3), некоторые из которых реагируют с сульфгидрильными (тиоловыми) группами белков с образованием S-нитрозотиолов (реакция S-нитрозирования), что ведет к модуляции активности и стабильности белков. S-нитрозирование остатков цистеина в белках, участвующих в функционировании сигнальных путей, приводит к обратимой модификации многих клеточных сигнальных путей. Результатом, в частности, может быть индукция цитотоксического S-нитрозирования и окислительных реакций, ведущих к апоптозу [3–7].

S-нитрозирование сигнальных белков может вести и как к прогрессии, так и к ингибированию клеточной пролиферации. Например, S-нитрозирование ядерного транскрипционного фактора NF-κB, матриксной металлопротеазы 9, Fas-рецептора промотирует клеточную гибель, тогда как S-нитрозирование каспазы-3, каспазы 9 и c-JUN-терминальной киназы подавляет их активность и ингибирует апоптоз [7]. NO является также одним из ключевых модуляторов функций иммунной системы, в частности пролиферации и гибели T-лимфоцитов, B-лимфоцитов и тучных клеток [6].

Эффект NO как регуляторной молекулы реализуется при физиологических, наномолярных концентрациях, тогда как цитотоксическое действие NO, генерируемого макрофагами и нейтрофилами, в отношении патогенов и опухолевых клеток проявляется при более высоком микромолярном уровне NO [8]. Таким образом в зависимости от относительного уровня NO этот агент может либо стимулировать опухолевый рост или вызвать гибель клеток, в связи с чем NO часто характеризуют как «обоюдоострый меч» [9]. Низкий конститутивный уровень NO в опухоли, вызванный ее гипоксией, повышает выживаемость клеток и опухолевую прогрессию, обеспечивая растущую в связи с развитием опухоли потребность в кислороде, что реализуется в результате вазодилатирующего эффекта этих концентраций NO. Уровни NO ниже или выше оптимальных для роста опухоли значений могут активировать трансдукцию сигналов, ведущих к ингибированию опухолевого роста и гибели клеток. Высокие концентрации NO модулируют также противоопухолевую иммунную защиту [3–7].

Нормальным уровнем NO принято считать концентрации ниже 50 нмоль/л, выделять умеренно повышенную концентрацию (100–350 мкмоль/л) и высокую концентрацию (500–1000 мкмоль/л). Эффект при умеренно повышенных концентрациях NO включает в себя усиление клеточной пролиферации, нестабильность генома, снижение апоптоза и репарацию ДНК. Результатом действия NO в высоких концентрациях

является снижение пролиферации, усиление апоптоза, повреждение ДНК и модулирование сигнальных путей, стимулированное повреждением ДНК [7]. Про- или антиканцерогенное действие NO определяется и многими другими факторами – источником генерации NO, скоростью его образования и метаболизма, типом опухолевых клеток и пр. [10, 11].

Дозозависимая бивалентность действия NO может быть использована в терапевтических целях. При этом возможно либо применение ингибиторов NOS для снижения уровня эндогенного NO ниже оптимального, что должно вести к подавлению опухолевого роста, либо использование доноров NO для повышения содержания оксида азота до уровня, приводящего к гибели опухолевых клеток [7, 12–14].

Следует отметить, что в ряде исследований обнаружено усиление синтеза NO в опухолях. Об этом свидетельствуют, в частности, данные, указывающие на гиперэкспрессию индуцибельной изоформы NOS в разных опухолях человека, включая рак молочной и предстательной железы, колоректальный рак, что ведет к гиперпродукции NO в опухоли до концентраций, превосходящих физиологический уровень. Считается, что это является одним из факторов, способствующих возникновению и развитию опухоли и ее метастатический диссеминации [2, 15, 16].

Обоснованием для применения доноров NO в такой ситуации может служить развиваемая в последние годы новая стратегия лекарственного лечения злокачественных опухолей, основанная на индукции в опухолевых клетках оксидативного стресса путем повышения в ней уровня АФК. Основой этой стратегии является представление, согласно которому для опухолевой клетки требуется более высокая концентрация АФК по сравнению с нормальной клеткой. Как следствие, при повышении содержания АФК критический уровень АФК, при котором происходит повреждение клетки и ее гибель, в опухолевых клетках будет достигнут раньше, чем в нормальных [17]. Можно полагать, что аналогичный эффект будет оказывать нитрозативный стресс, вызываемый активными форм азота.

Первым указанием на цитотоксическое действие NO в отношении опухолевых клеток считают результаты экспериментов, в которых было показано, что культивирование клеток лейкемии L-1210 с активированными перитонеальными макрофагами, продуцирующими NO, ингибировало пролиферацию лейкемических клеток. Ингибирование активности NOS с помощью ингибитора NOS L-NAME (L-N^G-Nitro arginine methyl ester) и применение миоглобина (перехватчика NO) эффективно предупреждают гибель лейке-

мических клеток под действием активированных макрофагов [2].

Прямая доставка в клетку экзогенного NO невозможна из-за очень короткого времени жизни этой молекулы. Более реальным является повышение в организме уровня NO путем усиления экспрессии NOS или введения экзогенного NO с помощью доноров NO.

К донорам NO относят вещества, способные в условиях *in vivo* образовывать NO *in situ* в результате высвобождения NO, входящего в их состав, или вследствие химических или биохимических превращений донора. Существенным для экзогенных доноров оксида азота, высвобождающих NO в физиологических условиях, считается их способность обеспечивать длительное время полу-высвобождения радикала, колеблющееся в пределах от нескольких минут до суток. Доноры оксида азота, обеспечивающие повышение его уровня за счет биоактивации этих веществ *in vivo*, должны обладать длительным временем жизни в физиологических условиях для поддержания высокой концентрации NO в ткани (клетке) – мишени [2, 12, 13].

Биологические эффекты NO, высвобождаемого из донора NO, реализуются в результате ряда реакций: реакция с супероксидным анионом (O₂⁻), ведущая к образованию пероксинитрита (ONOO⁻), являющегося сильным оксидантом, индуцирующим в клетках пероксидацию липидов; окисление цистеина и S-нитрозирование белков, что ведет к апоптотической и некротической гибели клеток; реакция NO с O₂ (автоокисление) или распад протонированной формы ONOO⁻, ведущие к образованию диоксида азота (NO₂), что может вести к нитрованию тирозиновых остатков в белках, в том числе белков сигнальных путей с изменением их функции. В результате реакции NO₂ с NO образуется триоксид азота (N₂O₃), который может вызывать S-нитрозирование тиолсодержащих белков, что рассматривается как посттрансляционная модификация, конкурирующая с такими важными процессами, как фосфорилирование и убиквитинация белков [4, 12].

Противоопухолевый эффект повышенного уровня NO в зависимости от достигаемой концентрации и типа опухоли может реализовываться в результате взаимодействия с разными молекулярными мишенями и по разным механизмам. Конечным результатом является индукция или усиление апоптоза по разным путям – р53-зависимому, митохондриальному, Fas-зависимому. Механизмы индукции апоптоза под действием NO включают повреждение ДНК, включая образование двойных разрывов ДНК, повреждение митохондрий (изменение проницаемости митохондриальной мембра-

ны и выход в цитозоль цитохрома *c* и AIF), подавление экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и их протеосомальную деградацию, усиление продукции проапоптотических белков Bax и Bad, активацию каспазного сигналинга, ингибирование ангиогенеза, ингибирование гипоксии. Все эти эффекты реализуются в результате взаимодействия NO с разными молекулярными мишенями, в том числе с гипоксия-индуцибельным фактором 1 α (HIF-1 α), NF- κ B, p53, белками некоторых сигнальных путей (Ras, ERKs, Akt, циклин D1/ретинобластома, mTOR, JNK) и пр. [9, 12, 13, 16, 18–22].

Показано, что эти эффекты могут также sensibilizировать опухоль к химио-радио-иммуно-терапии и способствуют преодолению резистентности к химиотерапии. Показано, что резистентность к ряду цитостатиков, в частности к доксорубину, обусловленная гиперэкспрессией белков, определяющих феномен множественной лекарственной устойчивости (Pgp, MRPs), ассоциирована с низкой продукцией NO в резистентных опухолях. Повышение уровня NO приводит к исчезновению или существенному ослаблению резистентности [12, 23, 24].

Подтверждением возможности с помощью NO усиливать цитотоксичность можно рассматривать результаты экспериментов, в которых показано, что болюсное насыщение культуры клеток рака молочной железы человека (PMЖ) линии MCF-7 газообразным NO за 30 мин до внесения в среду доксорубина значительно усилило его цитотоксическое действие – доля выживших клеток уменьшилась с 40% при действии одного доксорубина до 5% при комбинированном воздействии. Следует отметить, что культивирование клеток MCF-7 в среде, насыщенной NO, без добавления доксорубина, практически не влияло на выживаемость клеток [25].

В то же время отмечается, что в определенных ситуациях NO способен индуцировать резистентность опухолевых клеток к некоторым цитостатикам. Предполагаются разные механизмы этого эффекта, в частности стабилизация антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и гипоксического фактора HIF-1 α в результате нитрозилирования реактивных сульфгидрильных групп в этих белках, что индуцирует, частности, резистентность опухолевых клеток к цисплатине [15]. К числу белков, модулируемых NO, относится топоизомераза II, у которой под действием NO ингибируется каталитическая и релаксирующая активность, что ведет (как показано на клетках MCF-7 и клетках рака толстой кишки HT29) к развитию резистентности к ингибитору топоизомеразы II этопозиду [16].

О связи концентрации NO с цитотоксичностью свидетельствуют результаты исследования

влияния пяти различных концентраций NO на культуру клеток MCF-7. При низких концентрациях NO (1–300 нМ) отмечен рост клеток и антиапоптотический эффект, при этом регистрировалась активация cGMP, фосфорилирование Akt, стабилизация HIF-1 α . В высоких дозах NO (>400 нМ) индуцировался цитотоксический эффект и апоптоз на фоне фосфорилирования p53 и развития нитрозативного стресса [12]. Получен ряд экспериментальных данных, указывающих на возможную реализацию противоопухолевого действия NO в результате модулирования противоопухолевого иммунитета [22].

Одним из механизмов защиты опухолевых клеток от действия эффекторных клеток иммунной системы является сбрасывание с поверхностных мембран опухолевых клеток специальных молекул главного комплекса гистосовместимости (MIC A и MIC B), которые ответственны за связывание с рецептором NK G2D на мембранах NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Считается, что рефрактерность к иммунному надзору гипоксических опухолевых клеток опосредована этим механизмом, так как гипоксия усиливает сбрасывание MIC. Это происходит в результате накопления в гипоксических клетках HIF-1 α и вызванной этим гиперэкспрессии металлопротеазы ADAM10, что ведет к потере клетками молекул MIC A и MIC B. На культуре клеток рака предстательной железы человека (РПЖ) DU-145 и PMЖ MDA-MB231, культивируемых в условиях гипоксии, показано, что применение доноров NO (нитроглицерин и DETA-NO), уменьшает накопление в опухолевых клетках HIF-1 α , подавляет гиперэкспрессию ADAM10, предотвращает снижение экспрессии MIC на мембранах опухолевых клеток и усиливает их лизис в результате действия лимфоцитов периферической крови человека, активированных интерлейкином-2. На мышцах nude линии NIS SWISS (с сохраненной активностью NK/LAK-клеток) с растущими подкожно ксенографтами DU-145 показано, что трансдермальное введение нитроглицерина тормозит рост опухоли, однако в опытах на мышцах с подавленной активностью NK/LAK-клеток этот эффект не наблюдали [26, 27].

Еще одним важным с точки зрения усиления противоопухолевого иммунитета эффектом ингибирования HIF-1 α является подавление в клетках опухоли и клетках микроокружения гиперэкспрессии лиганда программируемой гибели (PD-L1) Т-лимфоцитов, которая индуцируется гиперэкспрессией HIF-1 α . Это ведет к усилению цитотоксического действия Т-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток. Следует отметить, что ингибирование PD-L1 является одним из механизмов действия ряда современных противоопухолевых иммуно-терапевтических препаратов. Показано, что инкубация с нитроглицери-

ном клеток разных опухолей (DU-145, MDA-MB-231, меланомы B16-OVA) блокировала индуцированную гипоксией гиперэкспрессию PD-L1. На клетках меланомы показано, что это привело к опосредованному цитотоксическими лимфоцитами лизису опухолевых клеток [28].

Считается, что в реализации противоопухолевого эффекта NO могут участвовать также макрофаги, что определяется способностью этих клеток включать в себя NO-содержащие соединения, в частности динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), с последующей направленной транспортировкой этих комплексов к злокачественным опухолям непосредственно в опухолевые клетки или в окружение опухоли [29–31].

В качестве доноров NO синтезирован и изучен на наличие цитотоксической и противоопухолевой активности ряд органических (нитраты/нитриты, S-нитрозотиолы, диазениумдиолаты) и неорганических соединений (металл-нитрозильные соединения, в основном ДНКЖ с различными лигандами). Как правило, цитотоксический эффект регистрировался при применении препаратов в микромолярных концентрациях; по выраженности эффект различался для разных соединений на порядки (IC_{50} колебался от 0.2 до 38.6 мкМ) [28].

Следует подчеркнуть, что противоопухолевый эффект разных доноров реализуется в результате высвобождения NO, следовательно, все они имеют в принципе одинаковые молекулярные мишени и механизмы действия. Особенности эффекта разных доноров NO определяются их химическим строением, физико-химическими свойствами, фармакокинетикой и метаболизмом, а также зависят от типа опухоли [32].

Терапевтическая эффективность потенциальных доноров NO может быть ограничена возможными системными эффектами, обусловленными такими биологическими эффектами NO, как вазодилатация, гипотензия, накопление токсических метаболитов – цианиды [13].

Следует отметить, что несмотря на многолетние экспериментальные исследования противоопухолевых свойств разных доноров NO клинически значимых препаратов на их базе пока не создано. Одним из серьезных препятствий на этом пути считается способность NO не только ингибировать рост опухоли, но и стимулировать пролиферацию опухолевых клеток [32].

Среди нитратов – доноров NO – противоопухолевые свойства изучены в основном у нитроглицерина (тринитратглицерина). Интерес к нитроглицерину как возможному противоопухолевому средству, стимулировался программой перепрофилирования лекарств для онкологии, задачей которой было изучение противоопухолевых свойств у лекарственных препаратов, приме-

няемых по другим показаниям, и для которых имелись основания предполагать наличие противоопухолевой активности [33]. Первоначально считалось, что вазодилатирующие свойства нитроглицерина помогут усилить эффективность конвенциональных противоопухолевых препаратов за счет увеличения поступления препаратов в опухоль.

Усиление активности цитостатиков при сочетании с нитроглицерином может быть реализовано и по другим механизмам. Одной из причин резистентности опухоли к некоторым противоопухолевым препаратам является гипоксия, ассоциированная с гиперэкспрессией в опухолях гипоксического фактора HIF-1 α в результате ингибирования продукции эндогенного NO. В 2001 г. авторы работы [34] на культуре клеток РМЖ линии MDA-MB-231 и меланомы мышей линии B16F-10 показали, что ингибирование продукции эндогенного NO в условиях гипоксии приводит к быстрому развитию резистентности опухолевых клеток к доксорубину и 5-фторурацилу. Этот эффект частично снимался введением небольших (1 мкМ и 0.1 мкМ) доз нитроглицерина. В экспериментах *in vitro* на разных опухолевых моделях (РМЖ линии MDA-MB-231, РПЖ человека линий PC-3, DU-145 и мышей линия TRAMP-C2, меланомы B-16 мышей) показано, что применение нитроглицерина способно уменьшать или полностью ликвидировать обусловленную гипоксией резистентность опухолевых клеток к действию разных препаратов, (доксорубин, 5-фторурацил, пеметрексат, паклитаксел) [14, 18, 35].

Усиление противоопухолевой активности цитостатиков при комбинации с нитроглицерином показано также в экспериментах *in vivo*. На ксенографтах РПЖ PC-3 показано, что внутривенное введение доксорубина и трансдермальное введение нитроглицерина на 55% сильнее тормозит рост опухоли по сравнению с применением одного доксорубина [33]. Сочетание пеметрексата с нитроглицерином тормозило рост карциномы Льюис достоверно сильнее, чем применение одного пеметрексата [14, 36]. В ряде экспериментов показано, что нитроглицерин обладает самостоятельной противоопухолевой активностью. Торможение роста опухоли зарегистрировано при трансдермальном применении нитроглицерина мышам с трансплантированным РМЖ 4T1, с ксенографтами РПЖ PC-3 и DU 145. Противоопухолевый эффект нитроглицерина связывают со способностью снижать уровень HIF-1 α в гипоксических опухолевых тканях, что ведет к подавлению ангиогенеза и оказывает проапоптотическое действие. С помощью газовой хроматографии в плазме крови этих мышей обнаружено присутствие нитроглицерина и его метаболитов, что расценено как показатель эффективного всасывания нитроглицерина в кровь

при трансдермальном введении [14, 18, 27, 28, 33, 35].

При внутривенной трансплантации мышам клеток меланомы B16F10, предварительно инкубированных в течение 12 ч в среде с пониженным содержанием O_2 и добавлением нитроглицерина, обнаружено уменьшение числа легочных метастазов (спустя две недели после трансплантации опухоли) почти в семь раз по сравнению с контролем. Эти результаты расцениваются как указание на способность нитроглицерина подавлять метастатический потенциал гипоксических опухолевых клеток [37].

Введение нитроглицерина в программу перепрофилирования лекарств для онкологии способствовало тому, что возможность применения нитроглицерина в онкологической клинике была изучена в нескольких ретроспективных и проспективных клинических исследованиях [33].

В ретроспективных исследованиях обнаружено, что эффективность химиотерапии обычно была выше у больных, которым химиотерапия проводилась на фоне приема нитроглицерина в связи со стенокардией по сравнению с больными, которые нитроглицерин не получали. В проспективных исследованиях в основном оценивалась возможность повышения эффективности стандартной химиотерапии при добавлении к ней нитроглицерина. Большая часть этих исследований выполнена при немелкоклеточном раке легкого. Нитроглицерин применяли в виде пластыря, обеспечивающего постоянное регулируемое поступление препарата в кровь.

Результаты этих исследований противоречивы. Регистрировалось как улучшение (по всем показателям) результатов стандартной комбинированной химиотерапии немелкоклеточного рака легкого при сочетании с нитроглицерином, так и отсутствие достоверного улучшения медианы времени до прогрессирования и общей выживаемости больных, хотя в нескольких исследованиях отмечалось увеличение частоты непосредственного объективного эффекта [33].

В проспективном исследовании изучено влияние длительного (в течение двух лет) трансдермального введения нитроглицерина в низких дозах (0.03 мг/ч) на динамику изменения уровня простатического специфического антигена у больных РПЖ. Обнаружено, что применение нитроглицерина замедлило темп его роста — время удвоения уровня простатического специфического антигена увеличилось с 13.3 месяцев до применения нитроглицерина до 31.8 месяцев [33].

В рандомизированном контролируемом исследовании показано, что применение нитроглицерина через катетер перед введением липокаина/доксорубина увеличивает непосредственную эффективность хемоземболизации печени у

больных гепатоцеллюлярным раком печени. [33]. В небольшом исследовании фазы I не зарегистрировано улучшения результатов при добавлении нитроглицерина к неoadъювантой химиолучевой терапии рака прямой кишки [33].

К числу органических нитратов — доноров NO, у которых обнаружена существенная противоопухолевая активность, относится глицидилнитрат, который генерирует NO в результате селективной биоактивации в опухолевых клетках, что было показано на клетках меланомы M21 и плоскоклеточного рака мышей SCC VII. Цитотоксичность самого глицидилнитрата в опытах *in vitro* и его противоопухолевый эффект *in vivo* на этих опухолях были незначительны, однако комбинация препарата с цисплатиной и гамма-облучением приводила к существенному достоверному усилению эффективности этих воздействий. Показано, что введение глицидилнитрата мышам с трансплантированной опухолью SCC VII усиливает кровоток в опухоли, не меняя кровоток в окружающих нормальных тканях. Предполагается, что этот эффект определяет химио- и радиосенсибилизирующее действие глицидилнитрата. Важной особенностью глицидилнитрата считают низкую токсичность — максимально переносимая доза у мышей составляла 150 мг/кг [3, 38].

Большую группу доноров NO, обладающих существенной противоопухолевой активностью, составляют N-диазениумдиолаты, которые состоят из диолатной группы $[N(O)O^-NO^-]$, соединенной через атом азота с нуклеофильными аминами, включая первичные или вторичные амины или полиамины, и содержат терминальную нитрозильную группу. Соли диазениумдиолатов относительно стабильны в высшем состоянии солидном состоянии, но способны высвобождать в водной среде в физиологических условиях 1.5–2.0 моля NO на один моль исходного соединения с временем полувыведения NO от нескольких секунд до нескольких часов [3, 19].

К наиболее изученным диазениумдиолатам с выявленной противоопухолевой активностью относятся DETA/NONOate (диэтилентриамин NONOate), DEA/NONOate (диэтиламин NONOate), PAPA/NONOate (пропиламинпропиламин/NONOate), JS-K (*O*-(2,4-dinitrophenyl)-1-[(4-ethoxycarbonyl) piperazin-1-yl]diazene-1,2-diolate). Важной особенностью этих доноров оксида азота является достаточно большое время высвобождения NO ($t_{1/2}$ составляет десятки минут или часы).

Среди этой группы соединений большое внимание привлек JS-K, генерирующий NO *in situ* после активации в реакции с глутатионом, катализируемой глутатион-S-трансферазой (GST). В организме функцией GST является катализ конъюгации ксенобиотиков с глутатионом, ведущую

к выбросу ксенобиотика из клетки. Внутриклеточное образование NO из JS-K происходит в результате катализируемого GST нуклеофильного ароматического замещения глутатином с образованием диазенимдиолатного аниона (diazoniumdiolate anion), который спонтанно гидролизуетсся с образованием двух эквивалентов NO. Об участии GST в образовании NO свидетельствуют результаты экспериментов, в которых зарегистрировано при введении ингибитора GST (Cibastop Blue) снижение на 66% высокого уровня NO, индуцированного в клетках множественной миеломы под действием JS-K [20].

Установлено, что для многих опухолей характерна гиперэкспрессия GST и этот феномен дает основания полагать, что введение JS-K приведет к более высоким интрацеллюлярным концентрациям NO в опухолевых клетках по сравнению с нормальными. Показано, что, например, цитотоксичность JS-K в отношении клеток почечно-клеточного рака примерно в 10 раз превосходит цитотоксичность в отношении клеток нормального почечного эпителия (линии HREpC, SV-HUC-1); ингибирование пролиферации клеток множественной миеломы регистрируется при концентрациях JS-K, не оказывающих цитотоксического эффекта на нормальные мононуклеары периферической крови и стромальные клетки костного мозга, на нормальные фибробласты кожи (линия BJ-5ta) [20, 21, 39].

В стандартной культуральной среде JS-K относительно стабилен, время его полураспада составляет 5 ч. Однако он быстро и полностью метаболизируется клетками. С помощью жидкостной хроматографии /масс спектрометрии показано, что через 30 мин после добавления JS-K в культуру клеток лейкоза U937 в результате взаимодействия JS-K с глутатином время полураспада JS-K составляет 30 мин, выход NO составляет 1.7 моля на 1 моль JS-K. После одночасовой инкубации клеток с JS-K зарегистрировано значительное снижение концентрации GSH и снижение отношения GSH/GSSG [40].

При исследовании зависимости «структура–антипролиферативная активность» ряда структурных аналогов JS-K установлено, что наибольшее значение для реализации цитотоксичности имеет наличие двух нитрогрупп (NO₂) в ароматическом кольце молекулы JS-K [39]. О существенной роли генерации NO в цитотоксическом действии JS-K свидетельствует значительное, до 75%, снижение цитотоксичности под действием перехватчиков NO – кобаламина и N-ацетил-L-цистеина [20].

Цитотоксический эффект JS-K показан на клетках разных опухолей (рак легкого, толстой кишки, яичников, РПЖ, почки, мочевого пузыря, гепатоцеллюлярный рак, лейкозы, множе-

ственная миелома). Степень цитотоксичности зависела от типа опухолевых клеток и характеризовалась IC₅₀ равным 0.2–17.6 мкМ [5, 11, 20, 21, 39–43].

Применение JS-K в культуре клеток рака яичников, РМЖ, резистентных к доксорубину, цисплатине, митоксантрону вследствие гиперэкспрессии гликопротеина p170 и BCRP, привело к восстановлению чувствительности клеток к этим цитостатикам. В модельных экспериментах с изолированными мембранами показано, что этот эффект обусловлен прямым ингибированием АТФ-азной активности этих белков, что ведет к значительному увеличению содержания цитостатиков в клетке [5, 44]. Противоопухолевая активность JS-K (торможение роста опухолей, увеличение продолжительности жизни мышей) показана в экспериментах *in vivo* с ксенографтами разных опухолей человека (немелкоклеточный рак легкого, РПЖ, множественная миелома, лейкоз) [6, 11, 20, 40, 41].

Основное внимание в изучении противоопухолевых свойств ряда близких по структуре диазенимдиолатов – DETA/NONOate, DEA/NONOate, PAPA/NONOate – уделялось исследованию возможностей их применения в дополнение к стандартным цитостатикам. На клетках РПЖ РС-3, а также на ксенографтах этой опухоли показано, что DETA/NO усиливает апоптоз, индуцируемый TRAIL и FasL, влияя на NF-κB/Snail/YY1/RKIP сигнальный каскад в результате ингибирования NF-κB путем S-нитрозирования p50. Установлено, что комбинация DETA/NO с цисплатиной достоверно увеличивает регрессию опухоли по сравнению с применением одной цисплатины [3, 19]. DEA/NONOate усиливал цитотоксичность доксорубина на клетках MCF-7 (доля выживших клеток составила 15–20% против 40% при применении только доксорубина [25]).

В то же время в ряде экспериментов с клетками MCF-7, HT-29, A-375, HL-60 показано, что инкубация клеток с PAPA/NONOate, DEA/NONOate значительно снижает цитотоксичность ингибиторов топоизомераз – этопозида, камптотецина. Этот эффект связывают с способностью NO или его метаболитов ингибировать АТФ-азную активность топоизомераз в результате реагирования с SH-группами этих белков и тем самым подавлять их каталитическую активность, что было обнаружено в модельных экспериментах с очищенным ферментом. Результатом является исчезновение мишени для действия препаратов и развитие резистентности к ним [16, 45–47]. 12-часовая инкубация клеток меланомы B16F10 мышей с DETA/NONOate (1fM) в среде с пониженным содержанием O₂ (1%) приводила к уменьшению числа легочных метастазов с 35.5 ± 13.1 в контроле до 7 ± 14.4 через две недели после внут-

ривенного введения этих клеток мышам C₅₇Bl/6. Этот результат рассматривается как подтверждение способности NO подавлять метастатический потенциал гипоксических опухолевых клеток [37].

Как указывалось выше, в настоящее время противоопухолевые свойства обнаружены у синтетических (экзогенных) ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [8, 29, 30, 32, 48]. Эти комплексы, существующие в моно- и биядерной формах, могут выступать в живых организмах в качестве не только доноров молекул NO, но и доноров катионов нитрозония, способных связываться с тиоловыми группами белков и низкомолекулярных соединений, с образованием соответствующих S-нитрозотиолов [49–51].

Высвобождение NO из ДНКЖ *in situ* может обеспечиваться эндогенными хелаторами железа, перехватывающими на себя железо, в результате чего молекула ДНКЖ распадается с высвобождением по две молекулы NO и по два иона нитрозония (NO⁺) на один железо-динитрозильный фрагмент в этих комплексах [49–51]. О таком механизме распада ДНКЖ свидетельствуют, в частности, результаты изучения цитотоксического действия комплекса ДНКЖ с тиосульфатом на клетки лейкоза человека линии Jukart. Обнаружено, что одновременное с ДНКЖ применение хелатора железа (N-methyl-D-glucamid ditiocarbamat) значительно усиливает апоптотическую гибель лейкемических клеток, индуцированную высвобождавшимися из ДНКЖ катионами нитрозония [52]. Предполагается, что механизм распада ДНКЖ под действием хелаторов железа обеспечивает определенную селективность действия ДНКЖ на опухолевые клетки, поскольку в них имеется гиперпродукция такого рода хелаторов, необходимая для обеспечения железом интенсивно пролиферирующих опухолевых клеток [32, 48].

Антипролиферативные свойства ДНКЖ были впервые обнаружены на модели экспериментального доброкачественного эндометриоза крыс, когда было показано, что внутрибрюшинное введение комплекса ДНКЖ с глутатионом (ДНКЖ-Г) полностью подавляло рост быстро растущих эндометриом, возникающих после внутрибрюшинной имплантации фрагментов эпителия матки крыс [53, 54].

Цитотоксичность комплексов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами показана при культивировании с ними разных опухолевых клеток — HeLa, PC-3, SKBR, CRL5866, MCF-7 [8, 29–31, 55]. Цитотоксичность на клетках PC-3 характеризовалась выраженной апоптотической гибелью клеток, ассоциированной с подавлением экспрессии антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-xl) [8].

Противоопухолевая активность комплексов ДНКЖ с различными лигандами установлена в экспериментах *in vivo* с трансплантируемыми опухолями мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома молочной железы мышей Ca-755, аденокарцинома толстой кишки Акатол). Обнаружено, что внутрибрюшинное и внутривенное введение этих комплексов приводит к дозо- и времязависимому торможению роста опухолей до 90–70% в зависимости от типа опухоли, способа и схемы введения препарата, дозового режима, природы лиганда в комплексе. Следует отметить, что в этих экспериментах зарегистрирован нелинейный характер зависимости эффекта от дозы, которая проходит через максимум [29, 30, 32, 48, 56, 57].

Авторы работы [8] обнаружили ингибирование роста ксенографтов РПЖ человека РС-3 на 95% при внутривенном введении комплекса монопядерного ДНКЖ с двумя тиолсодержащими фрагментами производными этилмеркаптана (S(CH₂)OH и S(CH₂)NH₃). Показано, что апоптотическая гибель опухолевых клеток при применении этого препарата опосредована NO, высвобождающимся из ДНКЖ.

О влиянии природы лиганда на противоопухолевую активность комплексов ДНКЖ свидетельствуют результаты сравнительного изучения ростиногибирующей активности ДНКЖ-Г и комплекса ДНКЖ с меркаптосукцинатом. Оба препарата вызывали дозо- и времязависимое торможение роста карциномы Льюис, однако противоопухолевая активность ДНКЖ-Г была существенно выше — зарегистрированное максимальное торможение роста опухоли этими препаратами составляло соответственно 90 и 65% [58].

При сравнительном изучении противоопухолевой активности двух ДНКЖ-Г, различающихся на порядок по содержанию в них свободного глутатиона (1:10), зарегистрировано более эффективное действие ДНКЖ-Г с повышенным содержанием глутатиона — торможение роста карциномы Льюис составило 85 и 70% соответственно. Предполагается, что это обусловлено стабилизирующим влиянием свободного глутатиона на биядерные ДНКЖ [56].

Методом ЭПР обнаружено различие в накоплении в опухоли и нормальных тканях парамагнитной формы ДНКЖ после внутрибрюшинного введения ДНКЖ-Г. Концентрация монопядерных ДНКЖ в ткани карциномы Льюис составила 1.2 ± 0.5 нмоль/мг влажной ткани, в селезенке и легких — 0.31 ± 0.1 и 0.25 ± 0.05 нмоль/мг влажной ткани соответственно. Это наблюдение рассматривается как подтверждение определенной избирательности распределения ДНКЖ-Г в организме животных с преимущественным накоплением в ткани опухоли [56].

Получены данные, указывающие на меньшую эффективность ДНКЖ в опытах *in vitro* по сравнению с экспериментами *in vivo* на трансплантированных опухолях. Эти данные рассматриваются как указание на участие иммунокомпетентных клеток в реализации противоопухолевого эффекта ДНКЖ в условиях *in vivo*, что определяется способностью этих клеток, например, макрофагов эффективно включать в себя ДНКЖ с последующей направленной транспортировкой этих комплексов к злокачественным опухолям и их поступлением из макрофагов в опухолевую ткань [30, 58].

Вместе с тем ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как правило при низких дозах, способны оказывать на клеточные культуры положительное действие, усиливающее их жизнедеятельность. Такое действие моноядерных ДНКЖ с тиомочевинной было продемонстрировано в работе [59] в опытах на культурах фибробластов легких человека и кардиомиоцитов крыс. Более того, оказалось, что эти комплексы защищали кардиомиоциты от токсичности, индуцированной доксорубицином [59].

Цитотоксической и противоопухолевой активностью обладает S-нитрозоглютацион, являющийся биологическим носителем NO, выделяющегося из S-нитрозоглютациона после распада S-N-связи [30].

Показано, что GSNO дозозависимо подавляет рост клеток в культурах клеток рака толстой кишки человека линий HCA7, HT29, HCT116. При концентрации GSNO в культуральной среде 10–20 мкМ подавления роста клеток не регистрировалось, концентрации 50–100 мкМ достоверно замедляли рост клеток по сравнению с контролем, концентрации 300–500 мкМ практически полностью блокировали пролиферацию клеток.

Во всех трех линиях GSNO вызывал время- и дозозависимое увеличение числа апоптотических клеток с максимальным эффектом через 72 ч инкубации при концентрациях GSNO 300 и 500 мкМ. Увеличение числа апоптотических клеток коррелировало со снижением количества клеток в фазе G1 без изменения других параметров клеточного цикла [10]. Противоопухолевая активность GSNO была обнаружена также в опытах с перевиваемыми солидными опухолями мышей (карцинома легких Льюис и аденокарцинома Ca-755), при которых внутрибрюшинное применение GSNO дозозависимо тормозило рост опухолей на 60–90% [30].

Введение GSNO внутривенно мышам линии SCID с ксенографтами кастрационно-резистентного РПЖ линии 22RV1 тормозило рост опухоли, при этом в опухолях регистрировалось достоверное увеличение уровня NO по сравнению с контролем, снижение числа К-67-положительных

клеток, уменьшение опухоль-инфильтрирующих противовоспалительных макрофагов (M2) и усиление продукции провоспалительных макрофагов (M1). Считают, что этот эффект является одним из механизмов реализации противоопухолевого действия NO. Следует отметить, что *in vitro* GSNO не влиял на пролиферацию клеток 22RV1 [23].

На клетках рака толстой кишки HT29, резистентных к доксорубину, показано, что инкубация этих клеток с GSNO приводила к восстановлению чувствительности клеток к доксорубину, ассоциированному со снижением выброса доксорубина из клеток и нитрованием тирозина в молекуле белка множественной лекарственной устойчивости MRP3 [23].

Любопытно, что, как было показано в работах [4, 60], в качестве донора NO может выступать продукт модификации одного из компонентов ракетного топлива – RRx-001 (bromoacetyl-3,3-dinitroazetidine, ABDNAZ, C₅H₆BrN₃O₅). Оказалось, что это соединение обладает способностью одновременно генерировать в организме АФК и выступать в роли донора NO. В результате развивается и оксидативный, и нитрозативный стресс, вызывающий гибель опухолевых клеток [4, 60]. На 11 клеточных линиях разных опухолей человека была зарегистрирована цитотоксичность RRx-001 (IC₅₀ составляет 2.3–6.0 ммоль/л), достоверно не отличающаяся от цитотоксичности на этих клетках цисплатины. На клетках SCC VII показано, что цитотоксичность RRx-001 в условиях гипоксии более чем в четыре раза превосходит цитотоксичность этого соединения при нормоксии (IC₅₀ составлял 0.14 и 0.66 ммоль/л).

В экспериментах с клетками рака толстой кишки человека линии HT29 и мышшиной опухоли SCC VII обнаружено, что культивирование клеток с RRx-001 ведет к значительному повышению внутриклеточной концентрации АФК и появлению двунитевых разрывов ДНК. Эти данные дали основания считать индукцию в опухолевых клетках оксидативного стресса одним из механизмов цитотоксического и противоопухолевого действия RRx-001.

Способность RRx-001 выступать в качестве донора NO в результате отщепления нитрогрупп в процессе метаболизма препарата связывают с обнаруженным в опухолях SCC VII драматическим увеличением кровотока и объема крови через 6 ч после внутривенного введения препарата и сохраняющееся на этом уровне в течение 48 ч, что приводило к усилению эффекта облучения опухолей [60, 61]. Этот эффект был обусловлен вазодилатирующим действием NO, высвобождавшимся из RRx-001. Кроме того, связываясь с β-цистеином дезоксигенированного гемоглобина, RRx-001 усиливал *in situ* в условиях гипоксии,

присущей злокачественным опухолям, каталитическое превращение неорганического сывороточного нитрита в NO, ведущее к нитрозативному стрессу и к гибели опухолевых клеток. Было установлено также, что после введения RRx-001 быстро, необратимо и селективно связывался также с глутатионом, что вело к возрастанию оксидативного стресса, с последующим быстрым удалением аддукта RRx-001 с глутатионом из организма [4, 60, 61].

Предполагается, что одним из механизмов противоопухолевого действия RRx-001 может быть воздействие на контрольные точки иммунитета. В опытах *in vitro* и *in vivo* с клетками рака легкого A549 показано усиление фагоцитарной активности опухоль-ассоциированных моноцитов/макрофагов, которая в опухолях подавлена в результате гиперэкспрессии CD47 опухолевыми клетками и SIRP- α макрофагами [62].

В предклинических токсикологических исследованиях показано, что RRx-001 не обладает значимой клинически токсичностью: при ежедневном применении у мышей в течение 14 суток дозо-лимитирующей токсичности обнаружено не было. Низкая токсичность препарата была подтверждена во время фазы I–II клинических испытаний Rrx-001, при этом не зарегистрировано случаев гипотензии, головных болей и метгемоглобинемии, что связывают со способностью RRx-001 селективно доставлять NO в опухоль. Сообщалось о двух случаях клинического улучшения длительностью шесть–десять месяцев у больных метастатическим раком толстой кишки, ставших резистентными к химиотерапии, и о восстановлении чувствительности к химиотерапии после применения RRx-001 [3, 4, 22, 63, 64]. FDA и EMA разрешена фаза III мультцентровых клинических испытаний препарата [64].

В качестве донора NO исследуется препарат Saquinavir-NO (Saq-NO), полученный в результате ковалентного присоединения молекулы NO к известному ингибитору протеазы Saquinavir (Saq), обладающему активностью против вируса иммунодефицита человека.

Цитотоксическую активность Saq-NO, зарегистрированную в опытах *in vitro* с клетками меланомы A375 человека, связывают с влиянием на белки внутриклеточных сигнальных путей. Показано, что культивирование этих клеток с Saq-NO в течение 12 ч индуцирует апоптоз опухолевых клеток, ассоциированный с гиперэкспрессией АКТ и снижением продукции pERK. Показано также, что Saq-NO повышает эндогенный синтез iNOS и увеличивает чувствительность клеток меланомы к TRAIL.

Однако исследование Saq-NO на клетках рака толстой кишки человека линии HCT116 и мышей CT26CL25 показало, что цитотоксический эф-

фект соединения на этих клетках не зависит от NO. Об этом свидетельствовало незначительное увеличение уровня NO в клетках после применения Saq-NO и сохранение эффекта после одновременного введения перехватчика пероксинитрита [65]. На ксенографтах меланомы A375 и на перевиваемом раке толстой кишки мышей CT26CL25 при введении Saq-NO отмечено значительное торможение роста обеих опухолей и снижение метастазирования штамма CT26CL25 [66, 67].

В качестве эффективного донора NO рассматривается препарат с названием GIT-27NO, представляющий собой модифицированный NO противовоспалительный препарат VGX-1027 ((S,R)-3-фенил-4,5-дигидро-5-изаксолуксусная кислота). На клетках рака толстой кишки человека (HCT116) и мышей (CT26CL25) показана значительная цитостатическая активность, а на ксенографтах РПЖ (PC-3, LnCap) и на перевиваемом раке толстой кишки мышей (CT26CL25) — существенное торможение роста опухоли. В клетках, культивируемых с GIT-27NO, обнаружена высокая генерация нитритов, а применение перехватчика пероксинитрита полностью блокировало цитостатический эффект препарата. Гибель клеток при применении GIT-27NO происходила по каспазозависимому пути апоптоза [65, 67].

История противоопухолевой химиотерапии показывает, что значительный скачок в повышении эффективности лекарственной терапии рака обычно обусловлен появлением новых классов препаратов, отличающихся механизмами действия от уже применяемых. Примерами могут служить производные платины, таксаны, молекулярно-ориентированные препараты, ингибиторы контрольных точек иммунитета. Тем не менее проблема повышения эффективности терапии рака остается актуальной.

В этой связи обнаружение цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активности у доноров оксида азота, совершенно нового для противоопухолевой химиотерапии класса веществ, следует рассматривать как важную веху в истории противоопухолевой химиотерапии. Приведенные в настоящем обзоре результаты разнообразных исследований противоопухолевых свойств разных доноров NO дают основания полагать, что продолжение исследований в этой области весьма перспективно.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. J. Ignarro, *Nitric Oxide Biology and Pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
2. B. K. Sinha, *Cancer Sci. Ther.* **8**, 244 (2016). Doi:10.4172/1948-5956.1000421
3. Z. Huang, J. Fu, and Y. Zhang, *J. Med. Chem.* **60**, 7617 (2017). DOI: 0.1021/asc.jmedchem.6801672
4. B. Oronsky, G. R. Fanger, N. Oronsky, et al., *Trans. Oncol.* **7** (2), 167 (2014). DOI: 10.1016/j.tranon.2014.02.001
5. B. K. Sinha, L. Perera, and R. E. Cannon, *Biomed. Pharmacother.* **120**, 109468 (2019). DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109468
6. Y. Soni, K. Softness, H. Arora, et al., *Am. J. Men's Health* **14** (1), 1557988320903191 (2020). DOI: 10/1177/1557988320903191
7. F. Vannini, K. Kashfi, and N. Nath, *Redox Biol.* **6**, 334 (2015). DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.009
8. S. G. Wu, C. Y. Lu, Y. L. Chen, et al., *Inorg. Chem.* **55**, 9383 (2016). DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6B01562
9. H. Wang, L. Wang, Z. Xie, et al., *Cancers (Basel)* **12** (7), 1881 (2020). DOI: 10.3390/cancers12071881
10. Q. Liu, S.T. Chan, and R. Mahendran, *Carcinogenesis* **24** (4), 637 (2003). DOI: org/10.1093/carcin/bgg014
11. A. T. Maciag, H. Chakrapani, J. E. Saaverdra, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336** (2), 313 (2011). DOI: 10.1124/j.pet.110.17404
12. Z. Huang, L. Liu, J. Chen, et al., *Biomed. Pharmacother.* **107** (11), 1385 (2018). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.142
13. S. K. Chaudhary, M. Chaudhary, S. Bagde, et al., *Word J. Surg. Oncol.* **11**, 118 (2013). DOI: 10.1186/1477-7819-11-118
14. V. Sukhatme, G. Bouche, L. Mehens, et al., *Ecancer* **9**, 568 (2015). DOI: 10.3322/ecancer2015.568
15. B. K. Sinha, A. Kumar, and R. P. Mason, *Biochem. Biophys. Rep.* **10**, 252 (2017). DOI: 10.106/j.bbrep.2017.04.011
16. A. Kumar, M. Enrenshaft, J. E. Tokar, et al., *Biochem. Biophys. Acta* **1860** (7), 1519 (2016). Doi:10.1016/j.bbagen.2016.04.009
17. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика* **64** (3), 552 (2019).
18. B. Bonavida, *Drug Resist. Update* **9** (3), 157 (2006). DOI: 10.1016/j.drug.2006.05.003
19. B. Bonavida and S. Baritaki, *Nitric Oxide* **24**, 1 (2011). DOI: 10.1016/j.niox2010.10.001
20. T. Kiziltepe, T. Hideshima, K. Ishitsuka, et al., *Blood* **110** (2), 709 (2007). DOI: 10.1182/blood-2006-10-05845.
21. M. Qui, L. Chen, G. Tan, et al., *Sci. Rep.* **5**, 15104 (2015). DOI: 10.1038/screp.15104
22. E. Hays and B. Bonavida, *Antioxidants (Basel)*. **8** (9), 497 (2019). DOI: 10/3390/antiox8090407
23. H. Arora, K. Panara, M. Kuchakulla, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (44), 11298 (2018). DOI: 10.1073/pnas.18127004115.
24. C. Riganti, E. Miraglia, D. Viarisio, et al., *Cancer Res.* **65** (2), 16 (2006).
25. C. B. Eving, E. E. Kelley, C. J. Weyert, et al., *Nitric oxide* **10** (3), 119 (2004). DOI: 10.1016/j.niox.2004.03.006
26. I. D. Barsoum, K. Hamilton, Y. Li, et al., *Cancer Res.* **71** (24), 7433 (2011). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2104
27. D. R. Siemens, N. Hu, A. D. Sheikh, et al., *Cancer Res.* **68** (12), 4746 (2008). DOI: 10.1158/0008-5742.Can-08-0054
28. I. B. Barsoum, C. A. Smallwood, D. R. Siemens, et al., *Cancer Res.* **74** (3), 665 (2013). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0992
29. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **64** (6), 1216 (2019). DOI: 10.1134/s0006302919060218
30. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65** (1), 48 (2020). DOI: 10.3185/s00063029200119968
31. A. F. Vanin, L. A. Ostrovskaya, and D. B. Korman, *Austin J. of Anal. Pharm. Chem.* **5** (3), 1104 (2018). DOI: 10.26420/austinjanalpharmchem.2018.1104
32. M. M. Reynolds, S. D. Witzeling, V. B. Demodaran, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 647 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.201.01.041
33. Д. Б. Корман, *Практическая онкология* **18** (1), 139 (2017).
34. N. E. Matthews, M. A. Adams, L. R. Maxwell, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **93** (24), 1879 (2001).
35. L. J. Frederiksen, R. Sullivan, M. A. Maxwell, et al., *Clin. Cancer Res.* **13** (7), 2199 (2007). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1807
36. H. Nagai, H. Yasuda, Y. Hatachi, et al., *Inter. J. Oncol.* **41** (1), 24 (2012). DOI: org/10.3892/ijo.2012.1461
37. L. M. Postovit, M. A. Adams, G. E. Liash, et al., *Inter. J. Cancer* **108**, 47 (2004). DOI: 10.1002/j.ijc.11556
38. S. Ning, M. Bednarski, B. Oronsky, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **447**, 537 (2014).
39. H. Chakrapani, R. C. Kalthur, A. E. Maciag, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9764 (2008). DOI: 10.1016/j.bmc.2008.09.063
40. A. E. Maciag, R. L. Holland, Y. S. Cheng, et al., *Redox Biol.* **1** (1), 115 (2013). DOI: 10.1016/j.redox.2012.12.002
41. P. J. Shami, J. E. Saavedra, I. Y. Wang, et al., *Mol. Cancer Ther.* **2**, 409 (2003).
42. Z. Liu, G. Lin, Y. Gou, et al., *Biomed. Pharmacother.* **92**, 989 (2017). DOI: 10.1016/j.biopha.2017.05.141
43. L. Liu, Z. Huang, J. Chen, et al., *J. Cell Biochem.* **119**, 6633 (2018). DOI: 10/1002/jcb.26845
44. B. K. Sinha, C. D. Bortner, R. P. Mason, et al., *Biochem. Biophys. Acta. Gen. Sub.* **1862** 2806 (2018). DOI: 10/1016/j.bbagen.2018.08.21
45. B. K. Sinha, A. Kumar, S. Shattachajee, et al., *J. Pharm. Exper. Ther.* **347**, 607 (2013). DOI: 10.1124/jpet.113.207928

46. N. K. Sharma, A. Kumar, A. Kumari, et al., *PloS One* **10**: e0141897 (2015). DOI: 10/1371/journal.pone.0141897
47. B. K. Sinha, S. Bhattacharjee, S. Chatterjee, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 379 (2013).
48. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **62**, 591 (2017).
49. A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).
50. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.* **77**, 279 (2019).
51. A. F. Vanin, *Appl. Magn. Res.* **51**, 851 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01270-6
52. A. L. Kleschyov, S. S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1340 (2006)
53. N. Y. Giliano, L. V. Konevega, L. A. Noskin, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 151 (2011).
54. E. N. Burgova, N. A. Tkachev, O. V. Paklina, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 37 (2014)
55. E. N. Burgova, Y. I. Christidis, A. V. Kurkov, et al., *Cell Biochem. Biophys* **77**, 89 (2019).
56. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60** (1), 152 (2015).
57. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **60** (6), 1157 (2015).
58. А. Ф. Ванин, Л. А. Островская, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **65** (5), 1009 (2020).
59. N. P. Akentieva, N. A. Sanina, A. R. Gizatullin, et al., *Front. Pharmacol.* **10**, 1277 (2019)
60. J. Scinski, B. Oronsky, S. Ning, et al., *Redox Biol.* **6** (1), (2015). DOI: 10.1016/j.redox.2015.07.002
61. S. Ning, M. Bednarski, B. Oronsky, et al., *Cancer Res.* **72** (10), 2600 (2012). DOI: 10.1158/0008-5472.CAV-11-2303
62. P. Calabreses, *Transl. Oncol.* **19** (4), 626 (2019). DOI: 10:1016/tranon.2018.12.001
63. T. Reid, S. Dad, R. Kom, et al., *Case Rep. Oncol.* **7** (1), 79 (2014). DOI: 10.1159/000358382
64. C. A. Carter, B. Oronsky, S. Caroen, et al., *Case Rep. Oncol.* **9** (2), 285 (2016). DOI: 10.1159/000446209
65. M. Mojic, S. Mijatovic, D. Marsimovic-Ivanic, et al., *Mol. Pharmacol.* **82** (4), 700 (2012). DOI: 10.1124/mol.112.077842
66. S. Mijatovic, D. Marsimovic-Ivanic, M. Mojic, et al., *J. Cell Physiol.* **226** (7), 1803 (2011). DOI: 10.1002/jcp.22513
67. M. Donia, M. Mijatovic, D. Marsimovic-Ivanic, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **615** (1), 228 (2009). DOI: 10.106/j/ejphar.2009.04.069 .

Nitric Oxide Donors as Potential Antitumor Agents

D.B. Korman*, L.A. Ostrovskaya*, and A.F Vanin**, ***

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

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

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

The review examines the role of nitric oxide as one of the universal regulators of metabolic processes of living organisms. The results of experimental studies in the field of NO and cancer are presented. The antitumor and cytotoxic effects of various nitrogen oxide donors are described, and the mechanisms of their action are discussed.

Keywords: nitric oxide, nitric oxide donors, experimental models of animal tumors, human tumor cell culture

ТРАНСПОРТ ГЛИЦЕРИНА В МИТОХОНДРИИ

© 2021 г. А.И. Даль*, Н.Л. Векшин**

*Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

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

E-mail: aleksandrina.dal@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 06.12.2020 г.

Рассмотрен вопрос о поступлении молекул глицерина (в нефосфорилированной форме) внутрь митохондрий. С помощью спектрофлуориметрии и ИК-Фурье-спектроскопии продемонстрировано эффективное связывание глицерина с митохондриальными мембранами из печени крысы. Методами полярографии и турбидиметрии показано, что в малых концентрациях (0.1–0.4 мМ) глицерин повышает проницаемость внутренней мембраны для субстратов – НАДН и сукцината, а в больших концентрациях сильно повреждает мембраны. Глицерин в малых концентрациях усиливает потребление кислорода интактными митохондриями (в изотонической среде) на НАДН или на сукцинате, а в больших – угнетает. В гипотонической среде глицерин сразу начинает подавлять НАДН-дегидрогеназу, но не сукцинатдегидрогеназу. Полученные данные позволяют заключить, что глицерин может сам по себе напрямую транспортироваться (пассивно по градиенту) внутрь митохондрий, а не только в форме глицерофосфата. Предполагается, что глицерин, взаимодействуя с липидами и белками, формирует во внутренней мембране каналы для проникновения себя и субстратов.

Ключевые слова: митохондрии, глицерин, потребление кислорода, НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, дыхательная цепь

DOI: 10.31857/S0006302921020071

Общепринято, что глицерин транспортируется внутрь митохондрий в форме альфа-глицерофосфата, образующегося в цитоплазме [1]. В печени имеется фермент глицеролкиназа, катализирующий в цитозоле фосфорилирование глицерина в глицерофосфат, который проникает в митохондрии и превращается в 3-фосфоглицериновый альдегид. Внутри митохондрий имеется своя фосфоглицериндегидрогеназа, отдающая электроны и протоны в дыхательную цепь, что сопровождается синтезом двух молекул АТФ. Значительная часть глицерина, образующегося при гидролизе липидов, используется для их ресинтеза [1].

Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что некоторое количество добавленного глицерина ингибирует сукцинат-зависимое дыхание митохондрий (хотя мало влияет на шунтирующие реакции переноса электронов к искусственным акцепторам) [2]. Представляет интерес подробнее изучить способность глицерина влиять на активность дегидрогеназ дыхательной цепи. Главное – важно понять, может ли глицерин сам по себе (в нефосфорилированном виде) проникать извне

внутри митохондрий. Выяснение этих вопросов и было целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фракцию митохондрий из печени крысы выделяли по стандартной методике с небольшими модификациями [2], все растворы охлаждали на льду. Печень крысы помещали в 40 мл ледяной среды выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 0.5 мМ ЭГТА и 10 мМ HEPES (pH 7.5), после чего ее продавливали через пресс, добавляли 40 мл той же среды и затем проводили гомогенизацию в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения неразрушенных клеток. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 20 мин при 3500 g (тяжелая фракция митохондрий). Полученный осадок осторожно гомогенизировали в 5–8 мл среды выделения и затем брали для опытов (хранили на льду и использовали в течение нескольких часов).

В полярографических опытах изотоническая среда инкубации митохондрий содержала 150 мМ

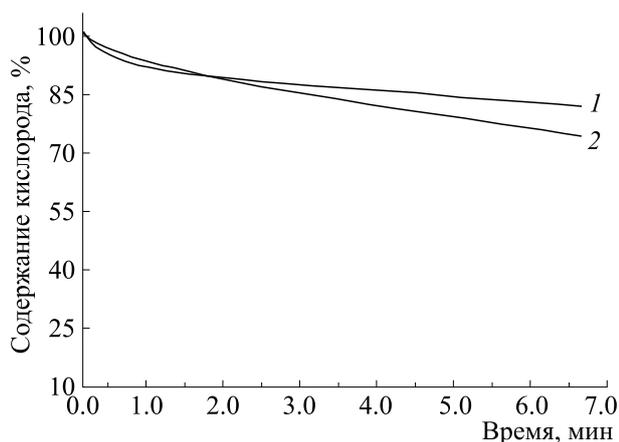


Рис. 1. Потребление кислорода в суспензии печеночных митохондрий (2 мг /мл) в изотонической среде при добавке 1 мМ НАДН (1) и то же в присутствии 400 мкМ глицерина (2). По оси ординат – содержание кислорода в процентах (100% соответствуют 250 мкМ в воде при нормальном атмосферном давлении).

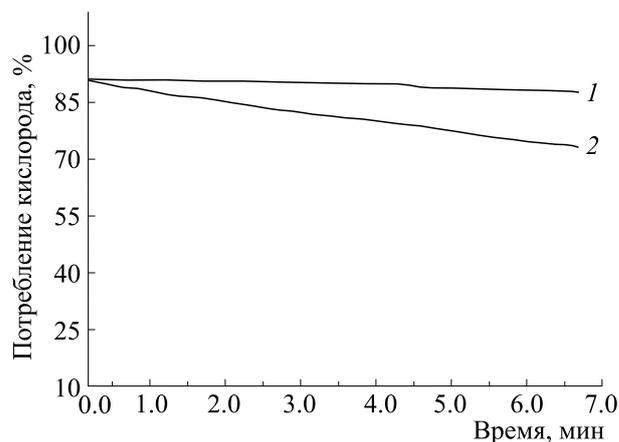


Рис. 2. Потребление кислорода в суспензии митохондрий в изотонической среде при добавке 1 мМ сукцината (1), то же самое в присутствии 400 мкМ глицерина (2).

сахарозы и 10 мМ трис-фосфатного буфера (рН 7.0). Гипотоническая среда инкубации содержала только 40 мМ хлорида натрия (рН 7.0).

Измерение потребления кислорода суспензией митохондрий в герметичной ячейке объемом 2.6 мл при перемешивании (в изотонической или гипотонической среде при добавлении сукцината или НАДН) проводили полярографическим методом с использованием термооксиметра «Эксперт-001» (ООО «ЭкониКС», Россия) с электродом Кларка.

Светорассеяние митохондрий измеряли турбидиметрически при 700 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре «ПЭ-5400УФ» (ООО «ПромЭкоЛаб», Санкт-Петербург) по оптической плотности мутной суспензии. Концентрацию митохондриального белка определяли на том же приборе по оптической плотности триптофановых остатков при 286 нм (после разрушения митохондрий детергентом додецилсульфатом натрия, устраняющим светорассеяние) [3].

Спектры ИК-поглощения митохондриальных суспензий, помещенных и высушенных на прозрачных пластинах фторида кальция, регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре FT-801 («Симекс», Новосибирск). Образцы получали путем центрифугирования суспензий без глицерина (контроль) и в присутствии 100–400 мкМ глицерина (опыт). Супернатанты отбрасывали и высушивали 50 мкл осадка на пластинах с помощью конвекции теплого воздуха. Для ИК-спектроскопии митохондрии специально выделяли в 300 мМ хлорида натрия – без добавления сахарозы и дру-

гих реагентов, мешающих измерениям в средней ИК-области.

Спектры триптофановой флуоресценции белков разбавленных суспензий митохондрий (0.1–0.3 мг/мл) регистрировали на спектрофлуориметре SLM-4800 (SLM Inc., США) при возбуждении на 286 нм в кварцевых микрокуветах с длиной оптического пути 0.4 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость дыхания изолированных митохондрий лимитируется в первую очередь проницаемостью внутренней мембраны для добавляемых субстратов дыхательной цепи [4]. Внутренняя мембранная НАДН-дегидрогеназа, активный центр которой обращен в матрикс, слишком медленно окисляет НАДН, добавленный к свежевыделенным нативным митохондриям в изотонической среде, именно из-за своей низкой проницаемости (нет никакой «внешней» НАДН-дегидрогеназы в наружной мембране [2, 4]). Молекула сукцината, имеющая гораздо меньший размер, чем молекула НАДН, лучше проникает внутрь митохондрий и поэтому окисляется с более заметной скоростью [4].

При добавлении небольших (0.1–0.4 мМ) количеств глицерина к суспензии свежевыделенных печеночных митохондрий, помещенных в изотоническую среду, наблюдается активация НАДН-зависимого (рис. 1, табл. 1) и сукцинат-зависимого дыхания (рис. 2, табл. 1). Активация вызвана тем, что молекулы глицерина повышают проницаемость внутренней мембраны. Глицерин, встраиваясь в отдельные участки липидной фазы, вероятно, нарушает их (рис. 3). В результате НАДН и сукцинат легче входят внутрь, где и

Таблица 1. Скорость потребления кислорода (в мкМ/мин/мг) в суспензии печеночных митохондрий

Глицерин, мкМ	0	100	200	400	900
Скорость на НАДН в изотонии	28 ± 3	43 ± 3	39 ± 3	50 ± 4	41 ± 3
Скорость на сукцинате в изотонии	11 ± 3	17 ± 3	26 ± 3	81 ± 5	34 ± 3
Скорость на НАДН в гипотонии	120 ± 5	90 ± 5	50 ± 4	40 ± 4	—
Скорость на сукцинате в гипотонии	145 ± 5	110 ± 5	120 ± 5	130 ± 5	—

Примечание. Концентрация митохондрий в суспензии – 2 мг/мл. Изотоническая среда: митохондрии выделяли в среде, содержащей сахарозу – 250 мМ, ЭГТА – 0.5 мМ, НЕРЕС – 10 мМ, рН 7.4; для полярографии использовали изотоническую среду, содержащую сахарозу – 150 мМ, трис-фосфатный буфер – 10 мМ, рН 7.0. Гипотоническая среда: митохондрии выделяли в 300 мМ NaCl, для полярографии использовали дистиллированную воду (2 мл), добавляя туда митохондрии (0.5 мл), концентрация NaCl в итоге составляла 40 мМ..

окисляются в активных центрах своих дегидрогеназ.

Зависимость дыхания от концентрации глицерина имеет сложный характер как в случае НАДН, так и в случае сукцината (рис. 4, табл. 1). При малых количествах глицерина в обоих случаях имеет место ускорение, обусловленное повышением мембранной проницаемости, а в более высоких – угнетение, что может быть связано как с прямым действием глицерина на дегидрогеназы, так и со слишком сильным повреждением мембран или (и) торможением ферментов за счет высокой микровязкости при связывании глицерина в активном центре. О повреждении свидетельствует уменьшение светорассеяния суспензии митохондрий. Так, при добавлении глицерина свыше 0.9 мМ наблюдалось падение величины светорассеяния (измеряемого по величине оптической плотности при 700 нм) с 1.7 до 0.8, что обусловлено выходом оптически плотного матричного содержимого наружу из-за резкого повышения проницаемости внутренней мембраны (этот вопрос был подробно рассмотрен в работе [4]).

В гипотонической же среде, когда проницаемость внутренней мембраны велика и НАДН окисляется достаточно быстро, глицерин подав-

ляет дыхание уже в малой концентрации (рис. 5). Нужно отметить, что в гипотонических условиях кислород при окислении НАДН потребляется не только на цитохромоксидазе, но и непосредственно на НАДН-оксидазе [4]. Добавление глицерина в небольших концентрациях в гипотонических условиях приводит к существенному угнетению НАДН-зависимой дыхательной активности (рис. 6, табл. 1). Местом приложения глицерина тут является сам НАДН-дегидрогеназный комплекс I, а не другие комплексы дыхательной цепи, включая цитохромоксидазу. Это следует из того, что сукцинатоксидазная активность (в условиях гипотонии) глицерином почти не угнетается (рис. 6).

Подавление НАДН-зависимого дыхания глицерином трудно объяснить тривиальным повышением вязкости раствора, так как вязкость возрастает не слишком сильно: с ~1 сП (водный раствор) до 1.8 сП (0.4 мМ глицерина) [5]. Против тривиального эффекта вязкости говорит также

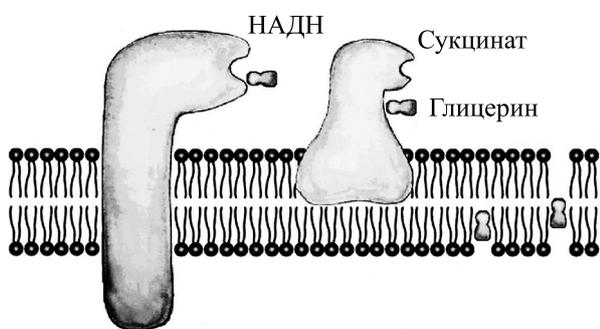


Рис. 3. Схема точек приложения глицерина во внутренней митохондриальной.

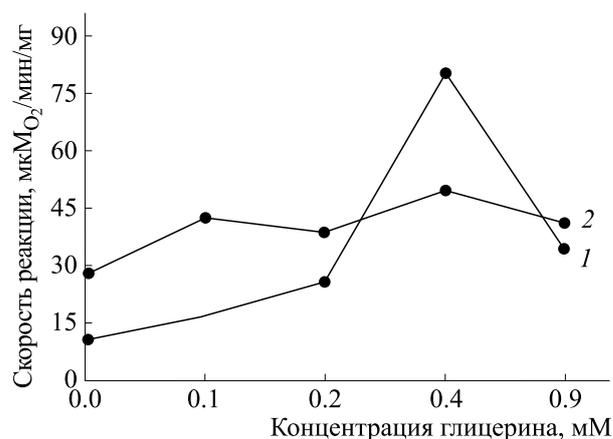


Рис. 4. Зависимости скорости сукцинат-оксидазной (1) и НАДН-оксидазной (2) реакции в суспензии митохондрий в изотонической среде от концентрации глицерина.

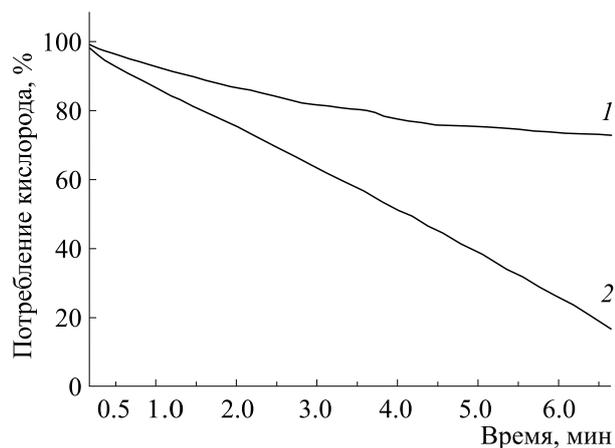


Рис. 5. Потребление кислорода в суспензии митохондрий в гипотонической среде (40 мМ NaCl) при добавке 1 мМ НАДН в присутствии 400 мкМ глицерина (1) и без глицерина (2).

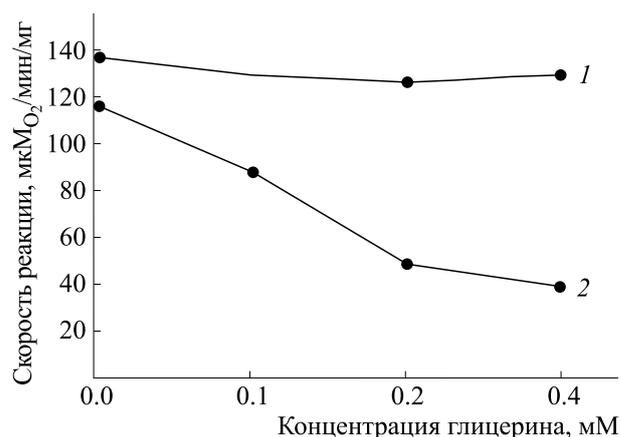


Рис. 6. Зависимости скорости сукцинат-оксидазной (1) и НАДН-оксидазной (2) реакции в суспензии митохондрий в гипотонической среде от концентрации глицерина.

то, что глицерин почти не влияет на скорость сукцинатзависимого дыхания (табл. 1). Из полученных данных следует, что глицерин действует непосредственно на НАДН-дегидрогеназный комплекс I (рис. 3), но не на дыхательные комплексы II, III и IV.

Возможны четыре причины угнетающего действия глицерина на окисление НАДН комплексом I (рис. 3): а) повышение вязкости в районе активного центра фермента; б) аллостерическое ингибирование; в) конкурентное ингибирование; г) повышение вязкости липидной фазы. В первых двух случаях молекула глицерина воздействует на фермент путем образования с ним трех водородных связей. В третьем случае молекула глицерина, входя в карман фермента, мешает вхождению туда молекулы НАДН. В чет-

вертом случае глицерин мешает диффундировать убихинону, который должен снимать электроны с НАДН-дегидрогеназы.

Судя по действующим концентрациям глицерина, его константа связывания с мембранами митохондрий достаточно велика и составляет не менее 10^4 M^{-1} . Глицерин может хорошо связываться с мембранными липидами и белками за счет формирования сразу трех водородных связей своими тремя гидроксильными группами.

Существенное связывание глицерина с митохондриальными мембранами подтверждается прямыми данными ИК-Фурье-спектроскопии (рис. 7). Главный вклад в ИК-поглощение теней митохондрий, потерявших матрикс, дают мембранные белки [4]. Широкая интенсивная полоса

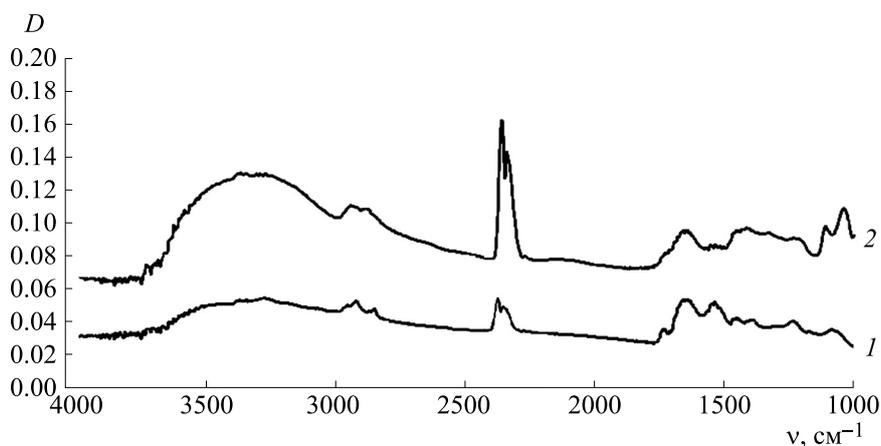


Рис. 7. Спектры ИК-поглощения высушенных теней митохондрий (на поверхности окошка из фтористого кальция) без добавок (1) и с мембранно-связанным глицерином (2). Митохондрии выделяли из печени в растворе 0.3 М NaCl (без сахарозы, триса и ЭГТА).

Таблица 2. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции белков митохондрий от добавления глицерина и дейтерированного глицерина

Длина волны, нм	Интенсивность триптофановой флуоресценции митохондрий, отн. ед.	То же + 0.1 мМ глицерина	То же + 0.1 мМ дейтероглицерина
320	0.94	0.57	1.28
355	1.05	0.71	1.48
380	0.53	0.36	0.72

в районе 3300 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями ОН-групп и NH-групп (белковый Амид А); дуплет в районе 2900 см^{-1} обусловлен валентными колебаниями ОН- и СН-групп белков и липидов; небольшая полоса в районе 1660 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями СО-групп (белковый Амид I), а также деформационными колебаниями ОН-групп молекул связанной воды, оставшейся после высушивания образца; небольшой пик при 1540 см^{-1} (Амид II) вызван деформационными колебаниями NH-групп. При связывании глицерина с митохондриями резко усиливается широкая полоса при $3300\text{--}3400\text{ см}^{-1}$, что связано с валентными колебаниями трех ОН-групп глицерина. Деформационный дуплет глицерина при 1050 см^{-1} в мембранах заметно усилен в сравнении со спектром самого глицерина (на рисунке сам глицерин не показан). Поскольку при связывании глицерина наблюдается снижение белкового пика при 1540 см^{-1} , то это говорит о том, что молекулы глицерина связываются не только в липидной фазе, но также образуют комплексы с поверхностями мембранных белков. Кроме того, при связывании глицерина с мембранами усиливается пик при 2300 см^{-1} , принадлежащий углекислому газу, имеющемуся в мембранах и в глицерине (фоновый сигнал углекислого газа воздуха был вычтен). Общая приподнятость ИК-спектра теней митохондрий в присутствии глицерина по сравнению с тенями митохондрий без глицерина обусловлена большим светорассеянием этого образца (поэтому при оценке интенсивностей белковых полос вклад этой бесструктурной полосы вычитали).

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что глицерин способен сам по себе напрямую транспортироваться (пассивно по градиенту) внутрь митохондрий, а не только в форме глицерофосфата. Он эффективно связывается с митохондриальными мембранами, формируя каналы и повышая проницаемость внутренней мембраны для субстратов — НАДН и сукцината. Проникая внутрь, он подав-

ляет прежде всего работу НАДН-дегидрогеназного комплекса I.

Факт связывания глицерина с мембранами нативных митохондрий подтверждается данными по изменению их белковой триптофановой флуоресценции (табл. 2). Глицерин тушит триптофановую флуоресценцию, акцептируя вибронную энергию на валентные колебания групп —ОН и —СН, а дейтероглицерин (D8), наоборот, усиливает — благодаря увеличению квантового выхода флуоресценции триптофана в окружении тяжелых групп —OD и —CD.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность А.В. Чаплыгиной, М.С. Фроловой и А.Н. Дойниковой за помощь в работе.

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. М. Кокс и Д. Нельсон, *Основы биохимии Лениндже-ра* (Москва, 2017).
2. И. В. Шарова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **49** (5), 814 (2004).
3. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
4. Н. Л. Векшин, *Биофизика митохондрий* (Фотон-век, Пушкино, 2019).
5. *Краткий справочник физико-химических величин*, сост. Н. М. Барон и др. (Химия, Л., 1974)..

Glycerol Transport in Mitochondria

A.I. Dal* and N.L. Vekshin**

*Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

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

Particular emphasis is placed on the entry of glycerol molecules (in a non-phosphorylated form) into the mitochondria. Spectrofluorimetry and FTIR spectroscopy have revealed that glycerol is effectively bound to mitochondrial membranes from rat liver. By using polarography and turbidimetric methods it was shown that at low concentrations (0.1–0.4 mM) glycerol increases the permeability of the inner membrane for substrates, such as NADH and succinate, and at high concentrations it strongly damages membranes. Low glycerol concentrations increase but high concentrations of glycerol suppress oxygen consumption of intact mitochondria suspended in an isotonic medium with NADH or succinate added. In a hypotonic medium, glycerol immediately begins to suppress NADH dehydrogenase, but not succinate dehydrogenase. The data obtained provide evidence for a conclusion that glycerol itself can directly transported (passively along a gradient) into the mitochondria, and not only in the form of glycerophosphate. It is assumed that glycerol, while interacting with lipids and proteins, forms channels in the inner membrane for the penetration of itself and substrates.

Keywords: mitochondria, glycerol, oxygen consumption, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, respiratory chain

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНДУКТОРОВ ФЕРРОПТОЗА НА МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫСЫ

© 2021 г. А.С. Фефлер*, М.В. Иванова**, К.Б. Шумаев**, ***, Э.К. Рууге*, **

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

**ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

***ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: ruuge@mail.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 15.01.2021 г.

С помощью оптической спектроскопии проведено исследование моделей окисления липидов мембран митохондрий сердца крысы. Эффективность окислительного действия тестируемых железосодержащих комплексов оценивали по уровню образующихся в пробах ТБК-реактивных соединений как основных вторичных продуктов перекисного окисления. За изменением структурно-конформационных характеристик липидов митохондриальных мембран под действием инициаторов окисления следили с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых меток. Для наблюдения за изменениями суспензии митохондрий некоторое время выдерживали с прооксидантами (как правило, миоглобин с гидропероксидом кумола). В качестве спиновых меток были использованы 5-доксилстеариновая и 16-доксилстеариновая кислоты, парамагнитные NO-фрагменты которых прикреплены к разным участкам углеводородной цепи. Использованные модели окисления позволили получить препараты мембран митохондрий с разной степенью окислительной модификации. Установлено, что инициаторы окисления гидропероксид кумола (или трет-бутила) с миоглобином приводили к потере парамагнетизма встроенных в мембраны спиновых меток

Ключевые слова: ферроптоз, сердце, митохондрии, окисление липидов, спиновые метки, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302921020083

Термин ферроптоз для описания нового механизма регулируемой клеточной гибели был впервые предложен в 2012 г. [1]. Ферроптоз – это процесс гибели клеток, зависящий от железа и активных форм кислорода. Среди цитологических изменений при ферроптозе отмечают уменьшение или исчезновение митохондриальных крист и разрыв внешней мембраны митохондрий [2]. Эти внутриклеточные аномалии являются результатом потери селективной проницаемости плазматической мембраны из-за интенсивного перекисного окисления липидов и развития окислительного стресса. Гибель ферроптотических клеток может быть остановлена липофильными антиоксидантами, хелаторами железа и истощением полиненасыщенных ацилов жирных

кислот фосфолипидов, которые являются основными субстратами летальных для клеток процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов [3, 4]. Ферроптоз является основным механизмом гибели клеток, связанным с повреждением органов в условиях гипоксии, включая ишемические заболевания сердца, повреждение головного мозга и почечную недостаточность [5].

Ряд исследований продемонстрировал, что митохондрии играют решающую роль в ферроптозе, вызванном истощением цистеина, но не при ингибировании GPX4 [5]. Снижение уровня цистеина приводит к повышению потенциала (гиперполяризации) митохондриальной мембраны и накоплению липидных пероксидов. Ингибирование митохондриального цикла трикарбоновых кислот или цепи переноса электронов снижает гиперполяризацию митохондриальной мембраны, накопление перекисей липидов и ферроптоз [5]. Повышение потенциала митохон-

Сокращения: CumOON – гидропероксид кумола, *t*-BuOON – трет-бутилгидропероксид, МДА – малоновый альдегид, ТБК – тиобарбитуровая кислота, 5DS – 5-доксилстеариновая кислота, 16DS – 16-доксилстеариновая кислота.

дриальной мембраны отражает увеличение активности митохондриальной цепи переноса электронов и последующее образование АФК, что объясняет его роль в ферроптозе [5].

Митохондрии являются органеллами, играющими ключевую роль в окислительном метаболизме. В связи с этим важно, что ферроптоз связан с морфологическими изменениями митохондрий и окислением основного фосфолипида этих органелл - кардиолипина [4, 6], причем мишенями действия некоторых мощных ингибиторов ферроптоза, по-видимому, являются митохондрии [4, 5].

Целью настоящей работы было выяснение механизмов воздействия железосодержащих соединений – возможных индукторов ферроптоза – на мембраны митохондрий. С использованием оптической спектроскопии были изучены несколько моделей окисления липидов мембран митохондрий сердца крысы. В качестве окислителей использовали железосодержащие белки (миоглобин, гемоглобин, ферритин) или ионы Fe^{2+} в сочетании с органическими гидропероксидами, гидропероксидом кумола или трет-бутил гидропероксидом. С помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток было изучено взаимодействие 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты с липидами в митохондриальных мембранах под действием инициаторов окисления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение изолированных митохондрий. Митохондрии выделяли из сердец крыс линии Wistar (масса животных 250–300 г) методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения содержала 70 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES, 220 мМ маннитола, 1 мМ EDTA, pH 7.4. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 0–4°C. После анестезии крысы внутрибрюшинным введением уретана (1.8 г/кг массы животного) сердце вырезали и помещали в стаканчик с охлажденной средой выделения. Сердце перекладывали в охлажденную чашку Петри, освобождали от предсердий и надрезали с боков четыре раза (для лучшей отмывки от крови). После этого сердце измельчали ножницами, снова промывали раствором среды выделения и пропускали через сито из нержавеющей стали с диаметром отверстий 0.8 мм. Далее измельченную ткань переносили в гомогенизатор (стекло–тефлон), добавляли 25–30 мл среды выделения до соотношения ткань/среда выделения 1:8 и гомогенизировали две-три минуты до превращения суспензии в гомогенную. Осаждение митохондрий производили в два этапа на центрифуге К-24 (ГДР). После первого центрифугирования (10 мин, 700 g), супернатант, в котором содержа-

лись митохондрии, фильтровали и снова центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. Осадок, суспендировали в 0,2 мл среды выделения с бычьим сывороточным альбумином (3 мг/мл), переносили в маленькую пробирку и хранили во льду. Концентрация белка в митохондриальной суспензии, определенная по методу Лоури, составляла 30–35 мг/мл.

Окисление митохондрий. Окисление митохондрий (0.4 мг белка/мл) проводили в условиях интенсивного перемешивания при комнатной температуре в стеклянных пробирках ($d = 25$ мм, $h = 80$ мм). Среда инкубирования содержала 0.15 М KCl и 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7.4. Конечная концентрация инициатора окисления, гидропероксида кумола (CumOON) или *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOON), составляла 1.6 мМ. Для приготовления исходного водного раствора *трет*-бутилгидропероксида добавляли 30 мкл 70% *t*-BuOON в 1 мл H_2O . Для приготовления исходного спиртового раствора гидропероксида кумола растворяли 50 мкл 80% CumOON в 1 мл этанола. Для запуска окисления к препаратам митохондрий добавляли различные комплексы железа: 7 мкМ метмиоглобина, 1.9 мкМ метгемоглобина, 2.8 мкМ ферритина, 38.1 мкМ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (соли Мора). Концентрацию малонового альдегида (МДА) определяли по методу, описанному в работе [8], с незначительными модификациями. Отбирали по 1 мл смеси до введения инициаторов окисления, сразу после введения гидропероксида кумола (или *трет*-бутилгидропероксида), затем через 5, 10, 20, 30 мин после начала окисления, к отобраным образцам добавляли 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТБК) и 10 мкл 5 мМ бутилгидрокситолуола. Далее образцы перемешивали на вортексе, 45 мин выдерживали в кипящей водяной бане, охлаждали и центрифугировали 5 мин при 3000 g. В надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при $\lambda = 532$ нм (максимум поглощения триметинового комплекса ТБК-МДА). Концентрацию МДА вычисляли, используя коэффициент молярной экстинкции для комплекса ТБК-МДА $\epsilon = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7]. Измерения проводили на спектрофотометре Cary 60 (Agilent, Австралия).

Спектроскопия ЭПР спиновых меток 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты. Ферроптоз приводит к повреждению внешней и внутренней митохондриальных мембран [3]. Метод спиновых меток является одним из способов, который позволяет следить за изменением структурно-конформационных характеристик липидов митохондриальных мембран под действием инициаторов окисления. Для наблюдения за указанными изменениями суспензии митохондрий

выдерживали некоторое время с прооксидантами (как правило, миоглобин с гидропероксидом кумола).

Регистрацию и анализ спектров ЭПР проводили на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь). Реакционную смесь вводили в газопроницаемую PTFE Sub-Lite-Wall капиллярную трубку (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Капиллярная трубка дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов. Это обеспечивало доступ воздуха (содержит ~21% O₂) к образцу в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектра.

Характерные спектры 5-доксил- (5DS) и 16-доксилпроизводных (16DS) стеариновой кислоты в биологических мембранах представлены на рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильных радикалов чувствительны к изменениям их молекулярной подвижности и физико-химических свойств окружающей среды [9]. 5DS и 16DS характеризуются разной глубиной погружения своего парамагнитного NO-фрагмента в липидный бислой и соответственно разными скоростями вращательной диффузии. На рис. 1 показаны необходимые для анализа спектров ЭПР 5DS и 16DS параметры [8, 9]:

1) параметр порядка S , определяемый по формуле

$$S = (A'_{\parallel} - A'_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \cdot a/a'$$

где $A'_{\parallel} = 1/2\Delta H_{\parallel}$ и $A'_{\perp} \approx 1/2\Delta H_{\perp}$,

$$a' = 1/3(A'_{\parallel} + 2A'_{\perp}),$$

$$a = 1/3(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy});$$

2) время корреляции вращательной диффузии, оцениваемое по формулам

$$\tau_{+1} = 6.5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_{+1} [(I_{+1}/I_{-1})^{1/2} - 1], \text{ с,}$$

$$\text{или } \tau_0 = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 [(I_0/I_{-1})^{1/2} - 1], \text{ с;}$$

3) параметр p/h , позволяющий оценить соотношение метки, растворенной в полярной среде, к метке, встроенной в липиды биологических мембран.

В качестве объекта исследования использовали спин-меченую суспензию митохондрий сердца крысы, содержащую 100 мкМ 5DS или 100 мкМ 16DS. Запись спектров ЭПР 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты проводили при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении. Условия записи спектров ЭПР: ослабление СВЧ-мощности 5–10 дБ, амплитуда ВЧ-модуляции 0.1–0.2 мТл, коэффициент усиления 100–1000, диапазон раз-

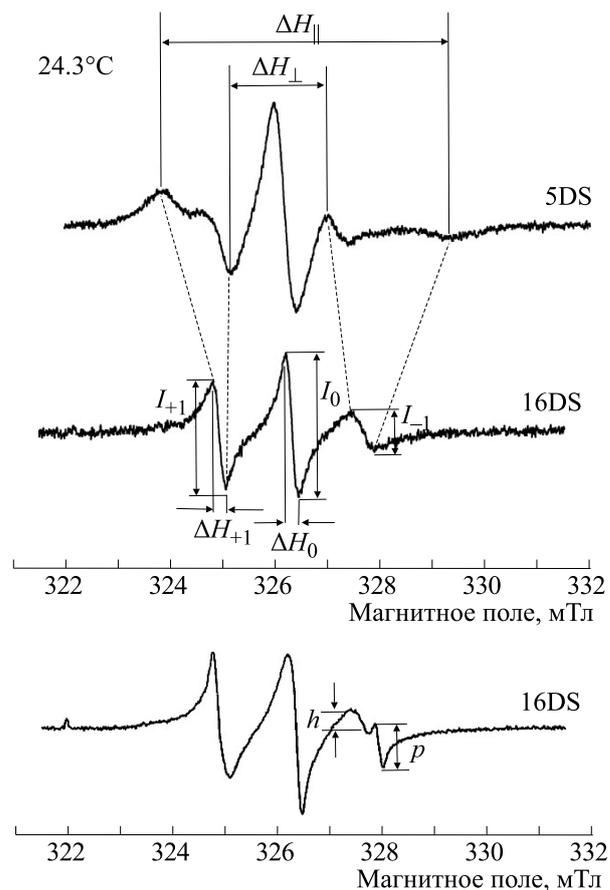


Рис. 1. Спектры ЭПР 5-доксил- и 16-доксилпроизводных стеариновой кислоты в биологических мембранах.

вертки 10 мТл. Выбор параметров определялся требованием достижения максимальной чувствительности при неискаженной форме сигнала.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (ФРГ), Aldrich (США) и других.

Статистический анализ. Эксперименты с каждой концентрацией исследуемых веществ проводили в трех-пяти повторах. Для экспериментальных групп вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие окислителей с изолированными митохондриями. В качестве окислителей в работе использовали белки, содержащие редокс-активное железо (миоглобин или гемоглобин) и ионы

Концентрации инициаторов окисления в среде инкубации

Миоглобин	Гемоглобин	Соль Мора	Ферритин	CumOОН	<i>t</i> -BuOОН
7 мкМ	1.9 мкМ	38.1 мкМ	2.84 мкМ	1.6 мМ	1.6 мМ

Fe²⁺ (соль Мора) в сочетании с органическими гидропероксидами: миоглобин + CumOОН, миоглобин + *t*-BuOОН, ферритин + CumOОН, ферритин + *t*-BuOОН, гемоглобин + CumOОН, Fe²⁺ + *t*-BuOОН, Fe²⁺ + CumOОН. Концентрации соединений в среде инкубации митохондрий указаны в таблице.

Эффективность окислительного действия тестируемых железосодержащих комплексов оценивали по образованию ТБК-реактивных соединений (МДА и другие карбонильные вторичные продукты перекисного окисления).

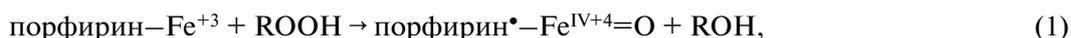
Данные о накоплении продуктов перекисного окисления мембран митохондрий в присутствии различных инициаторов окисления представлены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что комбинация гидропероксида кумола с миоглобином и гемоглобином оказывала наибольшее влияние на мембраны митохондрий: за 30 мин окисления в суспензии митохондрий образовывался МДА в количестве 14–16 нмоль/мг белка, т. е. в три раза больше, чем при добавлении других использованных в работе прооксидантов.

Следует отметить, что CumOОН более липофильное соединение, чем *t*-BuOОН. Логарифмы коэффициентов распределения этих соединений в системе «1-октанол – вода» равны 2.6 для гидропероксида кумола [11] и –1.3 для *трет*-бутилгидро-

ропероксида [12]. Гидропероксид кумола находится в основном в липидной фазе, а *трет*-бутилгидропероксид – в водной фазе. Этим можно объяснить больший эффект гидропероксида кумола на окисление мембран митохондрий по сравнению с *трет*-бутилгидропероксидом.

Различие в действии гемопротеидов, использованных для инициации окисления, возможно, вызвано отличием редокс-потенциалов ионов железа в составе миоглобина и гемоглобина. Согласно литературным данным [13], E_0' , измеренные при pH 7.0 по отношению к Ag/AgCl-электроду, равны –155 мВ и –52 мВ для миоглобина и тетрамерного гемоглобина А соответственно.

Следует отметить, что в реакциях ионов Fe²⁺ с различными гидропероксидами (так называемых реакциях Фентоновского типа) образуются свободные радикалы [4, 14]. Эти реакции играют ключевую роль в цепных процессах перекисного окисления липидов, в том числе при ферроптозе [14]. Из ферритина железо также высвобождается в виде ионов двухвалентного железа [15]. Вместе с тем при взаимодействии органических гидропероксидов с метгемом (порфирином–Fe³⁺) кроме алкоксильных (RO•) и алкилпероксильных радикалов (ROO•) формируется оксоферрильная форма гема (порфирином–Fe^{IV+4}=O) [16, 17]:



Известно, что оксоферрильные формы гемопротеидов являются чрезвычайно сильными окислителями, участвующими в окислительной модификации важных биомолекул [16].

Взаимодействие спин-меченых производных стеариновой кислоты с мембранами митохондрий. На рис. 3 представлены спектры ЭПР 5-доксилстеариновой кислоты и 16-доксилстеариновой кислоты в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре (~25°C) до добавки в реакционную смесь окислителей – индукторов ферроптоза.

Приведенные на рис. 3 спектр 5DS характерен для медленной вращательной диффузии спиновой метки при наличии более быстрого анизотропного вращения вокруг длинной оси молеку-

лы стеариновой кислоты. Спектральные параметры 5DS свидетельствуют также о локализации NO-фрагмента метки вблизи поверхности липидного бислоя мембран митохондрий. Вращательную диффузию 5DS в мембране можно характеризовать расстоянием между крайними экстремумами и/или параметром порядка S (см. Материалы и методы). Эти параметры следующие:

$$\Delta H_{\parallel} = 5.31 \text{ мТл}, \Delta H_{\perp} = 1.81 \text{ мТл}, S = 0.65.$$

Вращательная диффузия 16DS в мембранах митохондрий характеризуется временами корреляции и степенью анизотропии вращательного движения:

$$\tau_0 = 1.36 \cdot 10^{-9} \text{ с}, \tau_{+1} = 1.04 \cdot 10^{-9} \text{ с}, \tau_{+1}/\tau_0 = 0.76.$$

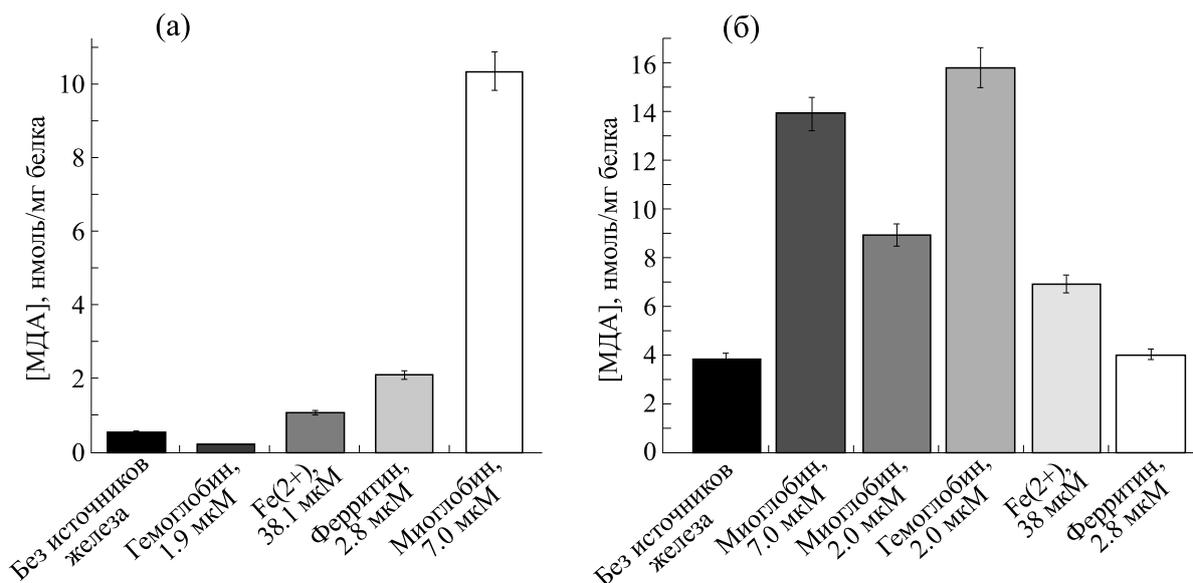


Рис. 2. Накопление МДА в суспензии митохондрий через 30 мин после добавления инициаторов окисления: (а) – соединений железа и 1.6 мМ *трет*-бутилгидропероксида; (б) – соединений железа и 1.6 мМ гидропероксида кумола.

Приведенные выше спектральные параметры являются весьма характерными для многих спин-меченых радикалами 5DS и 16DS биологических мембран.

На рис. 4а,б представлены спектры ЭПР 5DS и 16DS, записанные после добавления в инкубационную смесь возможных индукторов ферроптоза – соединений, вызывающих окисление липидов митохондриальных мембран. Добавленные инициаторы окисления (гидропероксид кумола или смесь гидропероксида кумола с миоглобином) приводили к небольшому изменению спектральных параметров использованных спиновых меток. Эти изменения свидетельствовали об уменьшении микровязкости (увеличении жидкостности) липидов митохондриальных мембран, однако выявленные экспериментальные различия оказались недостаточными для доказательства статистической достоверности.

Хорошо известно, что многие железосодержащие соединения в сочетании с органическими гидропероксидами способны восстанавливать нитрокислые радикалы, вызывая потерю их парамагнетизма. Эти соединения растворимы в полярной среде, однако способны также проникать внутрь биологических мембран. Действительно, из рис. 4а,б видно, что после введения в суспензию митохондрий компонентов использованной окислительной смеси – гидропероксида кумола и миоглобина – спектры 5DS и 16DS постепенно теряют свою интенсивность, по-видимому, в результате редокс-реакций парамагнитной $>N-O$ группы [18]. Это может быть как восстановление с образованием гидросиламина $>N-OH$, так и

окисление, в результате чего формируется нитрон $>N=O$, причем оба продукта диамагнитны. Соответствующие кинетические кривые образования предполагаемых диамагнитных продуктов, построенные по убыли амплитуды центральной компоненты (I_0) спектров обеих спиновых меток, приведены на рис. 5а,б. Нами установлено, что скорость процесса зависела как от доступности парамагнитного фрагмента метки для окислитель-

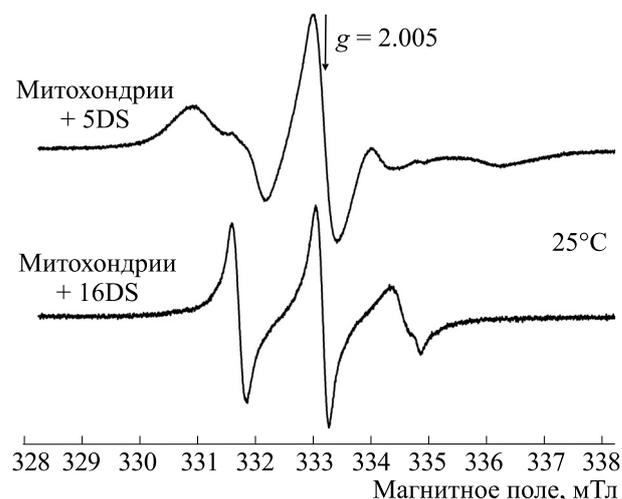


Рис. 3. Спектры ЭПР 5DS и 16DS в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре ($\sim 25^\circ\text{C}$) до добавки в реакционную смесь окислителей (индукторов ферроптоза). Образцы находились (при pH 7.4) в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2).

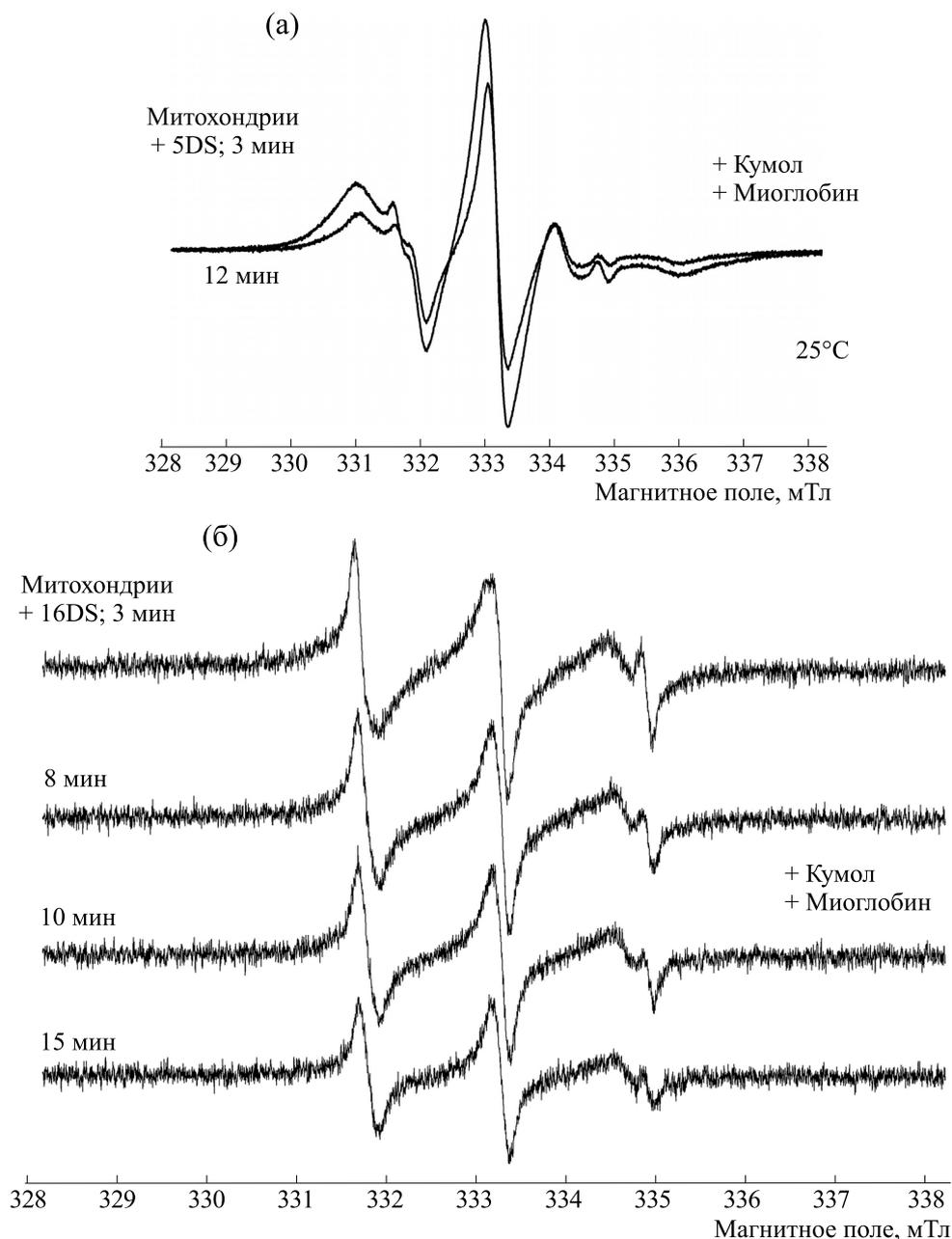


Рис. 4. Спектры ЭПР 5DS и 16DS в суспензии митохондрий сердца крысы, записанные при комнатной температуре ($\sim 25^\circ\text{C}$) до добавки в реакционную смесь окислителей (индукторов ферроптоза). Образцы находились (при pH 7.4) в газопроницаемых PTFE Sub-Lite-Wall капиллярах фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США), обдуваемых воздухом (21% O_2).

ля, так и от концентрации последнего. При добавлении 5DS или 16DS вместе с окислителем непосредственно в среду инкубации без митохондрий потеря парамагнетизма спиновых меток происходила практически мгновенно. В случае длительной инкубации митохондрий (≥ 30 мин) с окислителями перед добавлением спиновых меток 5DS или 16DS их спектральные параметры оказались стабильными. Исходя из этих данных и

реакций (1)–(3) можно предположить, что в условиях наших экспериментов в основном происходит окисление парамагнитной $>\text{N}-\text{O}$ группы спиновых зондов. Хотя нельзя исключить восстановление этой группы с участием цепи переноса электронов митохондрий.

Введение в спин-меченую радикалами 5DS или 16DS суспензию митохондрий только миоглобина не приводило к спаду интенсивности их

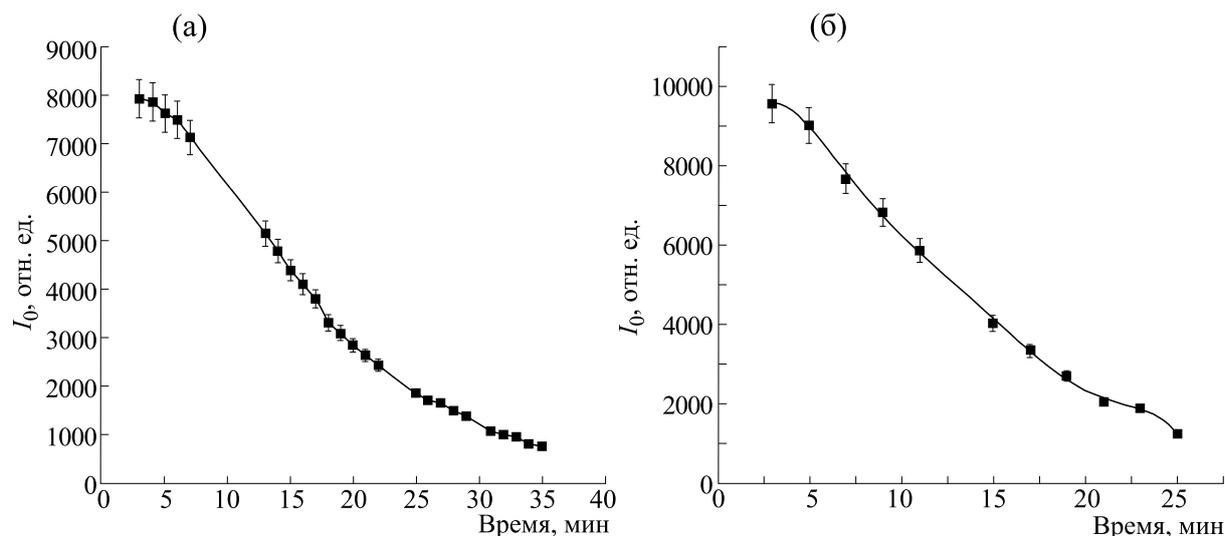


Рис. 5. Кинетические кривые образования диамагнитных производных спиновых меток в суспензии митохондрий с миоглобином и гидропероксидом кумола: (а) — для 5-DS, концентрация гидропероксида кумола 10 мМ, миоглобина 22 мкМ; (б) — для 16-DS, концентрация гидропероксида кумола 2.26 мМ, миоглобина 4.8 мкМ.

спектров ЭПР. В то же время при использовании в качестве инициатора окисления только гидропероксида кумола спектры обоих радикалов также постепенно теряли свою интенсивность. Этот факт согласуется с тем, что окисление мембран митохондрий происходит и в отсутствие внешних источников железа (рис. 2), в качестве которых могут выступать различные митохондриальные железосодержащие белки [15].

Следует отметить, что при увеличении концентрации и/или времени действия окислителей (гидропероксида кумола и миоглобина) всегда наступил момент, когда спектры ЭПР 5DS или 16DS в мембранах митохондрий больше не регистрировались. Это свидетельствовало о том, что в наших экспериментах NO-фрагменты всех молекул 5-доксилстеариновой кислоты или 16-доксилстеариновой кислоты оказались доступными для окислителей независимо от места их локализации в митохондриях. Ранее нами были проведены эксперименты с аскорбиновой кислотой — восстановителем нитроксильных радикалов. Поскольку аскорбиновая кислота не может реагировать с 5DS- и 16DS-радикалами, локализованными во внутренней мембране митохондрий, спектры ЭПР этих спиновых зондов частично сохраняют свою интенсивность. В случае действия гидропероксида кумола и миоглобина в качестве окислителей, по-видимому, происходит изменение упаковки липидов митохондрий и свободнорадикальные реакции перекисного окисления липидов распространяются и на внутреннюю мембрану, что позволяет окислителям добраться до NO-фрагмента 5DS и 16DS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было обнаружено, что ионы железа и гемовое железо приводят к усилению перекисного окисления липидов митохондрий в присутствии органических гидроперекисей. Упомянутые соединения рассматриваются в качестве индукторов ферроптоза, действие которых связано с продукцией свободных радикалов липидов и оксоферрильной формы гемовой группы.

С помощью ЭПР-спектроскопии, применяя в качестве спиновых меток 5-доксил- и 16-доксил-производных стеариновой кислоты, получены данные о воздействии на липиды мембран митохондрий сердца крысы индукторов окисления (индукторов ферроптоза). Используемые окислители (гидропероксид кумола и трет-бутила с миоглобином) приводили к постепенной потере парамагнетизма встроенных в мембраны митохондрий спиновых меток, при этом скорость процесса зависела от доступности парамагнитного фрагмента метки и концентрации окислителя. Этот процесс, по-видимому, связан с редокс-реакциями, происходящими в мембранах митохондрий при перекисном окислении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-015-00125 и 19-015-00444).

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. B. Zhou, J. Liu, R. Kang, et al., *Semin. Cancer Biol.* **66**, 89 (2020).
2. Y. Xie, W. Hou, X. Song, et al., *Cell Death Differ.* **23**, 369 (2016).
3. S. Doll and M. Conrad, *IUBMB Life* **69** (6), 423 (2017).
4. M. M. Gaschler, B. R. Stockwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419 (2017).
5. M. Gao, J. Yi, J. Zhu, et al., *Mol. Cell* **73** (2), 354 (2019).
6. S. J. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, et al., *Cell* **149** (5), 1060 (2012).
7. H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
8. R. O. Sinnhuber, T. C. Yu, *Food Technol.* **12** (1), 9 (1958).
9. M. A. Hemminga I, *Chem. Phys. Lipids* **32**, 323 (1983).
10. H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **25** (4), 709 (1956).
11. International Programme on Chemical Safety (IPCS) [Electronic resource]. URL: www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0761.htm. (Дата обращения 20.05.20)
12. International Programme on Chemical Safety (IPCS) [Electronic resource]. URL: www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0842.htm. (Дата обращения 20.05.20)
13. S. C. Dorman, C. F. Kenny, L. Miller, et al., *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **30** (1), 39 (2002).
14. R. Shah, M. S. Shchepinov, and D. A. Pratt, *ACS Cent. Sci.* **4** (3), 387 (2018).
15. K. B. Shumaev, A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, et al., *Biofactors* **44** (3), 237 (2018).
16. К. Б. Шумаев, Н. Э. Петрова, И. В. Заббарова и др., *Биохимия* **69** (5) 699 (2004).
17. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide* **18** (1), 37 (2008).
18. G. Bačić, A. Pavićević, and F. Peyrot, *Redox Biology* **8**, 226 (2016).

Effect of Ferroptosis Inductors on Rat-Heart Mitochondrial Membranes

A.S. Fefler*, M.V. Ivanova**, K.B. Shumaev**,***, and E.K. Ruuge*, **

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

**National Medical Research Centre for Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

***Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, Leninskiy prosp. 33/2

Using optical spectroscopy, we have studied the models of lipid oxidation in mitochondrial membranes isolated from rat heart. The oxidative efficiency of the tested iron-containing complexes was assessed by the level of TBA-reactive compounds formed in the samples as the main secondary products of peroxidation. Site-directed spin labeling in combination with EPR spectroscopy was used to trace changes in the structural and conformational characteristics of mitochondrial membrane lipids in the presence of oxidation initiators. Therefore, mitochondrial suspensions were incubated with prooxidants (it was generally a reaction mixture containing myoglobin and cumene hydroperoxide) for a while. In this study, we used the spin labeled molecules of 5-doxylstearic and 16-doxylstearic acid, whose paramagnetic NO-fragments are attached to different side chain positions of the hydrocarbon chain. With the use of oxidation models, it was possible to obtain preparations of mitochondrial membranes with different degrees of oxidative modification. It was found that combination of the initiators of the oxidation – cumene (or tert-butyl hydroperoxide) and myoglobin results in the failure of paramagnetic centers of the spin labeled membrane protein to serve as the probes of changes.

Keywords: ferroptosis, heart, mitochondria, lipid oxidation, spin labels, electron paramagnetic resonance

УДК 577.35

КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ МИТОХОНДРИАЛЬНО-РЕТИКУЛЯРНОЙ СЕТИ

© 2021 г. Г.В. Кудрявцева, Ю.А. Маленков, В.В. Шишкин, В.И. Шишкин, А.А. Каргунен

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: visvi@mail.ru

Поступила в редакцию 05.11.2019 г.

После доработки 05.11.2019 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

Митохондриально-ретикулярная сеть, функционально интегрированная в процессы энергообеспечения всех систем жизнедеятельности организма, рассматривается как открытая, динамическая, саморегулирующаяся организация, участвующая в обеспечении энергетического гомеостаза клетки под контролем главного энергетического индикатора – АМФ-активируемой протеинкиназы. Митохондриально-ретикулярная сеть регулируется по крайней мере тремя разнонаправленными энергетическими векторами – делением и слиянием митохондрий, а также митохондриальными механизмами апоптоза. Предложена кинетическая математическая модель функционирования митохондриально-ретикулярной сети. Поиск эффективных стратегий функционирования митохондриально-ретикулярной сети сводится к математической задаче максимизации целевой функции при наличии ограничения. Эта задача решается с помощью функции Лагранжа.

Ключевые слова: митохондрии, митохондриально-ретикулярная сеть, окислительное фосфорилирование, цепочки энергетического снабжения.

DOI: 10.31857/S0006302921020095

На современном этапе развития науки использование математического аппарата как универсального языка междисциплинарного научного общения является очевидным и общепризнанным. В биологии и медицине построение адекватных математических моделей, количественно и достаточно точно описывающих процессы и явления на молекулярном уровне, становится просто необходимым в силу их мультипараметричности и разнокачественности, а также инвазивности и чрезвычайной сложности алгоритмов проведения экспериментов как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*. Помимо важного общетеоретического аспекта математическое моделирование динамики медико-биологических функциональных систем [1, 2] имеет серьезное прикладное значение, поскольку позволяет выразить результат научного абстрагирования данной конкретной проблемы посредством, например, дифференциальных уравнений и придать таким образом полученным данным количественные динамические характеристики.

Все отмеченное выше полностью относится и к проблемам биоэнергетики. Возросший интерес

ученых к дальнейшей расшифровке биоэнергетических процессов в клетке объясняется сегодня тем, что любое нарушение митохондриальной функциональной динамики сопряжено не только с развитием «митохондриальных» болезней, но и с другими тяжелыми патологиями, системными патологическими проявлениями, старением организма, возникновением онкологических заболеваний и др. [3–12] (см. таблицу).

В представленном исследовании митохондриально-ретикулярная сеть (МРС) рассматривается с позиций теории функциональных систем [1, 2] как универсальная эукариотическая функциональная система энергообеспечения клетки, сложившаяся и закреплённая в ходе эволюционного процесса.

Целью настоящей работы явилось кинетическое моделирование энергетических процессов в клетке на примере функционирования динамической митохондриально-ретикулярной сети.

МИТОХОНДРИАЛЬНО-РЕТИКУЛЯРНАЯ СЕТЬ

Известно, что свыше 95% биологической энергии генерируется в митохондриальных структурах в результате метаболических процес-

Сокращения: МРС – митохондриально-ретикулярная сеть; ЦЭС – цепочки энергетического снабжения (дыхательная цепь митохондрий)..

Некоторые процессы и явления, связанные со степенью энергизации тканей (биоэнергетика митохондриально-ретикулярной сети)

Степень энергизации тканей	Процессы и явления
Снижение продукции АТФ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Аноксия (гипоксия) различных генезов: гемодинамическая (кровопотери, пороки сердца, тромбозы, спазм сосудов); гемоглибиновая (связывание гемоглобина токсинами и дыхательными ядами, гипогемоглибинемия различной этиологии, гемоглибинопатии). 2. Онкологические заболевания, интоксикация, окисление этанола, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, нейродегенеративный синдром, ишемия миокарда, процессы старения организма, анемии, сердечная недостаточность, грипп, гипогликемия, сахарный диабет, тромбофлебит, атеросклероз, гипотериоз, авитаминоз витаминов группы В, геморрагический шок, судороги (как результат предельного истощения АТФ). 3. Блокировка дыхательной цепи митохондрий. (Ингибиторы НАДН-дегидрогеназ: стероиды, жирорастворимые витамины, тяжелые металлы, мышьяк, фторорганические соединения, спирты, ароматические и гетероциклические соединения, ненасыщенные алифатические и циклические углеводороды. Ингибитор ФАДН-сукцинатдегидрогеназы: малонат, оксалоацетат. Ингибиторы цитохром С- оксидазы: цианиды, угарный газ, сероводород, карбоксин, ионы цинка). 4. Разобщение дыхания с окислительным фосфорилированием: протониферы (липофильные соединения, свободные жирные кислоты, билирубин, продукты перекисного окисления липидов, салицилаты, гормоны щитовидной железы, динитрофенол, пентахлорфенол, производные витамина К), ионофоры (простагландины, анестетики, полипептидные антибиотики – валиномицин, нигерицин, грамицидины А, В, С). 5. Стимулирование свободнорадикальных процессов в митохондриях (продукция активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий: ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси). 6. Необратимая кальцификация и высокоамплитудное набухание митохондрий.
Интенсификация продукции АТФ	<ol style="list-style-type: none"> 1. Активация биохимических, биофизических и физико-химических процессов. Локализация митохондрий в цитоплазме специализированных клеток в местах наибольшего энергопотребления (в поперечно-полосатой мускулатуре они сосредоточены около миофибрилл; в сперматозоидах – обвивают ось жгутика, т.к. постоянное потребление АТФ обеспечивает необходимое движение хвоста гаметы; очень много митохондрий в мотонейронах спинного мозга и клетках спинального ганглия; локализация митохондрий в нервных клетках наблюдается вблизи синапсов, что обеспечивает энергией процессы передачи нервных импульсов; митохондрии ствольных клеток распределены хаотично, поскольку энергия АТФ практически равномерно используется всеми органоидами клетки; в процессе биосинтеза белка митохондрии группируются в зонах эргастоплазмы, т.е. в зонах цитоплазмы, насыщенной РНК- рибосомами). 2. Интенсификация клеточного дыхания и скорости окислительного фосфорилирования. 3. Возрастание скорости метаболизма, объема кровотока, микроциркуляции и степени оксигенации тканей; интенсификация локального кровообращения и лимфотока. 4. Активация мембранных и лизосомальных ферментов, деполимеризация гиалуроновой и хондроитинсерной кислот. 5. Обеспечение апоптоза, как энергозависимого процесса. 6. Стимулирование репаративной регенерации тканей (очистление очага воспаления от клеточного детрита и патогенных микроорганизмов, рассасывание отеков, заживление ран, трофических язв, стимулирование остеосинтеза). 7. Активация митотической активности клеток, поддержание высокого пролиферативного потенциала клеток (например, клетки системы кроветворения, эпителиальные клетки, гепатоциты и др.). 8. Усиление адаптационно-трофических и компенсаторно-адаптивных процессов. 9. Стимуляция функциональной активности клеток и клеточных органелл (вибрация ядра, деление митохондрий), усиленная митохондриальная динамика мышечных клеток при физической нагрузке. 10. Низкоамплитудное (обратимое) набухание митохондрий. 11. Биотрансформация ксенобиотиков.

сов и мембранозависимого фосфорилирования, сопровождающего преобразование материальных пищевых субстратов и кислорода в полезную энергию макроэргических фосфоэфирных связей АТФ. Посредством митохондрий образуется основная часть макроэргов, т. е. соединений, при гидролизе которых убыль свободной энергии составляет не менее 5 ккал/моль. Установлено, что в среднем в клетках человека содержится от 100 до 500 митохондрий, занимающих в общем от 10 до 20% внутриклеточного объема. При этом в зависимости от интенсивности дыхательных процессов ткани в одной митохондрии может быть сосредоточено, например, 5000 дыхательных цепей (печень человека), или же 20000 дыхательных цепей (сердце человека). В клетках миокарда, например, насчитывается до 5000 митохондрий и, следовательно, примерно $10 \cdot 10^7$ дыхательных цепей. Отметим, что организм взрослого человека за сутки синтезирует и расходует в среднем около 40–60 кГ АТФ, при этом каждая молекула АТФ ресинтезируется свыше 2000 раз в сутки [13].

Дыхательная цепь митохондрий располагается во внутренней мембране митохондрий и представляет собой мультиферментное образование, организованное в виде четырех крупных мембранно-связанных мультиферментных комплекса. Это пример многокомпартментной электрон-транспортной системы трансмембранных белков и переносчиков электронов, заключающей в себе сложный многоступенчатый и крайне чувствительный процесс сопряжения дыхания с окислительным фосфорилированием. Процесс начинается отщеплением протона и электрона от метаболического субстрата окисления при участии наиболее уязвимого и лабильного НАДН-дегидрогеназного (НАДФН-дегидрогеназного) звена. НАДН-дегидрогеназы играют исключительно важную роль в процессе клеточного дыхания и сопряженного с ним процесса окислительного фосфорилирования. Этим ферментативным звеном дыхательной цепи митохондрий формируется свыше 40% протонного градиента. Транспорт электронов по дыхательной цепи происходит по градиенту $ox-red$ -потенциала (в порядке его убывания) и заканчивается включением неорганического фосфата в молекулу АДФ (процесс окислительного фосфорилирования) посредством АТФ-синтазы (протонная АТФ-синтаза), представленной в митохондриях в виде крупных АТФ-синтазных комплексов. АТФ-синтаза — высокоэффективная ферментативная субстанция, превращающая электрохимическую энергию в механическую и вновь — в энергию химических связей [14].

Митохондриально-ретикулярная сеть рассматривается авторами как открытая, динамическая, саморегулирующаяся организация, участвующая в

обеспечении энергетического гомеостаза клетки под контролем главного энергетического индикатора — АМФ-активируемой протеинкиназы [15]. Каждый элемент митохондриально-ретикулярной сети взаимодействует для достижения полезных адаптационных результатов: генерации и трансформации энергии в клетке. МРС регулируется по крайней мере тремя разнонаправленными энергетическими векторами — делением и слиянием митохондрий, а также митохондриальными механизмами апоптоза. Интересно, что в процессе генерации и трансформации энергии в электрон-транспортных сетях митохондрия может разогреваться до 50°C [16].

Очевидно, что архитектура МРС обладает тканевой специфичностью и напрямую зависит от метаболических особенностей клеток, их энергетических потребностей и морфофункциональной организации. В свою очередь эти положения определяют количество митохондрий в клетке, их энергоресурсный потенциал, а следовательно, — число, форму и площадь крист, плотность матрикса, толщину и степень проницаемости митохондриальных мембран и др. Специфика структурно-функциональной динамики и пространственной организации МРС являются определяющими факторами в обеспечении нормального гомеостаза клетки, а возможные нарушения морфофункционального профиля МРС ассоциируются с развитием серьезных патологических процессов и процессов старения в организме [13, 17–19].

В плане изложенного выше отметим, что по сути, МРС — это определяющий адаптационный механизм клетки, сформировавшийся в эволюции, возможно, в процессе симбиогенеза [20]. Вовлеченность МРС в работу всех систем жизнеобеспечения клетки универсальна: поддержание энергетического и кальциевого гомеостаза, контроль уровня активных форм кислорода: ионов кислорода, свободных радикалов и перекисей, оксида азота (предупреждение оксидативного стресса), биотрансформация ксенобиотиков, регуляция клеточной смерти (митохондрии — центральное звено апоптоза — программируемой клеточной смерти) [21–25].

Каждая митохондрия внутри формирует собственное поляризованное электрон-транспортное пространство, включающее в себя (на основе биологической симбиотики, функциональной и топографической компартментализации и колокализации) цепочки энергетического снабжения (ЦЭС) как аналог динамической дыхательной цепи митохондрий, представленные фермент-субстратными комплексами, метаболитами и интермедиатами энергетического пула, локализованными во внутренней митохондриальной мембране, и структурно-функциональными элементами эндоплазматиче-

ческого ретикулума [23, 26, 27]. Биологическая симбиотика в данном контексте — это совокупность взаимосвязанных и обязательных взаимодействий, складывающихся между клеткой и МРС. Функциональная и топографическая компартиментализация — это локализация и распределение (взаимное расположение, компоновка) элементов поляризованного электрон-транспортного пространства митохондрий (областей, зон-компартиментов), содержащих отдельные взаимосвязанные фермент-субстратные комплексы, которые структурно и функционально формируют цепочки энергетического снабжения. Колокализация — совместное, взаимосвязанное распределение, расположение, разноуровневое взаимодействие электрон-транспортных систем митохондрий, объединенных в ЦЭС.

Наглядно прослеживается прагматическая взаимосвязь, существующая внутри МРС между различными электрон-транспортными элементами, составляющими ЦЭС. Примем условно, что слева направо по ЦЭС передается программная информация об уровне энергизации клетки, восстребованности макроэргических фосфатов, концентрации метаболитов и значении потенциала мембраны митохондрий, а справа налево — информация о реализации заданной программы действий. Каждая данная цепочка в МРС является условно линейной и не содержит дублирующих звеньев. Консерватизм и пластичность организации всех ЦЭС в МРС распространяется на каждое звено ЦЭС, отражая принцип изоморфизма построения МРС различного уровня организованной сложности.

Основная регуляторная функция ЦЭС, ответственных за выработку макроэргических фосфатов, в норме — это расшифровка сигналов от МРС на продукцию АТФ, что в известной мере зависит от количественного содержания дыхательных ферментов. Например, в митохондриях бурого жира преобладают дыхательные ферменты по сравнению с ферментами, осуществляющими фосфорилирование АДФ. В связи с этим в митохондриях бурого жира превалируют процессы свободного окисления, не сопряженного с окислительным фосфорилированием [28]. Такой вариант функционирования МРС при нормальном обмене веществ здорового человека можно назвать пассивным, отражающим консерватизм архитектурного и функционального построения МРС. Однако, в ситуациях, требующих повышенных энергозатрат требуется их оптимизация и интенсификация работы МРС. Это уже активная функция ЦЭС, входящих в МРС, и обладающих свойством пластичности в плане того, что оптимизация уровня АТФ управляется за счет баланса между симпатической и парасимпатической регуляцией в организме. При этом доминирующую роль в процессе играют два метаболита —

сукцинат и α -кетоглутарат, связанные с адренергической и холинергической регуляцией соответственно через сукцинатдегидрогеназу и α -кетоглутаратдегидрогеназу, что имеет серьезную прагматическую мотивировку [23]. Поэтому каждая ЦЭС обладает своей системой управления, снабжается аналитической информацией и имеет свою доминанту (целевую функцию) для выбора оптимальной стратегии управления.

Важной особенностью динамики ЦЭС, входящих в МРС, является тот факт, что передача информации по каналам ЦЭС характеризуется нарастающим колебательных процессов («Bullwhip effect» или «BW-эффект») [29, 30]. Причина, возникновения BW-эффекта, по нашему мнению, может быть объяснена на основе применения теории бифуркаций. По-видимому, возникновение BW-эффекта заключается в наличии когерентных (согласованно протекающих во времени колебаний, разность фаз которых постоянна) автоколебаний самих систем управления, составляющих ЦЭС в МРС. Проявление BW-эффекта в работе МРС следует отнести за счет естественных ограничений:

- прогнозирования продукции макроэргических фосфатов в ЦЭС только в прямом направлении;
- взаимосвязями между структурной организацией и функцией МРС;
- разнокачественностью регуляторных систем самовосстановления на уровне клеточных оргanelл (митохондрии) и на уровне клетки (известно, например, что митохондриальная ДНК на порядок более уязвима по отношению к свободным радикалам, чем ядерная ДНК) [31];
- колебаниями энергетической емкости МРС в зависимости от физиологического статуса организма (норма, токсикологическое воздействие, болезнь) [32–34].

Наличие BW-эффекта носит негативный характер и может вызвать резонансные явления, парализующие работу МРС и приводящие к необратимым нарушениям (разрывам) связей в ЦЭС и даже к полному разобщению дыхания с окислительным фосфорилированием [35]. С другой стороны, резонансные взаимодействия в ЦЭС способны синтезировать некие диссипирующие (условно долгоживущие) агломераты ферментативных систем (мультиферментные комплексы), входящие в состав ЦЭС, и задающие, например (в зависимости от энергетической потребности клетки), оптимизационную программу превалирования дыхательных ферментов над ферментами окислительного фосфорилирования, и наоборот [28].

Таким образом, можно заключить, что детерминированность работы резонирующего комплекса ЦЭС обеспечивается только в том случае,

если его структура комплементарна внешнему потоку энергии и адекватно контролируется АМФ-активируемой протеинкиназой. Неопределенность и нарушения в работе МРС начинаются тогда, когда не выделена структура резонирующего комплекса и не соблюдены основные термодинамические принципы его работы: принцип экономии энтропии и принцип минимума диссипации [36, 37]. То есть чем выше энергоемкость МРС, тем меньше уровень энтропии в системе и тем большим энергетическим потенциалом она обладает.

Мы исходим из того положения, что управленческие решения в процессе работы МРС принимаются на уровне каждой митохондриальной ЦЭС исключительно в целях получения максимального положительного результата (т. е. оптимизации работы всей МРС) и имеют доминирующую мотивацию.

Система принятия решения в каждой ЦЭС представляет собой несколько функций разных мультиферментных комплексов, часть из которых является главной, а остальные — дополнительными. Главные и наиболее уязвимые звенья ЦЭС (НАДН-дегидрогеназы и протоноформное разобщение дыхания с окислительным фосфорилированием) обмениваются полной информацией посредством МРС и оптимизируют ее энергозатраты [14].

ПОСТРОЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНО- РЕТИКУЛЯРНОЙ СЕТИ

При разработке и описании кинетической математической модели работы МРС мы опирались на постулаты профессора А.В. Прасолова (СПбГУ) и ряд публикаций отечественных и зарубежных ученых [26,37].

Все звенья ЦЭС в МРС являются ее организованными структурными компонентами (мембранносвязанные мультиферментные комплексы); все ЦЭС являются замкнутыми; слева направо по ЦЭС передается программная информация об уровне энергизации клетки, востребованности макроэргических фосфатов в виде АТФ, концентрации метаболитов и значении потенциала мембраны митохондрий, а справа налево — информация о реализации заданной программы действий.

На первом этапе построения модели введем необходимые обозначения:

1. Вектор $X = \{x_k\}_{k=1}^m$ — это управляющая переменная системы МРС. Для каждого звена ЦЭС управление задается специфическими характеристиками: объемом имеющихся макроэргических фосфатов, доступностью энергетических метаболитов (в особенности янтарной и α -кетоглутаровой кислот), количественным соотношением ды-

хательных ферментов и ферментов, осуществляющих фосфорилирование АДФ, уровнем сопряженности процессов дыхания с окислительным фосфорилированием. Все эти характеристики ЦЭС, которым могут приравняться произвольные (экспериментальные) значения, являются управлениями.

2. Функции $\{f_i(X)\}_{i=1}^n$ — целевые функции всех эшелонов ЦЭС МРС. В качестве целевых функций могут выступать энергетические затраты, тогда целью является минимизация соответствующей функции; или интенсификация работы сети (синтез АТФ) — тогда решение принимается для увеличения функции. Далее мы считаем, что $f_i(X)$ — энергетическая прибыль звена ЦЭС.

3. Допустимое множество Ω стратегий X определяет интервалы значений каждой управляющей переменной X_k . Например, метаболический запрос на дополнительную энергизацию тканей (при различных напряжениях организма, развитии патологических процессов и др. — см. таблицу).

4. Эффективное Парето-множество (Парето-оптимальность) $W \subset \Omega$ является целью настоящего проекта. Внутри этого множества лежит оптимальная стратегия управления ЦЭС МРС [38]. При решении поставленной многокритериальной задачи мы исследуем вопрос сужения множества Парето на основе конечного набора квантов информации [39]. В нашем случае Парето-оптимальность — это достижение оптимальной стратегии управления ЦЭС МРС в плане оптимального обеспечения энергетических запросов клетки и биологической ткани в целом.

5. Функция полезности доминантной структуры всех ЦЭС как функциональных подсистем МРС является линейной комбинацией четырех мембранносвязанных мультиферментных комплексов, с весовыми коэффициентами, которые выбираются в зависимости от уровня различных метаболитов в клетке, поступающих в ЦЭС.

6. Вводится следующее допущение: норма энергообеспечения МРС клетки β_k рассчитывается только с учетом работы всех ЦЭС клетки (F_{main}), исключая субстратное фосфорилирование.

Норма энергообеспечения МРС исчисляется как отношение суммарной продукции митохондриальной АТФ к энергетическим затратам клетки за сутки, выраженное в процентах. С учетом того, что время жизни одной молекулы АТФ составляет в среднем минуту [14], эффективность работы каждого звена МРС определяется одной из целевых функций f_k , заданной на множестве управляющих переменных $X \in R^m$. Пусть в клетке содержится n ЦЭС, так, что $k = 1, 2, \dots, n$. Управля-

ющие переменные $X = \{x_k\}_{k=1}^m$ с точки зрения интерпретации являются здесь стратегиями поведения всей функциональной системы МРС и отдельных сегментов, в частности. После предварительного анализа системы в пространстве $X \in R^m$ выделено Ω допустимых стратегий. Предположим, что цель задачи найти стратегии, которые дают наибольшие значения всем функциям вида $f_i(X)$. Однако это не всегда возможно. Если стратегия X^* доставляет наибольшее значение сразу всем $f_i(X)$, то задача становится тривиальной: находим для каждой $f_i(X)$ множество точек максимума и ищем их пересечение. Если результат не является пустым множеством, то он и дает решение задачи. На практике, однако, ситуация является более сложной и требует громоздких вычислений (поэтому здесь мы их не приводим). Сначала из множества Ω удаляются так называемые доминируемые стратегии, то есть такие стратегии, которые можно улучшить в пределах допустимого множества Ω . Формально точку $Y \in \Omega$ назовем доминируемой, если существует $X \in \Omega$ такой области, что для всех целевых функций имеют место неравенства $f_i(Y) \leq f_i(X)$. Оставшееся после удаления множество стратегий называют эффективным множеством W (или Парето-множеством), $W \subset \Omega \subset R^m$ [39]. Эффективные стратегии обладают свойством компромиссной оптимальности в том смысле, что улучшение функционального состояния (оптимизация деятельности) одной части ЦЭС невозможно без ухудшения какой-либо другой. Отсюда следует, что необходимо знать эффективное множество W и именно в нем искать оптимальную стратегию. Для случая, когда $f_i(X)$ линейны по X , а множество Ω выпукло, разработаны численные методы оценки Парето-множества W . В представленной работе мы опираемся на две теоремы, которые обосновывают применение линейных комбинаций целевых функций $f_i(X)$, $i = 1, \dots, n$, для оценки

области W [37]. Пусть $\mu = \{\mu_k\}_{k=1}^n$ – вектор с положительными компонентами, сумма которых равна единице.

Теорема 1. Если $X^* = \arg \max_{X \in \Omega} \sum_{k=1}^n \mu_k f_k(X)$ для некоторого вектора μ , то $X^* \in W$.

Теорема 2. Если $X^* \in W$, то существует вектор μ такой, что $X^* = \arg \max_{X \in \Omega} \sum_{k=1}^n \mu_k f_k(X)$.

Если $\mu = \mu(x)$ и $\mu_k(X) > 0$ и $\sum_{k=1}^n \mu_k(X) = 1$, то теоремы останутся верны.

Множество указанных векторов μ ограничено в R^n , поэтому можно с определенной точностью проанализировать все указанные μ и для каждого вычислить наибольшее значение: $\sum_{k=1}^n \mu_k f_k(X)$.

Тогда, согласно теореме 1, получим множество $X^*(\mu)$, которое и является оценкой эффективного множества W . На данном этапе формализации предположим, что мы вычислили оценку: $\hat{w}: W \subset \hat{w} \subset \Omega \subset R^m$.

Выделим из n звеньев некие l , которые отнесем к главным звеньям цепочки энергетического снабжения, а остальные $(n - 1)$ назовем дополнительными. Для оптимизации по главной части создадим свертку целевых функций:

$$F_{\text{main}} = \sum_{i=1}^l \alpha_i f_i(x), \quad (1)$$

где $\alpha_i \geq 0$, $\sum_{i=1}^l \alpha_i = 1$.

Дополнительным звеньям предложим фиксированную норму энергообеспечения из пределов, определенных эффективным множеством W , т.е. $f_k(X) = \beta_k$, $k = l+1, \dots, n$, где $\beta_k = f_k(Y_k)$ – фиксированная норма энергообеспечения МРС клетки, рассчитывается только с учетом работы всех ЦЭС клетки (F_{main}), исключая субстратное фосфорилирование.

Подчеркнем, что норма энергообеспечения допустима в том смысле, что существует некая фиксированная норма энергообеспечения МРС β_k , которая не мешает каждому элементу цепочек энергетического снабжения максимизировать свой ресурсный потенциал и увеличить выработку АТФ. В таком случае, вопрос поиска оптимума функционирования МРС сводится к математической задаче максимизации целевой функции при наличии ограничения. Эта задача решается с помощью функции Лагранжа. Максимизация функции Лагранжа выглядит следующим образом:

$$G(X) = F_{\text{main}}(X) + \sum_{k=l+1}^n \lambda_k [f_k(X) - \beta_k], X \in W.$$

В этом плане особый интерес представляет выбор весовых коэффициентов $\{\alpha_i\}$, $i = 1, \dots, l$ в формуле линейной свертки (1). Общая целевая функция централизованной части цепочки энергетического снабжения (аналог функции полезности) задается на множество Ω , и оптимальная страте-

гия X^* доставляет ей наибольшее значение среди всех стратегий из \hat{w} .

Для каждого набора $\{\alpha_i\}$, $i = 1, \dots, l$ будет своя оптимальная стратегия.

Пусть l централизованных участков ЦЭС используют C_i ($i = 1, \dots, l$) ключевых метаболитов для синтеза АТФ. Тогда в качестве весовых коэффициентов могут рассматриваться величины, представленные дробью вида $\alpha_i = C_i / \sum_{i=1}^l C_i$. Такие распределения удовлетворяют условиям:

$$\alpha_i > 0, \sum_{i=1}^l \alpha_i = 1.$$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует учитывать, что МРС функционирует как открытая термодинамическая подсистема клетки, способная достигнуть некоего стационарного состояния, когда отток энтропии может уравновесить ее прирост. Такие системы, характеризующиеся приростом энтропии, называются диссипативными [40, 41]. В МРС, как и в любой диссипативной системе, возможно возникновение ситуации, когда внутренний прирост энтропии будет ниже ее отдачи. Именно тогда возникают и нарастают флуктуации как в самой МРС, так и во входящих в нее ЦЭС. Таким образом, намечается неравновесный фазовый переход, обусловленный флуктуациями, расширяющимися внутри ЦЭС, формирующих непосредственно саму МРС и определяющими непосредственно степень энергизации всей МРС. Баланс энтропии определяет устойчивость МРС в целом как многокомпонентной и многоуровневой функциональной системы [41, 42], и обуславливает степень ее самоорганизации при наступлении негэнтропийных фазовых переходов, вызванных нарушениями энергетического гомеостаза клетки.

МРС следует отнести к разряду сложных энергетически значимых мультипараметрических, пространственно-временных диссипативных структур клетки [40, 41], характеризующихся неравновесными фазовыми квантовыми переходами, обусловленными разрастающимися флуктуациями и развитием бифуркационных явлений непосредственно в самих ЦЭС, определяющих структурно-функциональную основу всей МРС. Энергетические процессы, происходящие в МРС, поддаются системному квантованию [43]. Генезис устойчивого энергоснабжения клетки, обусловленный функциональной динамикой МРС, генетически детерминирован, эволюционно обусловлен и в целом носит циклический ха-

рактер и непосредственно зависит от степени сопряженности процессов дыхания с окислительным фосфорилированием в митохондриальных компартментах. Оптимизация митохондриального метаболизма, установление в клетке оптимального соотношения аэробного гликолиза и дыхания – это путь преодоления возрастных изменений в организме, вектор борьбы с онкозаболеваниями и «митохондриальными» болезнями [44, 45]. И в этом отношении биологические сетевые подходы и их применение в изучении процессов старения организма, развития онкологических процессов, заболеваний различного этиопатогенеза может оказаться весьма перспективным [46].

Знание целевых функций отдельных звеньев ЦЭС дает нам возможность оценить эффективную (точнее слабо эффективную) область. Это требует конкретизации структуры системы управления: какие из звеньев ЦЭС (дыхательной цепи митохондрий) должны управляться централизованно, а какие получают относительную свободу. Централизованное управление подразумевает некоторое ранжирование энергетических ресурсов, установление приоритетов, которое формально определяется весовыми коэффициентами свертки целевых функций.

Все изложенное выше демонстрирует необходимость использования в анализе энергетической динамики работы МРС теории многофункциональной оптимизации. К сожалению, эта теория не содержит универсальных методов построения эффективных областей и их оценок. Для каждой математической модели требуется обоснование принятия решения. Поэтому нам представляется наиболее целесообразным построение моделей ЦЭС МРС в виде набора целевых функций, заданных над некоторым ограниченным множеством допустимых стратегий, с последующей оценкой эффективного множества полученных критериев и выбором главной и дополнительной частей ЦЭС. Принятие стратегического решения завершает анализ модели.

Предложенный математический проект оптимальной структурной и функциональной компоновки МРС, полностью обеспечивающий энергозапросы клетки в различных физиологических состояниях, может быть развит в следующих направлениях:

– рассмотрение дополнительных особенностей работы ЦЭС МРС (таких, например, как различные функции распределения потока энергетических метаболитов (например, сукцината и α -кетоглутарата); изменения состава и структуры (в частности, – вязкости), среды митохондриального матрикса; включение дополнительных ферментативных блоков (например, превалирование ферментов, осуществляющих фосфорилирова-

ние АДФ над дыхательными ферментами) в МРС, обеспечивающей гомеостатический баланс макроэргических фосфатов и т.п.;

– разработка численных методов оценки эффективного множества стратегий энергетической динамики МРС, основанных на знании вида целевых функций;

– анализ различных комбинаций звеньев ЦЭС МРС (например, выделение главной и дополнительных частей; выявление эффективных комбинаций централизованного, а также децентрализованного управления метаболическими процессами, минимизирующими ВВ-эффект).

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. *Физиологические системы организма*, под ред. акад. К. В. Судакова (Медицина, М., 1987).
2. П. К. Анохин, *Кибернетика функциональных систем* (Медицина, М., 1998).
3. В. Payne and P. Chinnery, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1847** (11), 1347 (2015).
4. J. Zhu and C. Chu, *J. Alzheimer's Disease* **20** (2), 325 (2010).
5. D. Wallace, W. Fan, and V. Procaccio, *Annu. Rev. Pathol.* (5), 297 (2011).
6. S. Cardoso, R. Seïqa, and P. Moreira, *Expert Rev. Neurother.* **17** (1), 77 (2017).
7. A. Grimm, A. Eckert, *J. Neurochem.* **143** (4), 418 (2017).
8. M. Ristow and K. Zarse, *Exp. Gerontol.* **45** (6), 410 (2010).
9. A. Fatokun, V. Dawson, and T. Dawson, *Br. J. Pharmacol.* **17** (8), 2000 (2014).
10. A. Y. Harin, *Nanotechnology* **28** (10), 46 (2017).
11. И. О. Мазунин, Н. В. Володько, Е. Б. Стариковская и Р. И. Сукерник, *Молекуляр. биология* **44** (5), 755 (2010).
12. C. Desler, et al., *Curr. Med. Chem.* **24** (10), 15 (2017).
13. J. Piquereau, F. Caffin, M. Novotova, et al., *Front. Physiol.* **4**, Art. No 102 (2013). DOI: 10.3389/fphys.2013.00102
14. V. P. Skulachev, *Mol. Aspects Med.* (20), 139 (1999).
15. V. I. Shishkin, V. V. Shishkin, Y. A. Malenkov, and G. V. Kudriavtseva, *Ann. Rheum. Dis.* **76** (6), 507 (2017).
16. D. Chretien, P. Benit, H.-H. Ha, et al., *PLoS Biol.* **16** (1), e2003992 (2018). DOI: 10.1371/journal.pbio.2003992.
17. S. Lorez-Arnaiz, et al. *Neurochem. Res.* **41** (1-2), 353 (2016).
18. D. Harman, *Biogerontology* **10** (6), 773 (2009).
19. A. Kuznetsov, M. Hermann, and V. Saks, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41** (10), 1928 (2009).
20. N. Lane, *J. Theor. Biol.* **434** (7), 124 (2017).
21. T. Cali, et al., *J. Biol. Chem.* **287** (22), 17914 (2012).
22. B. Westermann, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1817** (10), 1833 (2012).
23. М. В. Захарченко, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2012).
24. L. Galluzzi, I. Vitale, and S. Aaronson, *Cell Death Differ.* **25**, 486 (2018).
25. G. Kroemer, L. Galluzzi, and P. Vandenabeele, *Cell Death Differ.* **16**, 3 (2009).
26. Е. А. Метёлкин, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (МГУ, М., 2008).
27. И. С. Виноградская, Т. Г. Кузнецова и Е. А. Супруненко, *Вестн. МГУ. Сер. 16 – Биология*, № 2, 16 (2014).
28. Н. А. Кутукова, П. Г. Назаров, Г. В. Кудрявцева и В. И. Шишкин, *Успехи геронтологии* **29** (4), 586 (2016).
29. Y. Chen, J. Drezner, and D. Ryan, *Management Sci.* **46** (3), 436 (2000).
30. J. Dejonckheere, S. Disney, M. Lambrecht, and D. Towill, *Eur. J. Operat. Res.* **5**, 24 (2003).
31. C. S. Palmer, et al., *EMBO Rep.* **12** (6), 43 (2011).
32. Р. В. Деев, А. И. Билялов и Т. М. Жампеисов, *Гены и клетки* **13** (1), 6 (2018).
33. О. В. Ковалева, М. С. Шитова и И. Б. Зборовская, *Клинич. онкогематология* **7** (2), 103 (2014).
34. R. Gomez-Sintes, M. Ledesma, and P. Boya, *Ageing Res. Rev.* **32**, 150, (2016).
35. В. Hassard, *Theory and application of Hopf bifurcation* (Cambridge Univ.Press, 1981).
36. С. Д. Хайтун, *Развитие естественнонаучных взглядов о соотношении закона возрастания энтропии и эволюции. Концепция самоорганизации в исторической ретроспективе* (Наука, М., 1994).
37. А. В. Прасолов, *Математические методы экономической динамики* (Лань, СПб., 2008).
38. В. В. Подиновский и В. Д. Ногин, *Парето-оптимальные решения многокритериальных задач* (Наука, М., 2007).
39. А. С. Холево, в сб. *Итоги науки и техники, сер. Современ. проблемы математического фундаментального направления* (Наука, М., 1991), сс. 5–132.
40. И. Пригожин и Д. Кондепуди, *Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур* (Наука, М., 2002).
41. Г. Николис и И. Пригожин, *Самоорганизация в неравновесных системах: от диссипативных структур*

- к упорядоченности через флуктуации (Мир, М., 1979).
42. А. Н. Ремизов, *Медицинская и биологическая физика* (Дрофа, М., 2003).
43. Л. Аккарди, *Диалоги о квантовой механике* (РХД, М., 2004).
44. Н. В. Хундерякова и др., *Здоровье и образование в 21 веке* **19** (12), 298 (2017).
45. L. Ferrucci and E. Fabbri, *Nature Rev. Cardiol.* **15**, 505 (2018).
46. P. Zhang and Y. Itan, *Gene* **10** (10), 797 (2019).

Kinetic Modeling of Mitochondrial-Reticular Network Dynamics

G.V. Kudryavtseva, Yu.A. Malenkov, V.V. Shishkin, V.I. Shishkin, and A.A. Kartunen

Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

This study indicates a mitochondrial-reticular network, functionally integrated into the processes that provide energy to all systems of the organism as open, dynamic, self-regulatory organization involved in the energy homeostasis of the cell under the control of AMP-activated protein kinase as the main energy indicator. The mitochondrial-reticular network is regulated by at least three multidirectional energy vectors – mitochondrial fission and fusion, and mitochondrial apoptosis mechanisms. A kinetic mathematical model of mitochondrial-reticular network function is proposed. A search for effective strategies for the functioning of mitochondrial-reticular network is resolved into constrained optimization through the use of the Lagrange multiplier.

Keywords: mitochondria, mitochondrial-reticular network, oxidative phosphorylation, chain of energy supply

РЕСВЕРАТРОЛ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

© 2021 г. В.И. Бинюков*, И.В. Жигачева*, Е.М. Миль*, Н.И. Крикунова*, М.М. Расулов**

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

E-mail: zhigacheva@mail.ru

**Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, 105118 Москва, ш. Энтузиастов, 38

E-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Поступила в редакцию 25.01.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

На моделях острой гипобарической гипоксии и острого алкогольного отравления исследованы антистрессовые свойства природного полифенола ресвератрола. Острая гипобарическая гипоксия и острое алкогольное отравление приводили к росту интенсивности перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей. Активация перекисного окисления липидов сопровождалась набуханием и изменениями в содержании жирных кислот C_{18} и C_{20-22} в составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Индекс ненасыщенности C_{18} -жирных кислот снижался на 7.5% (с 1.69 ± 0.01 до 1.52 ± 0.01). При этом соотношение $(20:3\omega 6 + 20:5\omega 3)/22:6\omega 3$ для жирных кислот в условиях острой гипобарической гипоксии уменьшалось с 0.23 ± 0.02 до 0.13 ± 0.01 , что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле. Введение животным в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг ресвератрола предотвращало изменения жирнокислотного состава, активацию перекисного окисления липидов и набухание митохондрий, что влияло на физиологические показатели. Предполагается, что адаптогенные свойства ресвератрола могут быть обусловлены предотвращением перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий, что, вероятно, отражается на функциональном состоянии этих органелл, способствуя сохранению энергетического метаболизма клетки в условиях стресса.

Ключевые слова: адаптогены, митохондрии, перекисное окисление липидов, гипоксия, острое алкогольное отравление.

DOI: 10.31857/S0006302921020101

Стрессовые воздействия влекут за собой смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения содержания активных форм кислорода (АФК) в клетке [1]. При этом одним из основных источников АФК могут быть митохондрии [2]. Митохондрии являются как источником, так и мишенью для этих интермедиатов. Избыточная генерация АФК приводит к окислению белков по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждению ДНК митохондрий и смещению редокс-потенциала клетки из-за окисления глутатиона и НАД(Ф)Н [3]. Кроме того, увеличение генерации АФК вызывает пероксидацию липидов мембран, прежде всего кар-

диолипина, и набухание митохондрий. Следствием «перекисного» набухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране) является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза. Поскольку наиболее общим проявлением стресс-реакции является увеличение генерации АФК митохондриями, то, можно предположить, что препараты-адаптогены, вероятно, должны снижать генерацию АФК этими органеллами. В качестве адаптогенов, вероятно, можно использовать антиоксиданты, в частности антиоксиданты природного происхождения. К таким антиоксидантам относится ресвератрол (транс-3,4,5-тригидроксистерилбен).

Ресвератрол (рис. 1) был выделен в 1940 г. из корня белого морозника (*Veratrum album*), а затем найден в корнях японского спорыша (*Polygonum cuspidatum*) [4]. В настоящее время ресвератрол

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, ЖК – жирные кислоты, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ОГГ – острая гипобарическая гипоксия, ОАО – острое алкогольное отравление.

обнаружен как минимум в 72 видах растений [5]. Он обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [6]. Кроме того, ресвератрол предотвращает возрастные заболевания, рак кожи и осуществляет защиту от сердечно-сосудистых заболеваний [7].

Несмотря на низкую биодоступность, ресвератрол проявляет активность *in vivo* [8]. Активность ресвератрола *in vivo* можно объяснить повторным превращением как сульфатов, так и глюкуронидов ресвератрола в свободный ресвератрол в органах-мишенях, таких как печень [9, 10]. Также возможно, что комплексы ресвератрола с альбумином и липопротеинами могут взаимодействовать с клеточными мембранами, которые имеют рецепторы для альбумина и липопротеинов низкой плотности. По-видимому, комплексы диссоциируют, оставляя ресвератрол свободным и позволяя ему проникать в клетки. Другим возможным объяснением может быть биологическая активность его метаболитов.

Основной мишенью для ресвератрола являются митохондрии. Точный механизм влияния ресвератрола на функциональное состояние митохондрий еще не известен. С одной стороны, ресвератрол проявляет антиоксидантный эффект при патологиях и стрессе, с другой стороны — он проявляет прооксидантные свойства и активирует апоптоз [11]. В работах [12, 13] авторы *in vitro* и *in vivo* выявили дозовые эффекты ресвератрола. Так, была установлена стимуляция активности комплекса I ресвератролом в низких (<5 мкМ) дозах, и наоборот — подавление активности этого комплекса ресвератролом в больших (50 мкМ) дозах. Препарат предотвращал высвобождение цитохрома *c* и снижал генерацию супероксидного анион-радикала за счет активации в мембранах митохондрий разобщающего белка UCP2 [11]. Однако ресвератрол в зависимости от концентрации (12–28 мкМ) может ингибировать активность F_0F_1 -АТФазы/АТФ-синтазы митохондрий [13]. По мнению авторов, влияние ресвератрола на F_0F_1 -АТФазу/АТФ-синтазу связано с его способностью взаимодействовать с частью F1 белка. Нарушение активности F_0F_1 -АТФаз может привести к гибели клеток в результате апоптоза или некроза, в зависимости от степени ингибирования. Ингибирование активности F_0F_1 -АТФазы/АТФ-синтазы наблюдалось лишь при использовании препарата в довольно высоких концентрациях. В более низких концентрациях (от пикомолярных до наномолярных) ресвератрол стимулировал активность F_0F_1 -АТФазы [14, 15].

Необходимо отметить, что препарат повышал активность антиоксидантных ферментов и активировал экспрессию антиоксидантных генов [16, 18]. Так в опытах *in vitro* на гепатоцитах он повышал активность каталазы, супероксиддисмутазы,

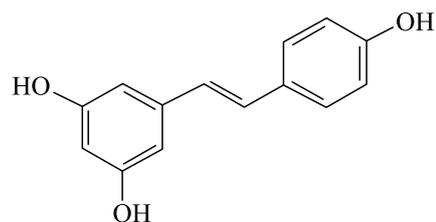


Рис. 1. Структурная формула ресвератрола.

глутатионпероксидазы, NADPH-хинон-оксидоредуктазы и глутатион-S-трансферазы. При этом ресвератрол повышал уровень Nrf2, регулирующего экспрессию антиоксидантных генов, и индуцировал его транслокацию в ядро [17]. В высоких концентрациях препарат вызывал нарушение окислительно-восстановительного статуса клетки, увеличение генерации АФК митохондриями, а также открытие митохондриальной неспецифической поры, что вело к снижению жизнеспособности клеток [19]. Эти результаты подчеркивают важность баланса между про- и антиоксидантными эффектами ресвератрола в зависимости от его дозы и возраста животных. В связи с этим целью исследования было изучение влияния ресвератрола и стрессовых воздействий на функциональное состояние митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях печени мышей линии Balb/c.

Регулирующие стандарты. Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации и в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [20], согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя, а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [21].

Мышам опытной группы внутрибрюшинно вводили $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг ресвератрола в течение 5 суток. Раствор ресвератрола готовили разведением препарата в бидистиллированной воде. Исходный раствор (1 мл) препарата ($2 \cdot 10^{-4}$ М) доводили водой до 40 мл и вводили животным препарат в объеме 0.1 мл (исходя из средней массы мышей 25 г). Контрольной группе животных внутрибрюшинно вводили 0.1 мл бидистиллированной воды.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [22]. Первое центрифугирование — при 600 g в те-

чение 10 мин, второе – при 9000 g, 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань : среда – 1 : 0.25. Среда выделения содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4.

Скорости дыхания митохондрий определяли с помощью закрытого электрода типа Кларка на полярографе LP-7E (Чехия). Среда инкубации содержала: 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ MgSO₄, 2 мМ KН₂PO₄, 10 мМ KCl, 2 мМ аскорбата, 5 мкМ ротенона, 0.9 мкМ антимицина А, 0.5 мкМ FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона) и 400 мкМ N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), pH 7.4.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [23]. Липиды экстрагировали смесью «хлороформ : метанол» = 2 : 1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии : смесь «хлороформ–метанол» = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Япония). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 360 нм, испускания – 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Исследование жирных кислот мембран митохондрий печени мышей проводили методом газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [24, 25]. МЭЖК экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм, J&W Scientific, США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку – 1 : 40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [26]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали как площадь пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результата проводили с

использованием программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных газохроматографическому анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

Индекс ненасыщенности жирных кислот (или индекс двойных связей) рассчитывали по формуле $ИДС = \sum P_j n / 100$, где P_j – относительное процентное содержание жирных кислот (ЖК) в общей липидной фракции мембран митохондрий, n – число двойных связей в молекуле ЖК.

Коэффициент ненасыщенности (K) жирных кислот определяли, как отношение \sum ненасыщенных ЖК / \sum насыщенных ЖК.

Морфологию митохондрий исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Образцы митохондрий фиксировали 2%-м глутаровым альдегидом в течение 1 ч с последующей промывкой водой и осаждением методом центрифугирования. Митохондрии наносили на поверхность кремниевой подложки и подсушивали на воздухе. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG11 с радиусом кривизны 10 нм. Некоторые геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя программный пакет «Image Analysis». Сечение проводили на высоте 30 нм. Объем имиджа митохондрий исследуемых препаратов соответствовал произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения.

Набухание выделенных митохондрий оценивали по оптической плотности суспензии митохондрий (D) при длине волны 540 нм на спектрофотометре СФ-26 (Россия). Измерение проводили в кювете объемом 2 мл при температуре 28°C. Среда инкубации митохондрий содержала: 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, pH 7.5. Концентрация белка в пробе составляла 0.3 мг/мл.

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии, острой гемической гипоксии, острой цитотоксической гипоксии и острого алкогольного отравления.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 65 мМ KCl, 10 мМ HEPES и 1 мМ KН₂PO₄, pH 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

Острую гипобарическую гипоксию (ОГГ) у мышей Balb/c моделировали в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления (230.40 мм рт. ст.), что соответствует высоте 9000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5 тысячам метров (давление 405 мм рт. ст.) над уровнем моря. В каждую последующую минуту проводили «подъем» еще на одну тысячу метров. Время пребывания крыс на «высоте» 9000 м над уровнем моря – 5.0 мин.

Острое алкогольное отравление (ОАО) вызывали введением мышам линии Balb/c массой 20–25 г перорально этанол в дозе 8 г/кг.

Острую гемическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c нитрита натрия в дозе 250 мг/кг.

Острую цитотоксическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c азида натрия из расчета 20 мг/кг.

Протекторную активность препарата определяли при введении мышам течение 5 суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола.

Использовали следующие реактивы: метанол, хлороформ, карбонат калия (Merck, Германия), сахарозу, трис, ротенон, антимицин А, ТМФД (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (свободный от жирных кислот), глутаровый альдегид (Sigma, США), NEPES (MP Biomedicals, Германия), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск концентраций ресвератрола, эффективно снижающих интенсивность ПОЛ, проводили, используя модель «старения» митохондрий печени (инкубация митохондрий в гипотонической солевой среде при комнатной температуре). «Старение» митохондрий печени мышей приводило к активации ПОЛ в мембранах митохондрий. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий возрастала в 2.5 раза (рис. 2). Введение ресвератрола в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и имело дозозависимую зависимость. В концентрации 10^{-4} М препарат не влиял на интенсивность ПОЛ в мембранах «стареющих» митохондрий. При этом в концентрации 10^{-3} М ресвератрол проявлял прооксидантную активность. В интервале 10^{-5} – 10^{-14} М ресвератрол снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Эти данные свидетельствуют о возможности использования 10^{-5} – 10^{-14} М препарата для защиты от оксидативного стресса.

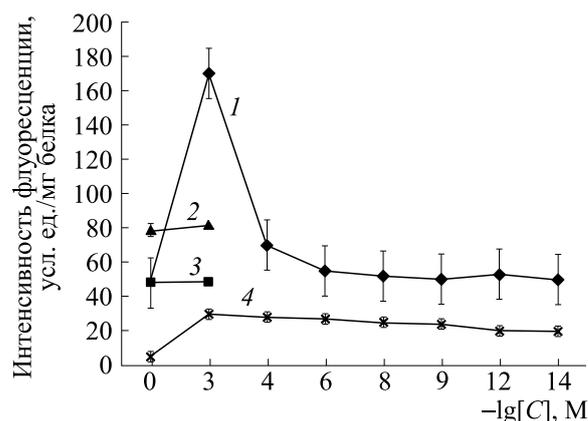


Рис. 2. Влияние «старения» митохондрий и различных концентраций ресвератрола на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа). По оси абсцисс отрицательный логарифм концентрации ресвератрола; по оси ординат – интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в усл. ед./мг белка; 1 – «старение» митохондрий с ресвератролом; 2 – уровни флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах «стареющих» митохондрий; 3 – уровни флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий группы «контроль» (без введения в среду инкубации ресвератрола); 4 – раствор ресвератрола, приготовленный в среде выделения (0.25 М сахарозы, 10 мМ NEPES, pH 7.4). Нулевая точка на кривой 4 – флуоресценция среды выделения.

Для исследования антистрессовых свойств препарата была выбрана концентрация 10^{-5} М. Поскольку выбор данной концентрации был сделан исходя из результатов изучения прямого влияния ресвератрола на изолированные митохондрии, необходимо было выяснить, окажет ли препарат в данной концентрации защитный эффект при введении его животным. Для этого ресвератрол вводили мышам в течение 5 суток в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг. Последнюю инъекцию проводили за 45 мин до выделения митохондрий. Проверку защитного действия препарата осуществляли на модели «старения» митохондрий, исследуя АСМ-изображения митохондрий различных групп животных. АСМ-изображения митохондрий печени мышей, инкубируемых в гипотонической среде, существенно отличались от контрольных образцов, инкубируемых в изотонической среде, где наблюдали митохондрии со средним объемом $V = 0.295 \pm 0.003$ мкм³, (рис. 3). В то время в условиях гипотонии объем митохондрий составлял $V = 0.555 \pm 0.003$ мкм³. Ресвератрол предотвращал набухание митохондрий: средний размер митохондрий почти не отличался от контрольных образцов. В следующей серии опытов проверку протекторных свойств препарата проводили на моделях острой ОГГ и ОАО. Выбор данных моделей обусловлен активацией пе-

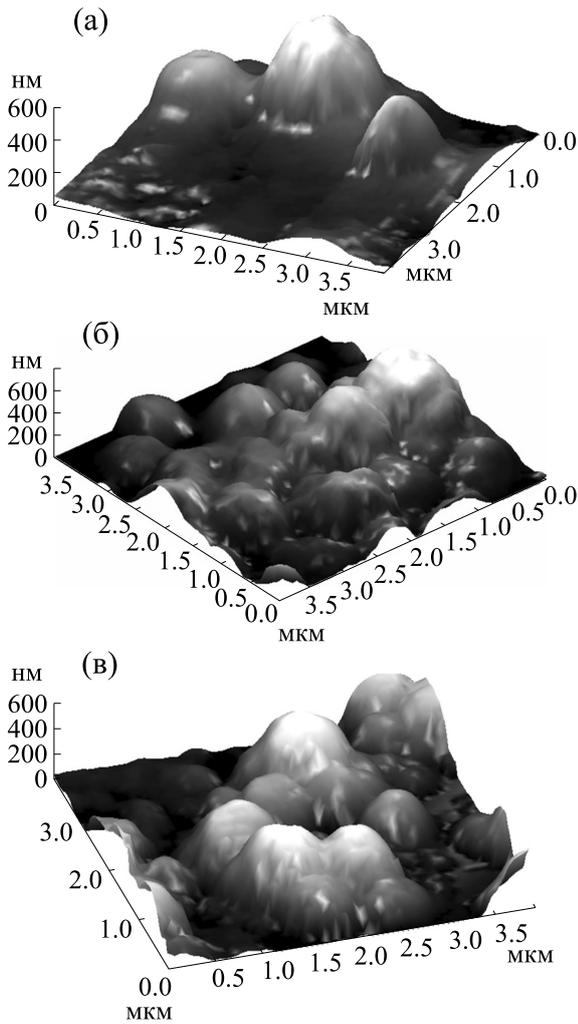


Рис. 3. АСМ-изображения (3Д) изолированных митохондрий печени мышей (мкм³): (а) – контроль; (б) – ОГГ; (в) – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОГГ.

рекисного окисления липидов и дисфункцией митохондрий в условиях ОГГ и острого алкогольного отравления [27]. ОГГ вызывала увеличение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей в 1.75 раза (рис. 4). При этом острое алкогольное отравление в 1.4 раза повышало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени (рис. 5). Это согласуется с литературными данными, поскольку одним из основных гепатотоксических эффектов ацетальдегида, образующегося в печени из этанола в результате активации алкогольдегидрогеназы, является инициация перекисного окисления липидов [28]. Увеличение генерации АФК митохондриями, сопровождающееся активацией ПОЛ, способствовало набуханию митохондрий [29], о

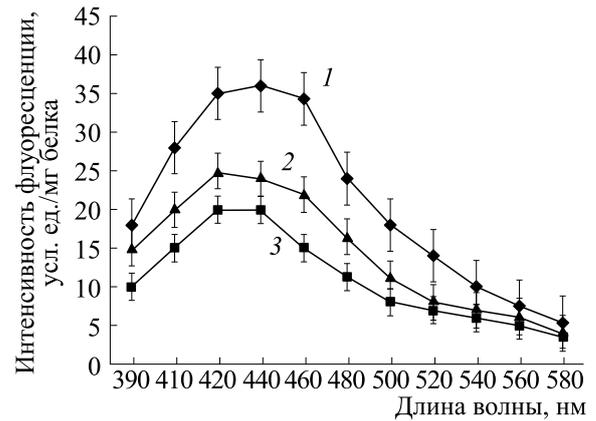


Рис. 4. Влияние острой гипобарической гипоксии и ресвератрола на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. По оси абсцисс – длина волны в нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции в усл. ед./мг белка; 1 – ОГГ; 2 – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОГГ; 3 – контроль.

чем свидетельствовало снижение оптической плотности суспензии митохондрий в 1.15 раза.

Введение животным в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола до стрессовых воздействий (ОГГ или ОАО) предотвращало активацию ПОЛ и набухание митохондрий (рис. 4 и 5).

Рост интенсивности ПОЛ в условиях ОГГ приводил к изменениям в жирнокислотном составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Изменения наблюдались в содержании ЖК, содержащих 18 и 20–22 углеродных атома. Так, индекс ненасыщенности C_{18} ЖК снижался на 7.5% (табл. 1), а коэффициент ненасыщенности C_{18} ЖК – с 1.69 ± 0.01 до 1.52 ± 0.01 . При этом содержание линолевой кислоты, одной из основных ЖК в составе кардиолипина – фосфолипиды, который входит в состав внутренней мембраны митохондрий и обеспечивает эффективную работу дыхательной цепи митохондрий, уменьшалось на 6%. На 27% снижалось содержание метаболита арахидоновой кислоты ($22:4\omega 6$) и на 28.4% – докозапентаеновой кислоты ($22:5\omega 3$) (табл. 1).

Соотношения между ЖК – предшественниками и ингибитором синтеза эйкозаноидов $20:4\omega 6/22:6\omega 3$ и $(20:3\omega 6+20:5\omega 3)/22:6\omega 3$ – в условиях ОГГ снизились с 2.11 ± 0.12 до 1.61 ± 0.10 и – с 0.23 ± 0.02 до 0.13 ± 0.01 соответственно, что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле (рис. 6). Известно, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций, включая усиление или подавление воспалительных и аллергических реакций, контроль артериального давления, сокращения или расслабления гладких мышц и многое другое [30].

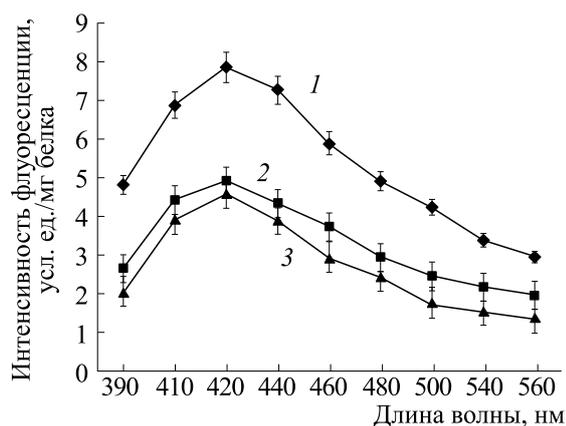


Рис. 5. Влияние острого алкогольного отравления и ресвератрола на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. По оси абсцисс – длина волны в нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в усл. ед./мг белка; 1 – ОАО; 2 – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОАО; 3 – контроль.

Снижение содержания этих ЖК, возможно, так же как и снижение содержания линолевой кислоты, влияло на устойчивость организма к стрессовым воздействиям

Сокращение пула ненасыщенных C_{18} ЖК, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, вероятно, обусловлено

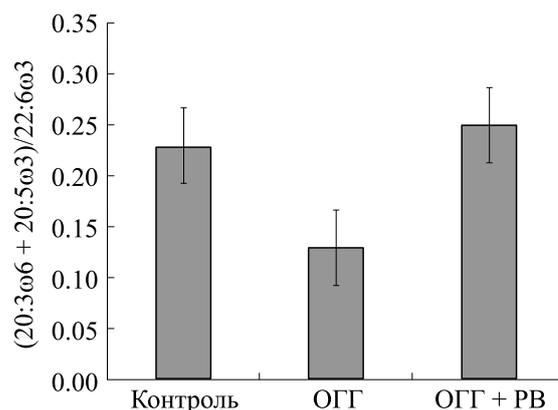


Рис. 6. Соотношение $20:3\omega6 + 20:5\omega3 / 22:6\omega3$ в мембранах митохондрий печени.

окислением этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий, что могло отразиться на биоэнергетических характеристиках [31]. Действительно, ОАГ почти в 1.3 раза снижала скорости транспорта электронов на конечном цитохром-оксидазном участке дыхательной цепи митохондрий. При этом скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД сократились с 68.4 ± 2.5 до 53.1 ± 1.8 нг моль $O_2 / (мг \text{ белка } \cdot \text{ мин})$.

Введение в среду инкубации этих митохондрий $5 \cdot 10^{-6}$ М цитохрома с вызывало восстановление скоростей окисления пары «аскорбат +

Таблица 1. Влияние ОАГ на жирнокислотный состав общей липидной фазы митохондрий печени мышей

ЖК	Контроль, отн. %	ОАГ, отн. %	ОАГ + ресвератрол, отн. %
16:1 ω 9	0.50 ± 0.20	1.00 ± 0.50	0.45 ± 0.35
16:1 ω 1	0.75 ± 0.05	0.85 ± 0.35	0.75 ± 0.35
16:0	21.35 ± 1.25	21.41 ± 1.16	21.7 ± 0.8
18:2 ω 6	13.50 ± 0.15	12.71 ± 0.16	14.35 ± 0.19
18:1 ω 9	11.0 ± 2.5	9.50 ± 2.13	9.55 ± 0.95
18:1 ω 7	2.90 ± 0.04	2.13 ± 0.60	2.60 ± 0.10
18:0	16.75 ± 1.30	15.98 ± 1.27	16.85 ± 1.65
20:4 ω 6	20.3 ± 1.0	20.93 ± 0.76	20.15 ± 1.35
20:3 ω 6	1.90 ± 0.02	1.56 ± 0.38	2.05 ± 0.55
20:5 ω 3	0.30 ± 0.00	0.17 ± 0.04	0.45 ± 0.15
22:6 ω 3	9.6 ± 1.0	13.01 ± 2.04	10.0 ± 0.50
22:4 ω 6	0.55 ± 0.50	0.40 ± 0.13	0.50 ± 0.00
22:5 ω 3	0.60 ± 0.00	0.43 ± 0.11	0.60 ± 0.00
$\Sigma C_{18\text{ненас}} / C_{18}$	1.69	1.52	1.57

Таблица 2. Антистрессовая активность ресвератрола

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Ресвератрол
Инъекция азида натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни, мин	2.3 ± 0.5	6.2 ± 1.5
	Доля выживших, %	0	30
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни, мин	20.5 ± 3.1	38.7 ± 5.4
	Доля выживших, %	0	15
Пероральное введение этанола (8 г/кг)	Время жизни, мин	35.4 ± 6.1	127.4 ± 41.1
	Доля выживших, %	0	12

Примечание. Представлены результаты пяти повторов по десять животных.

ТМФД» до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома *c*, обусловленной окислением кардиолипина [31].

Отметим, что ресвератрол предотвращал изменения в жирнокислотном составе мембран митохондрий. Предотвращая ПОЛ, ресвератрол, по видимому, предупреждал потери цитохрома *c* митохондриями. При этом скорости окисления пары «аскорбат + ТМФД» не отличались от контрольных величин. Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразились и на физиологических показателях, а именно на устойчивости организма к действию стрессовых факторов. Действительно, введение $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола в течение пяти суток в 1.89–2.70 раза увеличивало продолжительность жизни в условиях цитотоксической и гемической гипоксии и в 3.6 раза – в условиях острого алкогольного отравления. При этом на 15–30% повышалась выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии и на 12% – в условиях острого алкогольного отравления (табл. 2).

ВЫВОДЫ

Основываясь на полученных результатах, можно прийти к заключению, что адаптогенные свойства ресвератрола могут быть обусловлены предотвращением перекисного окисления липидов в стрессовых условиях. Предупреждение перекисидации фосфолипидов в мембранах митохондрий, вероятно, отразилось и на функциональном состоянии этих органелл, способствуя сохранению энергетического метаболизма клетки. Таким образом ресвератрол, вероятно, повышал устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, а также в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. L. Taylor, D. A. Day, and A. H. Millar, *J. Exp. Botany* **55** (394), 1 (2003).
2. E. Plotnikov, A. Chupyrkina, A. Vasileva, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, S58 (2008).
3. M. P. Murphy, *Biochem. Soc. Trans.* **32** (6), 1011 (2004).
4. S. Nonomura, H. Kanagawa, and A. Makimoto, *Yakugaku Zasshi* **83**, 988 (1963).
5. W. Dercks and L. L. Creasy, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 203 (1989).
6. V. Cucciolla, A. Borriello, A. Oliva, et al., *Cell Cycle* **6** (20), 2495 (2007). DOI: 10.4161/cc.6.20.4815
7. J. A. Baur and D. A. Sinclair, *Nature Rev. Drug Discovery* **5**, 493 (2006).
8. S. Saxena and A. Srivastava, *J. Pharmaceut. Technol., Research and Management* **2**, 145, (2014) DOI: 10.15415/jptrm.2014.22010
9. E. Wenzel and V. Somoza, *Mol. Nutrition Food Res.* **49** (5), 472 (2005).
10. X. Vitrac, A. Desmoulière, B. Brouillaud, et al., *Life Sci.* **72** (20), 2219 (2003).
11. A. C. Moreira, A. M. Silva, M. S. Santos, and V. A. Sardão, *Food Chem. Toxicol.* **53**, 18 (2013). DOI: 10.1016/j.fct.2012.11.031
12. N. Gueguen, V. Desquiret-Dumas, G. Leman, et al., *PloS One* **10** (12), e0144290 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0144290

13. V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 6662 (2013).
14. J. Zheng and V. D. Ramirez, *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1115 (2000).
15. J. L. Kipp and V. D. Ramirez, *Endocrine* **15**, 165 (2001).
16. M. Inglés, J. Gambini, M. G. Miguel, et al., *BioMed Res. Int.* (3), Article ID 580852, 6 (2014).
17. J. A. Rubiolo, G. Mithieux, and F. V. Vega, *Eur. J. Pharmacol.* **591** (1–3), 66 (2008).
18. G.-S. Liu, Z.-S. Zhang, B. Yang, and W. He, *Life Sci.* **91** (17–18), 872 (2012).
19. W. Gadacha, M. Ben-Attia, D. Bonnefont-Rousselot, et al., *Redox Rep.* **14** (4), 154 (2009) DOI: 10.1179/135100009X46613112
20. Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), (Strasbourg, 1986).
21. Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачевой. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* (Профиль, М., 2010).
22. E. N. Mokhova, V. P. Skulachev, and I. V. Zhigacheva, *Biochim. Biophys. Acta* **501**, 415 (1977).
23. B. I. Fletcher, C. D. Dillard, and A. L. Tappel, *Anal. Biochem.* **52**, 1 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-811
24. J. P. Carreau and J. P. Dubacq, *J. Chromatogr.* **151** (3), 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get
25. J. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, and I. S. Sim, *Poult Sci.* **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
26. R. V. Golovina and T. E. Kuzmenko, *Chromatography* **10** (9), 545 (1977).
27. Л. Д. Лукьянова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **124** (9), 244 (1997).
28. Е. Г. Доркина, *Эксперим. клинич. фармакология* **73** (4), 35 (2010).
29. I. Scott and D. C. Logan, *New Phytologist* **177**, 90 (2008).
30. C. C. C. R. de Carvalho and M. J. Caramujo, *Molecules* **23** (10), 2583 (2018). DOI: 10.3390/molecules23102583
31. J. Petereit, K. Katayama, Ch. Lorenz, et al., *Front. Plant Sci.* **8**, 72 (2017). DOI: 10.3389/fpls.2017.00072.

Resveratrol Prevents Stress-Related Dysfunction of Mitochondria

V.I. Binyukov*, I.V. Zhigacheva*, E.M. Mil'*, N.I. Krikunova*, and M.M. Rasulov**

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

**State Scientific Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, shosse Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

This study was conducted to investigate the antistress potential of resveratrol, a natural polyphenol, in models that reproduce the conditions of acute hypobaric hypoxia and acute alcohol intoxication. Acute alcohol intoxication and acute hypobaric hypoxia induced an increase in the intensity of lipid peroxidation in the membranes of liver mitochondria from mice. Activation of lipid peroxidation was accompanied by swelling and variations in the levels of fatty acids with C₁₈ and C_{20–22n} in the composition of the total lipid fraction of mitochondrial membranes. The index of the unsaturation of fatty acids with C18 was decreased by 7.5% (from 1.69 ± 0.01 to 1.52 ± 0.01). Moreover, the index (20:3ω6+20:5ω3)/22:6ω3 was decreased from 0.23 ± 0.02 to 0.13 ± 0.01 for fatty acids under acute hypobaric hypoxia conditions, suggesting a decrease in eicosanoid metabolism. The administration of 2 · 10⁻⁵ mol/kg of resveratrol in animals for five days prevented changes in fatty acid composition, inhibiting activation of lipid peroxidation and swelling of mitochondria, thereby affecting physiological parameters. Thus, the adaptogenic properties of resveratrol may be ascribed to the prevention of lipid peroxidation in mitochondrial membranes, that probably affect functional state of these organelles, contributing to the maintenance of cell energy metabolism under stress conditions.

Keywords: adaptogens, mitochondria, lipid peroxidation, hypoxia, acute alcohol intoxication

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПОЛИЕНОВЫМИ АНТИБИОТИКАМИ В ПОЛЕ ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

© 2021 г. Г.Г. Султанова, Х.М. Касумов

*Институт ботаники Национальной академии наук Азербайджана,
AZ1004, Баку, Падамдартское шоссе, 40, Азербайджанская Республика*

E-mail: sultanqul@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2019 г.

После доработки 14.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Исследован гемолиз эритроцитов, индуцированный ультразвуком и алкильными производными амфотерицина В и леворина, модифицированных по аминной и карбоксильной группам. Разработан кинетический метод изучения физико-химических характеристик клеток крови под действием ультразвука в физиотерапевтическом режиме озвучивания. Показано, что взаимодействие ультразвуковых волн с биологическими системами основано на явлении кавитации. Изучено действие алкильных производных амфотерицина В и леворина на физико-химические характеристики эритроцитов. Предполагается, что изменение механической стойкости эритроцитов под влиянием полиеновых антибиотиков связано с нарушением микровязкости белково-липидной системы мембран эритроцитов путем образования ионных каналов. Обнаружена корреляция действия полиеновых антибиотиков на липидные и клеточные мембраны.

Ключевые слова: полиеновые антибиотики, эритроциты, стойкость клеток, гемолиз, ультразвук.

DOI: 10.31857/S0006302921020113

В настоящее время ультразвуковые (УЗ) исследования относятся к категории наиболее информативных и безопасных методов диагностики в медицине. Использование УЗ-методов в практической медицине непосредственно связано с изучением взаимодействия УЗ-волн с биологическими структурами. Особый интерес представляют исследования степени изменения функционального состояния клеток в зависимости от интенсивности, частоты и времени воздействия ультразвука. Важно оценить вклад каждого из перечисленных факторов на степень изменения функционального состояния клеток. Повышение интенсивности ультразвука выше 0.4 Вт/см² приводит к эффектам кавитации, вызывающим повреждение биологических структур по свободно-радикальному механизму с образованием микропотоков вокруг осциллирующих микропузырьков [1, 2]. Однако до сих пор нет анализа воздействия физических параметров среды на поведение клеток крови в поле УЗ-волн. Действие внешних факторов на биологические объекты приводит к изменению ряда морфологических, биохимических,

физиологических параметров организма. Анализ литературных данных показывает, что эритроциты крови более чувствительны к действию физических и химических факторов внешней среды, характеризующиеся изменением ряда физико-химических параметров мембран эритроцитов. В качестве экзогенных факторов действия на эритроциты использовались энергия УЗ-волн и действие полиеновых антибиотиков (ПА).

ПА являются единственными в природе соединениями, эффективно взаимодействующими с клеточными и липидными мембранами, увеличивающими проницаемость мембран для ионов и органических соединений [3]. Основными представителями ПА являются амфотерицин В, нистатин, микогептин и леворин. На рис. 1 показаны структурные формулы наиболее активных из ПА – амфотерицина В и леворина.

В основе биологического действия ПА лежит формирование ими в липидных мембранах в комплексе с холестерином, эргостерином и другими стеринами структурных ионных каналов молекулярных размеров [2, 4]. Амфотерициновый канал формируется молекулами стерина и антибиотика в стехиометрическом соотношении 1:1. Амфотерицин В с холестерином формирует канал в сте-

Сокращения: УЗ – ультразвук, ПА – полиеновые антибиотики, УФ – ультрафиолет, ДМСО – диметилсульфоксид.

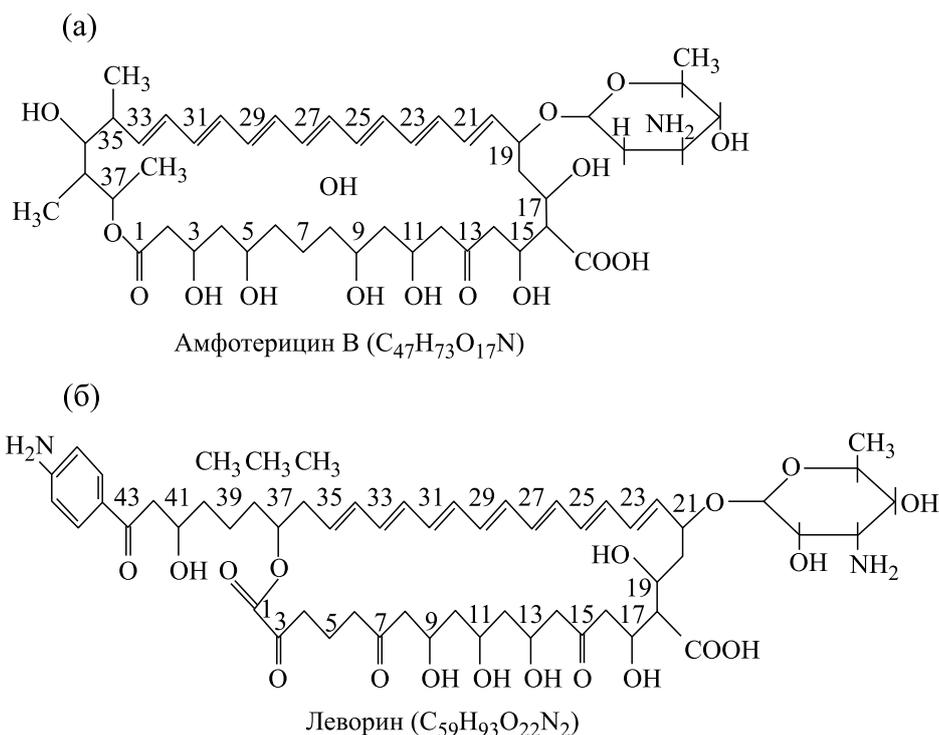


Рис. 1. Химическая структура амфотерицина В (а) и леворина (б).

хиометрическом соотношении 8 : 8. Для различных ПА значения стехиометрических коэффициентов варьируют в пределах 3–17. Внутренний диаметр амфотерицинового канала составляет 8–10 Å. Антибиотик взаимодействует со стероидом путем образования водородной связи между ними [3, 5–8].

Мембраны эритроцитов являются удобным объектом исследования механизма взаимодействия полиенов с клеточными мембранами. Исследование гемолитической активности эритроцитов и их механической стойкости представляет интерес для выяснения количественных закономерностей их биологического действия полиенов.

В настоящей работе исследуется действие ряда производных амфотерицина В и леворина, модифицированных по аминной и карбоксильной группам, на ультразвуковой и индуцированный гемолиз эритроцитов. Исследования характера действия ряда производных амфотерицина В и леворина на клетки эритроцитов могут дать ряд важных рекомендаций для их практического использования в медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки состояния мембран при действии физических (УЗ) и химических (ПА) факторов на клетки разработан кинетический метод УЗ-гемо-

лиза [1, 9, 10]. В качестве объекта исследования были использованы эритроциты, выделенные из венозной крови в норме. Эритроциты подвергали воздействию УЗ в физиотерапевтическом режиме озвучивания с использованием прибора УТ-5, применяемого в физиотерапии. Эритроциты осаждали из 3 мл гепаринизированной или цитратной крови (0.5 мл цитрата + 2.5 мл цельной крови) и двукратно отмывали от плазмы 0.9%-м раствором NaCl (физиологическим раствором). Центрифугирование проводили трижды при 6000 об/мин в течение 10 мин. Концентрация клеток в исследуемой суспензии составила 10^6 – 10^8 кл/мл. Стойкость эритроцитов изучали в условиях непрерывного действия УЗ при частоте 0.88 МГц с интенсивностями от 0.1 до 1.0 Вт/см² при температуре 22°C [10]. В правую кювету фотоэлектрического колориметра помещают исследуемую суспензию эритроцитов, а в левую вводится контрольный раствор. Параметры, характеризующие механическую стойкость эритроцитов (время гемолиза $t_{гем}$, время полуразрушения t_{50} , скорость гемолиза $V_{гем}$ и эффективная константа скорости k), определялись непосредственно из экспериментальных кривых [1, 11]. В работе были исследованы амфотерицин В и леворин, а также их алкильные производные и производные леворина – леворидон, изомерная форма леворидона – изолеворидон и карболеворин, которые были предоставлены проф. В.М. Вайнштейном (Санкт-Петербургский

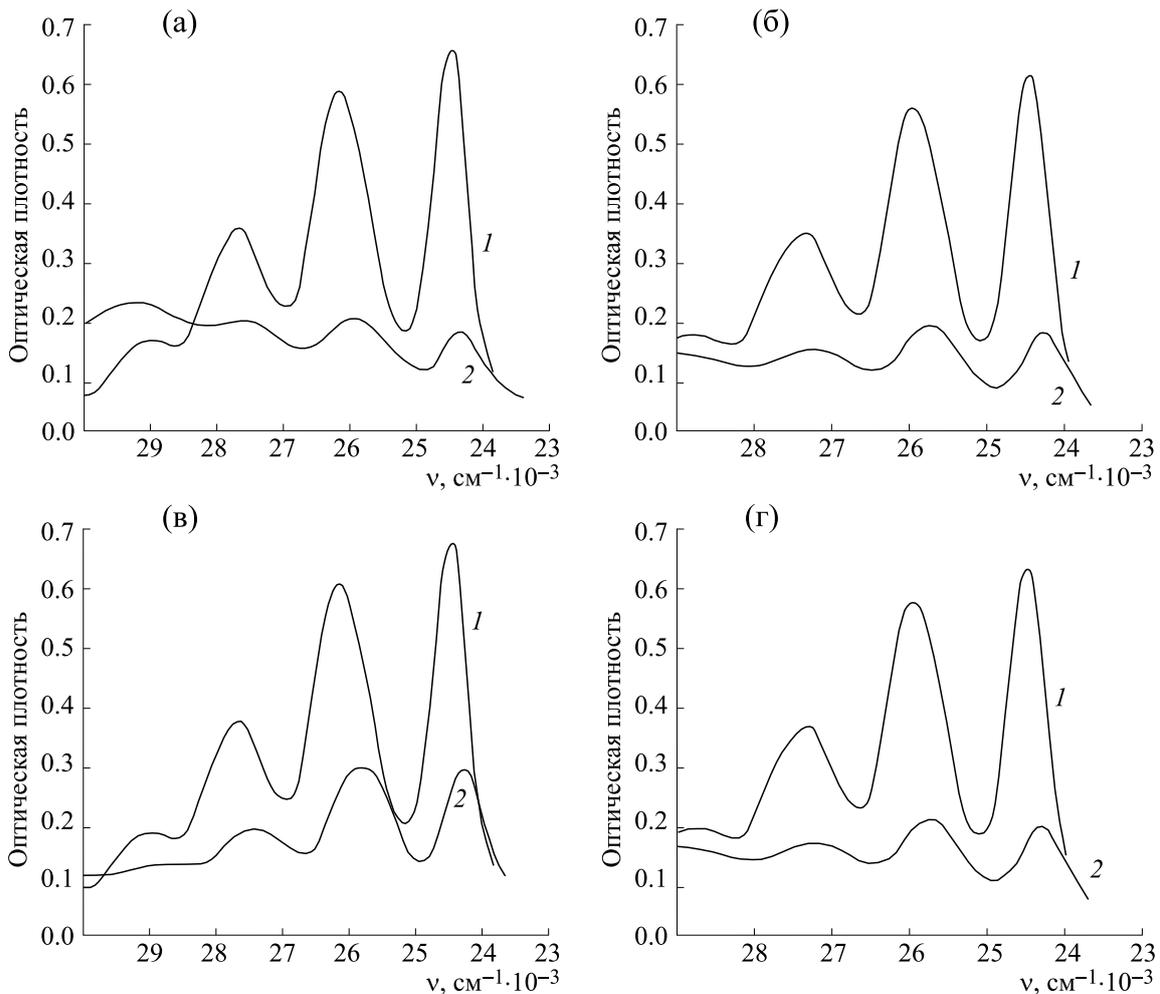


Рис. 2. УФ-спектры исходного амфотерицина В (а) и его алкильных производных: метильных (б), этильных (в) и пропильных (г) в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М в метаноле (1) и в воде (2). По оси абсцисс – частота оптического поглощения (ν), по оси ординат – оптическая плотность (D).

государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России). ПА готовили в виде растворов различной концентрации в диметилсульфоксиде (ДМСО). Амфотерицин В и леворин, а также их производные растворяли в концентрации 1 мг в 1 мл ДМСО, а затем в соответствующих концентрациях вводили в суспензию эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гемолитический эффект эритроцитов, индуцированный ультразвуком. Изучена кинетика гемолиза эритроцитов человека, индуцированного филипином, амфотерицином В и нистатином [10]. Гемолитическая активность филипина связана с увеличением проницаемости мембран для веществ с низкой молекулярной массой (КСИ), а также для макромолекул, включая гемоглобин, в изотонической среде. Предполагается, что амфо-

терицин В и нистатин могут одновременно образовывать ряд транспортных систем, различающихся по своей молекулярной организации и гемолитической активности. Уровень их участия в проницаемости мембран эритроцитов зависит от изменений структурной организации мембран и химического состава инкубационной среды. По своей химической природе ПА относятся к группе макролидных гептаеновых антибиотиков [3]. Благодаря наличию хромофорной цепочки в структуре молекул ПА они имеют типичный спектр в ультрафиолетовой области (УФ-спектр) с тремя основными максимумами поглощения (рис. 2). Биологическая активность ПА зависит от среды, в которой растворяется антибиотик. Макролактонное кольцо амфотерицина В включает в себя полиеновый хромофор с семью сопряженными двойными связями, что находит отражение в УФ-спектре амфотерицина В. Последний имеет три основных максимума поглощения при следу-

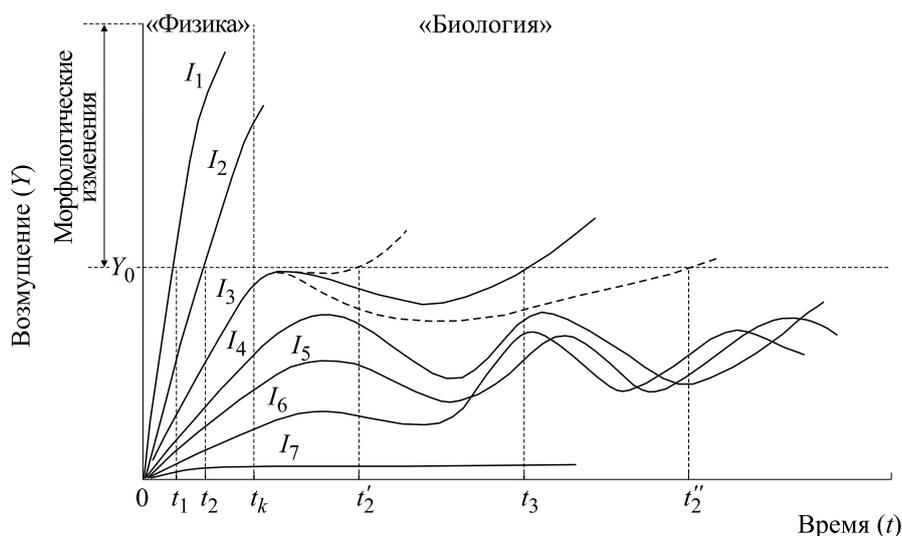


Рис. 3. Зависимость биологических эффектов УЗ от интенсивности и времени озвучивания: ($I_1 \geq 5$ Вт/см², $I_2 - 5-1$ Вт/см², $I_4-I_6 - 1.0-0.4$ Вт/см², $I_7 -$ менее 0.1 Вт/см²).

ющих длинах волн: 358–360, 378–380 и 400–403 нм. На рис. 2 показаны УФ-спектры поглощения амфотерицина В и его алкильных производных в растворе метанола и в водном растворе. Наибольшая молекулярная дисперсность амфотерицина В достигается в органическом растворителе – метаноле (рис. 2, спектры 1) и в ДМСО. Вероятно, биодоступность антибиотика была бы максимальной в таких растворителях. В водном растворе антибиотики в такой же концентрации образуют высокодисперсный коллоидный раствор с характерными максимумами, но меньшей величиной оптической плотности (рис. 2, спектры 2), что объясняет их несколько меньшую активность по сравнению с растворами в метаноле. Таким образом, в растворах ДМСО и метаноле антибиотики находятся в молекулярной форме, и в этой форме они обладают наиболее высокой биологической активностью [9]. В водных растворах полиены находятся в ассоциированной форме и потому они менее активны [3].

Изучены кинетические характеристики действия ПА на гемолиз эритроцитов и их устойчивость к действию ультразвука. Одним из характерных признаков кавитации является УЗ-свечение, которое наблюдается в водных растворах при интенсивности 0.3–0.5 Вт/см² и при частоте >0.88 МГц. В плазме крови порог УЗ-свечения достигается при 0.3 Вт/см² при частоте 1 МГц. На рис. 3 показана зависимость биологических эффектов УЗ от интенсивности и времени озвучивания. Видно, что существует четко выраженная пороговая интенсивность УЗ-воздействия, при превышении ее начинается лизис клеток.

В результате воздействия УЗ в среде возникают градиенты колебательной скорости, обусловленные акустическим течением. В воде при частоте 1 МГц и интенсивности 1 Вт/см² эти колебательные напряжения достигают порядка 200 Н/м² [11]. Для изучения биоэффектов, создаваемых сдвиговыми напряжениями, широко применяют гемолиз красных кровяных телец в суспензии *in vitro* [2, 12]. При близком расположении двух частиц в УЗ-поле между ними возникает сила взаимодействия, обусловленная воздействием на колеблющуюся частицу УЗ и пропорциональная произведению объемов сфер и обратно пропорциональная расстоянию между ними [10, 12, 13]. Если тромбоциты облучать УЗ в присутствии газовых пузырьков, то уже при малой интенсивности (32 мВт/см²) они собираются в сгустки около пузырьков. В случае с эритроцитами действие УЗ с интенсивностью 20–30 мВт/см² приводит к высвобождению АТФ [14].

Проведена аналогия в действии режимов УЗ-озвучивания эритроцитов *in vitro* и сил, возникающих в различных участках кровяного русла *in vivo*. Известно, что в различных участках сосудистого русла реологические характеристики крови неодинаковы. В связи с этим при анализе кровотока необходимо характеризовать реологические показатели (вязкость цельной крови, вязкоэластичность, деформируемость и агрегацию эритроцитов) как в крупных сосудах ($d > 200$ мкм), так и в микрососудистом русле ($d < 200$ мкм). Кровь млекопитающих и человека, течение которых в сосудах описывается степенным законом $y = ax^n$

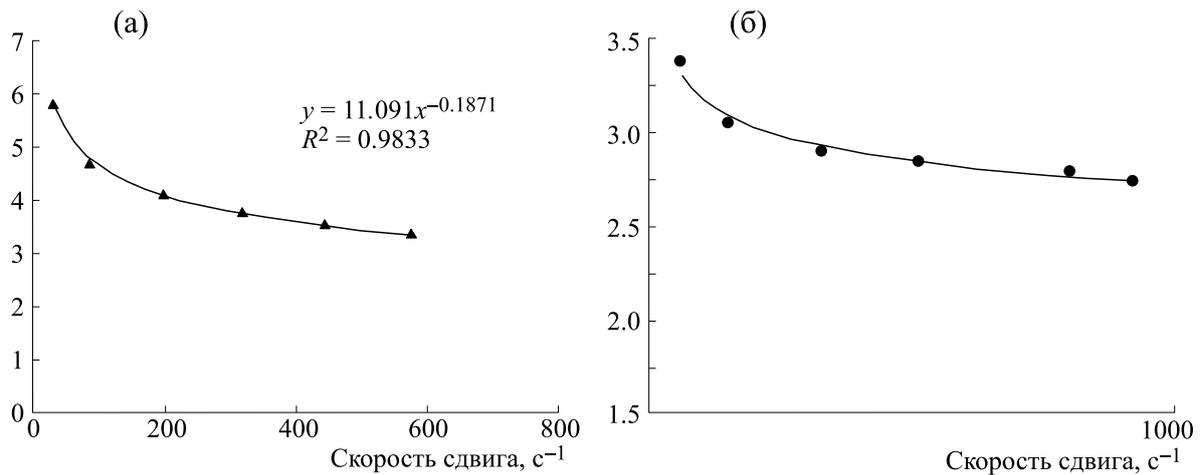


Рис. 4. Типичные кривые течения цельной крови (а) и суспензии эритроцитов (б) (гематокрит 40%) в изотоническом растворе NaCl при разных скоростях сдвига (как аналогов модели неньютоновской жидкости), описываемых степенным законом: $y = ax^n$ [20].

и суспензия эритроцитов в плазме ведут себя подобно неньютоновским жидкостям (рис. 4) [15].

Вязкость плазмы цельной крови в полтора раза выше, чем вязкость изотонического раствора ($1.8\text{--}2.2 \text{ мПа}\cdot\text{с} > 1.10 \text{ мПа}\cdot\text{с}$). В процессе непрерывной циркуляции в кровеносных сосудах клетки крови выдерживают как интенсивные, так и пассивные деформации, что обеспечивается деформируемостью и стабильностью мембран [15]. В связи с этим необходимо отметить, что сопротивление кровотоку в сосудистой системе связано, по-видимому, со снижением вязкости суспензии эритроцитов, с увеличением скорости сдвига, что свидетельствует о существенной роли деформации эритроцитов в потоке и создании вязкого сопротивления кровотоку в сосудистой системе без учета действия таких реологических факторов, как агрегация, гематокрит, вязкость суспензионной среды. Таким образом, человеческая кровь ведет себя подобно неньютоновской жидкости, характерным признаком которой является снижение вязкости с увеличением скорости или напряжения сдвига. Это, по-видимому, обусловлено двумя процессами: формированием агрегатов эритроцитов при низкой сдвиговой скорости, которые полностью распадаются при скоростях сдвига порядка $80\text{--}120 \text{ с}^{-1}$ и потоковой деформацией эритроцитов вместе с их ориентацией вдоль линии потока при средних и особенно высоких скоростях сдвига (выше 50 с^{-1}). Эритроциты диаметром $\sim 8 \text{ мкм}$ при течении в микрососудах диаметром меньше размера самой клетки подвергаются большим напряжениям сдвига. Деформируемость эритроцитов определяет продолжительность их жизни в кровотоке и зависит от формы клетки, внутренней вязкости и механических свойств мембран [15]. На деформацию оказывают влияние также сдвиговые силы (завися-

щие от скорости сдвига и вязкости внеклеточной жидкости) и гематокрит. Повышение вязкости суспензии при высоком гематокрите в основном ведет к увеличению деформации эритроцитов. При определенной величине гематокрита наблюдается снижение деформации. Исследование на моделях разбавленных суспензий эритроцитов позволяет оценить деформируемость эритроцитов в кровотоке. Она повышалась вследствие разжижения потока при влиянии сдвиговых сил, связанных с деформацией и ориентацией клеток в потоке. С учетом вышеизложенного, предложено условное моделирование действия сдвиговых сил на клетки крови в поле влияния УЗ поля на суспензию эритроцитов. В капиллярах эритроциты подвергаются наибольшему риску разрушения, нежели в аорте и артериях. Предложена модель механического разрушения клеток в кровяном русле в поле действия УЗ [1, 16]. При этом реологические параметры клеток в различных частях кровяного русла коррелируют с данными поведения эритроцитов при разных условиях озвучивания. Проведенный анализ позволяет предположить, что между резистентностью клеток при различных режимах УЗ-воздействия и их поведением в кровяном русле существует корреляция, которую можно представить как модель поведения эритроцитов в различных участках кровяного русла.

Таким образом, можно сказать, что в основе механизмов морфологических и функциональных повреждений биологических клеток при физиотерапевтическом режиме озвучивания в УЗ-поле лежат механические факторы — ударные волны, микротоки и акустические течения.

Действие полиеновых антибиотиков на мембраны эритроцитов. Изучены кинетические характе-

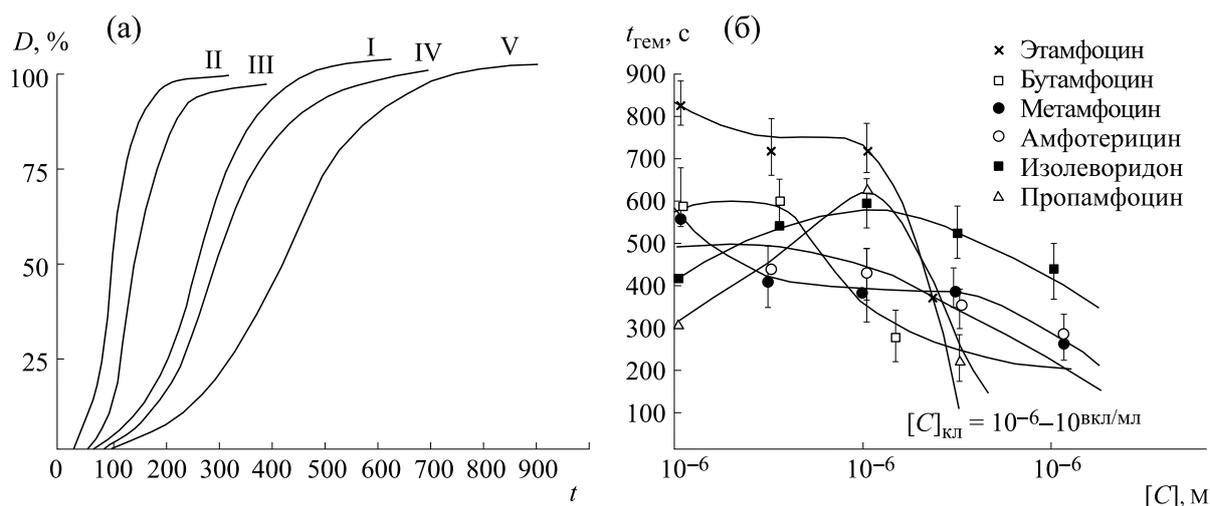


Рис. 5. Сравнение гемолитических эффектов эквимоллярных концентраций ПА. (а) – Кинетические кривые ультразвукового гемолиза эритроцитов в контроле и в присутствии эквимоллярных концентраций ПА: I – контроль, II – амфотерицин В, III – леворин, IV – бутамфоцин, V – изолеворидон (по оси абсцисс – время гемолиза, с; по оси ординат – светопропускание, %). (б) – Зависимости времени гемолиза эритроцитов от концентрации ПА в суспензии эритроцитов.

ристики действия ПА на гемолиз эритроцитов и их устойчивость к действию УЗ. Действие биологически активных соединений на мембраны эритроцитов может привести к нарушению целостности клеток, одним из проявлений которых является гемолиз. Была изучена способность ПА гемолизировать эритроциты в изотонической среде. Показано, что производные амфотерицина В – метамфоцин, этамфоцин, карбоамфоцин и производные леворина – леворидон, изолеворидон, карболеворин – в суспензии эритроцитов обладают гемолитической активностью в изотонической среде в концентрациях $10^{-5}–10^{-4}$ М. Однако обработка эритроцитов чистым раствором ДМСО в изотонической среде в концентрации 1%, пропамфоцином и бутамфоцином не приводит к гемолизу. На рис. 5 представлены кинетические кривые гемолиза эритроцитов, индуцированных эквимоллярными концентрациями изученных антибиотиков. Кривые имеют S-образную форму с определенным периодом индукции 5–25 мин (латентным периодом) и подчиняются закону Гомперца. Как видно из рис. 5, гемолитический эффект ПА имеет концентрационный характер. Для характеристики гемолитической активности исследуемых антибиотиков выделяют три основные гемолитические зоны: область стабилизации при концентрациях антибиотика ($>10^{-6}$ М), нормальную составляющую ($\sim 10^{-5}$ М) и участок гемолиза ($< 10^{-4}$ М) [10].

При инкубации ПА с эритроцитами в поле действия УЗ также происходит изменение их гемолитической активности. Основные параметры гемолиза определяют механическую резистент-

ность эритроцитов. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 6. На рис. 6 представлены сравнительные результаты процесса гемолиза в присутствии ряда ПА. В контрольных экспериментах было изучено действие ДМСО на эритроциты. Концентрацию ДМСО изменяли от 0.1 до 10%, и в пределах указанных концентраций ДМСО существенно не влияет на процесс УЗ-гемолиза.

Из рис. 6 видно, что ПА по-разному влияют на гемолитическую устойчивость эритроцитов в поле действия УЗ волн. Одни антибиотики активизируют, другие замедляют, а третьи стабилизируют механическое разрушение эритроцитов под влиянием полиенов, по-видимому, могут быть связаны с нарушением микровязкости белково-липидной системы. В то же время некоторые из изученных препаратов препятствуют восстановлению клеток после УЗ-воздействия [10, 14]. Получено, что при интенсивности 0.6 Вт/см^2 и частоте 0.88 МГц , УЗ на 60–100% увеличивает электропроводность бислоевых липидных мембран, а также их проницаемость по отношению к аниону тетрафенилбората; на 10% ускоряет встраивание каналаобразующего антибиотика нистатина в матрицу фосфолипидных мембран, что, по-видимому, связано как с изменением механических свойств матрицы, так и нарушением в прилегающих к ней диффузионных слоях. Предполагается, что ПА, внедряясь в липопротеидную область мембраны, способны взаимодействовать с гидрофобными участками мембран эритроцитов, формируя в них структурные каналы, изменяя при этом ионную проницае-

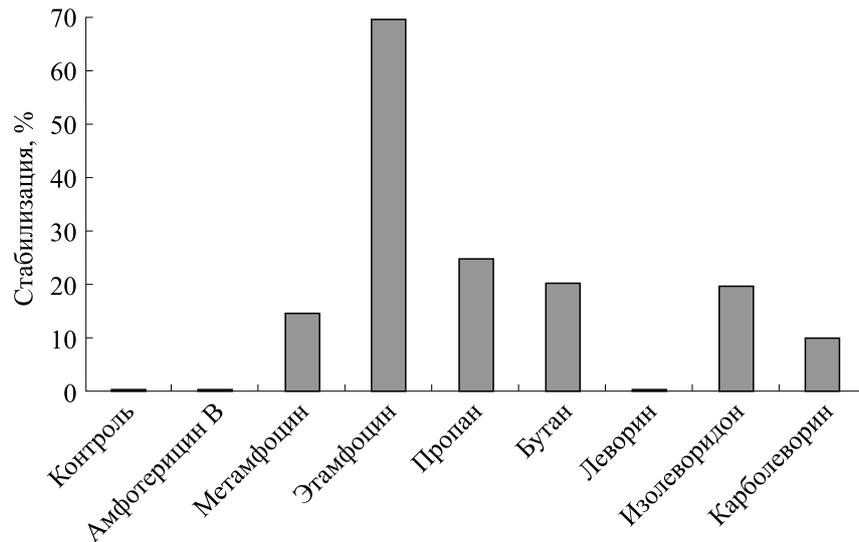


Рис. 6. Действие ПА на процесс стабилизации мембран эритроцитов. По оси абсцисс – изученные препараты, по оси ординат – степень стабилизации (в %) процесса гемолиза в изотонической среде под действием полиенов (10^{-5} М).

мость мембран [3, 14, 17]. В пользу данного предположения говорят результаты экспериментов, полученных при исследовании проницаемости мембран эритроцитов для не электролитов [18].

Ранее было показано, что ПА изменяют проницаемость бислойных липидных мембран для ионов только в том случае, когда в мембранах содержатся стеринные определенной структуры, в частности холестерин или эргостерин [3, 9, 19]. В мембранах эритроцитов содержится большое количество холестерина, и благодаря этой особенности клетки эритроцитов оказываются чувствительными к действию ПА. Полученные результаты подтверждаются ранее проведенными исследованиями механизма взаимодействия ПА с бислойными липидными мембранами на молекулярном уровне [3]. Биологическое действие полиенов может быть связано с изменением проницаемости биологических мембран, содержащих стеринные определенной структуры для ионов и органических соединений [4, 6, 18]. Было показано, что по степени изменения проницаемости липидных мембран ПА можно расположить в ряд с возрастающей биологической эффективностью: филипин > амфотерицин > леворин > нистатин, что согласуется с результатами УЗ-гемолиза (рис. 5) [3, 8, 10, 19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время в физиотерапии широко используется совместное применение ультразвука, антибиотиков и химиотерапевтических агентов. При введении мышам с опухолевыми клетками азотистого иприта продолжительность их жизни увеличивалась. Возможно, присутствие

цитотоксических агентов препятствует пораженным клеткам восстанавливать повреждения, вызванные УЗ и наоборот. Полученные результаты важны при использовании УЗ в медицине для выявления оптимальных условий озвучивания. Также отмечено значительное увеличение эффективности рентгеновского облучения в комбинации с УЗ [14]. Показано, что клетки, которые пережили воздействие УЗ и остались неповрежденными, продолжают давать потомство точно так же, как и их необлученные аналоги [17]. Исключение составляли клетки, которые облучались УЗ при повышенной температуре среды [20]. УЗ достаточно высокой интенсивности может привести к деградации ДНК в растворе, что обусловлено кавитацией, действием гидродинамических сдвиговых напряжений и образованием свободных радикалов. УЗ может стимулировать рост дрожжевых клеток и увеличивать скорость синтеза белка. Большинство функциональных изменений в клетках обусловлены взаимодействием УЗ с их мембранами клеток. Например, УЗ может воздействовать на электрофоретическую подвижность клеток [12]. Эритроциты, в отличие от других форменных элементов крови, наименее чувствительны к повреждающему действию УЗ. Считается, что гемолиз вызывается кавитацией или высоким гидродинамическим напряжением [13]. Есть, однако, некоторые признаки того, что гемолиз может происходить при терапевтических интенсивностях в случае коллапсирующей кавитации и в зонах турбулентных потоков. Показано, что АТФ может высвобождаться при низких интенсивностях УЗ, если эритроциты облучаются *in vitro* в присутствии стабильных газовых полостей. В используемом режиме озвучивания основные

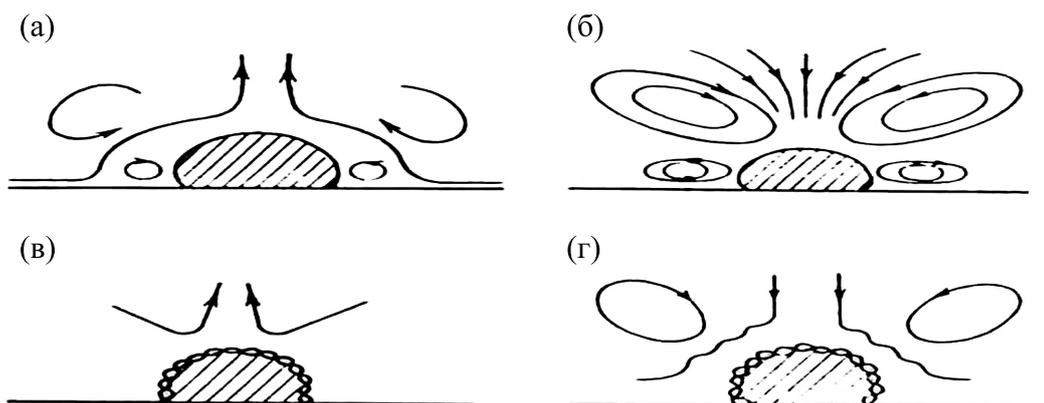


Рис. 7. Схема возникновения акустических течений.

повреждающие факторы — акустические микротечения и сдвиговые напряжения — не вызывают химических изменений в среде озвучивания. При действии внешних факторов на эритроциты меняются механические свойства их стромы. Эти параметры зависят от свойств самих эритроцитов (возраст, форма, реология), от условий озвучивания, фактора воздействия и наличия патологии в организме. Определен наиболее оптимальный (физиотерапевтический) режим воздействия УЗ, используемый в медицинской практике, не приводящий к негативным последствиям [1, 14].

Известно, что акустическая энергия УЗ в биологических средах имеет свойство поглощаться и рассеиваться [1, 10, 21]. С физической точки зрения поглощение акустической энергии обусловлено взаимодействием УЗ с биологическими тканевыми структурами. Если в среде содержатся относительно малые молекулы и среда текучая, то энергия колебательных или вращательных движений, вызванных взаимодействием с акустической волной, не приводит к специфическим химическим или биологическим изменениям и быстро превращается в тепло. В средах менее текучих, содержащих высокомолекулярные соединения, наблюдаются нетепловые специфические эффекты [2, 21]. Энергия, переносимая УЗ-полем, затухает при прохождении ее через вязкую среду и определяется как:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x}, \quad (1)$$

где μ — коэффициент затухания по интенсивности (закон Гомперца). Энергия, рассеянная из основного пучка, может поглощаться в других местах ткани. В поле действия УЗ-волн кинетика гемолиза эритроцитов подчиняется закону Гомперца [1, 20]. В биологических экспериментах используются продольные акустические волны, приводящие к кавитации. Кавитацией называется комплекс явлений, связанных с образованием полостей в жидкости [2, 5], что, в свою очередь,

связано с возникновением свободных радикалов, локально высоких температур, микротоков, ударных волн и кавитационных пузырьков. Число кавитационных пузырьков в 1 см³ жидкости достигает 10⁷, радиус пузырька в момент захлопывания составляет ~10⁻⁴–10⁻⁵ см. Возникающие при захлопывании ударные волны распространяются со сверхзвуковой скоростью [12, 21]. Эффект УЗ в биологических средах также может быть обусловлен действием гидродинамического течения растворителя, возникающего при распространении ударных волн [12]. В водных растворах порог кавитации прямо пропорционален частоте УЗ и обратно пропорционален времени воздействия. Порог кавитации заметно снижается при наличии микронеоднородностей, микроорганизмов и молекул растворимого газа. В условиях кавитации относительно низкая средняя плотность энергии УЗ-поля трансформируется в высокую плотность энергии, локализованную в непосредственной близости от захлопывающего пузырька. В этой области в воде при интенсивностях УЗ ~ 10 Вт/см² возникающее звуковое давление ~10⁶ дин/см² может приводить к разрыву химических связей. Кавитация может быть представлена как явление, при котором в объеме озвучиваемой жидкости образуется новая поверхность, включающая в себя кипение и бурную дегазацию при высоких интенсивностях УЗ [2, 21]. Существуют два типа активности пузырьков — стабильная (стационарная) и коллапсирующая (нестационарная) кавитация. Активность стабильной кавитации связана с возникновением акустических микротоков и высоких сдвиговых напряжений (рис. 7).

Активность коллапсирующих или нестационарных полостей приводит к повышению температуры и давления, а также к возможному использованию энергии УЗ для осуществления химических реакций [2]. Некоторые авторы

предположили, что в акустическом поле газ поочередно диффундирует в пузырек во время фазы разряжения и из пузырька во время фазы сжатия [12]. Анализируя различные механизмы гемолиза, можно сказать, что УЗ-гемолиз более динамичный, чем осмотический, что, возможно, связано с более энергичными характеристиками УЗ-поля. Интенсивность УЗ, при которой возникает акустическая кавитация в исследуемом образце, зависит от чистоты, образца, его газосодержания, предварительного воздействия на него УЗ, вязкости, температуры, частоты УЗ и режима импульсного воздействия, а также конфигурации УЗ поля в образце [2, 13]. Так, при действии УЗ (1 МГц, 32 мВт/см²) на эритроциты человека происходит высвобождение АТФ, что можно показать по свечению люциферин – люциферазного комплекса, добавленного в суспензию. Порог этого явления лежит в области 20–30 мВт/см². Эффект не наблюдается в отсутствии пузырьков газа или при более низких интенсивностях УЗ [21].

Исследования проницаемости бислоиных липидных мембран для ионов показали, что ПА по возрастающей эффективности своего действия на клеточные и липидные мембраны располагаются в один и тот же ряд, что согласуется с результатами УЗ-гемолиза эритроцитов. Это свидетельствует о корреляции между действием ПА на клеточные и липидные мембраны. Эта корреляция дает возможность использовать количественные параметры УЗ-гемолиза эритроцитов для оценки биологической эффективности ПА в терапевтических целях и в качестве биологически активных фармакологических препаратов [6, 8].

В заключение отметим, что весьма актуально создание новых видов противогрибковых препаратов и изучение их действия в связи с тем, что распространение инфекции ВИЧ сопутствует развитию грибковой инфекции. Полиеновые антибиотики обладают способностью подавлять грибковые инфекции, развитие гнойных инфекций, рост опухолевых клеток, снимать стрессовое состояние, и это указывает на необходимость использования ПА в биомедицинской практике.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EIF-BGM-3-BRFTF-2+/2017-15/12).

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. G. H. Sultanova, V. Kh. Qasimova, T. F. Pashazade, and Kh. M. Kasumov, Rep. Nat. Acad. Sci of Azerbaijan **LXXIV** (2), 58 (2018).
2. C. R. Hill, J. C. Bamber, and G. R. Ter Haar, *Physical principles of medical ultrasonics*, 2nd edit. (Wiley, 2004).
3. X. M. Касумов, *Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков* (Наука, М., 2009).
4. E. A. Romero, E. Valdivieso, and B. E. Cohen, J. Membrane Biol. **230** (2), 69 (2009).
5. V. Beringue, K. T. Adjou, F. Lamoury, et al., *Virology* **74**, 5432 (2000).
6. K. C. Gray, D. S. Palacios, I. Dailey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 2234 (2012).
7. B. Cybulska, J. Bolard, O. Seksek, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1240**, 167 (1995).
8. J. Milhaud, J. V. Ponsinet, M. Takashi, and B. Michels, *Biochim. Biophys. Acta* **1558**, 95 (2002).
9. В. А. Вайнштейн, Л. Н. Николаевич, Г. Г. Султанова и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **166** (12) 695 (2018).
10. G. Sultanova, A. Samedova, V. Gasimova, et al., *Sylwan* **161** (1), 161 (2017).
11. Г. Г. Султанова, А. А. Самедова и X. М. Касумов, *Антибиотики*, № 9–10, 9 (2007).
12. E. A. Brujan, T. Ikeda, and Y. Matsumoto, *Phys. Med. Biol.* **50** (20), 4797 (2005).
13. C. H. Farny, R. G. Holt, and R. A. Roy, *IEEE Trans. Biomed. Engineer.* **57**, 175 (2010).
14. W. D. O'Brien, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **93** (1–3), 212 (2007).
15. А. В. Муравьев, А. А. Ахапкина, П. В. Михайлов и А. А. Муравьев, *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* **13** (2), 64 (2014).
16. B. C. Wilcock, M. M. Endo, B. E. Uno, and M. D. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (23), 8488 (2013).
17. C. Garcia-Chaumont, O. Seksek, B. Jolles, and J. Bolard, *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **10** (3), 177 (2000).
18. M. Arczewska, G. Czernel, and M. Gagoś, *J. Phys. Chem. B* **120** (43), 11191 (2016).
19. A. Knopik-Skrocka and J. Bielawski, *Cell Mol. Biol. Lett.* **7** (1), 31 (2002).
20. A Margulis and I. M. Margulis, *J. Phys. Chem.* **79** (6), 1142 (2005).
21. G. Sultanova, *J. Integrated OMIKS, Spec. Issue* **9** (1), 8 (2020).

Physico-Chemical Properties of Erythrocyte Membranes in the Presence of Polyene Antibiotics in an Ultrasound Exam

G.G. Sultanova and Kh.M. Kasumov

Institute of Botany, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Padamdart shosse 40, Baku, AZ1004 Azerbaijan

Erythrocyte hemolysis induced by ultrasound and alkyl derivatives of amphotericin B and levorin modified by the amine and carboxyl groups was studied. A kinetic method has been developed for studying the physicochemical characteristics of blood cells during ultrasound physiotherapy. It was shown that the ultrasound interaction with biological systems is based on the cavitation effect. The effects of alkyl derivatives of amphotericin B and levorin on the physicochemical characteristics of erythrocytes were examined. It is assumed that the change in the mechanical stability of erythrocytes in the presence of polyenes is associated with an alteration in microviscosity of the protein-lipid system of erythrocyte membranes through the formation of ion channels. A correlation was found between the effects of polyenes on lipid and cell membranes.

Keywords: polyene antibiotics, erythrocytes, cell resistance, hemolysis, ultrasound

МЕМБРАННАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ, ВЫЗВАННАЯ ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ, В МАГНИТОЛИПОСОМАХ ЭРИТРОМИЦИНА: ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

© 2021 г. Б.М. Салах*, М Ради**, М. Абдель-Халим***, Х.М. Фахми****, Н.С. Эль-Дин*, М.Х. Габер****, *****

*Физический факультет Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

**Отдел фармацевтических технологий Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

***Отдел фармацевтической химии Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

****Факультет науки, Каирский университет, Гиза, Египет

*****Инженерный факультет Британского университета в Египте (BUE), Каир, Египет

E-mail: bassantmoustapha@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.2020 г.

После доработки 11.03.2020 г.

Принята к публикации 13.05.2020 г.

Антибиотикоустойчивость является серьезной проблемой, стоящей перед человечеством и возрастающей с каждым годом из-за чрезмерного или неправильного использования антибиотиков, что ведет к развитию новых механизмов лекарственной устойчивости бактерий. Для данного исследования были разработаны магнитолипосомы, нагруженные препаратом эритромицина. Их подвергли воздействию переменного магнитного поля (5 и 15 мТл, 100 кГц) в течение 30 мин, чтобы проверить влияние поля на скорость высвобождения лекарственного средства за пределы сопротивляемости бактерий. Было показано повышение температуры на 4 и 24°C в случае воздействия на инкапсулированные эритромицином магнитолипосомы переменным магнитным полем в 5 и 15 мТл соответственно. Кроме того, наблюдалось увеличение количества высвобожденного эритромицина (0.83 ± 0.1 мкг/мл и 1.33 ± 4 мкг/мл при воздействии в 5 и 15 мТл соответственно) по сравнению с контролем (0.24 ± 0.06 мкг/мл). Воздействие переменного магнитного поля на инкапсулированный в магнитолипосомы эритромицин ускоряло скорость его высвобождения из-за механического воздействия на наночастицы. Результаты позволяют предположить, что можно запускать и контролировать высвобождение лекарств, совмещая целевую систему доставки лекарств с нанотехнологиями и магнитным полем. При увеличении интенсивности переменного магнитного поля скорость высвобождения значительно возрастала.

Ключевые слова: переменное магнитное поле, высвобождение лекарств, доставка лекарств, эритромицин, магнитолипосомы.

DOI: 10.31857/S0006302921020125

Употребление лекарства всегда является компромиссом между его терапевтическим эффектом и побочными эффектами. Липосомные системы доставки лекарств позволяют не только доставлять лекарства в более высоких концентрациях, но и воздействовать на конкретные клетки или органы [1]. Следовательно, использование липосом в качестве контролируемой целевой системы доставки лекарств связано с замедленным высвобождением капсулированных лекарств [2] в

сочетании с длительным периодом циркуляции. Контроль проницаемости липосомной мембраны и избегание, таким образом, нецелевого высвобождения лекарств должны уменьшать негативные побочные эффекты свободного движения молекул лекарств [3].

Новые липосомы были разработаны для обеспечения разумного лечения организма человека путем высвобождения инкапсулированного содержимого в ответ на различные раздражители, такие как температура, pH, свет, ультразвук, магнитное поле и так далее [2]. Такие специфические стимулы используются в качестве движущей силы в механизмах высвобождения лекарств, осно-

Сокращения: ПМП – переменное магнитное поле, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, СПЖХ – сверхпроизводительная жидкостная хроматография.

ванных на взаимодействии стимулов и липосом [4]. Магнитно-срабатывающий механизм стал одной из наиболее эффективных стратегий в качестве стимула высвобождения и точного нацеливания [5].

При уменьшении размеров материалов до наноразмерного диапазона их уникальные и интересные физические и химические свойства могут быть улучшены [6], что вдохновляет на универсальный дизайн и захватывающие разработки традиционных и новых наноразмерных материалов для биомедицинских применений [7, 8]. Один из таких примеров – наночастицы оксида железа. Поскольку как липосомы, так и наночастицы оксида железа одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA – Food and Drug Administration), их комбинация может применяться в медицинских целях [9, 10]. Помимо адресной доставки самих липосом, контролируемое высвобождение лекарств из липосом является еще одним важным предметом изучения для их терапевтического применения [11, 12].

Контроль профиля высвобождения лекарств является одним из достижений систем доставки лекарств [2, 13]. Система доставки с участием магнитных наночастиц может помочь контролировать способность высвобождения лекарств в липосомах [14], которые имеют различную структуру, в первую очередь, определяемую структурой липидного бислоя или мембраной, которая окружает водный объем [15]. Варьирование структуры мембраны может создать огромное количество липосом с различными характеристиками и применениями [15].

Многие препараты подобного типа действия имеют серьезные побочные эффекты и токсичность, либо обладают очень высокой антимикробной активностью, но слабой фармакокинетикой и фармакодинамикой, которые ограничивают их использование. Инкапсуляция в липосомы улучшает доставку лекарственного средства к месту высвобождения [16–18].

Эритромицин, использованный в настоящем исследовании, являясь модельным относительно гидрофобным препаратом, он представляет собой антибиотик, который ингибирует синтез незаменимых белков в восприимчивых бактериях и используется при лечении инфекций горла, пневмонии, в дополнение к лечению широкого спектра бактериальных инфекций. Среди болезнетворных агентов, чувствительных к эритромицину, – *Staphylococcus aureus*, многие виды *Streptococcus*, виды *Mycoplasma*, *Legionella pneumophila* (бактерия, вызывающая болезнь легионеров) и *Corynebacterium diphtheriae* (возбудитель дифтерии). Как правило, эритромицин обладает низкой цитотоксичностью, однако было задоку-

ментировано, что он вызывает желудочно-кишечные проблемы, а также токсичен для печени из-за его нестабильности и химической конверсии в кислых условиях [19, 20]. Пожилые пациенты часто неспособны переносить активность перистальтики кишечника под воздействием препарата, тогда как дети считают совершенно неприемлемым неприятный вкус. Устойчивость к антибиотикам растет с угрожающей скоростью, что может быть обусловлено ростом потребления антибиотиков [21]. Для устранения устойчивости к антибиотикам были разработаны некоторые подходы, такие как разработка новых соединений, ингибирование их устойчивости к ферментам. Нанотехнологии могут играть важную роль в предотвращении устойчивости к антибиотикам путем избегания эффлюксных насосов и с помощью некоторых других механизмов [22, 23]. Магнитолипосомы, содержащие эритромицин, могут быть потенциальной системой наноносителей, которая может служить возможным решением для преодоления устойчивости к антибиотикам.

Расширенную регуляцию активности высвобождения липосомного лекарственного средства можно получить с помощью переменного магнитного поля (ПМП) [24]. ПМП может быть стимулом для запуска высвобождения лекарственного средства из магнитолипосомы [12, 25]. Кроме того, электромагнитное поле при дистанционном срабатывании наночастиц улучшает проницаемость фосфолипидной мембраны [25]. Авторы работы [26] использовали DOX-инкапсулированные магнитолипосомы и подвергали их воздействию высокочастотного ПМП (≈ 1 МГц). Выделенное тепло привело к высвобождению препарата из магнитолипосом [18, 26, 27]. В то же время в работе [28] авторы продемонстрировали усиленное высвобождение декстрана путем применения низкочастотного ПМП к магнитным коллагеновым нанокомпозитам. Авторы работы [11] продемонстрировали, что воздействие ПМП неинвазивно ведет к нагреву внедренных наночастиц оксида железа и вызывает высвобождение лекарственного средства из термочувствительных липосом у крыс.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы исследовать роль ПМП в иницировании действия наночастиц для ускорения высвобождения лекарственного средства из компартмента нановезикул, а также сравнить результаты воздействия на магнитолипосомы ПМП одинаковой частоты, но различной низкой интенсивности.

МЕТОДЫ

Приготовление магнитных наночастиц (Fe_3O_4). Магнитные наночастицы были синтезированы путем щелочного соосаждения с использованием

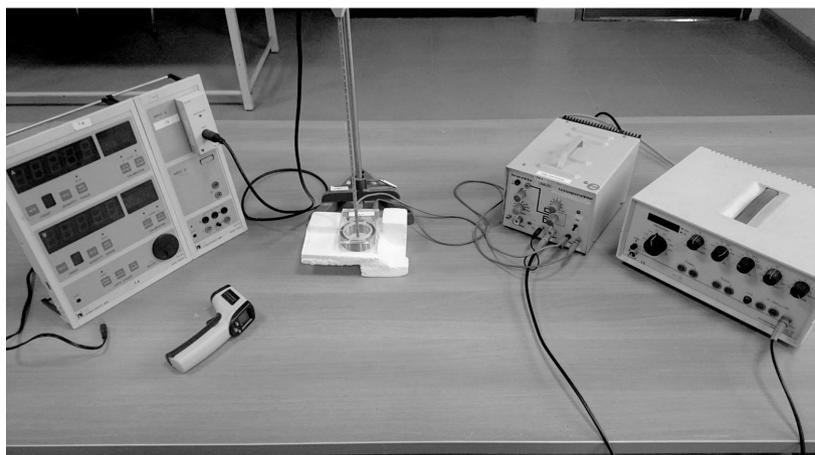


Рис. 1. Система воздействия переменным магнитным полем.

метода, описанного в работе [29]. Раствор, содержащий 0.07 моль/л Fe^{2+} и 0.14 моль/л Fe^{3+} , механически перемешивали (1000 об/мин) и нагревали до $80^{\circ}C$, затем добавляли к 50 мл NH_4OH и раствор перемешивали в течение 40 мин. После этого раствор оставляли для охлаждения при температуре окружающей среды. Затем магнитные частицы отделяли центрифугированием при 6000 об/мин. После промывали дистиллированной водой с последующей обработкой ультразвуком на ультразвуковой водяной бане в течение 30 мин.

Получение инкапсулированных эритромицином липосом и инкапсулированных эритромицином магнитолипосом холодным методом. Этосомы были получены в соответствии с методом, предложенным в работе [30], с простыми модификациями. Фосфатидилхолин (ФХ) (80 мг) из соевых бобов, 10 мг эмульгатора (Цетеарет-25) и 10 мг эритромицина растворяли в этаноле (20% по объему) и нагревали до $30 \pm 1^{\circ}C$ в закрытом сосуде на водяной бане. Дистиллированную воду, предварительно нагретую до $30 \pm 1^{\circ}C$, медленно добавляли тонкой струей к вышеуказанному раствору липида в этаноле при непрерывном перемешивании с использованием магнитной мешалки при 700 об/мин в течение 30 мин, затем хранили при $4^{\circ}C$. Что касается нановезикул эритромицина с

магнитными наночастицами, процедура была той же самой, что и выше, за исключением того, что магнитные наночастицы, диспергированные в дистиллированной воде, добавляли к этанольному раствору фосфатидилхолина, эмульгатора и эритромицина. Полученные нановезикулы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне с водяными банями в течение 30 мин [31].

Исследование приготовленных композиций. *Определение распределения по размерам.* Размер приготовленных композиций анализировали методом динамического рассеяния света с использованием Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments ZS, Великобритания).

Просвечивающая электронная микроскопия липосом (ПЭМ). Для определения формы синтезированных липосом использовали просвечивающий электронный микроскоп Jeol-2100 (Jeol, Япония).

Эффективность захвата. Инкапсулированную эритромицином липосому и инкапсулированную эритромицином магнитолипосому центрифугировали при 15889 g, $4^{\circ}C$ в течение 90 мин и отделяли надосадочную жидкость. Абсорбцию центрифугата измеряли методом жидкостной хроматографии с масс-спектроскопией. Следующее уравнение было использовано для расчета эффективности инкапсуляции.

$$EE\% = \frac{\text{Все лекарство} - \text{Свободное лекарство}}{\text{Все лекарство}} \times 100.$$

Система воздействия переменным магнитным полем. Как показано на рис. 1, система воздействия переменным магнитным полем состояла из круглой магнитной катушки ($N = 200$, $r = 3$ см,

$L = 0.35$ мГн), которая была подключена к генератору сигналов DDS-частотного генератора серии MHS-5200A и усилителю мощности NEVA Dr. Vatter GmbH & Co. Тип 7220 № 384. Сенсоры

Cassy, тесламетр и инфракрасный термометр были использованы для оценки напряженности магнитного поля и температуры соответственно.

Температурные эксперименты. Частотный генератор был установлен на 100 кГц в течение 10 мин, чтобы подтвердить стабильность магнитного поля, генерируемого в катушке. Затем кювету объемом 1.5 мл, заполненную инкапсулированными эритромицином магнитолипосомами, помещали в центр катушки, которая генерирует ПМП. Кювету изолировали пенопластовой оболочкой, чтобы не было прямого контакта с проводами катушки. Это необходимо для того, чтобы убедиться, что повышение температуры в образцах происходит из-за магнитной энергии, передаваемой ПМП магнитолипосоме, а не из-за проводимости от теплового внутреннего сопротивления проводов катушки или любых других изменений температуры окружающей среды. Повышение температуры непрерывно контролировали в течение 30 мин с использованием инфракрасного термометра, расположенного точно над кюветой. Температуру регистрировали каждую минуту. Каждый эксперимент проводили трижды, представленные данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение.

***In vitro* исследование высвобождения инкапсулированной эритромицином липосомы и инкапсулированной эритромицином магнитолипосомы до и после воздействия переменного магнитного поля.** Наносuspензию с магнитными наночастицами (0.5 мл) помещали в диализный мешок (MWCO: 12000–14000), наполненный дополнительно 5 мл фосфатно-солевого буфера, pH 7.4. Был взят 1 мл образцов. Образцы анализировали на эритромицин методом ЖХ/МС [1]. Для каждого испытания были подготовлены два набора образцов и подвергнуты воздействию ПМП с частотой 100 кГц, но с различной интенсивностью — 5 и 15 мТл соответственно, в течение получаса, затем проводили исследования высвобождения *in vitro*.

Были созданы две группы инкапсулированных эритромицином магнитолипосом: группа А, которая была контрольной группой, не подвергавшейся воздействию ПМП, и группа В, подвергавшаяся воздействию 5 мТл ПМП в течение 30 мин.

Приблизительно 1 мл каждого образца липосом отбирали через определенные интервалы времени в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч и заменяли равными объемами свежего фосфатно-солевого буфера буфера. Одновременно были созданы две другие группы инкапсулированных эритромицином магнитолипосом для воздействия ПМП 15 мТл с той же частотой.

Условия эксперимента с применением сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СПЖХ-МС/МС). СПЖХ-МС/МС для определения эритромицина проводили с использовани-

ем дифенгидрамина в качестве внутреннего эталона. Анализы были получены на системе Waters ACQUITY Xevo TQD, которая состояла из хроматографической системы ACQUITY UPLC H-Class и трехкврупольного масс-спектрометра XevoTQD с интерфейсом электрораспылительной ионизации (ESI) (Waters Corp., Milford, США). Для разделения аналитов использовали колонку Aquity UPLC VEN C18 50 \times 2.1 мм (размер частиц 1.7 мкм) (Waters, Wexford, Ирландия). Работу системы и сбор данных контролировали с помощью программного обеспечения MassLynx 4.1 (Waters, Milford, США). Все данные были обработаны с помощью программы количественной оценки TargetLynx (Waters, Milford, США). Градиентное элюирование при скорости потока 0.2 мл/мин проводили для хроматографического разделения с использованием 0.1% муравьиной кислоты в воде (А) и 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Градиент работал следующим образом: 0 мин, 95% А, 5% Б; 1.0 мин, 5% А, 95% Б; 3 мин, 5% А, 95% Б; 4 мин, 95% А, 5% Б; 6 мин, 95% А, 5% Б. Объем инъекции составлял 10 мкл, выполненный путем частичной инъекции в петлю с использованием переполнения иглы в качестве техники инъекции. Температура колонки была установлена на 40°C. В качестве газа для десольватации и для конуса использовали азот при скорости потока 800 и 1000 мл/ч соответственно. Аргон использовали в качестве «collision gas» при давлении приблизительно $3.67 \cdot 10^{-3}$ мбар. Оптимальные параметры МС были следующими: капиллярное напряжение 3.9 кВ, радиочастотное напряжение линзы 2.5 В, температура источника 150°C и температура десольватационного газа 300°C. Напряжение на конусе составляло 23 и 38 В для эритромицина и дифенгидрамина соответственно. Резервный источник энергии работал в положительном режиме. Количественную оценку проводили с использованием множественного мониторинга реакций переходов m/z 734.55 $>$ 158.15 с энергией столкновения 32 В для эритромицина и m/z 256.14 $>$ 167.04 с энергией столкновения 10 В для дифенгидрамина соответственно. Время задержки автоматически устанавливалось программным обеспечением MassLynx 4.1.

Приготовление образцов серийного разведения эритромицина. Для калибровки готовили исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл эритромицина в метаноле и разбавляли центрифугатом чистых липосом/магнитолипосом или фосфатно-солевым буфером для получения рабочих растворов с концентрацией 0.1, 0.3, 0.7, 2, 5 и 10 мкг/мл. Готовили исходный раствор (1 мг/мл) дифенгидрамина (внутренний эталон) в метаноле, затем разбавляли до 1 мкг/мл. Образцы калибровочной кривой готовили путем добавления 100 мкл 1 мкг/мл внутреннего эталона к 1 мл раствора эритромицина в каждом из разведений. Образцы

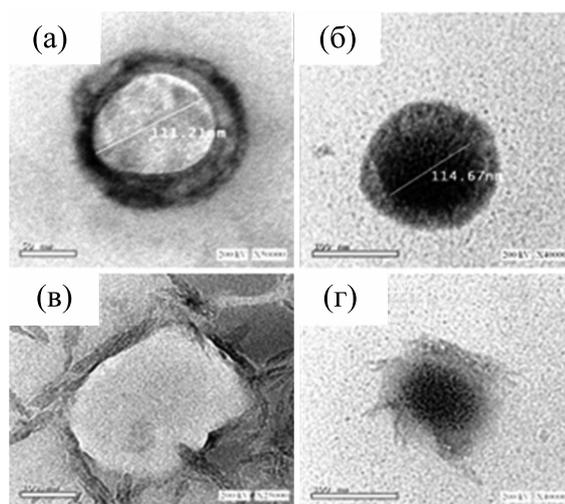


Рис. 2. ПЭМ-изображения липосом (а), магнитолипосом (б), липосом после обработки ПМП (в) и магнитолипосом после обработки ПМП (г).

калибровочной кривой фильтровали с использованием мембранных фильтров 0.22 мкм (Waters, США) и анализировали с использованием описанного выше метода СПЖХ-МС/МС.

Проверка метода. Впервые предложенный метод СПЖХ-МС/МС был утвержден в соответствии с руководящими принципами ИСН в следующем контексте: специфичность, линейность, порог чувствительности, предел количественного определения, воспроизводимость (в разные дни и внутрисуточная) и достоверность.

Порог чувствительности был определен как концентрация образца, дающая ответ, в три раза превышающий базовый шум. Предел количественного определения рассчитывали, как концентрацию образца, дающего сигнал, в десять раз превышающий базовый шум. Воспроизводимость в течение суток определяли в течение одних суток путем анализа трех образцов калибровочной кривой. Межсуточную воспроизводимость определяли в течение трех суток подряд при одинаковых концентрациях. Достоверность определяли путем введения четырех различных концентраций, которые не использовались при построении калибровочной кривой (образцы для контроля качества: 0.2, 0.5, 1, 3 мкг/мл), точность метода определяли как абсолютное значение отношения среднего от найденных значений образцов калибровочной кривой к их теоретическим значениям, выраженные в процентах. Критерии приемлемости данных включали точность в пределах $\pm 15\%$ и точность в пределах $\pm 15\%$ отклонения (85–115%) от номинального.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование приготовленных композиций. Средний размер приготовленных композиций липосом. Рассчитанный средний размер частиц различных композиций составлял 254 ± 10 нм для липосом, инкапсулированных эритромицином, и 473 ± 40 нм для магнитолипосом, инкапсулированных эритромицином. Распределение индекса полидисперсности составляло 0.35 и 0.32 для инкапсулированных эритромицином липосом и инкапсулированных эритромицином магнитолипосом соответственно.

Зета-потенциал. Было установлено, что средний зета-потенциал для инкапсулированных эритромицином липосом составляет 47.9 ± 0.35 мВ, тогда как для инкапсулированных эритромицином магнитолипосом он составляет 47.5 ± 0.85 мВ.

Эффективность захвата. Эффективность загрузки лекарственного средства составляла $87.9 + 2.2\%$ для инкапсулированной эритромицином липосомы и $97.8 + 1.5\%$ для инкапсулированной эритромицином магнитолипосомы, что указывает на высокую эффективность инкапсуляции лекарственного средства.

Подтверждение влияния переменного магнитного поля морфологически. Изменение морфологии простых липосом и магнитолипосом наблюдалось на изображениях, полученных с помощью ПЭМ, с размером частиц 111.21 нм и 114.67 нм соответственно (показаны на рис. 2, по одной частице в поле зрения). Таким образом, подтверждается успешное приготовления липосом и магнитолипосом, захват магнитных наночастиц и разрыв композитов после обработки ПМП.

Температурные результаты. Магнитолипосомы, подвергшиеся воздействию ПМП 5 мТл при

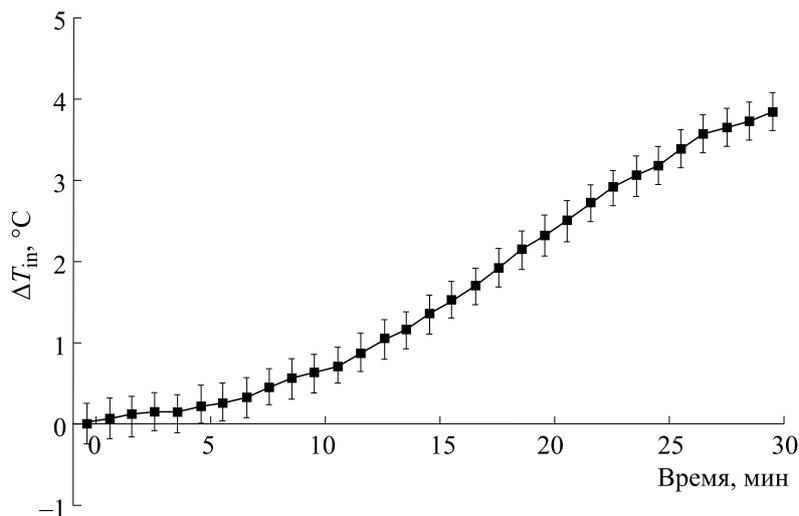


Рис. 3. Повышение разницы в температуре магнитолипосомы при увеличении продолжительности воздействия переменного магнитного поля при 100 кГц, 5.6 мТл.

100 кГц в течение получасового времени воздействия, демонстрировали повышение температуры с 23 до 27°C (почти 4°C) (рис. 3). Для воздействия ПМП 15 мТл повышение температуры — с 30 до 55°C (почти 24°C) (рис. 4).

Результаты высвобождения препарата *in vitro*. Измерения эритромицина с помощью метода СПЖХ-МС/МС. Впервые разработанный метод СПЖХ-МС/МС определения эритромицина был выполнен с использованием дифенгидрамина в качестве внутреннего эталона. Количественное определение было выполнено с использованием мониторинга множественных реакций переходов m/z 734.55 > 158.15 с энергией столкновения 32 В для эритромицина, как показано на рис. 5, и

m/z 256.14 > 167.04 с энергией столкновения 10 В для дифенгидрамина, как показано на рис. 6 соответственно.

Предложенный метод СПЖХ-МС/МС был подтвержден с точки зрения линейности, специфичности, порога чувствительности, предела количественного определения, воспроизводимости (однодневной и многодневной) и достоверности. Отклик каждого образца калибровочной кривой (y) наносили на график в зависимости от его концентрации (x). Получено уравнение линейной корреляции $y = 1.204x - 0.021$ с $R^2 = 0.994$. Обнаружено, что порог чувствительности составляет 0.5 нг/мл, а предел количественного опреде-

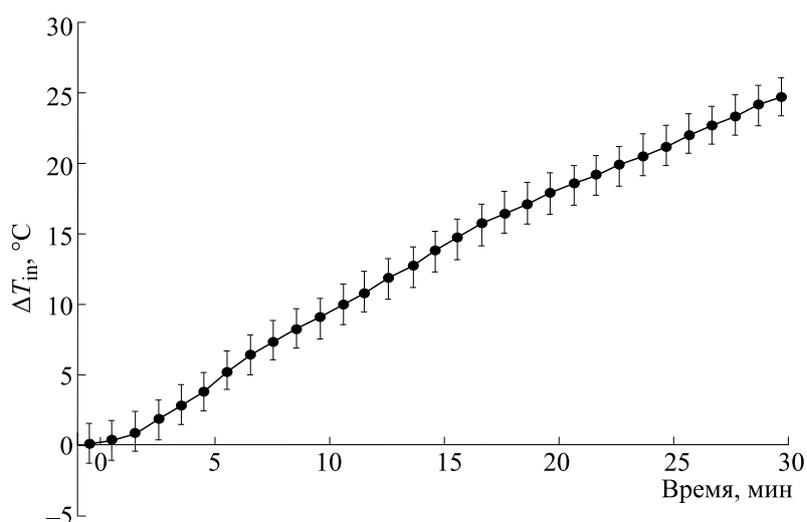


Рис. 4. Повышение разницы в температуре магнитолипосомы за счет увеличения продолжительности воздействия переменного магнитного поля при 100 кГц, 15 мТл.

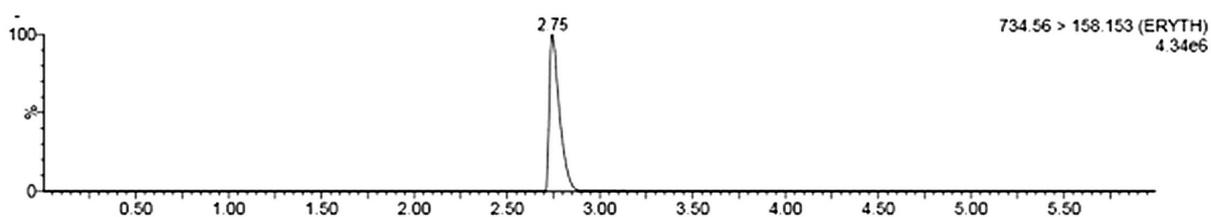


Рис. 5. СПЖХ-МС/МС-хроматограмма эритромицина в режиме множественного мониторинга реакций.

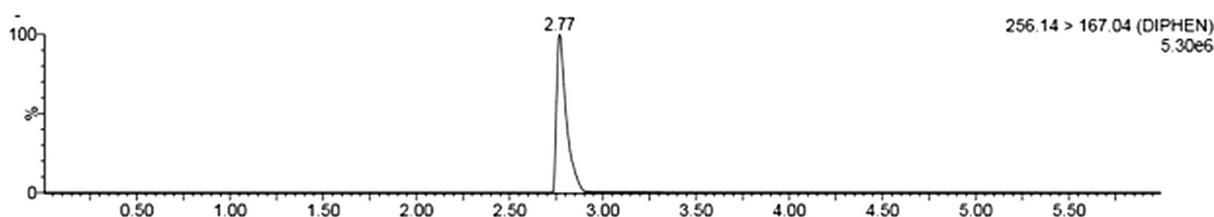


Рис. 6. СПЖХ-МС/МС-хроматограмма дифенгидрамина в режиме множественного мониторинга реакций.

ления – 1.6 нг/мл. Суточная повторяемость, оцениваемая как % КП, варьировала от 0.90 до 4.71%, тогда как для межсуточной воспроизводимости % КП варьировал от 0.55% до 4.94%. Для оценки точности были подготовлены четыре образца контроля качества, и измеренный с этой целью процент выхода составлял от 92 до 101%.

Выход препарата in vitro после воздействия переменного магнитного поля с различной интенсивностью. Магнитолипосомы, подвергшиеся воздействию ПМП 5 мТл, 100 кГц в течение получасового времени воздействия, продемонстрировали высвобождение эритромицина 0.83 ± 0.1 мкг/мл по отно-

шению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия (рис. 7). В то же время у магнитолипосом, подвергшихся воздействию ПМП 15 мТл, эритромицин высвобождался с содержанием $(1.33 \pm 0.04) \cdot 10^{-7}$ мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Магнитолипосомы тщательно оценивались с точки зрения контролируемого высвобождения лекарств. Движение магнитных наночастиц

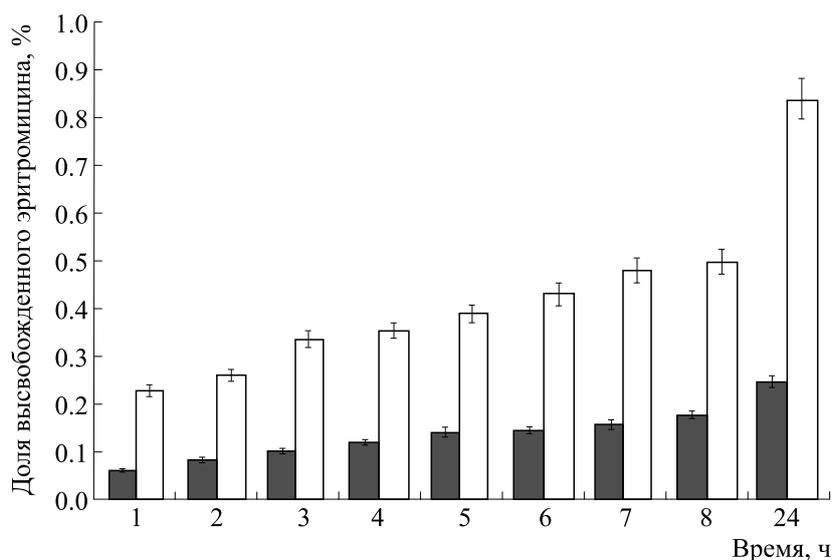


Рис. 7. Разница в высвобождении лекарственного средства из не подвергавшихся воздействию (темные столбики) и экспонированных в 5 мТл ПМП магнитолипосом (светлые столбики) в различные интервалы времени.

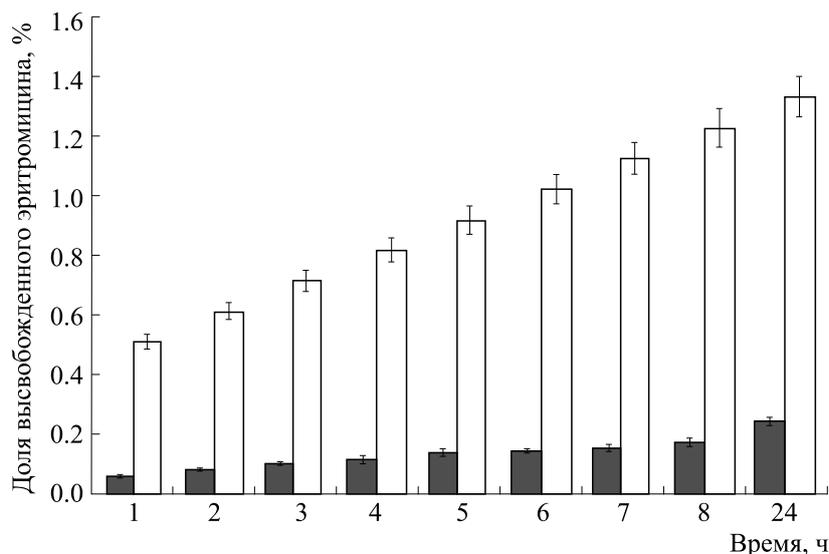


Рис. 8. Разница в высвобождении лекарственного средства из не подвергавшихся воздействию (темные столбики) и подвергавшихся воздействию 15 мТл магнитолипосом (светлые столбики) в течение 8 ч, а также через 24 ч.

вследствие воздействия магнитного поля достаточной интенсивности и частоты действует как основной триггер для высвобождения лекарств [3, 32]. Описанный здесь эффект проницаемости свидетельствует о том, что изменения в мембранах магнитолипосом могут быть вызваны воздействием относительно слабых магнитных полей при температурах, близких или равных T_c .

Наши ранние результаты показывают, что для изменения проницаемости бислоя достаточно на поверхность липидной мембраны приложить синусоидальное магнитное поле 100 кГц (пик в 5 мТл). ПЭМ-изображения также показали, что воздействие магнитного поля привело к изменениям в целостности поверхности липосом и даже к фрагментации мембраны, что доказывает заметное влияние ПМП на систему высвобождения лекарственного средства в присутствии магнитных наночастиц.

Магнитолипосомы были исследованы в качестве возможных носителей для систем доставки лекарств, зависящих от магнитного поля. Магнитолипосомы формировались из суперпарамагнитных гидрофобных наночастиц на основе оксида железа, заключенных в двухслойную липидную мембрану этих везикул [33, 34]. Наши эксперименты с применением атомно-силовой микроскопии показали, что присутствие гидрофобных наночастиц, встроенных в липидную мембрану, приводит к общему усилению жесткости и увеличению морфологической неоднородности, что должно способствовать механическому разрыву магнитолипосом во внешнем переменном магнитном поле низкой интенсивности. Чтобы подтвердить этот вывод, мы провели экс-

перименты по высвобождению эритромицина при наличии и отсутствии магнитного поля при комнатной температуре из магнитолипосом, загруженных пассивно и дистанционно.

Повышение температуры непрерывно отслеживалось каждую минуту в течение 30 мин. Повышение температуры почти на 4°C указывает на процесс прироста тепла (рис. 7). Способность магнитных наночастиц нагреваться зависит от характеристик магнитных частиц, таких как размер, намагниченность насыщения, когда выделяется тепло в результате потери гистерезиса, броуновской релаксации или релаксации по Нелю на основе размера частиц и частоты ПМП [12, 25].

Высвобождение отслеживалось в предположении о полном механическом разрыве магнитолипосом, который также визуализировали с помощью ПЭМ. Эритромицин высвобождался в количестве 0.83 ± 0.1 мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия. Это существенное высвобождение эритромицина из магнитных везикул, подверженных воздействию поля, по сравнению с неэкспонированными, происходит из-за воздействия механического воздействия и тепла, выделяемого липидным бислоем. Использование поля с частотой 100 кГц вызывает вращение и вибрацию частиц оксида железа, которые создают механические силы, вызывающие деформацию в фосфолипидной мембране липосомы.

Основная тенденция, которая вытекает из наших данных, говорит о том, что в наших экспериментальных условиях при воздействии 5 мТл высвобождение лекарственного средства происходит через разрыв магнитолипосом, вызванный

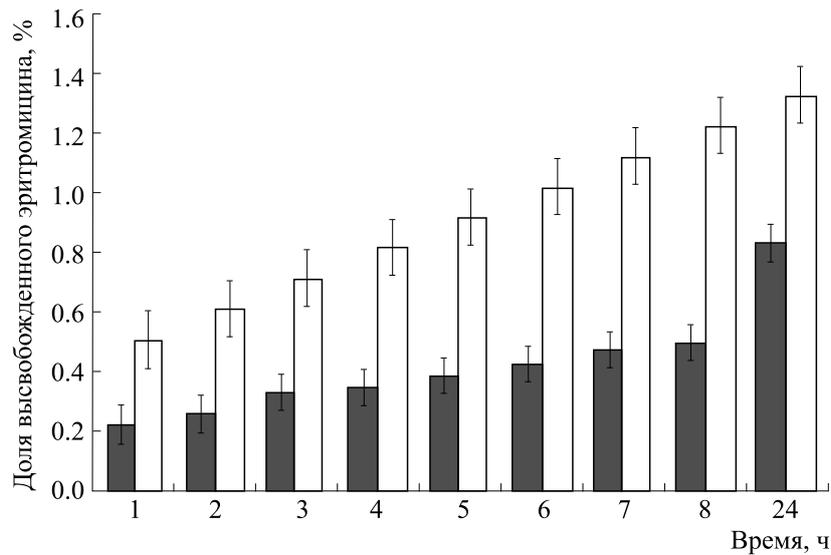


Рис. 9. Сравнение высвобождения эритромицина из магнитолипосом, подвергавшихся воздействию 5 и 15 мТл ПМП в течение 8 ч, а также через 24 ч.

механической вибрацией магнитных наночастиц, а не через локальный нагрев магнитной наночастицы. Таким образом происходит активация мембранной проницаемости, как наблюдали авторы работы [35].

Чтобы подтвердить влияние ПМП на контролируемое высвобождение лекарственного средства из магнитолипосом, высвобождение инкапсулированного эритромицина осуществляли в различных условиях путем увеличения напряженности магнитного поля до 15 мТл, где повышение температуры непрерывно контролировали ежеминутно до 30 мин. Эритромицин высвобождался с содержанием $(1.33 \pm 0.04) \cdot 10^{-7}$ мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия. Это повышение температуры на почти 24°C (рис. 8) сопровождало процесс получения тепла, указывая на то, что поглощение энергии электромагнитного поля может привести к новой конфигурации фосфолипида, что, в свою очередь, может привести к изменениям проницаемости липидной мембраны.

Сравнение данных по высвобождению эритромицина при воздействии 5 и 15 мТл при одной и той же частоте подчеркивает прямо пропорциональную взаимосвязь между магнитной энергией, передаваемой магнитолипосом переменным генерируемым электромагнитным полем, и проницаемостью мембраны.

Таким образом, свойства триггерного высвобождения ПМП продемонстрировали, что высво-

буждение нагрузки из магнитолипосом под действием ПМП было обусловлено контролируемым механическим приведением в действие магнитных наночастиц с помощью ненагревающего магнитного поля, что дает возможность преодолеть недостаток включения нагрева (рис. 7, 8) и показывает заметную разницу в высвобождении эритромицина из магнитолипосом до и после воздействия ПМП с различными частотами (5 и 15 мТл). Результаты показали увеличение процента высвобождения лекарственного средства при увеличении напряженности магнитного поля с 5 до 15 мТл (рис. 9). Эта низкая интенсивность поля на частоте 100 кГц вызывает вращение и вибрацию частиц оксида железа, которые создают механические силы, которые вызывают деформацию в фосфолипидной мембране липосомы.

В общем увеличение высвобождения лекарственного средства из липосомы возникает в результате применения ПМП, вызывающего механические силы, которые приводят к большему высвобождению лекарственного средства без разрыва фосфолипидной структуры липосомы. Кроме того, преимущество эффекта нагревания возникает в результате релаксации Нееля колеблющихся магнитолипосом, которые локализуют эффект нагревания в липосоме, не вызывая нагревания окружающей среды. Дополнительным преимуществом использования магнитолипосомы является возможность отслеживать ее внутри человеческого тела до желаемого места высвобождения, что гарантирует максимальную полу-

ченную дозу. Несмотря на то что необходимы дополнительные исследования, чтобы прояснить процесс высвобождения и применения магнитолипосом *in vivo*, гидрофобные МНЧ в мембране обеспечивают эффективный подход для реализации иницируемого высвобождения груза из липосом в контролируемом объеме и месте.

В дальнейшем запланированы работы по контролю количества лекарственного средства, выпущенного с использованием различных частотных диапазонов магнитного поля при безопасной для биологических систем напряженности.

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. A. Hardiansyah, L.-Y. Huang, M.-Ch. Yang, et al., *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 497 (2014).
2. P. R. Kulkarni, J. D. Yadav, and K. A. Vaidya, *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **3**, 10 (2011).
3. R. P. Liburdy and T. S. Tenforde, *Rad. Res.* **108**, 102 (1986)
4. Y. Wang and D. S. Kohane, *Nature Rev. Materials* **2**, 17020 (2017). DOI: 10.1038/natrevmats.2017.20
5. A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 144 (2012).
6. S. Laurent, D. Forge, M. Port, et al., *Chem. Rev.* **110** (4), 2574 (2010). DOI:10.1021/cr900197g
7. Ch. Tapeinos, in *Smart Nanoparticles for Biomedicine* (Elsevier, 2018), pp. 131–142. DOI: 10.1016/B978-0-12-814156-4.00009-4
8. S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna, et al., *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* **1** (6), 228 (2011).
9. T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, et al., *J. of Magnetism and Magnet. Mater.* **293**, 483 (2005).
10. J. Estelrich, E. Escibano, J. Queralt, and M. A. Busquets, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (4), 8070 (2015). DOI: 10.3390/ijms16048070
11. L. A. Tai, P. J. Tsai, Y. C. Wang, et al., *Nanotechnology* **20** (13) (2009). DOI: 10.1088/0957-4484/20/13/135101
12. D. Qiu, and X. An, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **104**, 326 (2013). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.033
13. R. I. Blumenthal, *J. Nanomed. Biotherapeutic Discov.* **4** (3), 1000130 (2014). DOI: 10.4172/2155-983x.1000130
14. S. Nappini, M. Bonini, F. Ridi, and P. Baglioni, *Soft Matter* **7** (10), 4801 (2011). DOI: 10.1039/c0sm01264e
15. A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, et al., *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1** (2), 147 (2012). DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020
16. S. Nappini, S. Fogli, B. Castroflorio, et al., *J. Mater. Chem. B* **4**, 716 (2016).
17. Y. I. Golovin, S. L. Gribovsky, D. Y. Golovin, et al., *J. Control. Release* **219**, 43 (2015).
18. W. Zhan and C. H. Wang, *J. Control. Release* **285**, 212 (2018). doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.006
19. T. Hirsch, F. Jacobsen, H.-U. Steinau, and L. Steinstraesser, *Prot. Peptide Lett.* **15** (3), 238 (2008).
20. L. S. Tavares, M. D. O. Santos, L. F. Viccini, et al., *Peptides* **29** (10), 1842 (2008).
21. S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, et al., *Cureus* **9** (6), e1403 (2017).
22. U. Shimanovich and A. Gedanken, *J. Mater. Chem. B* **4** (5), 824 (2016).
23. A. Gupta, S. Mumtaz, C.-H. Li, et al., *Chem. Soc. Rev.* **48** (2), 415 (2019).
24. D. Belc, C. Chen, R. Roberts, et al., In *Proc. NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show – NSTI Nanotech 2005* (2005), pp. 23–26.
25. R. Spera, F. Apollonio, M. Liberti, et al., *Colloids Surf. B Biointerfaces* **131**, 136 (2015).
26. M. Babincová, P. Čičmanec, V. Altanerová, *Bioelectrochemistry* **55** (1–2), 17 (2002). DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00171-2
27. A. Joniec, S. Sek, and P. Kryszinski, *Chemistry – Eur. J.* **22** (49), 17715 (2016). DOI: 10.1002/chem.201602809
28. V. M. De Paoli, S. H. Lacerda De Paoli, L. Spinu, et al., *Langmuir* **22**, 5894 (2006).
29. N. C. C. Lobato, Â. de Mello Ferreira, and M. B. Mansur, *Separat. Purif. Technol.* **168**, 93 (2016).
30. E. Touitou, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, *J. Control. Release* **65**, 403 (2000).
31. M. Rady, I. Gomaa, N. Afifi, and M. Abdel-Kader, *Int. J. Pharmaceut.* **548** (1), 480 (2018).
32. G. Podaru, R. Dani, H. Wang, et al., *J. Phys. Chem. B* **118** (40), 11715 (2014). doi: 10.1021/jp5022278
33. C. A. Monnier, D. Burnand, B. Rothen-Rutishauser, et al., *Eur. J. Nanomedicine* **6** (4), 201 (2014). DOI: 10.1515/ejnm-2014-0042
34. A. R. O. Rodrigues, B. G. Almeida, J. M. Rodrigues, et al., *RSC Advances* **7** (25), 15352 (2017). DOI: 10.1039/c7ra00447h
35. K. Y. Vlasova, A. Piroyan, I. M. Le-Deygen, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **552**, 689 (2019). DOI: 10.1016/j.jcis.2019.05.071.

Alternating Magnetic Field-Induced Membrane Permeability in Erythromycin Magnetoliposomes: a Potential Solution to Antibiotic Resistance

Bassant M. Salah*, Mai Rady**, Mohammad Abdel-Halim***, Heba M. Fahmy****, Nermeen S. El-Din*, and Mohamed H. Gaber*****, *****

*Physics Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt

**Pharmaceutical Technology Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt

***Pharmaceutical Chemistry Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt

****Faculty of Science, Cairo University, Giza, Egypt

*****Faculty of Engineering, British University in Egypt, Cairo, Egypt

Antibiotic resistance is a serious problem facing the world; it is increasing every year due to overuse or misuse of antibiotics which leads to the development of new mechanisms of drug resistance by bacteria. For this study, erythromycin-loaded magnetoliposomes have been prepared and subjected to alternating magnetic field (5 and 15 mT, 100 KHz) for 30 min to test the effect of exposure on the rate of drug export out of the cell behind the resistance mechanism of bacteria. Results showed temperature increases of 4 and 24 degrees Celsius after exposure of erythromycin-loaded magnetoliposomes to 5mT and 15mT, respectively. Moreover, it was found that the percentage of erythromycin exported was greater after exposure to alternating magnetic field ($0.83 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ and $1.33 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ in 5 mT and 15mT AMF, respectively) than that in the control group ($0.24 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$). Exposure to alternating magnetic field induced higher rate of erythromycin release from magnetoliposomes via mechanical actuation of the nanoparticles. These findings suggest that it is possible to trigger and control the drug release by merging the targeted drug delivery system with the nanotechnology and magnetic field. Upon increasing the intensity of the alternating magnetic field, the release rate increased significantly.

Keywords: alternating magnetic field, drug release, drug delivery, erythromycin, magnetoliposomes

УДК 577.3

ФОТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОРФИРИНОВ НА КЛЕТКИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА Saki-1

© 2021 г. А.Ф. Арутюнян, Л.Л. Тевонян, А.Д. Бениаминов, Е.Е. Егоров, Д.Н. Калюжный

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

E-mail: uzhny@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

В рамках разработки и поиска фотосенсибилизаторов с возможно более узкой направленностью рассмотрены два типа тетрапиридиновых порфиринов: катионный порфирин P4 (ТМРуP4) и его амфифильное производное порфирин P1, содержащее карбоксильные группы, а также их цинк-содержащие аналоги ZnP4 и ZnP1. Проведено сравнение физико-химических свойств двух классов молекул и исследовано их воздействие на клетки светлоклеточной карциномы почек Saki-1 в культуре. Соединения в микромолярных концентрациях не вызывали морфологических изменений клеток в отсутствие облучения светом. Обработка клеток порфирином P4 под действием синего света вызывала быстрое проявление цитотоксичности. Клетки начинали открепляться от субстрата, а на мембранах появлялись вздутия (блебы). Скорость этих изменений согласуется с прямым повреждением мембран, вызываемым порфирином P4. В аналогичных условиях соединение ZnP1 не вызывало никаких видимых изменения морфологии клеток Saki-1. Полученные результаты могут быть объяснены различной липофильностью соединений и, как следствие, их различной локализацией в клетке. Преимущественно мембранная локализация должна преобладать для более липофильного соединения P4 по сравнению с ZnP1, что может служить объяснением быстрого цитопатического эффекта.

Ключевые слова: порфирин, активные формы кислорода, клетки.

DOI: 10.31857/S0006302921020137

Фотодинамическая терапия опухолей одно из активно развивающихся направлений в настоящее время. Порфирины – перспективные молекулы для применения в фотодинамической терапии опухолей благодаря специфичному взаимодействию с клеточными структурами и способности генерировать активные формы кислорода [1, 2]. Фотохимическое действие приводит к направленному повреждению клеточных мишеней, тем самым вызывая гибель опухолевых клеток. В настоящее время ведется разработка и поиск фотосенсибилизаторов с определенной мишенью действия. Порфирины являются классом соединений, которые удобны для химической модификации с целью достижения целевых характеристик. Для доставки фотосенсибилизаторов в клетки и преодоления факторов гипоксии опухолей предлагаются различные носители, в том числе способные наряду с соединениями переносить кислород [3].

Тетрапиридилпорфирины рассматриваются как класс молекул, способных к взаимодействию с различными клеточными мишенями, одной из которых является ДНК. Для повышения растворимости соединений и лучшей доставки в клетки преимуществом обладают катионные формы. Для катионного порфирина ТМРуP4 в малой концентрации (0.5 мкМ) изучено изменение экспрессии генов, при помощи полногеномного анализа последовательности РНК. Было обнаружено, что высокая доля измененных генов были функционально связаны с клеточной адгезией. В высокой же концентрации (2 мкМ) соединение ТМРуP4 вызывало клеточную гибель [4]. ТМРуP4 проявляет высокое сродство к ДНК, в частности к неканоническим G-квадруплексным структурам, образующимся теломерной последовательностью ДНК [5], тем самым являясь потенциальным агентом, снижающим активность теломеразы посредством конкуренции во взаимодействии с субстратом.

При выборе фотосенсибилизаторов, имеющих направленное действие на ДНК, необходимо изу-

Сокращение: DPBF – 1,3-дифенилисобензофуран.

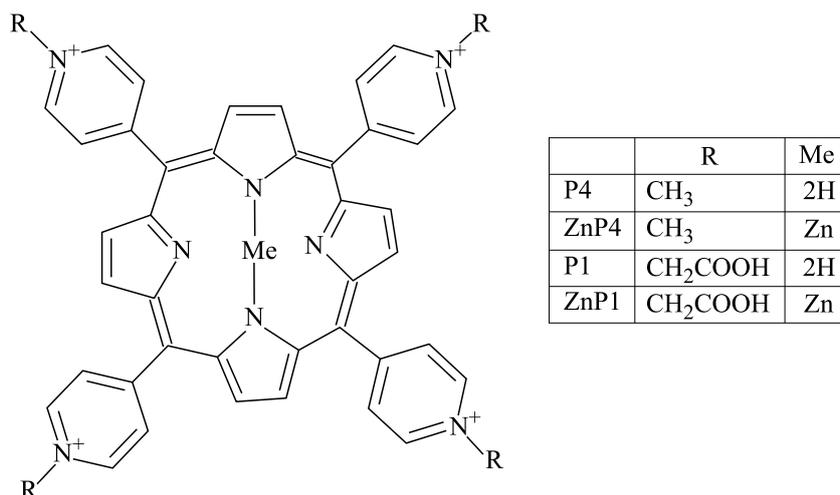


Рис. 1. Химическая структура порфиринов P1 (5,10,15,20-tetrakis(N-carboxymethyl-4-pyridinium)porphyrin) и P4 (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porphyrin), а также их цинк-содержащих аналогов ZnP1 и ZnP4.

чение возможного побочного эффекта на альтернативные клеточные мишени. Первой потенциальной мишенью амфифильных фотосенсибилизаторов является клеточная мембрана. В данной работе исследована индуцируемая светом генерация АФК несколькими катионными порфиринами и фотоиндуцируемое действие на линию клеток светлоклеточного рака почки человека Saki-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Производные тетрапиридилпорфиринов, исследованные в работе, показаны на рис. 1. Соединение ZnP4 получено кипячением порфирина P4 (TMPyP4, Sigma Aldrich, США) в присутствии Zn(OH)₂. Соединение P1 получено, как описано в работе [6], путем реакции 2-бромуксусной кислоты с тетрапиридинпорфирином (Sigma Aldrich, США). Аналогичным образом, порфирин ZnP1 получен кипячением P1 в присутствии Zn(OH)₂ [7]. Структуры полученных соединений подтверждены методами ЯМР и масс-спектрометрии.

Способность производных порфирина генерировать синглетный кислород под действием света качественно оценена путем разложения 1,3-дифенилисобензофурана (DPBF) [7]. Растворы, содержащие 100 мкМ DPBF и 1 мкМ соединений, освещали в течение 15 мин с помощью синего света светодиода. Изменение концентрации DPBF определяли по поглощению при 415 нм в диметилсульфоксиде. Зависимость поглощения от времени облучения аппроксимировали экспоненциальным затуханием для определения характерного времени разложения DPBF в присутствии фотосенсибилизаторов.

Коэффициент распределения соединений в бинарной системе «октанол/вода» был рассчитан

как отношение равновесных концентраций соединения в октанол и в воде. Соответствующие концентрации определены спектрофотометрически по поглощению порфиринов в полосе Soret в октанол до и после добавления воды.

Спектры поглощения регистрировали в различных растворителях (вода, диметилсульфоксид, октанол) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм с использованием спектрофотометра V-550 (Jasco, США).

Saki-1 – культура, полученная из светлоклеточного рака почки человека. Она сохраняет ряд характеристик первичной культуры. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с содержанием глюкозы 4.5 г/л, с добавлением глутамина, гентамицина (40 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия).

Клетки Saki были посажены в шестилуночные планшеты (Costar, США) за 24 ч до опыта. Далее в полную среду были добавлены порфирины до концентраций 1 или 10 мкМ (стоковые растворы порфиринов составляли 10 мМ в диметилсульфоксиде). Через час после добавления порфиринов клетки освещали светодиодным синим светом ($\lambda_{\max} = 470$ нм). Длительность облучения составляла 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение модификаций в молекулы порфиринов потенциально позволяет направлять их на различные мишени в клетке. Однако те же химические модификации влияют на проницаемость этих молекул в клетку, их растворимость, оптические свойства и т.д. В данной работе мы рассмот-

рели два типа тетрапиридиновых производных порфирина – P4 и P1, а также их цинксодержащие аналоги (рис. 1). Эти соединения зарекомендовали себя как лиганды ДНК. Как показано ранее *in vitro*, они имеют высокую аффинность к различным структурам нуклеиновых кислот. Чтобы ответить на вопрос, возможно ли их использование в качестве зондов для связывания нуклеиновых кислот *in cellulo*, необходимо подробно исследовать взаимодействие этих молекул с культурами эукариотических клетками: проницаемость, фототоксическое действие, возможную локализацию. Для этих целей была выбрана клеточная линия светлоклеточной карциномы почек человека Sak1-1 и определены фототоксические повреждения, вызываемые данными порфиринами. Предварительно исследованы физико-химические свойства молекул порфирина: спектральные характеристики, липофильность и способность генерировать активные формы кислорода.

Спектральные свойства и растворимость тетрапиридилпорфиринов. Порфириновые производные P4 и P1 отличались заместителями на пиридиновом кольце. В порфирине P1 гидрофобная метильная группа в P4 модифицирована введением отрицательно заряженной карбоксильной группы. Проведено сравнение спектров поглощения порфиринов P4, P1 и их цинксодержащих аналогов ZnP4 и ZnP1 в различных растворителях – воде, диметилсульфоксиде, октаноле. На рис. 2а приведены спектры поглощения порфириновых производных в воде. Максимум поглощения в полосе Соре зависит от присутствия цинка в порфириновом макроцикле. В металлопорфиринах ZnP4 и ZnP1 максимум сдвинут в длинноволновую область примерно на 20 нм относительно безметалльных производных P4 и P1. Спектр поглощения изученных соединений в растворителе диметилсульфоксиде практически не отличается от спектра водного раствора. При изменении растворителя на октанол наблюдался значительный сдвиг поглощения в длинноволновую область. Положение максимумов поглощения в октаноле и воде приведено в таблице.

Растворимость соединений в октаноле значительно зависит как от боковых заместителей на периферии макроцикла, так и от присутствия иона цинка внутри порфиринового ядра. Предельную концентрацию растворимости соединений в октаноле определяли после приготовления насыщенных растворов в комнатной температуре спектрофотометрически. Максимальная концентрация в октаноле соединения P4 с метильными заместителями составила порядка 70 мкМ. Оказалось, что предельная концентрация растворимости в октаноле в несколько раз падает как для цинкового производного ZnP4, так и при замене метильных групп на метилкарбоксильные (P1). Одновременное введение цинка и метилкарбок-

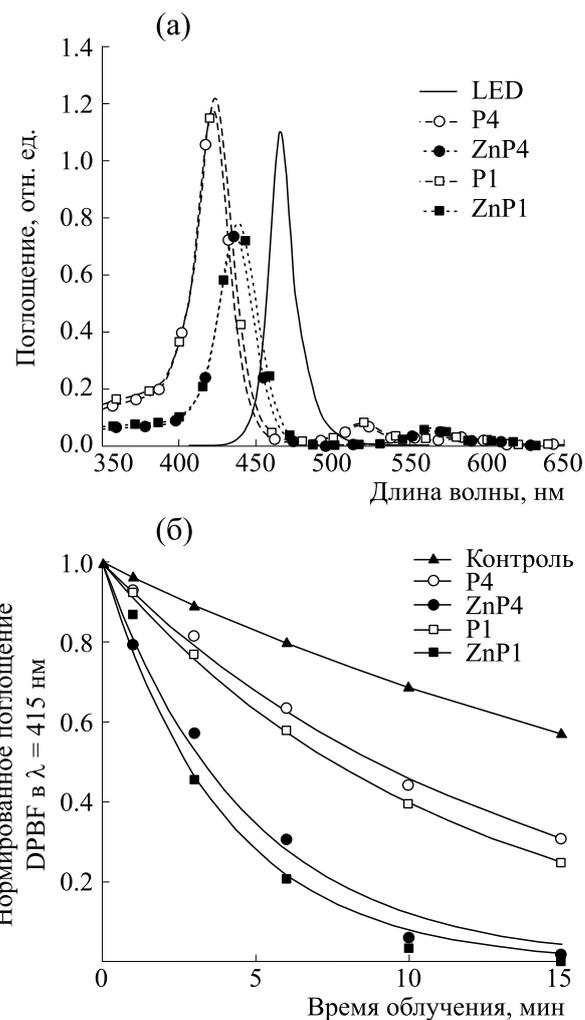


Рис. 2. (а) – Спектры поглощения порфиринов (P4, ZnP4, P1, ZnP1) в сравнении со спектром излучения светодиода (LED); (б) – фотодеградация DPBF в присутствии соединений.

сильных групп значительно снижало растворимость соединения ZnP1 в октаноле.

Длинноволновые сдвиги полосы поглощения характерны при изменении окружения соединений на менее полярное. Аналогичные сдвиги наблюдаются при взаимодействии порфириновых соединений с потенциальными клеточными мишенями (ДНК, белки, клеточные мембраны). Для направленного действия на клеточные мишени необходимо, чтобы спектр возбуждения фотосенсибилизатора совпадал со спектром источника света, ввиду этого мы использовали синий светодиод, для исследования воздействий на клетки индукции активных форм кислорода в растворе.

Сравнение липофильности соединений по коэффициенту распределения в системе «октанол/вода». Коэффициент распределения в системе «октанол/вода» определен по уменьшению concentra-

Физико-химические параметры производных порфирина

	Максимум полосы Соре в воде, нм	Максимум полосы Соре в октаноле, нм	Растворимость в октанолe, мкМ	$\log P$ (октанол : вода)	Характерное время разложения DPBF, мин
P4	422 ± 1	430 ± 1	68.0 ± 0.8	-1.4	12.8 ± 0.5
ZnP4	440 ± 1	457 ± 1	18.7 ± 1.5	-0.8	4.7 ± 0.3
P1	423 ± 1	435 ± 1	20.0 ± 0.9	-1.6	10.9 ± 0.3
ZnP1	441 ± 1	458 ± 3	2.7 ± 0.8	-2.4	3.9 ± 0.5

ции соединений в октанолe при добавлении воды к насыщенному раствору соединений в октанолe. Десятичный логарифм отношения концентраций в октанолe и воде для изученных соединений приведен в таблице. Найденный коэффициент распределения показывает, что соединения предпочтительно находятся в водной фазе, однако метилзамещенные соединения более липофильны. Для соединения ZnP1 наблюдалась самая маленькая концентрация в гидрофобной среде.

Генерация синглетного кислорода. Мы сравнили возможность индуцировать активные формы кислорода при возбуждении порфиринов синим светом. Способность порфиринов генерировать синглетный кислород можно оценить по измерению поглощения на длине волны 415 нм при деградации DPBF в диметилсульфоксиде. Этим методом исследованы фотофизические свойства водорастворимых производных порфирина, отличающихся включением металла в порфириновое ядро макроцикла и боковыми заместителями на периферии. Раствор, содержащий DPBF (100 мкМ) и порфирин (1 мкМ), облучали в течение 15 мин светом синего светодиода. На рис. 2б представлены нормированные кривые фотодеградации DPBF. Фотодеградация DPBF значительно усиливается в присутствии порфиринов, подтверждая, что они являются хорошими генераторами синглетного кислорода, который играет ключевую роль в ФДТ. Константа скорости фотодеградации DPBF (таблица) коррелирует с перекрыванием спектров поглощения соединений и спектром излучения светодиода, представленном на рис. 2а. Это согласуется с полученными ранее данными [7], что интенсивность генерации синглетного кислорода соединениями P4 и ZnP1 примерно одинакова при возбуждении белым светом. При этом растворимость в неполярном растворителе октанолe у этих двух соединений значительно отличалась, что может указывать на различную аккумуляцию соединений в клеточной мембране.

Цитотоксический эффект порфиринов под действием облучения светом. Наблюдение эффекта

порфиринов на клетки Saki-1 проводили через 30 мин после облучения синим светом светодиода, спектр которого представлен на рис. 2а. Прежде всего, стоит отметить, что мы не наблюдали никаких видимых изменений во всех случаях применения порфиринов в концентрации до 10 мкМ без освещения синим светом (рис. 3а,б,г). Клетки сохраняли обычную морфологию, наблюдалась митотическая активность.

Мы также не смогли увидеть изменений, вызванных порфирином ZnP1 после освещения (рис. 3в). В отличие от этого, через 30 мин после освещения клеток, которые инкубировали с порфирином P4, произошли заметные изменения (рис. 3д,е).

Все клетки начали округляться и терять контакт с подложкой. Это напоминало процесс начала митоза, когда до этого широко распластанные клетки, не теряя связь с субстратом (оставались контакты в виде тяжей), приобретали почти шаровидную форму (рис. 3е, черные стрелки). Одновременно на поверхности клеток появлялись выпячивания цитоплазмы («блебы»), имеющие разный размер (рис. 3е, белые стрелки), свидетельствующие о нарушении мембраны. Были обнаружены и уже погибшие клетки (рис. 3е, черные головки стрелок).

Обнаруженные морфологические изменения похожи на те, которые происходят в начале программируемой гибели клеток — апоптозе. Однако несмотря на схожесть, связать данные изменения с апоптозом сложно по нескольким причинам. Во-первых, на сроке 30 мин никакой апоптоз подобных клеток не может успеть завершиться (длительность апоптоза измеряется часами). Поэтому в любом случае на этом сроке было невозможно увидеть вызванную апоптозом фрагментацию ядер — довольно позднее событие для апоптоза прикрепленных клеток. Отличие состояло также в том, что на столь раннем сроке появлялись уже разрушенные клетки (рис. 1е, головки стрелок). Вероятнее всего, эти клетки погибли в результате повреждения мембраны и некроза.

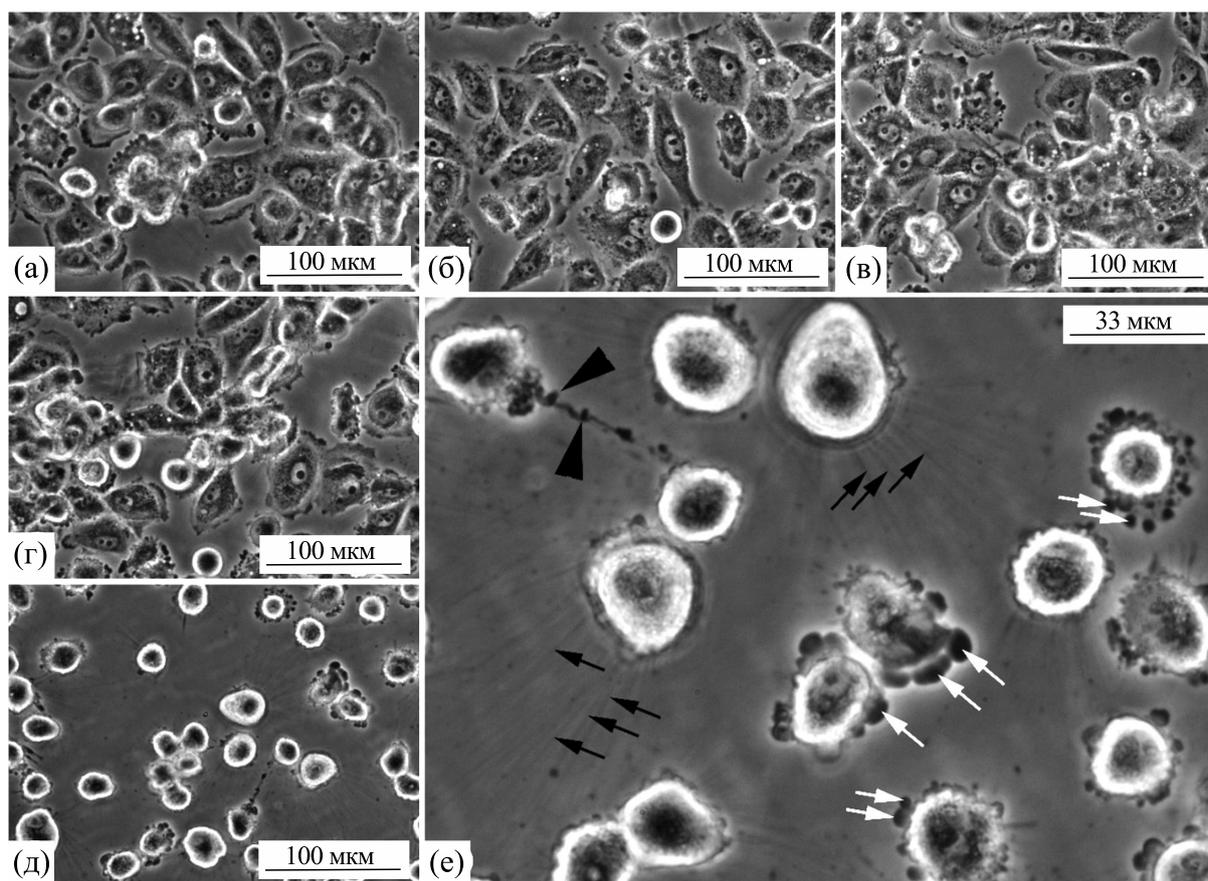


Рис. 3. Морфологические изменения клеток Саки под влиянием порфиринов и освещения: (а) – контрольные клетки, (б) – клетки через 30 мин инкубации с порфирином ZnP1, (в) – клетки с ZnP1 через 30 мин после освещения, (г) – клетки с P4 через 30 мин, (д) и (е) – клетки с P4 через 30 мин после освещения. На (е) белые стрелки – выпячивания плазмалеммы, черные стрелки – остатки клеточных креплений, головки от стрелок – остатки погибшей клетки. Фазовый контраст, цифровое контрастирование.

Также округлению клеток при апоптозе обычно предшествует потеря клеткой контактов с подложкой. В нашем случае контакты по большей мере сохранялись. Таким образом, морфологические изменения свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемые процессы были неуправляемыми и их исходной причиной было резкое изменение барьерных функций плазмалеммы.

Большинство порфиринов в процессах фотодинамической терапии оказывают цитотоксическое действие, что обычно является следствием взаимодействия порфиринов с множественными мишенями в клетке, в том числе повреждением мембран. Одиночные акты окисления в мембранах способны вызвать лавины реакций перекисного окисления липидов, оказывающие существенное действие на свойства мембран.

Порфирин P4 обладает более липофильными свойствами, чем порфирин ZnP1, поэтому можно ожидать, что его распределение в клетках сдвинуто в сторону мембран, а не цитозоля. Поэтому вполне логично, что при сравнении двух порфи-

ринов мы видим более сильное, а главным образом более быстрое действие более липофильного порфирина P4. Прямое повреждение мембран проявляется сразу, оно не нуждается в исполнении каких-либо предварительных химических реакциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из рассмотренных производных пиридиновых порфиринов ZnP1 является наиболее перспективным внутриклеточным зондом для направленного исследования структуры нуклеиновых кислот в клетке, в то время как быстрая цитотоксичность порфирина P4 обусловлена повреждением мембраны клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00332).

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. N. Malatesti, I. Munitic, and I. Jurak, *Biophys. Rev.* **9**, 149 (2017). DOI: 10.1007/s12551-017-0257-7
2. Y. Lin, T. Zhou, R. Bai, and Y. Xie, *J. Enzyme Inhibition & Med. Chem.* **35**, 1080 (2020). DOI: 10.1080/14756366.2020.1755669
3. E. V. Belyaeva, A. A. Markova, D. N. Kaluzhny, et al., *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* **18**, 617 (2018). DOI: 10.2174/1871520617666170719150834
4. X.-H. Zheng, X. Nie, H.-Y. Liu, et al., *Sci. Rep.* **6**, 26592 (2016). DOI: 10.1038/srep26592.
5. N. Konieczna, A. Romaniuk-Drapała, N. Lisiak, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2670 (2019). DOI: 10.3390/ijms20112670
6. M. B. Berezin, N. M. Berezina, A. S. Semeikin, and A. I. V'yugin, *Rus. J. Gen. Chem.* **77**, 1955 (2007). DOI: 10.1134/S1070363207110199
7. O. A. Kovaleva, V. B. Tsvetkov, O. K. Mamaeva, et al., *Eur. Biophys. J.* **43**, 545 (2014). DOI: 10.1007/s00249-014-0984-7.

Phototoxic Effect of Water-Soluble Porphyrins on Caki-1 Cells of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma

A.F. Arutyunyan, L.L. Tevonyan, A.D. Beniaminov, Y.E. Yegorov, and D.N. Kaluzhny

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

In order to develop and find photosensitizers which could be more suitable for target tissue, two types of tetrapyrroline porphyrins were used: cationic porphyrin P4 (TMPyP4) and its amphiphilic derivative porphyrin P1 containing carboxyl groups, and also their zinc-containing analogs ZnP4 and ZnP1. The physicochemical properties of these two classes of molecules were compared and their effects on clear cell renal cell carcinoma Caki-1 cells in the culture were investigated. Compounds in micromolar concentrations did not cause morphological changes in cells in the absence of light irradiation. The treatment of cells with porphyrin P4 under blue light led to rapid appearance of cytotoxicity. The cells began to detach from the substrate, and swellings (blebs) appeared on the membranes. The rate of these changes is consistent with direct membrane damage caused by porphyrin P4. Under similar conditions, compound ZnP1 did not cause any visible changes in the morphology of Caki-1 cells. The results obtained show that cells give different lipophilicity for the compounds and, as a consequence, they have different locations in the cell. On the whole, more lipophilic compound P4 unlike ZnP1 should be predominately located in a membrane, this may explain the rapid cytopathic effect.

Keywords: porphyrin, reactive oxygen species, cells

УДК 615.451.232

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ С КАРНОЗИНОМ И ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА

© 2016 г. В.А. Щелконогов*, **, ***, Е.С. Дарнотук*, А.В. Чеканов**, ***, О.А. Баранова**, ***, К.Д. Казаринов***, Н.С. Шастина*, С.Л. Стволинский****, Т.Н. Федорова****, Э.Ю. Соловьева**, А.И. Федин**, **Г.М. Сорокоумова***

*МИРЭА – Российский технологический университет, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86
E-mail: vasily9999@yandex.ru

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

***Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова РАН, 141190, Фрязино Московской области, пл. Введенского, 1

****Научный центр неврологии, Москва, 125367, Волоколамское шоссе, 80

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Подобраны условия для получения фосфатидилхолиновых липосом, содержащих одновременно липоевую кислоту и карнозин. Полученные липосомы представляют собой сферические частицы размером 180–250 нм, характеризующиеся эффективностью включения липоевой кислоты, равной 50–70%, и карнозина – 17–33%. На модели окисления фосфатидилхолина пероксидом водорода показано антиоксидантное действие карнозина, липоевой кислоты или липоевой кислоты с карнозином совместно, заключающееся в торможении процесса липидной пероксидации, которое проявляется в уменьшении образования продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Установлено, что липоевая кислота (5 мМ) и карнозин (0.1–10 мМ) в липосомах проявляют антиоксидантное действие. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной пероксидации в липосомах с антиоксидантами (липоевая кислота + карнозин) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов). Оценено влияние полученных липосомальных препаратов на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой. Обнаружено, что липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляет агрегацию тромбоцитов на 50–55% относительно контроля (тромбоциты и арахидоновая кислота), в то время как липосомы без антиоксидантов и водорастворимые формы препаратов карнозина и липоевой кислоты практически не влияют на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой кислотой.

Ключевые слова: липосомы, карнозин, липоевая кислота, ТБК-активные продукты, арахидоновая кислота.

DOI: 10.31857/S0006302921020149

Цереброваскулярные заболевания занимают второе место среди всех причин инвалидизации и смертности населения во всем мире, уступая сердечно-сосудистым патологиям и опережая онкологические заболевания. Нарушение кровоснабжения головного мозга является пусковым механизмом развития комплекса патобиохимических реакций, приводящих к дегенерации и гибели

нейронов. Наиболее значимыми являются нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, воспалительные процессы, аутофагия и деструкция гематоэнцефалического барьера, что сопровождается очаговым повреждением ткани мозга в области ишемии [1]. При этом окислительный стресс является основным молекулярным механизмом, лежащим в основе гибели ткани мозга и развития неврологического дефицита.

Сокращения: ЛК – липоевая кислота, АК – арахидоновая кислота, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, ФХ – фосфатидилхолин, ЭВ – эффективность включения, ТБК-АП – тиобарбитурат-активные продукты.

Патогенетическая значимость окислительного стресса при развитии ишемического поражения мозга обуславливает целесообразность применения нейропротекторных препаратов антиоксидантного действия [2]. Среди низкомолекулярных антиоксидантов представляют интерес липоевая кислота (ЛК) и карнозин.

ЛК способна перехватывать активные формы кислорода и восстанавливать эндогенные антиоксиданты – глутатион, витамины Е и С. Благодаря такому сочетанию свойств ее рассматривают как перспективный терапевтический препарат [3, 4]. На экспериментальных моделях ишемии у крыс и мышей было выявлено нейропротекторное действие ЛК, проявившееся в улучшении неврологических функций, уменьшении площади очага ишемического повреждения, обусловленного подавлением окислительного стресса и каспазо-зависимых процессов апоптоза [5, 6].

В медицинской практике препараты ЛК применяются при диабетической полинейропатии, интоксикации тяжелыми металлами, при циррозах печени. Имеются сведения об эффективности применения ЛК при комплексной терапии хронической ишемии головного мозга в третьей стадии заболевания, в том числе с последствиями ишемического инсульта [7, 8].

Существенным недостатком ЛК является ее очень низкая растворимость в воде, быстрое связывание с различными белками и быстрая биодegradация под действием различных ферментов [9], что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. Полная деградация в кровотоке происходит менее чем за час. В результате для достижения терапевтического эффекта препараты, содержащие ЛК, вводят в больших дозах и в течение длительного времени.

Другим эффективным антиоксидантом является карнозин – β -аланил-*L*-гистидин. Карнозин содержится в больших количествах в мышечной и нервной ткани. Он обладает не только свойствами прямого антиоксиданта-перехватчика радикалов, но является и антигликирующим агентом, хелатором ионов металлов, молекулярным шапероном и индуктором антиоксидантных систем в условиях окислительного стресса [10]. На различных моделях ишемии головного мозга было показано, что карнозин проявляет прямое нейропротекторное действие, ограничивая размеры формирующегося очага некроза, предотвращает развитие неврологической симптоматики, снижает смертность животных. Ключевые молекулярные механизмы нейропротекторного действия карнозина обусловлены его способностью уменьшать эксцитотоксичность глутамата, препятствовать развитию окислительного стресса, изменению соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, в особенности Bax

и Bcl-2, а также уменьшению активации киназы Akt, регулирующей соотношение и активность данных белков [11–14].

Нейропротекторное действие карнозина, показанное на различных моделях глобальной и фокальной ишемии головного мозга, открывает перспективу для создания лекарственных препаратов на его основе [15].

В пилотном исследовании, выполненном двойным слепым плацебо-контролируемым методом, было показано, что включение карнозина в схему лечения пациентов с хронической ишемией мозга оказывает стабилизирующее действие на форменные элементы крови, усиливает эндогенную антиоксидантную систему организма на фоне улучшения когнитивных функций мозга у пациентов [16].

Однако эффективность действия карнозина в организме ограничена низкой липофильностью, а также его гидролизом, катализируемым карнозиной [17]. Повысить эффективность карнозина можно путем синтеза его производных [18] или включив его в наноструктурные конструкции [19].

Одним из основных звеньев гемостатической активации, сопровождающей острые нарушения мозгового кровообращения, является уменьшение атромбогенных свойств эндотелия сосудистой стенки. У пациентов с ишемическим инсультом выявляется нарушение антиагрегационной, антикоагулянтной и фибринолитической активности сосудистой стенки, максимально выраженные в острейшем периоде ишемического инсульта [20, 21]. В настоящее время антиагрегантная терапия является ключевым фармакологическим подходом к профилактике и лечению острого ишемического инсульта [22].

В экспериментах *in vitro* было показано, что ЛК подавляет агрегацию тромбоцитов, снижает уровень кальция и тромбосана В2 при активации их коллагеном и арахидоновой кислотой (АК) [23]. Также было обнаружено, что липосомальная форма ЛК способна эффективно подавлять агрегацию тромбоцитов, обусловленную АК [24]. Антиагрегантное действие карнозина было описано в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [25].

Совокупность свойств, присущих ЛК и карнозину, делает актуальной задачу создания новых лекарственных форм на основе этих соединений. Одним из подходов к решению этой проблемы является создание препарата, содержащего ЛК и карнозин, путем включения их в липосомы. Способность липосом проникать через гематоэнцефалический барьер имеет важное значение для доставки этих препаратов в мозг [26].

Целью данной работы является получение новой липосомальной формы, включающей карно-

зин и ЛК, и исследование ее физико-химических свойств с оценкой влияния на функциональную активность тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 (Lipoid GmbH, Германия) 94%-й чистоты, выделенный из бобов сои; карнозин, липоевую кислоту, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), холестерин, фосфатно-солевой буферный раствор (Sigma-Aldrich, США); арахидоновую кислоту (Helena Biosciences, США); хлороформ, физиологический раствор (0.9% NaCl), этиловый спирт, сульфат аммония («Химмед», Россия). Для проведения диазореакции использовали следующие вещества: сульфаниловую кислоту, соляную кислоту, нитрит натрия, карбонат натрия, дезоксихолат натрия («Химмед», Россия).

Получение липосом методом пассивной загрузки. 1. *Фосфатидилхолиновые липосомы.* Раствор фосфатидилхолина (ФХ, 40 мг/мл) в хлороформе (1 мл) упаривали при температуре 40°C. Для приготовления суспензии липосом с концентрацией ФХ (40 мг/мл) полученную липидную пленку диспергировали 0.9% физиологическим раствором (рН 5.7, 1 мл) или 0.3 М буферным раствором сульфата аммония (рН 7.4, 1 мл). Полученную суспензию подвергали пятикратному циклу замораживания и оттаивания. Одноламеллярные везикулы получали методом экструзии с помощью миниэкструдера LiposoFast basic (Avestin, США) при многократном пропуске полученной дисперсии (50 раз) через ядерный поликарбонатный фильтр Whatman (США) с размером пор 100 и 200 нм.

2. *Липосомы, содержащие липоевую кислоту,* получали аналогично методике 1): упариванием раствора ЛК (5 мг/мл) и ДПФХ (40 мг/мл) или ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе (1 мл). Для приготовления суспензии липосом, содержащих ЛК, полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора (рН 5.7) или 1 мл 0.3 М буферного раствора сульфата аммония (с сахарозой или без нее, рН 7.4). При использовании ДПФХ полученную суспензию нагревали до 40°C с последующей экструзией.

3. *Липосомы, содержащие карнозин,* получали аналогично методике а): упариванием раствора ФХ (40 мг/мл) или ФХ (28 мг/мл) и холестерина (12 мг/мл) в хлороформе (1 мл). Для приготовления суспензии липосом, содержащих карнозин (20 мг/мл), полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора с карнозином (рН 8.2) с последующей экструзией полученных дисперсий.

4. *Липосомы, содержащие липоевую кислоту с карнозином,* получали аналогично методике 1): упариванием раствора ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе. Для приготовления суспензии липосом, содержащих ЛК (5 мг/мл) и карнозин (20 мг/мл), полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора с карнозином (рН 7.4) с последующей экструзией полученной дисперсии.

Отделение одноламеллярных везикул с включенными в них субстанциями от свободных препаратов проводили методом гель-хроматографии на колонке illustra NAP-5 с сорбентом Sephadex G25 Medium (Великобритания). Содержание инкапсулированных препаратов определяли после разрушения липосом этанолом: ЛК – спектрофотометрическим методом [24], карнозин – по диазореакции [27].

Получение липосом методом активной загрузки. Раствор ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе (1 мл) упаривали при температуре 40°C. Для приготовления суспензии липосом полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.3 М буферного раствора сульфата аммония (с сахарозой или без нее, рН 7.4) с последующей экструзией полученной дисперсии. Затем липосомы отделяли от сульфата аммония методом гель-фильтрации, к липосомам (0.75 мл) добавляли водный раствор карнозина (20 мг/мл, 0.25 мл) при нагревании при 60°C и перемешивали в течение 30 мин. Степень включения ЛК в липосомы определяли спектрофотометрическим методом, содержание карнозина – с помощью диазореакции. Размер полученных липосом определяли методом динамического светорассеяния на приборе Delsa Nano C (Beckman Coulter Inc., США).

Реакция карнозина с диазореактивом. Раствор сульфаниловой кислоты (0.5 мМ, 6 мл) и свежеприготовленный раствор нитрита натрия (0.6 М, 6 мл) перемешивали в течение 5 мин при охлаждении на ледяной бане. Затем прибавляли еще 24 мл раствора нитрита натрия, перемешивали в течение 5 мин, доливали дистиллированную воду до 100 мл. Далее строили калибровочный график зависимости концентрации карнозина от оптической плотности. Для этого отбирали различные аликвоты стандартного раствора карнозина (1 мМ: 12, 24 и 48 мкл и 10 мМ: 12 и 24 мкл) и доводили дистиллированной водой до 1 мл. Потом добавляли диазореактив (1.5 мл), перемешивали и оставляли на 5 мин, добавляли раствор Na₂CO₃ (0.9 М, 1.5 мл) и перемешивали, через 10 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре UV-1601 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 400 до 550 нм.

Одноламеллярные везикулы пропускали через эксклюзионную колонку для разделения липосом с карнозином от свободного карнозина, от-

бирали фракции и проводили диазореакцию. Для этого из полученных фракций отбирали в пробирку по 75 или 25 мкл образца (при этом фракцию с липосомами разрушали детергентом дезоксихолатом натрия (0.1 М, 1 мл)), добавляли дистиллированную воду до 1 мл. Затем добавляли диазореактив (1.5 мл), перемешивали и оставляли на 5 мин. Далее добавляли раствор Na_2CO_3 (0.9 М, 1.5 мл) и перемешивали. Через 10 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре в диапазоне длин волн от 400 до 550 нм.

К фосфатидилхолиновым липосомам, содержащим карнозин, ЛК, или ЛК (5 мМ) с карнозином в различных концентрациях (0.1 М–10 мМ), добавляли H_2O_2 (1 мМ), затем инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин и определяли содержание продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов, ТБК-АП). В качестве контролей использовали липосомы из ФХ, не содержащие данных антиоксидантов (в отсутствие H_2O_2 , а также в его присутствии до и после инкубации).

Определение ТБК-активных продуктов [28]. Использовали свежеприготовленный реагент, который получали путем растворения трихлоруксусной кислоты (0.9 М) и тиобарбитуровой кислоты (4.6 мМ) в дистиллированной воде при нагревании (50°C) на водяной бане. К 0.5 мл анализируемого образца липосом добавляли 3 мл указанного выше реагента и кипятили в течение 30 мин. Затем реакцию смесь охлаждали, добавляли 1 мл хлороформа, встряхивали и центрифугировали в течение 20 мин при 540 g при комнатной температуре на центрифуге СМ-6МТ (ELMI, Латвия). Измеряли оптическую плотность раствора в верхней водной фазе относительно реагента при 580 и 532 нм и рассчитывали концентрацию ТБК-активных продуктов (в нмоль/мл) в образце по формуле:

$$C_{\text{ТБК-АП}} = \frac{(OD_{532} - OD_{580}) \times 6 \times 1000}{155}.$$

(Коэффициент экстинкции малонового альдегида при 532 нм – $155 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$; коэффициент разведения липосом в реакционной среде – 6).

Подготовка образцов крови для исследования процесса агрегации тромбоцитов. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, взятых у здоровых доноров мужского пола в возрасте 20–25 лет ($n = 15$). Для забора венозной крови использовали стандартные пробирки Improvacuter® с антикоагулянтом (цитрат натрия, 3.8%). Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови в течение 10 мин при 135 g при комнатной температуре.

Исследование процесса агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой. В образцы с обогащенной тромбоцитами плазмой

($1 \cdot 10^6$ кл./мл, 225 мкл) добавляли липосомы без антиоксидантов, или комбинированный липосомальный препарат (ЛК и карнозин), или липосомы с ЛК или с карнозином, или их водорастворимые формы (растворы ЛК и карнозина в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7.4, 20 мкл), инкубировали в течение 5 мин при температуре, равной 37°C. Затем добавляли индуктор агрегации тромбоцитов – арахидоновую кислоту (1 мг/мл, 25 мкл). Агрегатограмму регистрировали на четырехканальном агрегометре Helena AggRAM (Helena Biosciences, США) в течение 10 мин.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Corporation, США). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовали статистический критерий Краскелла–Уоллиса ANOVA. Достоверными считались различия при $p < 0.05$. Результаты в табл. 1–3 и на рис. 1 и 2 представлены в виде средней величины и стандартной ошибки среднего значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЛК хорошо растворима в органических растворителях и щелочных растворах и мало растворима в воде, тогда как карнозин хорошо растворим в воде при разных значениях рН.

На первом этапе работы подбирали оптимальные условия для максимально возможного включения карнозина и ЛК в липосомы, в том числе путем подбора метода загрузки и липидного состава липосом.

Одноламеллярные везикулы, содержащие карнозин, получали методом пассивной загрузки, диспергируя высушенную липидную пленку водным раствором карнозина (20 мг/мл, рН 8.2) с последующей экструзией.

В результате проведенных исследований было установлено, что степень включения карнозина в липосомы из ФХ составила 28%, что на 10% больше, чем для образцов липосом, состоящих из ФХ и холестерина (табл. 1). При этом размер полученных наночастиц был одинаков и составил 235 нм, что позволяет судить о том, что липидный состав не влиял на размер получаемых липосом. Такое небольшое включение карнозина в липосомы можно объяснить, вероятно, быстрым выходом карнозина из водного пространства липосом при проведении гель-хроматографии. Поэтому при получении комплексного липосомального препарата, содержащего карнозин и ЛК, использовали активную загрузку карнозина в липосомы.

На следующем этапе работы получали липосомы с ЛК. Мультиламеллярные везикулы получа-

Таблица 1. Липосомальный препарат, содержащий карнозин

Состав липосом (40 мг/мл)	Карнозин, мг/мл	pH среды	ЭВ, %	Размер частиц, нм
ФХ	20	8.2	28 ± 7	235 ± 5
ХС/ФХ (1/1)	20	8.2	18 ± 5	235 ± 5

Примечание. Карнозин – исходная концентрация карнозина для получения липосом; ЭВ – эффективность включения карнозина в липосомы – отношение массы карнозина, включенного в липосомы, к исходной массе карнозина, которую брали для получения липосом; ХС/ФХ – молярное отношение холестерина к фосфатидилхолину.

Таблица 2. Липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту

Состав липосом (40 мг/мл)	ЛК, мг/мл	pH среды	ЭВ, %	Размер частиц, нм
ФХ	5	5.7	52 ± 10	245 ± 5
ФХ/(NH ₄) ₂ SO ₄	5	7.4	70 ± 10	245 ± 5
ФХ/(NH ₄) ₂ SO ₄ /сахароза	5	7.4	33 ± 10	219 ± 5
ДПФХ	5	6.3	44 ± 10	210 ± 5

Примечание. ЛК – исходная концентрация липоевой кислоты для получения липосом; ЭВ – эффективность включения ЛК в липосомы – отношение массы ЛК, включенной в липосомы, к исходной массе ЛК, которую брали для получения липосом.

ли путем диспергирования высушенной липидной пленки буферными растворами (pH 5.7–7.4). Одноламеллярные везикулы получали из мультламеллярных везикул путем экструзии через ядерный поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100–200 нм. Таким образом, были получены липосомы с ЛК, характеристики которых представлены в табл. 2.

Анализ полученных результатов показал, что в зависимости от липидного состава и pH среды образовывались наночастицы с различной эффективностью включения (ЭВ) ЛК в липосомы. Максимальная степень включения ЛК в липосомы наблюдалась при использовании ФХ и буферного раствора сульфата аммония (pH 7.4, ЭВ составила 70%). Также можно предположить, что в данном препарате часть ЛК распределена в водной фазе, а часть – в липидном бислое, что хорошо коррелирует с амфифильными свойствами ЛК. При использовании ДПФХ (pH 6.3) и добавлении сахарозы для получения липосом с ЛК происходило значительное уменьшение степени включения ЛК в наночастицы. Размер полученных наночастиц колебался в диапазоне 210–250 нм.

В продолжение работы получали липосомы с совместным включением ЛК и карнозина в наночастицы, используя метод пассивной и активной загрузки. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 3.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при совместном включении ЛК и карнозина в липосомы из ФХ методом пассивной загрузки происходило уменьшение степени включения в липосомы как карнозина (ЭВ = 12%), так и ЛК (ЭВ = 50%). Однако получение липосом с ЛК и карнозином методом активной загрузки привело к увеличению эффективности включения карнозина в липосомы (ЭВ = 33%) по сравнению с использованием метода пассивной загрузки. Более того, добавление криопротектора сахарозы к липосомам привело к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы (ЭВ = 24%) по сравнению с липосомами без сахарозы. При этом эффективность включения ЛК в липосомы из ФХ при использовании метода активной загрузки практически не изменилась (ЭВ = 50%). Размеры полученных наночастиц находились в диапазоне 180–250 нм и не отличались при вариации методов их получения.

С целью исследования антиоксидантного действия карнозина, ЛК, или ЛК и карнозина совместно, входящих в состав липосом, на процесс перекисного окисления липидов на следующем этапе работы определяли содержание ТБК-АП в образцах наносупензий, содержащих антиоксиданты. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 1.

Таблица 3. Липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту и карнозин

Состав липосом (40 мг/мл)	Действующее вещество		рН среды	ЭВ, %		Размер частиц, нм
	ЛК, мг/мл	Карнозин, мг/мл		ЛК	Карнозин	
Пассивная загрузка						
ФХ	5	20	8.2	50 ± 10	12 ± 5	245 ± 5
Активная загрузка						
ФХ	5	20	7.4	47 ± 10	33 ± 10	245 ± 5
ФХ/сахароза	5	20	7.4	53 ± 10	24 ± 10	183 ± 5

Примечание. ЛК – исходная концентрация липоевой кислоты для получения липосом; Карнозин – исходная концентрация карнозина для получения липосом; ЭВ – эффективность включения антиоксидантов в липосомы – отношение массы антиоксидантов, включенных в липосомы, к исходной массе антиоксидантов, которые брали для получения липосом.

Было обнаружено, что при добавлении H_2O_2 к фосфатидилхолиновым липосомам происходило повышение концентрации ТБК-АП (рис. 1, 2) по сравнению со спонтанным уровнем ТБК-АП (рис. 1, 1). Известно, что при взаимодействии пероксида водорода с фосфолипидами образуются пероксильные, алкоксильные, эпоксипероксильные, эпоксиалкильные и гидроксиалкильные ра-

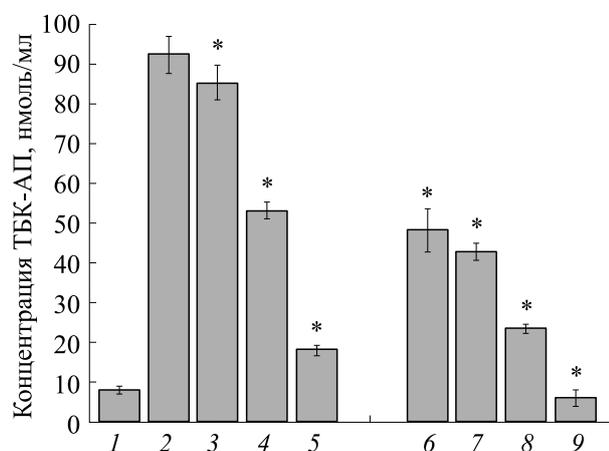


Рис. 1. Влияние ЛК и карнозина на концентрацию ТБК-АП, образующихся в процессе перекисного окисления липидов липосом, индуцированного пероксидом водорода. Окисление липосом проводили в присутствии пероксида водорода (1 мМ) при температуре 37°C в течение 60 мин. 1 – Исходная концентрация ТБК-АП в липосомах в отсутствие пероксида водорода; 2 – липосомы без антиоксидантов в присутствии пероксида водорода (контроль); 3, 4, 5 – липосомы с карнозином (концентрация карнозина – соответственно 0.1, 1, 10 мМ); 6 – липосомы с ЛК (5 мМ); 7, 8, 9 – липосомы с ЛК (5 мМ) и карнозином (концентрация карнозина – соответственно 0.1, 1, 10 мМ). * – $p < 0.05$ относительно контроля.

дикалы, которые в результате дальнейшей трансформации и β -расщепления превращаются в продукты перекисного окисления липидов (малоновый альдегид, акролеин, 4-гидрокси-2-ноненаль и другие). Добавление пероксида водорода к липосомам, содержащим карнозин (1 и 10 мМ; рис. 1, 4, 5) или ЛК (5 мМ; рис. 1, 6), приводило к значительному уменьшению (в два-четыре раза) содержания ТБК-АП (рис. 1, 4, 5, 6; $p < 0.05$). Наиболее эффективно антиоксидантные свойства проявляли оба антиоксиданта (ЛК, 5 мМ, и карнозин, 10 мМ) при окислении липидов липосом пероксидом водорода. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной пероксидации в липосомах с антиоксидантами (ЛК и карнозин; рис. 1, 9) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов; рис. 1, 2; $p < 0.05$). Вероятнее всего, антиоксидантные свойства ЛК и карнозина в данной биологической системе связаны с их окислением в процессе липидной пероксидации. В условиях *in vitro* и *in vivo* при липидной пероксидации в работах [29–32] было показано, что ЛК и карнозин могут нейтрализовать различные свободные радикалы (гидроксильный, пероксильные, алкоксильные, гидроксиалкильные и другие радикалы), при этом подвергаться окислению, тем самым уменьшая образование продуктов перекисного окисления липидов.

На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных липосомальных форм антиоксидантов на функциональную активность тромбоцитов в условиях индукции агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, полученных от условно здоровых доноров. Оценивали влияние полученных липосом с ЛК и карнозином

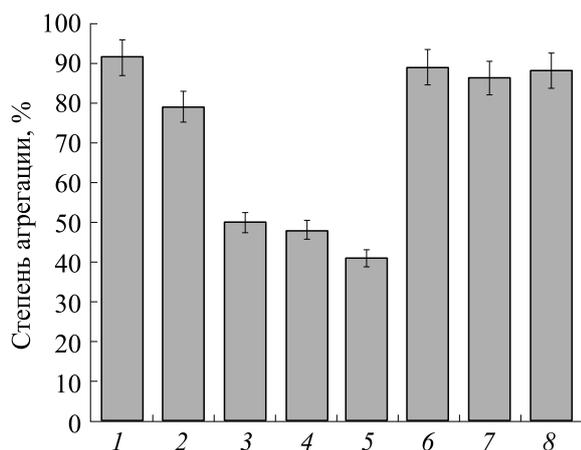


Рис. 2. Влияние липосомальных и водорастворимых препаратов (ЛК, карнозин, ЛК и карнозин) на агрегацию тромбоцитов человека, обусловленную АК (здоровые доноры, $n = 15$, $1 \cdot 10^6$ кл./мл): 1 – Контроль: тромбоциты и АК; 2 – тромбоциты, липосомы без антиоксидантов, АК; 3 – тромбоциты, липосомы с карнозином (2.1 мМ), АК; 4 – тромбоциты, липосомы с ЛК (1.5 мМ), АК; 5 – тромбоциты, липосомы с ЛК (1.5 мМ) и карнозином (2.1 мМ), АК; 6 – тромбоциты, карнозин (2.1 мМ), АК; 7 – тромбоциты, ЛК (1.5 мМ), АК; 8 – тромбоциты, ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), АК.

на функциональную активность тромбоцитов в сравнении с контролями: тромбоцитами и АК, липосомами без антиоксидантов, липосомами с ЛК или с карнозином, или растворами с ЛК и карнозином в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4). Результаты проведенных исследований представлены на рис. 2.

Было показано (рис. 2), что липосомы, содержащие ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляют агрегацию тромбоцитов, вызванную АК, на 50% относительно контроля (тромбоциты и АК). При этом было обнаружено, что липосомы с ЛК (1.5 мМ) и липосомы с карнозином (2.1 мМ) ингибируют агрегацию тромбоцитов, индуцированную АК, на 62 и 42% соответственно. Также было обнаружено, что как липосомы без антиоксидантов, так и водорастворимые формы препаратов карнозина (2.1 мМ) и ЛК (1.5 мМ) практически не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов, обусловленную индуктором АК. Вероятнее всего, это связано с плохой способностью водорастворимых препаратов ЛК и карнозина проникать в клетку. Имеются сведения о том, что транспорт в цитоплазму клеток (через клеточную мембрану) ЛК и карнозина в свободном виде затруднен [33–35]. В исследованиях *in vitro* было обнаружено, что карнозин проникает в клетку через клеточную мембрану с помощью пептидного транспортера PEPT2 [36]. Поэтому с целью улучшения транспорта препаратов через плазматические мембраны могут использоваться липосомы. В ли-

тературе имеются данные о том, что липосомы могут эффективно взаимодействовать с клетками, за счет их слияния с плазматической мембраной, в процессе эндоцитоза или с помощью других механизмов [37]. Поэтому можно предположить, что липосомы, содержащие ЛК или карнозин, а также липосомальный препарат с ЛК и карнозином способны проникать через клеточную мембрану за счет слияния липосом с мембраной тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов пассивной и активной загрузки были получены липосомы, содержащие карнозин и ЛК, с различной эффективностью включения субстанций в наночастицы. Методом пассивной загрузки были получены как липосомы с ЛК или с карнозином, так и липосомальный препарат, содержащий ЛК и карнозин совместно, характеризующиеся 50–70% степенью включения ЛК и 15–30% включения карнозина в липосомы. При совместном включении ЭВ составляла 50% для ЛК и 12% для карнозина. При использовании метода активной загрузки были получены липосомальные формы комплексного препарата, содержащего ЛК и карнозин, при этом удалось в два раза повысить степень включения карнозина в липосомы (25–33%). Однако эффективность включения ЛК в липосомы при использовании данного метода загрузки не изменилась (ЭВ = 50%).

При изучении процесса торможения липидной перекисидации липосом, проявляющейся в уменьшении образования продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, было показано, что при использовании концентрации ЛК (5 мМ) и карнозина (0.1–10 мМ) эти субстанции в липосомах проявляют антиоксидантное действие, вероятнее всего, вследствие окисления этих антиоксидантов [29–32], тем самым уменьшая концентрацию ТБК-АП. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной перекисидации в липосомах с антиоксидантами (ЛК и карнозин) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов). Таким образом, можно заключить, что полученный липосомальный препарат с ЛК и карнозином является более эффективным антиоксидантом по сравнению с ЛК или карнозином.

Оценка антиагрегационных свойств липосомальных форм карнозина, ЛК или липосомального препарата, содержащего ЛК и карнозин совместно, в сравнении с их водорастворимыми формами показала, что комбинированный липосомальный препарат, содержащий ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляет агрегацию тромбоцитов на 50–55% относительно контроля (тром-

боциты и АК), в то время как липосомы без антиоксидантов и водорастворимые формы препаратов ЛК и карнозин в тех же концентрациях не снижали агрегацию тромбоцитов, обусловленную индуктором агрегации АК.

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что новый липосомальный препарат с ЛК и карнозином является перспективным для дальнейших исследований по оценке его нейропротекторного действия на различных экспериментальных моделях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Абдулджабар Балсам Тарек за получение липосомальных препаратов; руководителю Представительства компании «ЛИПОИД АГ» (Германия) в Москве к.х.н. А.В. Сымону за предоставление фосфатидилхолина Lipoïd S-100; д.б.н., проф. РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России Ю.О. Теселкину за ценные замечания и помощь в написании данной статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственных заданий РНИМУ им. Н.И. Пирогова (№ гос. регистрации АААА-А19-100390063-9) и Научного центра неврологии (№ гос. регистрации АААА-А19-119111290050-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. У всех участников было получено информированное добровольное согласие на взятие биоматериала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. И. Гусев и В. И. Скворцова, Ишемия головного мозга (Медицина, М., 2001).
2. Э. Ю. Соловьева, О. П. Миронова, О. А. Баранова и др., Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова **108** (6), 34 (2008).
3. G. P. Biewenga, G. R. Naenen, and A. Bast, Gen. Pharmacol. **29** (3), 315 (1997).
4. A. Goraca, H. Nuk-Kolega, A. Piechota, et al., Pharmacol. Rep. **63** (4), 849 (2011).
5. W. M. Clark, L. G. Rinker, N. S. Lessov, et al., Stroke **32** (4), 1000 (2001).
6. H. Deng, X. Zuo, J. Zhang, et al., Mol. Med. Rep. **11** (5), 3659 (2015).
7. Э. И. Сайфуллина, Л. Б. Новикова, Г. Р. Иксанова и Э. М. Колчина, Клин. неврология **2**, 17 (2017).
8. Л. Б. Новикова, Г. Р. Иксанова, Э. М. Колчина и Ш. Н. Галимов, Неврологич. журн. **11** (3), 42 (2006).
9. S. Akiba, S. Matsugo, L. Packer, and T. Konishi, Anal. Biochem. **258** (2), 299 (1998).
10. А. А. Болдырев, Биохимия **77** (4), 403 (2012).
11. Y. I. Shen, P. He, Y. Y. Fan, et al., Free Radic. Biol. Med. **48** (5), 727 (2010). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.021
12. Т. Н. Федорова, С. А. Гаврилова, М. П. Морозова и др., Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии **20** (4), 25 (2017).
13. А. А. Девятов, Т. Н. Фёдорова, С. Л. Стволинский и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **163** (2), 156 (2017).
14. О. М. Лопачева, А. В. Лопачев, К. Н. Куличенкова и др., Анналы клин. эксперим. неврологии **12** (1), 38 (2018).
15. D. S. Berezchnoy, S. L. Stvolinsky, A. V. Lopachev, et al., Amino Acids **51** (1), 139 (2019).
16. Т. Н. Федорова, М. С. Беляев, О. А. Трунова и др., Биол. мембраны **25** (6), 458 (2008).
17. J. F. Lenny, R. P. George, A. M. Weiss, et al., Clin. Chim. Acta **123** (3), 221 (1982).
18. S. L. Stvolinsky, E. R. Bulygina, T. N. Fedorova, et al., Cell. Mol. Neurobiol. **30** (3), 395 (2010).
19. Н. А. Антонова, Г. М. Сорокоумова, Т. Н. Федорова и др., Тонкие химические технологии **11** (6), 55 (2016).
20. З. А. Суслина, М. М. Танашян и В. Г. Ионова, *Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия* (Медицина, М., 2005).
21. З. А. Суслина, А. В. Ерофеева, М. М. Танашян и В. Г. Ионова, Неврологич. вестн. **3-4**, 5 (2005).
22. М. А. Домашенко и М. М. Танашян, Рус. мед. журн. **19** (9), 562 (2011).
23. Y. S. Lai, C. Y. Shih, Y. F. Huang, and T. C. Chou, J. Agric. Food Chem. **58** (15), 8596 (2010). DOI: 10.1021/jf101518p
24. В. А. Щелконогов, Г. М. Сорокоумова, О. А. Баранова и др., Биомед. химия **62** (5), 577 (2016).
25. Н. Ю. Никитенко, В. Х. Шаврацкий, А. А. Болдырев и др., Вопр. мед. химии **41** (1), 41 (1995).
26. Т. Н. Федорова, С. Л. Стволинский, О. И. Куликова и др., Анналы клин. эксперим. неврологии **10** (1), 47 (2016).
27. Е. Ю. Канюка и С. Г. Зиновьев, Биохимия **9** (1), 110 (2014).
28. M. Uchiyama and M. Mihara, Analyt. Biochem. **86** (1), 271 (1978).
29. K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, et al., Biochim. Biophys. Acta **1790** (10), 1149 (2009). DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.07.026
30. B. J. Lee and D. G. Hendricks, J. Food Sci. **62** (5), 931 (1997). DOI: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb15009.x

31. C. V. Krishnan and M. Garnett, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **6**, 3607 (2011).
32. A. R. Smith, S. V. Shenvi, M. Widlansky, et al., *Curr. Med. Chem.* **11** (9), 1135 (2004). DOI: 10.2174/0929867043365387
33. H. Ihara, Y. Kakihana, A. Yamakage, et al., *J. Biol. Chem.* **294** (4), 1279 (2019).
34. K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, and T. M. Hagen, *IUBMB Life* **60** (6), 362 (2008).
35. G. J. Handelman, D. Han, H. Tritschler, and L. Pack-er, *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1725 (1994).
36. A. V. Lopachev, O. M. Lopacheva, D. A. Abaimov, et al., *Biochemistry* **81** (5), 511 (2016).
37. N. Duzgunes and S. Nir, *Adv. Drug Delivery Rev.* **40**, 3 (1999).

A Liposomal Drug with Carnosine and Lipoic Acid: Preparation, Antioxidant and Antiplatelet Properties

V.A. Shchelkonogov^{*, **, ***}, E.S. Darnotuk^{*}, A.V. Chekanov^{**, ***}, O.A. Baranova^{**}, K.D. Kazarinov^{****}, N.S. Shastina^{*}, S.L. Stvolinsky^{****}, T.N. Fedorova^{****}, E.Y. Solovieva^{**}, A.I. Fedin^{**}, and G.M. Sorokoumova^{*}

^{*}MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

^{**}Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

^{***}Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, pl. Vvedenskogo 1, Fryazino, Moscow Region, 141190 Russia

^{****}Research Center of Neurology, Volokolamskoye Shosse, 80, Moscow, 125367 Russia

The conditions have been created to produce phosphatidylcholine liposomes containing both lipoic acid and carnosine. The obtained liposomes are spherical particles with a size of 180–250 nm, characterized by the efficiency of the lipoic acid (50–70%) and carnosine (17–33%) inclusion. The oxidation of phosphatidylcholine by hydrogen peroxide was used as a model to show the antioxidant effects of carnosine, lipoic acid or the combined effects of lipoic acid and carnosine: the inclusion of carnosine and lipoic acid led to inhibition of lipid peroxidation process through a decrease in the formation of lipid peroxidation products to react with thiobarbituric acid. The study found antioxidant activity of lipoic acid (5 mM) and carnosine (0.1–10 mM) in liposomes. Also, it was shown that the amount of the relevant products of lipid peroxidation in liposomes with antioxidants (lipoic acid and carnosine in common) was 15 times lower than that in control liposomes (without antioxidants). The effects of the obtained liposomes on platelet aggregation induced by arachidonic acid were assessed. Results have indicated that liposomes with lipoic acid (1.5 mM) together with carnosine (2.1 mM) suppress platelet aggregation by 50%, while liposomes without antioxidants and water-soluble forms of carnosine and lipoic acid have virtually no effect on platelet aggregation, caused by arachidonic acid.

Keywords: liposomes, carnosine, lipoic acid, TBA-active products, arachidonic acid

УДК 577.355

СВЯЗЬ ИНДУКЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИСТЬЕВ СОИ *Glycine max* (L.) Merr. С БИОХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

© 2021 г. Д.Р. Шафигуллин*, **, А.А. Байков*, М.С. Гинс*, **, Е.П. Пронина*, В.Ф. Пивоваров*, А.В. Солдатенко*, Е.В. Романова**

*Федеральный научный центр овощеводства, 143080, Московская область, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14

**Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2

E-mail: shafigullin89@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 28.10.2020 г.

Принята к публикации 07.11.2020 г.

Изучено влияние условий выращивания на флуоресцентные характеристики листьев впервые интродуцируемых овощных и культивируемых масличных форм сои (*Glycine max* (L.) Merr.) в средней полосе России. Использованы следующие параметры индукции флуоресценции: NPQ (нефотохимическое тушение флуоресценции), qP (фотохимическое тушение флуоресценции), Q_y (действительный квантовый выход фотохимических реакций в фотосистеме II), $Q_{y_{max}}$ (максимальная квантовая эффективность фотосистемы II), Rfd (коэффициент жизненности). На примере сои в фазе цветения и технической спелости показана прямая связь между нефотохимическим тушением и фактором Rfd ($r = 0.95$) и обратная – показателя F_v с фотохимическим тушением (в фазе цветения и технической спелости $r = -0.89$ и -0.78 соответственно). Исследованы биохимические показатели, проанализированы их взаимосвязи с фотосинтетическими показателями листьев овощных форм сои. Так, накопление антиоксидантов имеет примерно одинаковую умеренную степень корреляционных связей ($r = 0.40$) с величинами $Q_{y_{max}}$, Rfd , $qP_{стац}$. В конце вегетации проанализированы отношения фактора жизненности в фазе технической спелости со значениями продуктивности растений сои овощной в фазе полной биологической спелости: с массой растения (включая подземную часть), с числом бобов на растении, с массой семян с растения. Между данными показателями существует устойчивая положительная сопряженность: от $r = 0.78$ (с массой растения и с массой семян с растения) до 0.90 (с числом бобов на растении). Коэффициент жизненности обладает практической значимостью, играя роль количественной характеристики продуктивности растений, что дает возможность использовать РАМ-флуориметрию в оценке физиологического состояния растительного организма и его хозяйственной эффективности.

Ключевые слова: флуоресценция хлорофилла, РАМ-флуориметрия, фото- и нефотохимическое тушение флуоресценции, соя овощная

DOI: 10.31857/S0006302921020150

Применение неструктивных методов является современным трендом в биофизических исследованиях фотосинтетических процессов [1], в которых особое внимание уделяется явлению люминесценции листьев растений [2, 3]. Известно, что некоторая часть поглощенной энергии, составляющая около 3–5%, излучается в виде флуоресценции, для исследователей эта информация имеет большое значение, поскольку позволяет производить оценку физиологического состояния фотосинтетического аппарата листа [4].

После темновой адаптации листьев в хлоропластах реакционные центры ФС II находятся в открытом состоянии. После включения действующего света реакционные центры «закрываются», причиной чего является восстановление хинонового пула акцепторов электронов в ФС II. Данный процесс обуславливает увеличение флуоресценции хлорофилла *a* [5]. Дальнейшее снижение флуоресценции связано с фотохимическим и нефотохимическим тушением возбуждения молекул хлорофилла *a* в антенных комплексах ФС II [4].

Наиболее современным методом исследования при этом является метод на базе системы РАМ (от англ. Pulse Amplitude Modulation) [6, 7]. В данном подходе флуоресценция возбуждается импульсами света; встроенный детектор регистрирует переменную часть возбужденной флуоресценции [3]. РАМ-флуориметрия применяется

Таблица 1. Происхождение образцов *Glycine max* (L.) Merr. и направления их использования

№ п/п	Образец	Происхождение	Направление
1	Окская	Россия	Масличное
2	Соер-5	Россия	Масличное
3	Gokuwase Nayabusa Edamame	Япония	Овощное
4	Образец В	Япония	Овощное
5	Нордик	Россия	Универсальное
6	Hidaka	Япония	Овощное
7	740-1	Швеция	Овощное
8	Fiskeby III	Швеция	Овощное
9	Tundra	Канада	Универсальное
10	Cha Kura Kake	Япония	Овощное

в фундаментальных и в прикладных исследованиях в физиологии растений, в разнообразных сельскохозяйственных, экологических изысканиях. Главные преимущества этого способа заключаются в неинвазивности, возможности постановки опыта экспресс-методом, восприимчивости показателей к стресс-факторам [8]. Актуальной задачей в биофизике является объяснение динамики флуоресцентных характеристик, выявление взаимных отношений между флуориметрическими признаками и физиолого-биохимическими показателями растительных объектов, а также выделение конкретных показателей, наиболее тонко реагирующих на изменение процессов, протекающих во время фотосинтеза и влияющих на состояние растительного организма [1]. Они представляют собой важные признаки для скрининга состояния фотосинтетической активности растений [6], на которые влияет ряд биотических и абиотических факторов среды.

Ряд работ посвящен изучению индуцируемых изменений флуоресценции хлорофилла и их роли в селекционных программах по созданию новых сортов культурных растений. В исследованиях по ячменю, капусте белокочанной, пшенице авторы достаточно успешно пытались увязать показатели флуоресценции с отдельными элементами продуктивности и даже с урожайностью [9–11]. Подобные статьи, посвященные сое овощной, почти не встречаются. Для нас представляет интерес изучение влияния экологических условий выращивания на активность фотосинтетического аппарата впервые интродуцируемых овощных форм сои в сравнении с традиционными, уже культивируемыми масличными сортами в условиях 55° с.ш.

Цель работы – изучение закономерностей изменений флуоресцентных показателей листьев, а

также установление их взаимосвязей с биохимическими характеристиками (содержание антиоксидантов, углеводов, пигментов, сухого вещества) и продуктивностью растений (масса растения, число бобов на растении, масса семян с растения) у овощных и масличных селекционных форм *Glycine max* (L.) Merr. в середине и на претерминальном этапе онтогенеза сои.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектом исследования являлись листья овощных и масличных селекционных форм сои в фазах массового цветения и массовой технической спелости. Овощные формы представлены согласно сформированной модели сортоотбора: по морфологическим и хозяйственным признакам, биологическим особенностям, биохимическим параметрам [12], к универсальным отнесены формы, проявлявшие признаки, присущие как овощным сортам, так и масличным. В статье на рисунках вариант в опыте соответствует порядковому числу в таблице. Большая часть селекционного материала была предоставлена Федеральным исследовательским центром «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», также использованы образцы из коллекции Федерального научного центра овощеводства (табл. 1).

Измерения проводили в июле–августе 2018 г. Растения выращивали на опытном поле Федерального научного центра овощеводства (Одинцовский район Московской области). Для определения флуоресцентных характеристик и биохимических показателей отбирали молодые, сформировавшиеся листья на среднем ярусе.

Измерения импульсно-модулированной флуоресценции хлорофилла *a*. Оценку физиологиче-

ского состояния фотосинтетического аппарата проводили с помощью портативного РАМ-флуориметра FluorPen FP110 (Photon Systems Instruments, Чехия).

Флуоресцентный анализ проводили на интактных листьях с вентральной стороны листа, не срывая их с растения, в утреннее время (не позже чем за час до наступления полудня) в соответствии с принятым протоколом освещения *NPQ* для определения нефотохимического тушения флуоресценции [3]. Измерения велись при температуре атмосферного воздуха 20–23°C.

Возбуждение флуоресценции осуществляли светом с $\lambda_{\max} = 455$ нм. Регистрацию флуоресценции проводили в диапазоне длин волн 667–750 нм. Перед началом измерения лист предварительно адаптировали к темноте в течение 30 мин. После этого включали слабый измерительный свет (0.09 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) для определения минимального уровня флуоресценции (F_0) и затем подавали насыщающую вспышку (3000 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) для определения максимальной флуоресценции (F_{\max}^0). После короткого периода темновой релаксации включали действующий свет, на его фоне подавали кратковременные насыщающие вспышки света и измеряли флуоресценцию (5 вспышек с интервалом 12 с). Интенсивность действующего света составляла 1000 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Через 60 с освещения действующий свет выключали для наблюдения темновой релаксации, продолжая периодически подавать насыщающие вспышки (3 вспышки с интервалом 26 с).

Определяли значения интенсивности флуоресценции под влиянием измерительного и актинового света и насыщающих вспышек на свету и в темноте: F_0 — начальная флуоресценция в листьях, адаптированных к темноте, F_0' — нулевая флуоресценция в листьях, адаптированных к свету, F_{\max}^0 — максимальная флуоресценция в листьях, адаптированных к темноте, F_{\max}' — максимальная флуоресценция в листьях, адаптированных к свету, F_v — переменная флуоресценция ($F_{\max}^0 - F_0$), F_p — максимальная флуоресценция при возбуждении действующим светом, F_t — стационарная флуоресценция в листьях, адаптированных к свету. На их основе вычисляли следующие показатели флуоресценции: нефотохимическое тушение флуоресценции $NPQ = (F_{\max}^0 - F_{\max}')/F_{\max}'$; фотохимическое тушение флуоресценции $qP = (F_{\max}' - F_t)/(F_{\max}' - F_0')$; действительный квантовый выход фотохимических реакций в ФС II $Q_y = (F_{\max}' - F_t)/F_{\max}'$; максимальная квантовая эффективность ФС II после темновой адаптации

$Q_{y_{\max}} = F_v/F_{\max}^0$. Также был измерен коэффициент жизнестойкости $\PhiС II Rfd = (F_{\max}^0 - F_t)/F_t$.

При определении параметров флуоресценции усреднение проводили по десяти опытным образцам.

Биохимический анализ листьев. Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили спектрофотометрическим методом по методике Лихтенталлера [13]. В качестве растворителя использовали 100%-й ацетон. Спектры поглощения измеряли при помощи спектрофотометра Solar PB2201 (ЗАО «СОЛАР», Республика Беларусь).

Определение суммарного содержания антиоксидантов проводили вольтамперометрическим методом на измерительном комплексе «ЦветЯуза 01-АА», разработанном в ОАО НПО «Химвамотика» (Москва) [14]. Экстракцию антиоксидантов проводили бидистиллированной водой при температуре 20°C. Регистрировали площади пиков в четырехкратной повторности. Массовую концентрацию антиоксидантов рассчитывали, используя калибровку по галловой кислоте.

Определение содержания сухого вещества осуществляли методом высушивания навески до постоянной массы [15].

Содержание углеводов анализировали методом Бертрана в модификации Бьери [15].

Определение содержания витамина С проводили йодометрическим методом [16].

Определение содержания фенольных соединений осуществляли методом Фолина–Чокальтеу [17].

При проведении биохимических исследований отбирали среднюю пробу в трехкратной повторности с тех листьев, которые использовали в РАМ-флуориметрии.

Измерение показателей продуктивности растений. Анализ показателей продуктивности растений (масса растения, число бобов на растении, масса семян с растения) определяли по пяти типичным растениям с одного образца при влажности 10%, листья которых использовались в физиологических исследованиях.

Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение индукции флуоресценции хлорофилла. В соответствии с протоколом измерений *NPQ* было исследовано нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла в листьях различных генотипов. Вначале наблюдалось скачкообразное усиление интенсивности флуоресценции (F_p), затем происходило ее постепенное затухание. Дан-

ная особенность известна как эффект Каутского [2]. После включения актиничного освещения образец освещали повторяющимися насыщающими вспышками, в результате чего флуоресценция возрастала до уровня F'_{\max} , величина которого оказывалась меньше, чем F_{\max} . По мере освещения действующим светом F'_{\max} постепенно снижалась, что объяснимо запуском механизма тепловой диссипации при освещении образца действующим светом [18].

Реакция на свет в фазе цветения не у всех образцов была одинакова. Тем не менее начальная интенсивность флуоресценции перед наиболее сильной насыщающей вспышкой (F_0), а также максимальная (F_{\max}^0) после нее почти у всех образцов совпадали. Однако было замечено, что вариант 740-1 показал нулевую флуоресценцию на 59% больше, а максимальную — на 71.3% выше, отличался низким содержанием хлорофилла $a + b$ — 1.24 мг/г сырой массы листа, при среднем их аккумуляровании у остальных приблизительно на одном уровне — 1.50 мг/г. Большие значения нулевой флуоресценции говорят о слабой передаче энергии возбуждения в светособирающей антенне ФС II. Это может быть обусловлено стрессом, вызванным высокими температурами, которые приводят к повреждению фотосинтетического аппарата из-за влияния света повышенной интенсивности, когда происходит активный синтез АТФ [4]. Более высокие значения флуоресценции в первые секунды освещения действующим светом листьев объясняются более медленным нарастанием нефотохимического тушения флуоресценции. Такое «торможение» определяется невысокой скоростью образования ΔpH , вызывающей нефотохимическое тушение флуоресценции [19]. Между тем проявление какого-либо стресса, вызванного абиотическими или биотическими факторами (болезни растений, повреждение вредителями или засухой), визуально на растениях образца 740-1 не наблюдалось. В данном случае можно предположить в целом влияние экологических условий на фотосинтетические процессы, протекающие в интродуцируемом образце овощного типа, и, в частности, теплового стресса. Показатели F_0 , F_{\max}^0 , F_V у данной линии в более поздней фазе развития не отличались от остальных.

В фазе технической спелости F_0 и F_{\max}^0 по генотипам были схожи, при этом максимальными данные величины были у варианта № 1 (масличный сорт Окская). Данный сорт более раннеспелый по сравнению с другими образцами, он раньше вступил в пору зрелости, и на данном этапе началось частичное старение растений.

После выключения актиничного света флуоресценция начинала меняться. Наблюдались пи-

ки F_{\max} , вызванные кратковременными вспышками, и резкое снижение вслед за ними флуоресценции, обусловленное фотохимическим и нефотохимическим тушением, о чем подробнее будет сказано в следующих разделах работы (рис. 1 и 2).

Сравнивая показатели интенсивности флуоресценции листьев в разные фазы развития растений, можно заметить, что величина F_0 была приблизительно одинаковой; максимальная флуоресценция в фазе технической спелости была выше в среднем на 19%, чем в фазе цветения, что можно объяснить претерминальной стадией в онтогенезе листьев, более высокой интенсивностью света и температурой атмосферного воздуха в фазе образования бобов и семян, что могло повлиять на степень восстановленности пула акцепторов электронов в ФС II.

Как известно, основная причина возникновения нефотохимического тушения — это образование градиента ΔpH и перенос части энергии возбуждения в ФС I. Эволюционные механизмы адаптации растений выработали эффективную систему, при которой происходит «выброс» части поглощенной световой энергии в виде тепла. Это происходит тогда, когда растения очень интенсивно начинают ассимилировать свет или при других стрессовых факторах. Когда после темновой адаптации включается действующий свет, происходит закисление внутритилакоидного пространства и возникает известное явление снижения pH [1].

После включения актиничного света наблюдался рост NPQ по всем образцам. Максимальные значения нефотохимического тушения наблюдались примерно на 68 с после включения действующего света.

На рис. 1 приведены характерные кривые изменения величины нефотохимического тушения по мере освещения листа. В целом образцы имели почти одинаковый ее уровень, за исключением варианта 740-1 (№ 7) и Fiskeby III (№ 8) в фазе цветения: стационарный уровень NPQ в фазе образования цветков у образца № 7 был меньше на 20%, а у образца № 8 — выше на 33%, чем в среднем у остальных вариантов, и равнялся 1.22 и 1.86 соответственно. Интересно, что образец № 8, обладавший максимальной величиной NPQ в фазе цветения, в последующем периоде формирования бобов показал его самое низкое значение (1.15); можно сказать, что в онтогенетическом развитии влияние тепловых стрессовых условий выращивания снизилось до минимума. Во время образования бобов по уровню тепловой диссипации отличался образец В (№ 4), с самым большим значением среди представленных вариантов (1.81). Он отличался медленным ростом NPQ в начале и более быстрым спадом при выключении

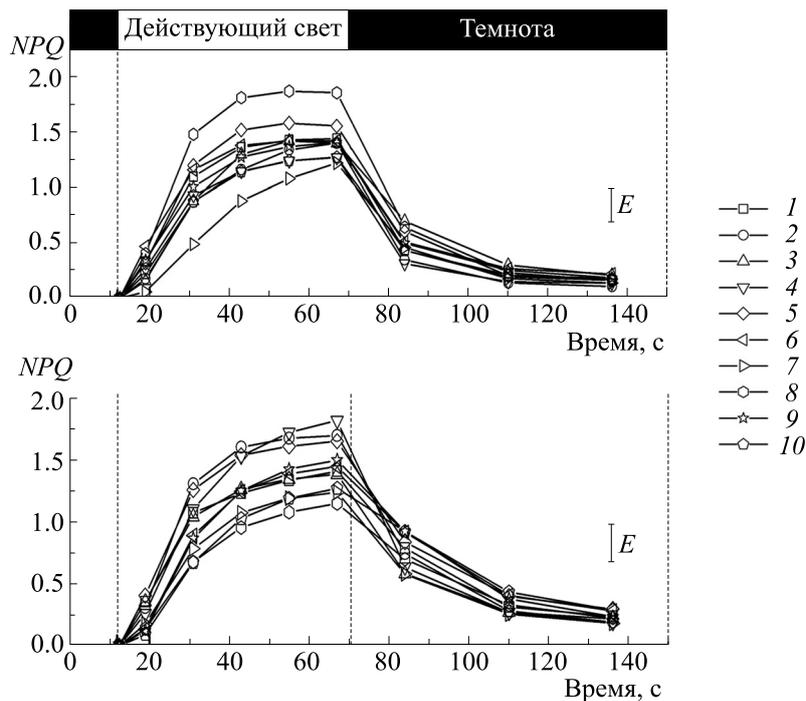


Рис. 1. Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) в листьях овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу). Числа 1–10 обозначают образцы, описанные в табл. 1.

действующего света. Это можно объяснить тем, что он был подвержен, с одной стороны, заболеванию вирусной мозаикой (*Soja virus*), с другой — повреждениями паутинным клещом (*Tetranychus urticae*) средней степени. Аналогичный эффект наблюдали на листьях садовой земляники при поражении их атлантическим паутинным клещом (*Tetranychus atlanticus*) [3].

Сразу после выключения актиничного света нефотохимическое тушение начинает сразу снижаться с достаточно высокой скоростью: приблизительно за 60 с оно возвращается практически в исходную позицию со средним значением 0.19. Почему тепловые потери не опускаются до нуля? Это объясняется фотоингибированием, которое обуславливается излишне сильным излучением, активация АТФ-синтазы вызывает уменьшение ΔpH , что приводит в конечном счете к снижению NPQ [18]. Его уровень после выключения актиничного света связан с релаксацией процессов регулируемого нефотохимического тушения, преимущественно с энергозависимым (qE) механизмом. В целом можно сделать вывод о том, что соя обеих селекционных форм имела стабильные значения NPQ . В фазе цветения и технической спелости медианные значения NPQ совпадали. Аномалий в кинетике нефотохимического тушения не выявлено.

Изучение эффективности фотохимических реакций. Значения фотохимического тушения явля-

ются важнейшими показателями эффективности световых стадий фотосинтеза, поскольку именно эта часть световой энергии может быть непосредственно использована в фотохимических реакциях. В качестве параметров фотохимического тушения мы использовали $Q_{y_{max}}$ и Q_y .

За начальную точку кривых квантового выхода взят показатель F_v/F_{max}^0 , характеризующий максимальный квантовый выход фотохимического разделения зарядов в ФС II. В фазе цветения он составлял в среднем 0.76 у масличных и 0.78 у овощных форм, что может говорить о состоянии стресса, вызванном частичным повреждением фотосинтетического аппарата. Такая реакция растений может объясняться влиянием яркого дневного света на растения со слабой системой фотозащиты. В фазе технической спелости значение $Q_{y_{max}}$ восстановилось, у овощных и масличных форм было одинаковым и составило в среднем уже 0.81, подтверждая нашу гипотезу о том, что стрессовое воздействие, связанное с ингибирующим светом, прекратилось. Относительная ошибка не превосходила 10%.

Стационарное значение показателя Q_y , отвечающего за фактический квантовый выход ФС II на свету, в фазе цветения у образца 740-1 было наименьшим среди всех изученных вариантов (0.10) с существенным отставанием от остальных в два раза, причиной чему является, возможно,

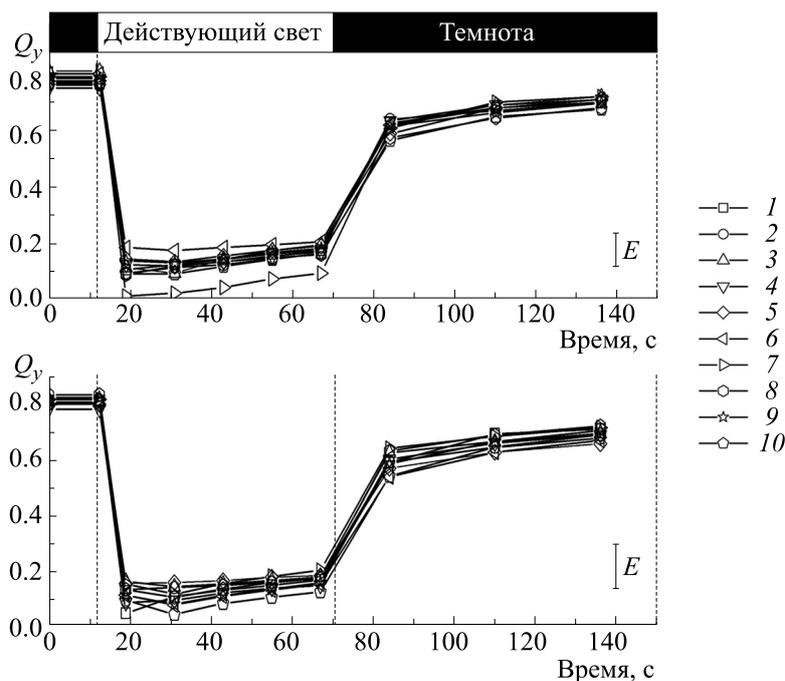


Рис. 2. Эффективный квантовый выход ФС II (Q_y) в листьях овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу). Числа 1–10 обозначают образцы, описанные в табл. 1.

более слабое развитие фотосинтетического аппарата в целом и чувствительность к стрессовым воздействиям. Любопытно, что этот же генотип в последующей фазе развития показал максимальный квантовый выход как после темновой адаптации (0.83), так и на свету (0.20) и, как следствие, повышенную продуктивность. Он обладал наибольшими значениями массы 1000 семян и коэффициента хозяйственной эффективности урожая среди представленных форм – 320.2 г и 51.4% соответственно.

После включения действующего света происходило значительное падение эффективности фотохимических реакций. Такие изменения обуславливаются окислением реакционных центров, под действием насыщающего актиничного света и процессом восстановления первичных хиннонных акцепторов электронов Q_A [3]. Затем, примерно начиная с 20-й секунды, возобновляется медленный рост Q_y . Усиление синтеза АТФ и восстановленного НАДФ-Н приводит к запуску цикла Кальвина–Бенсона, понижению интенсивности флуоресценции и возбуждению нефотохимического (NPQ) и фотохимического (qP) тушения флуоресценции в антеннах ФС II [20].

После прекращения подачи актиничного света, во время темновой релаксации, наблюдался резкий рост эффективности фотохимических реакций, особенно сильно это явление проявлялось в первые 15 с. После этого увеличение Q_y несколько замедлялось, но выходило на стационар

до конца периода регистрации протокола, едва не дотягивая до стартового уровня F_v/F_{max}^0 . Уменьшение Q_y по сравнению с $Q_{y,max}$ объясняется ингибирующим влиянием насыщающих вспышек на фоне действующего света на листовую аппарат сои. Показатели эффективности фотохимических реакций в разные фазы развития растений сои были схожи, за исключением упомянутого варианта 740-1 (рис. 2).

Нами был проведен анализ взаимосвязей некоторых флуоресцентных показателей в разные фазы развития растений (рис. 3). Найдена интересная особенность: и в фазе цветения, и в фазе технической спелости наблюдалась почти прямая зависимость тепловой диссипации с фактором жизненности – значение коэффициента корреляции было одинаково в обе фазы и составило 0.95. Казалось бы, величина Rfd , как одного из показателей относительного тушения и косвенно отражающий фотосинтетическую активность листа [21], должна быть обратно пропорциональна нефотохимическому тушению, поскольку чаще всего фотохимическое и нефотохимическое тушение развиваются и относятся друг к другу в противоположном соотношении [3]. Почему мы наблюдаем этот аномальный эффект в обе фазы онтогенеза листьев сои овощного типа? Отчасти это объяснимо тем фактом, что при относительно стабильном уровне F_{max}^0 менялись значения F'_{max} и F_t , которые

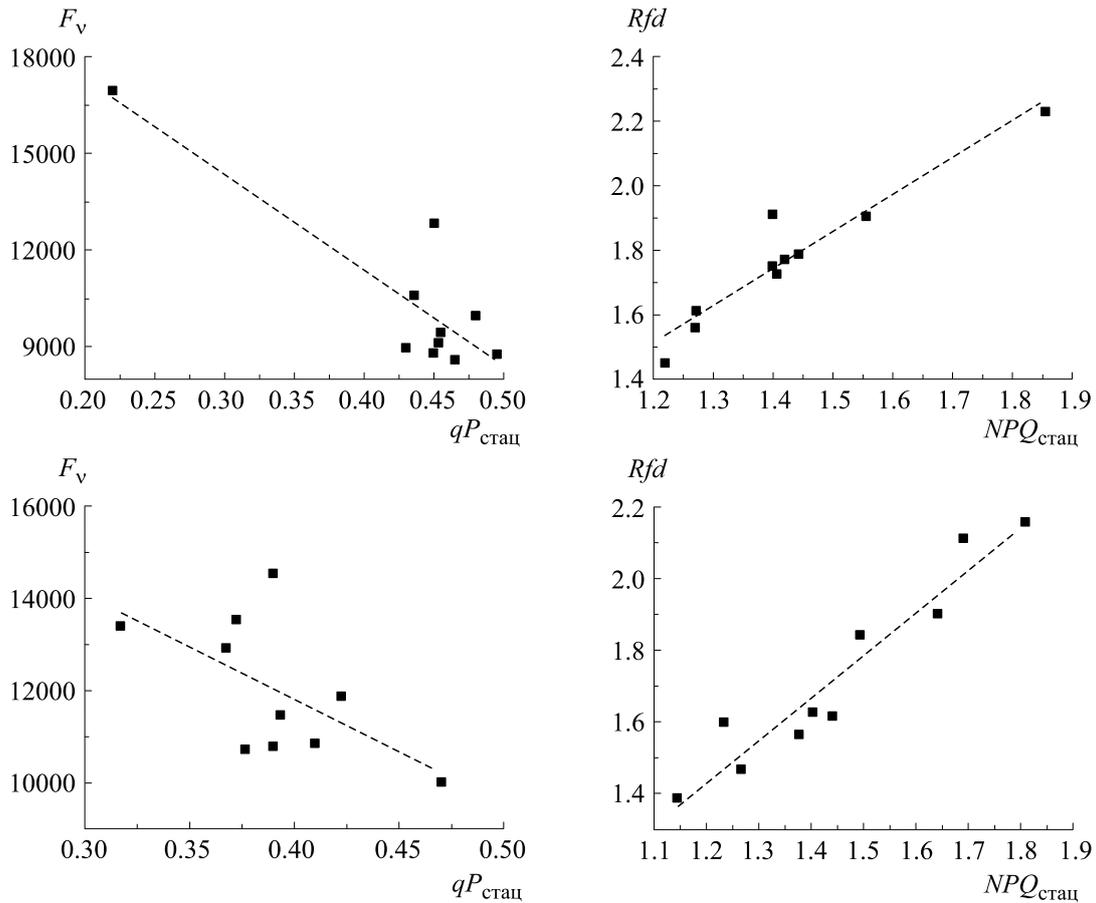


Рис. 3. Связь фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушения с переменной флуоресценцией (F_v) и коэффициентом жизненности (Rfd) в листьях сои овощной в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу).

положительно коррелировали между собой, что и повлекло увеличение обоих показателей.

Вариабельная флуоресценция имела отрицательную зависимость от фотохимического тушения флуоресценции – в фазе цветения и технической спелости $r = -0.89$ и -0.78 соответственно. F_v определяется разницей между максимальной флуоресценцией (F_{max}^0) и нулевой (F_0) после темновой адаптации и в значительной степени коррелирует с максимальным квантовым выходом ФС II $Q_{y_{\text{max}}}$ [2]. Вероятно, уменьшение F_v вызывает усиление $qP_{\text{стац}}$ по причине того, что терминальная и нулевая флуоресценция после адаптации к действующему свету имели отрицательную взаимосвязь с F_{max}^0 и F_0 . Наблюдение практически обратной пропорциональности вариабельной флуоресценции уровню фотохимического тушения может говорить об нетривиальном поведении растения. Можно сказать, что такая реакция обусловлена внешними условиями выращивания, достаточно нетрадиционными для этой культу-

ры, поскольку она формировалась длительное время в условиях короткого дня, в отличие от Центрального района Европейской части России, который характеризуется длинным световым периодом. Как будет указано ниже, в конечном итоге этот фактор не повлиял на продуктивность растений.

Сравнение флуоресцентных показателей листьев овощных и масличных форм. В целях подтверждения разницы флуоресцентных признаков у исследованных нами образцов была проведена иерархическая кластеризация полученных данных, представленных на рис. 4. В кластерный анализ был включен пул флуоресцентных показателей, а именно: F_v , F_p , $Q_{y_{\text{max}}}$, Rfd , $qP_{\text{стац}}$, $NPQ_{\text{стац}}$, а также их поведение на свету и релаксация в темноте. Устойчивость кластерного анализа была основана на результатах, полученных при использовании метода групповых средних, с расчетом евклидового расстояния.

В фазе цветения (рис. 4) была замечена интересная тенденция образования отдельного кла-

стера, состоящего только из масличных форм (Окская и Соер-5). Остальные образцы формировали кластеры в зависимости от флуоресцентных показателей, находясь ближе или дальше друг от друга. Установлено, что образец 740-1 (№ 7) не составил кластер, поскольку его характеристики не укладывались ни в один из имеющихся и не обладали схожестью с представленными генотипами. Образец В (№ 4) по флуоресцентным показателям вошел в отдельный кластер, который включал два субкластера — собственно сам образец и подгруппа с масличными формами. Исследуемые нами масличные линии — это созданные сорта для Нечерноземной зоны России, выделенные из исходного материала, адаптированного к местным условиям в течение достаточно продолжительного периода, овощные же формы интродуцируются впервые, и, как следствие, их физиологические показатели в целом и флуоресцентные характеристики в частности отличались от стандартных (зерновых) образцов, выращиваемых в этой зоне много ранее. Почему масличные формы выделились в отдельный кластер? Это объясняется тем, что они более раннеспелые (сумма активных температурных единиц меньше на 80–90°C), менее чувствительны к длине дня и, естественно, не подвергались целенаправленному отбору в условиях 55° с.ш., что сказалось на физиолого-биохимическом отличии образцов овощного биотипа, сформированных в Китайском центре [22, 23].

Сравнивая показатели флуоресценции в фазе технической спелости (рис. 4), можно отметить распад отдельного кластера масличных форм. Соер-5 и образец В показали сходные данные и образовали гомогенный кластер аналогично предыдущей фазе, что отразило их постоянство флуориметрической природы. В фазе технической спелости значительно меняются биофизические характеристики, почти нивелируется какое-либо различие в зависимости от селекционной направленности сорта. Возможно, это влияние предуборочной фазы развития, подготовки растений к биологической спелости, и, таким образом, растения «переключались» на формирование урожая.

Связь флуоресцентных показателей листьев овощных форм и биохимических характеристик. Определена связь важнейших биохимических характеристик с биофизическими, такими как: F_v , $Q_{y_{max}}$, Rfd , $qP_{стац}$, $NPQ_{стац}$. Выбор в пользу именно этих показателей объясняется тем, что они в основном отражают фотосинтетическую активность листьев и физиологическое состояние растений в целом.

Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов коррелировало с $Q_{y_{max}}$, Rfd , $qP_{стац}$ приблизительно на одинаковом уровне. Это объ-

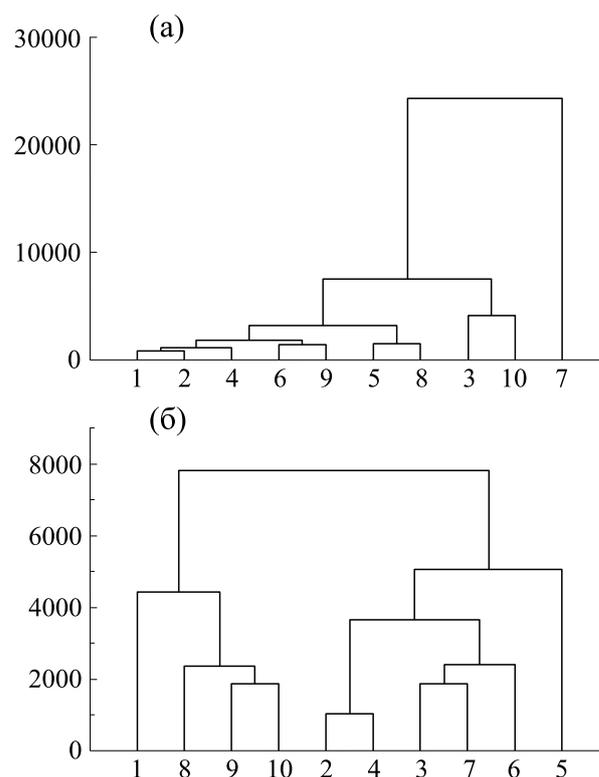


Рис. 4. Дендрограмма кластерного анализа показателей флуоресценции листьев овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и технической спелости (внизу).

яснимо, по-видимому, тем, что с усилением фотохимического тушения часть запасенной энергии в форме АТФ уходит на обеспечение энергетики синтеза антиоксидантов на случай защиты организма от стресса. В свою очередь, связь накопления фенольных соединений, обладающих иным метаболическим путем синтеза, отличалась от взаимного влияния водорастворимых антиоксидантов и биофизических характеристик. В нашем опыте они имели обратную зависимость с F_v , Rfd , $NPQ_{стац}$. Схожей природой корреляций обладают углеводы: с их увеличением наблюдалось уменьшение значений Rfd , $NPQ_{стац}$, $qP_{стац}$ в обе фазы.

Содержание пигментов в фазе цветения не обладало значимыми достоверными взаимосвязями с флуоресцентными показателями, за исключением положительной с Rfd и $NPQ_{стац}$. Это обусловлено тем, что увеличение содержания хлорофилла вызывает в известной степени усиление фотосинтетической активности [2]; при этом сопряженность содержания пигментов с тепловой диссипацией определяется в нашем случае почти прямой зависимостью $NPQ_{стац}$ с коэффициентом жизненности (рис. 3). Любопытно, что в фазе технической спелости это влияние утратилось — из-

Таблица 2. Сопряженность флуоресцентных показателей листьев овощных форм сои с биохимическими характеристиками

№ п/п	Биохимический параметр	Фаза развития растений	Показатели флуоресценции хлорофилла				
			F_v	$Q_{y_{max}}$	Rfd	$qP_{стак}$	$NPQ_{стак}$
1	Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов, в сырой массе	В фазе цветения	-0.09 ± 0.23	0.41 ± 0.21	0.41 ± 0.22	0.39 ± 0.22	0.27 ± 0.23
2	Суммарное содержание фенольных соединений, в сухой массе	В фазе технической спелости	-0.68 ± 0.17	-0.11 ± 0.23	-0.40 ± 0.22	0.22 ± 0.23	-0.34 ± 0.22
3	Содержание витамина С, в сырой массе	В фазе цветения	-0.22 ± 0.23	-0.18 ± 0.23	0.67 ± 0.18	0.10 ± 0.23	0.73 ± 0.16
		В фазе технической спелости	-0.59 ± 0.19	-0.79 ± 0.14	0.56 ± 0.19	0.37 ± 0.22	0.68 ± 0.17
4	Содержание углеводов, в сырой массе	В фазе цветения	0.65 ± 0.18	0.11 ± 0.23	-0.41 ± 0.22	-0.66 ± 0.18	-0.32 ± 0.22
		В фазе технической спелости	0.02 ± 0.24	0.36 ± 0.22	-0.66 ± 0.18	-0.27 ± 0.23	-0.63 ± 0.18
5	Содержание хлорофилла <i>a</i> и <i>b</i> , в сырой массе	В фазе цветения	-0.24 ± 0.24	0.22 ± 0.23	0.44 ± 0.21	0.27 ± 0.23	0.39 ± 0.22
		В фазе технической спелости	-0.01 ± 0.24	-0.52 ± 0.20	0.12 ± 0.23	-0.31 ± 0.22	0.26 ± 0.23
6	Содержание каротиноидов и ксантофилов	В фазе цветения	-0.38 ± 0.22	0.04 ± 0.24	0.41 ± 0.21	0.30 ± 0.22	0.43 ± 0.21
		В фазе технической спелости	0.07 ± 0.24	-0.51 ± 0.20	0.14 ± 0.23	-0.37 ± 0.22	0.24 ± 0.23
7	Содержание сухого вещества	В фазе технической спелости	0.05 ± 0.24	0.54 ± 0.20	-0.89 ± 0.11	-0.32 ± 0.22	-0.83 ± 0.13

менились пути использования фотохимической энергии запасенной в форме АТФ, которая стала потребляться на образование бобов, и наблюдалась обратная корреляционная связь с $Q_{y_{max}}$.

Накопление сухого вещества листьев обладало положительной корреляционной связью с максимальной квантовой эффективностью ФС II; с ее увеличением величины Rfd и $NPQ_{стак}$ снижались. Причиной этого является перераспределение энергетических потоков: часть энергии, которая использовалась на накопление сухого вещества в вегетативных органах, начала расходоваться на его аккумуляцию в образующихся плодах и семенах. Детальная картина корреляционных

взаимосвязей флуоресцентных показателей листьев овощных форм с биохимическими характеристиками дана в табл. 2.

Связь фотосинтетической активности с продуктивностью растений овощных форм. Коэффициент жизнестойкости («vitality index») показывает взаимодействие работы фотосистемы II с процессами темновой фазы [24, 25]. Rfd можно рассматривать как фактор потенциальной фотосинтетической активности [21, 26]. Мы изучали взаимозависимость фотосинтетической активности $(F_{max}^0 - F_t)/F_t$ в фазе технической спелости растений с показателями продуктивности ис-

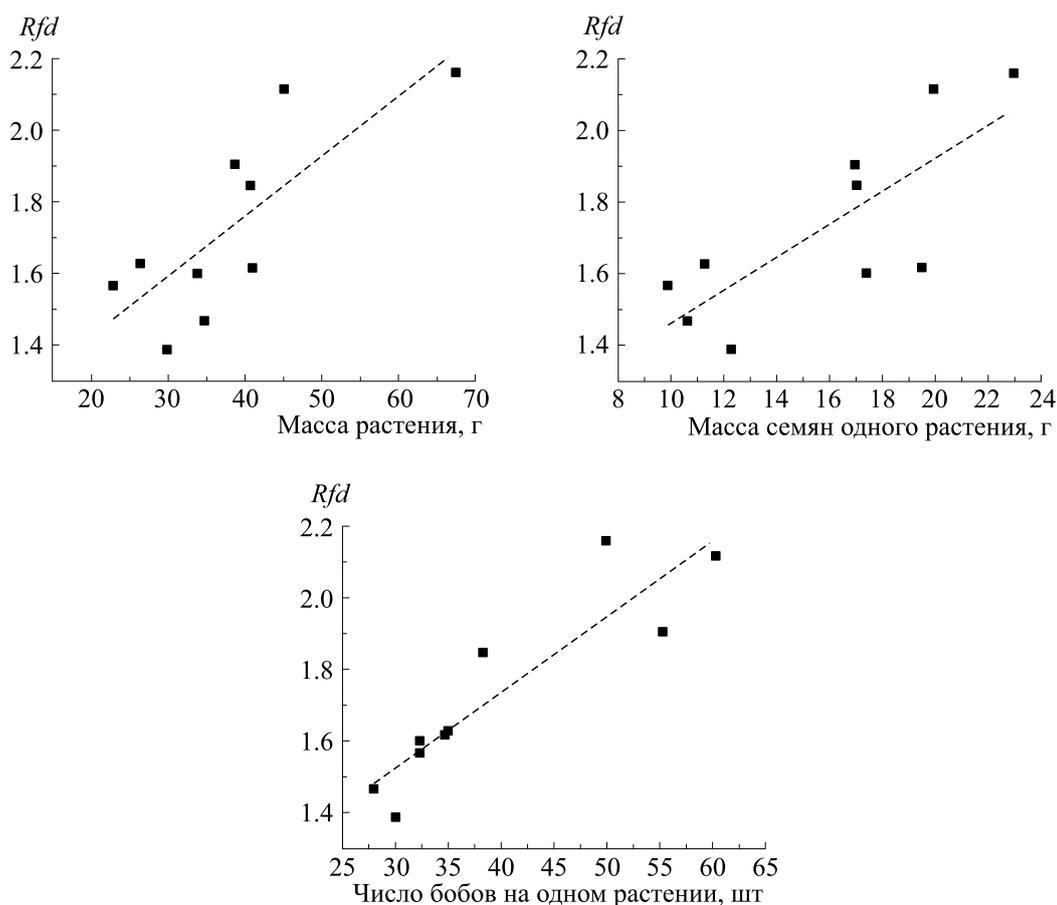


Рис. 5. Связь показателя коэффициента жизненности (Rfd) с показателями продуктивности растений сои овощной в фазе полной биологической спелости.

следуемого объекта: массой растения, массой семян с растения, числом бобов на растении. Эффективность фотохимических реакций (Rfd) в фазе интенсивного образования плодов составляла 1.69, что соответствует средним значениям данной культуры [27].

Связь коэффициента жизненности с показателями продуктивности растений была хоть и схожей, но имела различия (рис. 5). Высокая степень зависимости наблюдалась с числом бобов на растении ($r = 0.90$). Эта закономерность обуславливается тем, что обычно в нормальных, нестрессовых условиях растение закладывает максимально возможное число бобов, которые обладают слабой вариабельностью в пределах выборки. Следовательно, фенотипическая изменчивость не влияла на изменение картины взаимосвязей с Rfd . Эксперименты показывают, что фактическое число бобов часто стремится к теоретически ожидаемому, в отличие от числа семян на растении и, как следствие, от их массы [12]. С массой растения, включая подземную часть, и с массой семян

с растения взаимосвязь была несколько меньшей: по обоим показателям находилась на одном уровне ($r = 0.78$). Чем это объяснимо? Масса растения и семян подвержена сильной модификационной изменчивости, являясь количественным признаком, подчиненным множеству внешних и наследственных факторов; последние, в свою очередь, определяются большим числом неаллельных генов [12]. Несмотря на то что число бобов на растении потенциально может быть очень велико, часто в них имеются абортивные, недоразвитые семена, с очень низкой массой, в итоге приводящее к понижению общей продуктивности — интегрального показателя.

Наши исследования подтверждают тот факт, что показатель Rfd в том числе отражает ассимиляцию углекислого газа: значения коэффициента жизненности пропорциональны развитию элементов структуры урожая. Таким образом, показатель флуоресценции $(F_{\max}^0 - F_t)/F_t$ является свя-

зующим звеном между параметрами световой и результатами темновой стадии фотосинтеза.

ВЫВОДЫ

1. Найдена сильная корреляция между величиной $NPQ_{\text{стац}}$, характеризующей тепловую диссипацию в листьях, и фактором жизнеспособности Rfd , а также обратная зависимость вариабельной флуоресценции с фотохимическим тушением $qP_{\text{стац}}$ в середине и в конце онтогенеза.

2. Установлены различия флуоресцентных показателей между овощными и масличными селекционными формами *Glycine max* (L.) Merr. на ранних стадиях развития растений (в фазе цветения), что проявилось в образовании обособленного кластера последних. В дальнейшем в онтогенезе по мере развития генеративных органов этот эффект нивелируется. Предварительно можно сделать вывод о том, что данные показатели флуоресценции овощных форм сои частично отражают селекционные признаки, характерные для иных условий происхождения.

3. Определены взаимосвязи флуоресцентных показателей с биохимическими характеристиками, в частности, с накоплением антиоксидантов: с показателями Qu_{max} , Rfd , $qP_{\text{стац}}$ сопряженность была приблизительно равной на умеренном уровне, а также с содержанием сухого вещества: с его увеличением происходило снижение фактора жизнеспособности Rfd и тепловых потерь $NPQ_{\text{стац}}$.

4. Исследовано отношение показателя флуоресценции $(F_{\text{max}}^0 - F_t)/F_t$ с элементами продуктивности растений. Отношения индекса жизнеспособности с элементами продуктивности были схожими, при этом наибольшая степень корреляции обнаружена с числом бобов на растении. Анализ взаимосвязей фактора жизнеспособности, как важнейшего показателя индукционных изменений, с элементами структуры урожая дает возможность определять потенциальную хозяйственную эффективность растений сои овощной современными инструментальными методами на более ранних этапах онтогенеза.

Данные исследования методом РАМ-флуориметрии показывают перспективы применения флуоресцентного метода для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений, предварительного прогноза накопления определенных биохимических соединений и продуктивности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Благотворительного фонда В. Потанина (грант № ГПК-19/17).

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. O. A. Kalmatskaya, et al., *Biophysics* **60** (1), 135 (2015).
2. V. V. Ptushenko, O. S. Ptushenko, and A. N. Tikhonov, *Biochemistry (Moscow)* **79** (3), 260 (2014).
3. A. A. Baikov, et al., *Biophysics* **58** (2), 234 (2013).
4. В. Н. Гольцев и др., *Физиология растений* **63** (6), 881 (2016).
5. D. Lazár, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1412** (1), 1 (1999).
6. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papagerogiou (Springer, 2004).
7. W. W. Adams and B. Demmig-Adams, in *Chlorophyll a Fluorescence* (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 583–604.
8. Y.F. Liu, M.F. Qi, and T.L. Li, *Plant Sci.* **196**, 8 (2012).
9. E. Nalborczyk and H. J. Czembor, *Cereal and root-crop systems in Central Europe*, №. REP-5295. CIMMYT (1992).
10. M. H. Kalaji and P. Guo, *Photochem. Res. Progr.* **29**, 439 (2008).
11. M. H. Kalaji and S. Pietkiewicz, *Plant Breed. Seeds Sci.* **49**, 19 (2004).
12. D. R. Shafigullin, et al., *Rus. Agric. Sci.* **46** (3), 213 (2020).
13. H.K. Lichtenthaler, *Methods Enzymol.* **148**, 350 (1987).
14. А. Я. Яшин, Я. И. Яшин и Н. И. Черноусова, *Пищевая промышленность*, № 2, 10 (2006).
15. А. И. Ермаков и др., *Методы биохимического исследования растений* (Агропромиздат, Л., 1987), т. 143.
16. W. U. Wen, et al., *J. Anhui Agric. Sci.* **21** (2009).
17. E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, *Nature Protocols* **2** (4), 875 (2007).
18. O. P. Samoilo, V. V. Ptushenko, I. V. Kuvykin, et al., *BioSystems* **105**, 41 (2011).
19. G. H. Krause and E. Weis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313 (1991).
20. L. Alonso, et al., *Remote Sensing* **9** (8), 770 (2017).
21. В. А. Караваев, И. О. Белогрудов и А. К. Кукушкин, *Биофизика* **34** (4), 710 (1989).
22. Н. И. Вавилов, *Тр. прикл. ботан. и селекции* **16** (2), 248 (1926).
23. D. R. Shafigullin, et al., *Rus. Agric. Sci.* **46** (5), 447 (2020).

24. Л. Э. Гунар, В. А. Караваев и Р. В. Сычев, Изв. ТСХА, № 2, 78 (2008).
25. Л. Э. Гунар, А. Г. Мякинников, С. А. Глазунова и В. А. Караваев, Изв. ТСХА, № 2, 91 (2009).
26. В. А. Караваев, Л. Э. Гунар, А. Г. Мякинников и др., Биофизика 57 (4), 662 (2012).
27. A. Djekoun and C. Planchon, Euphytica 55 (3), 247 (1991).

Relationship of Inductional Changes of Fluorescent Leaf Indices of *Glycine max* (L.) Merr. with Biochemical Characteristics and Productivity

D.R. Shafigullin*, **, A.A. Baykov*, M.S. Gins*, **, E.P. Pronina*, V.F. Pivovarov*,
A.V. Soldatenko*, and E.V. Romanova**

*Federal Scientific Vegetable Center, ul. Selectzionnaya 14, pos. VNISSOK, Moscow Region, 143080 Russia

**Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 8/2, Moscow, 117198 Russia

The influence of growing conditions on the fluorescent characteristics of leaf of the soybean first time introducing vegetable and cultivating oilseed forms has been studied in the European part of Russia. It was used the following parameters of fluorescence induction: NPQ (non-photochemical fluorescence quenching), qP (photochemical quenching of fluorescence), Q_y (quantum yield of photochemical reactions in PS II), $Q_{y\max}$ (maximum quantum efficiency of PS II), Rfd (coefficient of vitality) in our work. We showed a direct relationship between non-photochemical quenching and Rfd factor in the flowering phase and R6-stage ($r = 0.95$), and the inverse relationship between the F_v and photochemical quenching (in the flowering phase and technical ripeness $r = -0.89$ and -0.78 , respectively) in the flowering phase and R6-stage. It was studied the biochemical parameters of leaves, analyzed their relationships with photosynthetic indicators of leaves of vegetable forms: the antioxidant accumulation had approximately the same moderate degree of correlation ($r = 0.40$) with $Q_{y\max}$, Rfd , $qP_{s,s}$. At the end of the growing season, we analyzed the relationship of the vitality factor in the R6-stage with the values of the vegetable soybean plant productivity in the phase of full biological ripeness: with the plant mass, including the underground part, with the number of beans per plant, with the seed mass per plant. There is a stable positive contingency between these indicators: from $r = 0.78$ (with the plant mass and with the seed mass per plant) to 0.90 (with the number of beans per plant). The vitality factor has a practical orientation, playing the role of a quantitative characteristic of plant productivity, which makes it possible to use PAM-fluorimetry in assessing the physiological state of plant organism and its economic efficiency.

Keywords: chlorophyll fluorescence, PAM fluorometry, photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching, vegetable soybean

ГИПОТЕЗЫ ОБ АДАПТАЦИИ ВОДОРΟΣЛЕЙ К ПЕРИОДИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

© 2021 г. В.Г. Ильичев*, О.А. Ильичева**

*Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, ул. Чехова, 41
E-mail: vitaly369@yandex.ru

**Донской государственный технический университет,
344022, Ростов-на-Дону, ул. Социалистическая, 162
E-mail: oaili@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.2020 г.

После доработки 12.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

Предложена новая эколого-эволюционная модель водорослей малой размерности. В ней реализована одновременная динамика переменных (биомассы популяций) и параметров-границ интервала температурной толерантности $[a - d, a + d]$. При заданном периодическом режиме температуры данные параметры стремятся к некоторым финальным, так называемым эволюционно-устойчивым значениям. В результате расчетов установлено, что на плоскости (a, d) все эволюционно-устойчивые параметры располагаются в форме «радуги», наиболее удаленные точки которой соответствуют холодолюбивым (диатомовым) и теплолюбивым (синезеленым) водорослям. Проведен анализ адаптации водорослей к двум периодическим факторам среды (температуры и солености) с заданными интервалами толерантности по температуре $[a - d, a + d]$ и по солености $[b - c, b + c]$. Установлено, что область эволюционно-устойчивых параметров в плоскости (a, b) зависит от степени синхронности факторов среды. В одних случаях эти параметры лежат на линейном отрезке, а в других вариантах возможно их неожиданное расположение на нелинейном овале.

Ключевые слова: модель, адаптация, эволюционно-устойчивые параметры, температура, соленость.

DOI: 10.31857/S0006302921020162

Возможное потепление климата вызовет деформацию не только температурного, но и других факторов среды. Так, в разных районах планеты изменится уровень осадков, что, в свою очередь, трансформирует там объем и сезонный режим речного стока. В частности, вариация донского стока всегда порождает преобразования солености Азовского моря – ключевого регулятора его продуктивности [1]. Известные модели ([2, 3] и др.) ориентированы преимущественно на описание поведения продукционных процессов. Однако для адекватной оценки долговременных экологических последствий при новых условиях среды требуются иные методы прогнозирования, а именно учет одновременной динамики и микроэволюции морских биоценозов. Игнорирование механизмов биологической адаптации приводит к занижению показателей биологической продуктивности.

Сокращение: ЭУ-параметры – эволюционно-устойчивые параметры.

Существуют разные подходы к построению моделей адаптации и микроэволюции. Создание достаточно эффективных эколого-эволюционных моделей связано с одновременным развитием математической экологии ([4, 5] и др.) и математической генетики ([6, 7] и др.). Однако прямолинейная попытка соединить эти формализации приводит к построению эколого-эволюционных моделей очень большой размерности. Это замедляет скорость расчетов и затрудняет проведение «асимптотических» прогнозов динамики экосистем на эволюционно-значимые времена.

В данной работе на основе идей эволюционного моделирования предложены новые компьютерные схемы [8], реализующие эти процессы. По сути, эволюция – это «естественный интеллект экосистем». Важное достоинство предлагаемого подхода – небольшая размерность моделей, что позволяет проводить долгосрочные прогнозы (на эволюционно-значимые времена) за приемлемое машинное время.

Ниже на основе эколого-эволюционной модели обнаружена взаимосвязь оптимальных темпе-

ратур и оптимальных соленостей развития для эволюционно-зрелых видов водорослей. Это позволяет существенно снизить биологу выбор возможных исходов при адаптации водорослей.

АДАПТАЦИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ К ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ. ГИПОТЕЗА КРИТИЧЕСКИХ ЗНАЧЕНИЙ

Исследование характера адаптации популяций к температурному режиму среды является довольно популярной темой [9]. Здесь можно выделить два подхода, которые можно условно назвать внутренним и внешним.

Во внутреннем подходе делается упор на пространственных преобразованиях структур некоторых макромолекул клетки при деформации температуры среды. Так, полагают, что при нагреве она «раскручивается», а при охлаждении — «скручивается» [10].

Во внешнем подходе ключевую роль играет концепция Ф. Добжанского [11] о жестком полиморфизме природных популяций. Суть ее в том, что популяция представляет собой набор узкоспециализированных субпопуляций (форм) с возможно разными скоростями роста. В этом случае изменение температуры среды вызывает перестройку доминирующих форм, отчего меняются продукционные характеристики популяции в целом.

Ниже будет использован второй подход. Он составляет основу эволюционной экологии, а его функции проще поддаются математическому описанию. Этот путь достаточно универсален и был применен при поиске закономерностей коадаптации маршрутов миграции взаимодействующих рыбных популяций [12].

Обычно в эколого-эволюционных моделях «прямолинейно» соединены экологические и генетические процессы [13]. Предполагается, что любая популяция состоит из ряда субпопуляций,

каждая из которых является носителем своих экологических параметров. В результате их антагонизма большая часть конкурентов погибает, а оставшиеся (одна или несколько) — являются носителями «оптимальных» параметров.

Несколько другой подход был предложен в работе [14], автор которой считал, что в процессе адаптации происходит поиск так называемых «эволюционно-устойчивых» параметров (ЭУ-параметры) с использованием теоретико-игровых соображений о выборе оптимальной стохастической стратегии поведения. Этот удачный термин может быть применен и в детерминированной ситуации. А именно, носителем ЭУ-параметра является популяция, которая не вытесняется своими мутантами с параметрами, близкими к исходным.

Напомним, основной недостаток традиционного подхода — необходимость задания в модели большого числа субпопуляций (1000 и более) на каждом трофическом уровне. Возникает противоречие между требованиями биологической адекватности и высокой скорости вычислений.

Здесь компромиссное решение основано на изобретении новой модельной конструкции «Адаптация». Она имитирует эволюционный процесс в малом, имеет небольшую размерность и поэтому обладает высоким быстродействием. В качестве иллюстрации ее практического применения будет проведен анализ динамики и микроэволюции фитоценоза при ежегодном периодическом изменении температуры водной среды.

Так, хорошо известно, что каждая группа водорослей имеет свой температурный интервал толерантности $I(a, d) = [a - d, a + d]$, внутри него происходит рост водорослей, скорость которого (R) в зависимости от температуры воды θ задается некоторой функцией, например, следующим симметричным образом:

$$R(\theta, a, d) = r \frac{[d^2 - (\theta - a)^2]}{d^3} \text{ при } \theta \in I(a, d), \text{ иначе } R = 0. \quad (1)$$

Здесь r — некоторая суточная константа роста водорослей (положим $r = 3$).

Принято говорить: a является оптимальной температурой развития, d — ширина интервала I (для конкретной группы водорослей). График функции R в зависимости от θ представляет собой «колокольчик» (см. рис. 1).

В формуле (1) воплощена гипотетическая идея Э. Пианки [15]: для эволюционно-зрелых популяций площадь под графиком R не изменяется при вариации параметров a и d . Отметим, что

иногда используются и «несимметричные» функции [16] для описания роста водорослей, но это не вызывает существенных изменений в результатах.

Следует отметить, что естественная гипотеза Э. Пианки обманчиво проста и требует определенных уточнений. Так, исход борьбы двух конкурентов с разными (но равновеликими по площади) «колокольчиками» может зависеть от хода температурной кривой. Представляет интерес

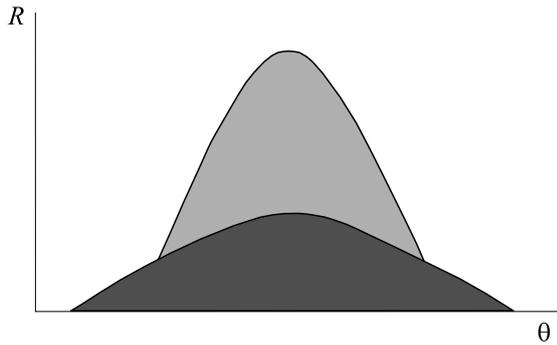


Рис. 1. График функции роста водорослей R в зависимости от температуры при фиксированном a и различных d .

проведение соответствующих лабораторных исследований.

В рамках известной модельной схемы Контуа [17] динамика численности одного вида водорослей задается базовым разностным уравнением:

$$x_{t+1} = x_t [1 - \alpha + R(\theta, a, d) \cdot K / (K + x_t)], \quad (2)$$

где x_t — текущая численность водорослей; α — точный коэффициент смертности ($\alpha = 0.1$); K — величина корма (азота, фосфора и т. д.), положим ниже $K = 1$. Шаг в модели составляет одни сутки.

Отметим, что правая часть модели (2) представляет однородную функцию первой степени относительно переменных x и K . Это сильно сближает такие модели с линейными и упрощает исследование. В последнее время такого сорта модели приобретают все большую популярность [18].

В дальнейшем ключевую роль играет понятие эволюционной устойчивости. Так, пару параметров (a^*, d^*) назовем эволюционно-устойчивой (ЭУ-параметрами), если соответствующая (исходная) популяция не вытесняется в сообществе конкурентов (форм или мутантов) с близкими к (a^*, d^*) значениями параметров. По сути, эволюционная устойчивость — это способность не проигрывать в конкурентной борьбе.

Отметим, что поиск популяцией ЭУ-параметров имеет прежде всего «оборонительное» значение, но зачастую здесь реализуется и побочный эффект — увеличение биомассы популяции водорослей. Разумеется, свойство эволюционной устойчивости может зависеть от заданного в модели количества конкурентов. Однако, если их число достаточно велико, то результат эволюционного поиска, как правило, однозначен.

Разумеется, можно модифицировать данное определение эволюционной устойчивости относительно любого набора мутантов. При этом оче-

видно, что в процессе эволюции могут реализоваться только ЭУ-параметры.

Изложим теперь основную идею модельного поиска пары ЭУ-параметров, основанную на методах эволюционного моделирования [8]. Здесь важно отметить, что базовое понятие вытеснения популяции (достижения ею нулевой численности на асимптотике) требует больших затрат машинного времени. Поэтому ниже воспользуемся «более слабым» аналогом явления «вымирания». Приведем два возможных варианта.

Первый вариант основан на принципе Олли [19]. Так, будем говорить:

X_0 вымирает, если ее численность становится меньше ε ,

где ε — малое положительное число. В качестве такого «абсолютного» порога можно взять тысячную долю от среднесуточной биомассы водорослей.

Второй вариант опирается на относительное соотношение численностей конкурентов в семействе $\{X_0, X_1, \dots, X_n\}$. Ниже под X_k будем подразумевать не только название, но и среднюю за период (один год) численность k -й популяции в режиме, близком к асимптотическому. Будем говорить, что

X_0 вытесняется, если $X_0/X_k < \varepsilon$ для некоторого k ,

где критическое значение ε — малая константа, например, можно положить $\varepsilon = 0.1$. Такого мутанта (с номером k) будем называть сильным. Если таких сильных мутантов несколько, то выбираем самого сильного, который ниже будет определять направление эволюционного процесса. Здесь подразумевается достаточно монотонное асимптотическое поведение средних численностей популяций, обусловленное простыми нелинейностями в моделях. Но в более сложных ситуациях реализуется колебательная динамика, и тогда сильные мутанты попеременно могут сменять друг друга. Так, в работе [8] на с. 59 показано, что в семействе из трех групп микроорганизмов $\{A, B, C\}$ имеет место неожиданная последовательность конкурентных исходов: A вытесняет B , B вытесняет C , C вытесняет A . В этом редком случае нельзя корректно выделить сильного мутанта.

Обычно эти различные варианты «слабого» отбора, заложенные в эколого-эволюционную модель, приводят к близким результатам. Но в ряде случаев второй вариант оказывается предпочтительнее. Ниже будет использован именно второй вариант. Пусть (a_0, d_0) — исходный набор параметров температурного интервала толерантности в исходной популяции X_0 . Зафиксируем некоторое число m — число мутантов $\{X_1, \dots, X_m\}$, каждый из которых имеет свои параметры. Данные коэффициенты выбираются близкими к исходным па-

раметрам [20]. Это производится следующим образом. Сначала определим величины:

$$a^- = a_0 - \xi_1, a^+ = a_0 + \xi_2, d^- = d_0 - \zeta_1, d^+ = d_0 + \zeta_2,$$

где все ξ_i и ζ_i – малые положительные фиксированные числа. Их можно выбирать случайным образом в некотором малом промежутке $(0, \Delta)$.

Считаем, что параметры мутантов следующие:

$$X^1 \rightarrow (a^-, d^-), X^2 \rightarrow (a^+, d^-), X^3 \rightarrow (a^-, d^+), X^4 \rightarrow (a^+, d^+).$$

Для сокращения формул ниже будем говорить, что (a_i, d_i) – параметры X^i .

Формализация «чисто» конкурентной борьбы в семействе близких популяций $\{X^0, X^1, \dots, X^4\}$ на базе модели (2) задается системой:

$$X_{t+1}^i = X_t^i [1 - \alpha + R(\theta_t, a_i, d_i) / (1 + \Sigma_t)], \quad (3)$$

где $\Sigma_t = X_t^0 + X_t^1 + \dots + X_t^4$ и $i = 0, 1, \dots, 4$. При фиксированных параметрах производим прогноз на длительный период времени (20 лет). Здесь могут возникнуть две ситуации:

1. «Плохая», когда исходная популяция вымирает (в слабом смысле). Тогда (a_0, d_0) заведомо не являются ЭУ-параметрами, и их следует модифицировать. Так, пусть, например, у первого мутанта наибольшая средняя за год численность среди остальных мутантов, тогда построим новые параметры исходной популяции:

$$(1 - \varepsilon)a_0 + \varepsilon a_1 + (1 - \varepsilon)d_0 + \varepsilon d_1, \quad (4)$$

где малый положительный параметр ε можно считать скоростью микроэволюции. Фактически формулы (4) означают малый сдвиг исходных параметров в сторону параметров самого сильного мутанта. Разумеется, это лишь одно из возможных направлений эволюционного процесса.

2. «Хорошая», когда исходная популяция не вымирает. Значит, она конкурентоспособна в рамках заданного набора мутантов.

Теперь следует произвести новую генерацию группы мутантов с новыми параметрами, близкими к коэффициентам исходной, например, путем случайного выбора каждого коэффициента в малом интервале «вариабельности» $(0, \Delta)$. Затем проводим очередное конкурентное испытание на 20 лет. Если таких (одновременно хороших) испытаний накопилось достаточно много (например, 100 испытаний), то можно с большой долей уверенности считать данные коэффициенты ЭУ-параметрами.

В качестве важного примера обсудим ситуацию, когда внутригодовая температура изменяется по фиксированному закону в пределах от 4 до 24:

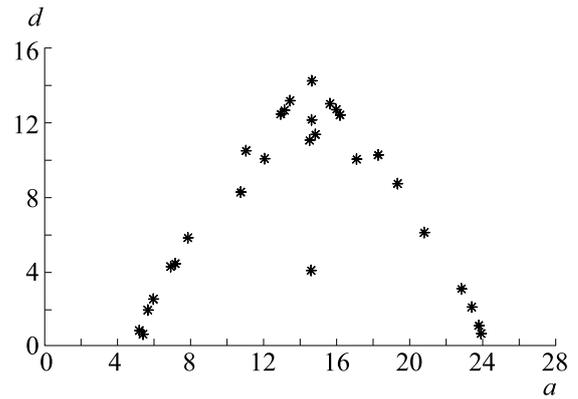


Рис. 2. Выделены ЭУ-параметры (a, d) , полученные по модели «Адаптация».

$$\theta_t = 14 - 10\cos(2\pi t/T).$$

Здесь и всюду ниже $T = 365$, а t принимает дискретные значения от 1 до 365.

Актуальна задача: какие пары (a^*, d^*) оказываются ЭУ-параметрами? При решении данной задачи задаем стартовые значения (a, d) , а затем под действием модели «Адаптация» происходит изменение переменных и медленное изменение параметров. Полученные в результате расчетов на многолетний период финальные значения являются ЭУ-параметрами. При компьютерных экспериментах были испробованы различные точки старта из области параметров (AD) : $4 \leq a \leq 24$ и $1 \leq d \leq 11$. Оказывается, что финальных пар (ЭУ-параметров) совсем немного, и они образуют (см. рис. 2) «радугу» (с малой сердцевиной).

Конструкция «Адаптация» позволяет выявить еще одно любопытное обстоятельство. Так, каждая начальная точка – узел решетки AD – притягивается к своей паре ЭУ-параметров, лежащей на «радуге». Какие же точки «радуги» являются наиболее «притягательными»?

Ими оказались три пары параметров: $Mini = (5, 1)$, $Maxi = (23, 1)$ и $Midl = (14, 10)$. Точнее, не сами точки, а их малые окрестности. Строго показано [21, 22], что в периодической среде множество ЭУ-параметров плотное, т.е. может содержать целые окрестности

Естественно, точка $Mini$ соответствует холодолюбивым (например, диатомовым), а точка $Maxi$ – теплолюбивым (например, синезеленым) водорослям. В лабораторных экспериментах, действительно, обнаружен бимодальный характер температурной адаптации: «любимые температуры» бывают двух типов – достаточно высокие и довольно низкие [9]. Вероятно, это эволюционные реликты прошлых долговременных изменений климата – потепления и похолодания.

В отличие от этих стеногалинных (узкоспециализированных) водорослей, третья точка *Midl* характерна для эвригалинных (широкоспециализированных) видов. Хотя они редко наблюдаются в Азовском море, но возможно этот (до поры до времени) скрытый вид является эволюционным резервом азовского фитоценоза. А именно, в случае многолетнего аperiodического (внутригодового) температурного режима он будет иметь конкурентное преимущество. Напротив, если периодический температурный режим в точности повторяется из года в год, то конкурентное преимущество принадлежит стеногалинным видам.

Отметим, что нелинейность Контуа в модели (3) допускает те или иные модификации. В этом случае трансформируется и соответствующее множество ЭУ-параметров. Однако если эти вариации не слишком сильные, то указанные выше точки («три богатыря») *Mini*, *Maxi* и *Midl* всегда в нем присутствуют.

Несколько более реалистичным представляется следующее задание температуры среды:

$$\theta_t = 14 - 10\cos(2\pi t/T) + h(t),$$

где $h(t)$ — случайная величина (белый шум) с равномерным распределением (нулевым средним и заданной дисперсией σ). В этом случае ширина «эволюционного оптимального» интервала толерантности будет увеличиваться с ростом σ .

$$\rho(S, b, c) = r \frac{[c^2 - (S - b)^2]}{c^3} \text{ при } S \in J(b, c), \text{ иначе } r = 0.$$

Здесь r — некоторая константа суточного роста водорослей.

Разумеется, по-прежнему актуальна проблема поиска ЭУ-параметров (b, c) . С использованием схемы адаптации из предыдущего параграфа установлено, что и в данном случае наиболее «притягательными» оказываются коэффициенты b , близкие к экстремальным значениям (минимумы или максимумы) температурной кривой с малым коэффициентом c . Согласно работе [8] это так называемая гипотеза критических значений.

Например, для периодического солевого режима водоема, «похожего» на Таганрогский залив, $S_t = 7 - 3\cos(2\pi t/T)$ найдены два «наиболее притягательных» параметра: $b = 4.5$ и $b = 9.5$ при $c = 0.5$. Они характерны для разных стеногалинных видов — пресноводных синезеленых и морских диатомовых водорослей. Реже возникает пара ЭУ-параметров $b = 7.0$ при $c = 3.5$, соответствующая эвригалинной водоросли.

Модификация модели «Адаптация». Обсудим поиск ЭУ-параметров (a, d, b, c) , когда на периоди-

Заметим, что в работе [23] приведена непрерывная модельная схема адаптации параметра a , включающая в себя основную популяцию и двух мутантов. При малом d тестовые расчеты показали, что в зависимости от выбора начального значения ЭУ-параметр a оказывается, как правило, вблизи одного из критических значений (локальных экстремумов) θ_c . Обнаружены и гораздо «менее притягательные» ЭУ-параметры a — это некоторые точки перегиба θ_c . В частности, значение 14 соответствует точке перегиба данной синусоидальной температурной кривой. В целом результаты по непрерывной и дискретной схемам практически совпадают.

ОДНОВРЕМЕННАЯ АДАПТАЦИЯ ВОДОРосЛЕЙ К СОЛЕВОМУ И ТЕМПЕРАТУРНОМУ РЕЖИМАМ СРЕДЫ

Соленость и рост. Кратко обсудим адаптацию водорослей к солености среды. Функционально влияние солености на динамику фитопланктона подобно действию температуры. Так, каждый вид водорослей обладает своим интервалом солевой толерантности $J(b, c) = [b - c, b + c]$, в пределах которого они способны развиваться. При описании скорости роста используем прежнюю гипотезу Пианки:

ческое изменение температуры и солености накладывается «белый шум» с небольшой дисперсией:

$$\begin{aligned} \theta_t &= 14 - 10\cos(2\pi t/T) + h_\theta(t) \\ \text{и } S_t &= 7 - 3\cos(2\pi t/T - \varphi) + h_S(t), \end{aligned} \quad (5)$$

где $h_\theta(t)$ и $h_S(t)$ — случайные величины с равномерным распределением; у обоих нулевое среднее и дисперсии 1 и 1/2 соответственно. Здесь φ — возможный временной сдвиг в годовом поведении указанных факторов. Например, при $\varphi = 0$ имеет место синхронная динамика, а при $\varphi = \pi$ — противоположное изменение (увеличение одного фактора сопровождается уменьшением другого).

Совместный учет данных факторов на рост водорослей может быть реализован многими способами. Ниже выбрана мультипликативная версия функции роста (Ω):

$$\Omega(\theta, S, a, d, b, c) = R(\theta, a, d) \rho(S, b, c).$$

Иногда среднегодовое значение Ω может оказаться слишком малым, тогда популяция будет вымирать. Для сохранения ее живучести в модели

следует выбирать достаточно большое значение g . Далее полагаем $r = 20$.

Теперь базовая модель динамики одной популяции водорослей представляется в форме:

$$x_{t+1} = x_t [1 - \alpha + \Omega(\theta_t, S_t, a_t, d_t, b_t, c_t) / (1 + x_t)]. \quad (6)$$

На ее основе построим модифицированную адаптивную конструкцию, в которой наряду с исходной популяцией задано и 16 мутантов со своими параметрами. Кратко ее суть заключается в следующем. Пусть (a_0, d_0, b_0, c_0) – текущие (базовые) параметры исходной популяции. Обозначим параметры мутантов через:

$$\begin{aligned} a^- &= a_0 - \delta_1, \quad a^+ = a_0 + \delta_2, \\ d^- &= d_0 - \eta_1, \quad d^+ = d_0 + \eta_2, \\ b^- &= b_0 - \delta_3, \quad b^+ = b_0 + \delta_4, \\ c^- &= c_0 - \eta_3, \quad c^+ = c_0 + \eta_4, \end{aligned} \quad (7)$$

где все δ_i и η_i – положительные числа из малого интервала «вариабельности» $(0, \Delta)$. Их можно выбрать случайным образом.

Параметры мутантов представляют собой комбинации данных вариаций от (a^-, d^-, b^-, c^-) до (a^+, d^+, b^+, c^+) . Удобно их обозначить через (a_1, d_1, b_1, c_1) и т.д. вплоть до $(a_{16}, d_{16}, b_{16}, c_{16})$. Теперь модель конкурентного сообщества «исходная популяция + мутанты» имеет следующий вид:

$$X_{t+1}^i = X_t^i [1 - \alpha + \Omega(\theta_t, S_t, a_i, d_i, b_i, c_i) / (1 + \Sigma_t)], \quad (8)$$

где $\Sigma_t = X_t^0 + X_t^1 + \dots + X_t^{16}$ и $i = 0, 1, \dots, 16$. Здесь схема адаптации будет аналогична предыдущей, а именно, если при фиксированных коэффициентах в модели (8) выявляется сильный мутант (например, первый), происходит пересчет базовых параметров по формулам:

$$\begin{aligned} (1 - \epsilon)a_0 + \epsilon a_1, \quad (1 - \epsilon)d_0 + \epsilon d_1 \\ \text{и} \quad (1 - \epsilon)b_0 + \epsilon b_1, \quad (1 - \epsilon)c_0 + \epsilon c_1, \end{aligned}$$

где скорость микроэволюции ϵ – малый положительный параметр.

После этого согласно формулам (7) строятся коэффициенты мутантов.

Если выявить сильного мутанта не удалось, то производим новую случайную генерацию параметров всех мутантов и т.д.

Отметим, что данная схема адаптации предъявляет более жесткие требования к эволюционной устойчивости: чем больше мутантов, тем труднее исходной популяции выдержать их конкурентное давление. Разумеется, можно задать и другое количество (m) мутантов с достаточно

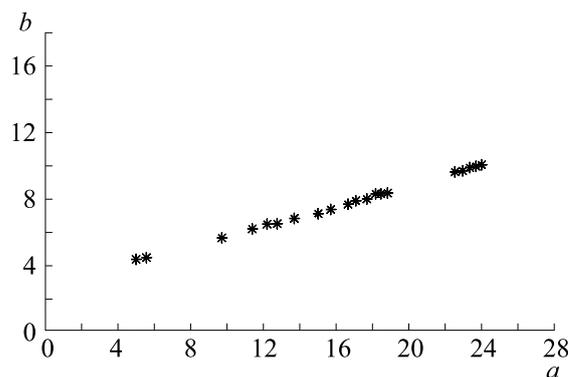


Рис. 3. ЭУ-параметры (a, b) при синхронном изменении температуры и солености. Структура типа «возрастающий отрезок».

представительным спектром параметров. Тестовые прогнозы продемонстрировали слабую зависимость области ЭУ-параметров от m .

Определенную роль играет и величина «вариабельности» Δ . Чем она больше, тем уже множество ЭУ-параметров.

Приведем результаты отдельных тестовых расчетов по данной модели. Во-первых, параметры d и c (ширина интервала толерантности) оказались малыми величинами. Во-вторых, подозреваем, что все возможные пары ЭУ-параметров a и b образуются как комбинации (прямое произведение) критических значений температуры и солености. Следовательно, кажется, что таких пар ЭУ-параметров будет не так уж много. Однако неожиданно возникла иная ситуация.

Напомним здесь возможную стратегию расчетов – это задание решетки в пространстве параметров (a, d, b, c) . Далее, узлы решетки выбираются в качестве начальных параметров, затем прослеживается их судьба вплоть до достижения ими финальных значений. В результате в четырехмерном пространстве возникает область ЭУ-параметров. Разумеется, такая полная программа исследований требует больших затрат машинного времени.

Поэтому воспользуемся ниже укороченной схема расчетов. Считаем, что старт «второстепенных» параметров (d, c) производится с фиксированных низких значений, например, с 2, а старт начальных «первостепенных» параметров (a, b) происходит из узлов решетки $[4, 24] \times [4, 10]$ с шагом 2. Далее прослеживается микроэволюция всех четырех параметров. Приведем основные результаты расчетов.

Синхронное поведение факторов. Формально это равносильно тому, чтобы положить в динамике факторов (5) сдвиг $\varphi = 0$. Оказалось, что все ЭУ-параметры (a, b) располагаются на возрастающем отрезке (см. рис. 3), соединяющем точки

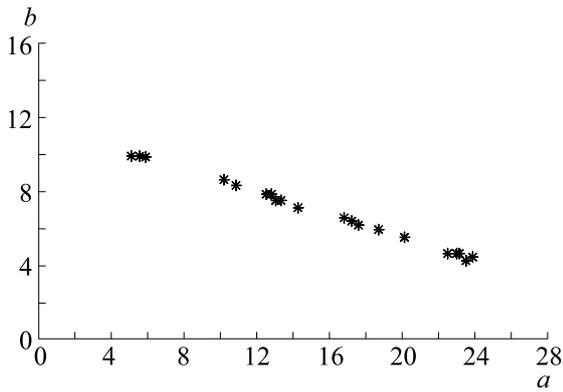


Рис. 4. ЭУ-параметры (a, b) при строго асинхронном изменении температуры и солености. Структура типа «убывающий отрезок».

(4,4) и (24,10). При этом финальные параметры d и c оказались близки к единице.

Строго асинхронное поведение факторов. Здесь в динамике температуры и солености (5) полагаем $\varphi = \pi$. В этом случае ЭУ-параметры образуют убывающий отрезок (см. рис. 4) с вершинами (4,10) и (24,4).

«Ортогональное» поведение факторов. Полагаем $\varphi = \pi/2$ — это промежуточный вариант в свете предыдущих экспериментов. Так, на одних временных отрезках данные факторы ведут себя синхронно, а на других — асинхронно. Поэтому неясно, как будет здесь располагаться множество ЭУ-параметров. Оказалось, что здесь ЭУ-параметры лежат на некотором овале, вписанном в дискретную решетку начальных значений (см. рис. 5). Вероятно, ЭУ-параметры не заполняют сплошь указанные одномерные структуры на рис. 3–5. Грубо говоря, появление «дыр» неизбежно!

Любопытно, что при $\varphi = 0$ и $\varphi = \pi$ множества ЭУ-параметров являются линейными структурами — отрезками. Кажется «вполне естественным»: при $\varphi = \pi/2$ множество ЭУ-параметров является «полусуммой» антисимметричных отрезков BO и UO . Возникает парадоксальная ситуация: итог может зависеть от способа усреднения — по вертикали или по горизонтали. Поэтому «естественный» подход приводит к разным построениям и не годится. Теперь не удивительно, что компромиссом оказывается нелинейный объект (овал).

Обсудим данные результаты с точки зрения непрерывной деформации угла φ на участке $I = [0, \pi]$. Путем дополнительных расчетов установлено, что множество ЭУ-параметров подвергается двум «испытаниям»: при росте φ от 0 до $\pi/2$ происходит постепенное «раздувание» отрезка BO в овал, а при увеличении φ до π овал медленно сплющивается в отрезок UO . В целом данные процессы сопровождаются медленным поворо-

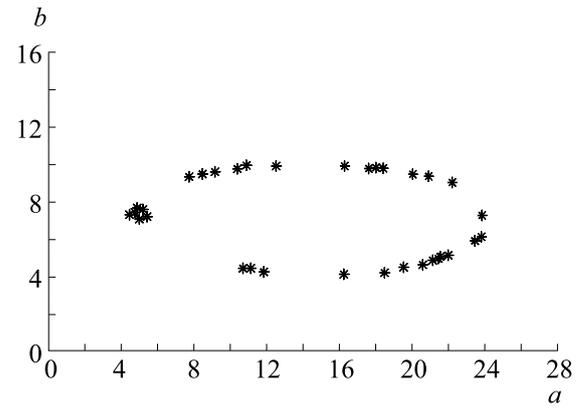


Рис. 5. ЭУ-параметры (a, b) при «ортогональном» изменении температуры и солености. Структура типа «овал».

том (против часовой стрелки) областей ЭУ-параметров.

Представляет интерес аналогичный поиск ЭУ-параметров, когда скорость роста водорослей задается иным образом. Так, весьма популярно следующее задание этой функции (принцип узкого места):

$$\Omega(\theta, S, a, d, b, c) = \min\{R(\theta, a, d) \rho(S, b, c)\}.$$

Расчеты показали, что теперь семейство ЭУ-параметров (a, b) похоже на предыдущее, но является куда более «тощим». Так, при синхронном изменении температуры и солености остаются лишь две окрестности точек — (4,4) и (24,10). При асинхронном поведении указанных факторов остаются три окрестности: (4,10), (14,7) и (24,4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе идей эволюционного моделирования предложены новые быстродействующие схемы адаптации параметров популяций. Показано, что эволюционно-устойчивые параметры роста водорослей составляют «тощее» множество, а его геометрическое расположение тесно связано с критическими точками (значениями минимумов и максимумов) динамики факторов среды.

Разумеется, возможна и целесообразна экспериментальная проверка полученных результатов. Так, в проточном культиваторе можно искусственно поддерживать постоянное содержание биогенных веществ и задавать определенный периодический температурный режим. Далее, в этот аквариум можно засеять тот или иной вид водорослей и после длительных наблюдений оценить итоговые интервалы температурной толерантности.

Обнаружено, что в процессе адаптации водорослей существенную роль играет взаимное поведение факторов среды. Здесь могут возникать как

линейные (отрезки), так и нелинейные (овалы) геометрические области ЭУ-параметров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Публикация подготовлена в рамках реализации Государственного задания ЮНЦ РАН (проект АААА—А18—118122790121-5).

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. М. Бронфман и Е. П. Хлебников, *Азовское море. Основы реконструкции* (Гидрометеоздат, Л., 1985).
2. Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, *Биофизическая динамика продукционных процессов* (ИКИ, Ижевск, 2004).
3. А. Б. Медвинский, С. Е. Петровский, И. А. Тихонова и др., *Успехи физ. наук* 172 (1), 31 (2002).
4. V. A. Kostitzin, *Symbios, parasitism of evolution* (Hermann, Paris, 1934).
5. В. Вольтерра, *Математическая теория борьбы за существование* (Наука, М., 1976).
6. J. B. S. Holdane, *The Causes of Evolution* (Longmans, Lond., 1932).
7. R. A. Fisher, *The genetical theory of natural selection* (Clarendon Press, Oxford, 1930).
8. В. Г. Ильичев, *Устойчивость, адаптация и управление в экологических системах* (Физматлит, М., 2009).
9. В. Б. Вербицкий, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт биологии внутренних вод, Борок, 2012).
10. Н. Н. Яковлев, *Живое и среда* (Наука, Л., 1986).
11. Th. Dobzhansky, *Genetics of the Evolutionary Process* (Columbia Univ. Press, N.Y., 1970).
12. В. Г. Ильичев и О. А. Ильичева, *Биофизика* 63 (2), 373 (2018).
13. Ю. М. Свиричев и В. П. Пасеков, *Основы математической генетики* (Наука, М., 1982).
14. J. M. Smith, *Evolution and the theory of games* (Cambridge Univ. Press, N.Y., 1982).
15. Э. Пианка, *Эволюционная экология* (Мир, М., 1981).
16. Ю. Н. Сергеев, А. А. Колодочка, Х. Д. Круммель и др., *Моделирование процессов переноса и трансформации вещества в море* (ЛГУ, Л., 1979).
17. В. Е. Contois, *J. Gen. Microbiol.* 21, 40 (1959).
18. Ю. В. Тютюнов и Л. И. Титова, *Журн. общ. биологии* 79 (6), 448 (2018).
19. W. C. Alle, A. E. Emerson, D. Park, and K. Smith, *Principles of Animals Ecology* (W. B. Saunders Co, Philadelphia, 1949).
20. В. Г. Ильичев, Л. В. Дашкевич и В. В. Кулыгин, *Природа*, № 8, 54 (2019).
21. В. Г. Ильичев, *Автоматика и телемеханика*, № 11, 115 (1996).
22. В. Г. Ильичев, *Биофизика* 50 (3), 567 (2005).
23. В. Г. Ильичев, В. В. Кулыгин и Л. В. Дашкевич, *Компьютерные исследования и моделирование* 9 (6), 981 (2017).

Hypotheses Concerning Algal Adaptation to Periodic Environmental Factors

V.G. Ilyichev* and O.A. Ilyicheva**

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

**Don State Technical University, ul. Socialisticheskaya 162, Rostov-on-Don, 344022 Russia

A new ecological-evolutionary model of small-sized algae has been proposed to describe the simultaneous dynamics of variables (population biomass) and parameters representing temperature tolerance limits [$a - d$, $a + d$]. In the given periodic temperature regime, the parameters tend to some final, so-called evolutionarily stable values. Calculation results showed that on the plane (a, d) all evolutionarily stable parameters are located in the form of a "rainbow", the farthest points of which correspond to cold-loving (diatomic) and heat-loving (blue-green) algae. Analysis of data relating to algal adaptation to two periodic environmental factors (temperature and salinity) within given ranges of temperature [$a - d$, $a + d$] and salinity [$b - c$, $b + c$] tolerance is performed. It has been established that the domain of evolutionarily stable parameters in the plane (a, b) depends on the degree of synchronism of environmental factors. In some cases, these parameters lie on a linear segment, and in other cases, their unexpected location on a nonlinear oval is possible.

Keywords: model, adaptation, evolutionarily stable parameters, temperature, salinity

УДК 577.3

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДЕМЕМБРАНИЗОВАННЫХ МЕДЛЕННЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН КРОЛИКА

© 2021 г. С.Р. Набиев*, С.Ю. Бершицкий*, А.К. Цатурян**, Н.А. Кубасова**

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

**Институт механики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Мичуринский просп., 1

E-mail: natalia@imec.msu.ru

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 05.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Изучены температурные зависимости напряжения и жесткости активно сокращающихся одиночных волокон медленной (*m. soleus*) мышцы кролика с помощью джоулевого скачка температуры. Показаны различия в характеристиках волокон быстрой (*m. psoas*) и медленной (*m. soleus*) мышцы кролика, вызванные, по-видимому, различиями в кинетике цикла миозиновой головки.

Ключевые слова: мышечное сокращение, изометрическое напряжение, скачок температуры.

DOI: 10.31857/S0006302921020174

Основополагающие работы в области исследования механизма мышечного сокращения были сделаны на быстрых волокнах скелетных мышц. Было показано, что развитие активной силы происходит за счет движения миозиновой головки, присоединенной к актину, либо поворота части головки, так называемого рычага, относительно ее актинсвязывающего домена, и предложены соответствующие модели [1, 2]. Казалось бы, величина развиваемой силы должна быть прямо пропорциональна числу присоединенных к актину миозиновых головок, и это число можно оценить по динамической (т.е. измеренной при быстрых изменениях длины) жесткости мышечного волокна. Однако эксперименты на активно сокращающихся волокнах быстрых скелетных мышц, выполненные при различных значениях температуры, показали, что наблюдаемый значительный рост силы с ростом температуры – четырех-пятикратный в мышце кролика при нагревании от 5°C до 35°C [3, 4] и в 1.7 раза при увеличении температуры мышцы лягушки от 4°C до 17°C [5, 6] – не сопровождается, либо сопровождается небольшим, не более 15%, ростом жесткости [3–6]. Это наблюдение, подкрепленное анализом изменений на рентгенодифракционных диаграммах активно сокращающихся мышечных волокон кролика в ответ на скачок температуры, привело к созданию новой структурно-кинетической модели актин-миозинового взаимодействия [7]. Согласно этой модели, развитие активного напря-

жения происходит в два шага. Сначала миозиновая головка слабо присоединяется к актину, не участвуя в генерации силы, но внося вклад в жесткость мышцы, затем она «застегивается», т.е. переходит в прочно связанное состояние и уже в ходе этого перехода развивает некоторую силу, и лишь на следующем шаге цикла взаимодействия с актином происходит поворот рычага. Таким образом, сила, развиваемая мышцей в изометрическом сокращении, пропорциональна не общему количеству присоединенных головок, а лишь числу тех из них, которые присоединены в последнем состоянии с повернутым рычагом, а жесткость – числу всех присоединенных головок.

В то же самое время исследование механики актин-миозинового взаимодействия в медленных скелетных мышцах, ничуть не менее важных с физиологической точки зрения, носило лишь фрагментарный характер. В экспериментах на волокнах медленных мышц, часто проводившихся параллельно с экспериментами на волокнах быстрых мышц этих же животных, были получены классические биофизические характеристики: кривая «сила–скорость» для волокон мышц морской свинки [8] и температурная зависимость кальциевой чувствительности силы для мышц крысы [9, 10]. Похожие эксперименты были выполнены примерно в то же время и в других лабораториях [11–13]. Было высказано предположение, что наблюдаемые различия механических

свойств медленных и быстрых волокон скелетных мышц могут быть вызваны различием изоформного состава тяжелых цепей миозина в быстрых и медленных мышцах с различной кинетикой их рабочего цикла [14].

В сравнительных экспериментах на волокнах мышц человека, содержащих различный набор тяжелых цепей миозина, с использованием усовершенствованной аппаратуры (более быстрый мотор для изменения длины мышцы, динамический контроль изменения длины саркомеров) были измерены не только характеристики стационарной связи сила-скорость при укорочении и растяжении этих мышц, но и их кинетические характеристики – скорость восстановления силы после малых и больших ступенчатых изменений длины и динамическая жесткость волокон при изометрических сокращениях и при растяжении с различной скоростью [15]. Были выявлены существенные различия свойств медленных и быстрых мышц. Однако в этих экспериментах динамическая жесткость была измерена лишь при одном значении температуры (12°C), далеко от физиологической для теплокровных. Температурная зависимость изометрического напряжения и динамической жесткости волокон камбаловидной (медленной) мышцы человека была исследована в интервале температур $5\text{--}20^{\circ}\text{C}$ [16]. Было показано, что динамическая жесткость волокон медленных мышц меняется в этом интервале температур значительно сильнее, чем волокон быстрых мышц. Следует заметить, что экспериментальные образцы волокон мышц человека не относились к чистым быстрым и медленным типам мышц, а содержали небольшую долю других изоформ миозина [15].

Новые эксперименты на одиночных волокнах камбаловидной мышцы кролика [17] подтвердили выводы, сделанные в работе [16]. Гель-электрофорезный анализ показал, что содержание быстрых изоформ миозина в волокнах *m. soleus* кролика пренебрежимо мало. Было показано, что при постоянной температуре 12°C увеличение уровня кальциевой активации волокна вело к увеличению как изометрического напряжения, так и жесткости полусаркомера. Авторами была предложена модель, объясняющая такое поведение напряжения и жесткости. Одно из важнейших предположений модели состояло в том, что жесткость одиночной миозиновой головки в волокнах медленной мышцы в три раза меньше, чем в быстрой. Этот вывод согласуется с прямыми измерениями жесткости одиночных миозиновых головок в оптической ловушке [16].

Поскольку во всех вышеописанных экспериментах температура не превышала 20°C , нам показалось важным дополнить исследования температурной зависимости напряжения и динами-

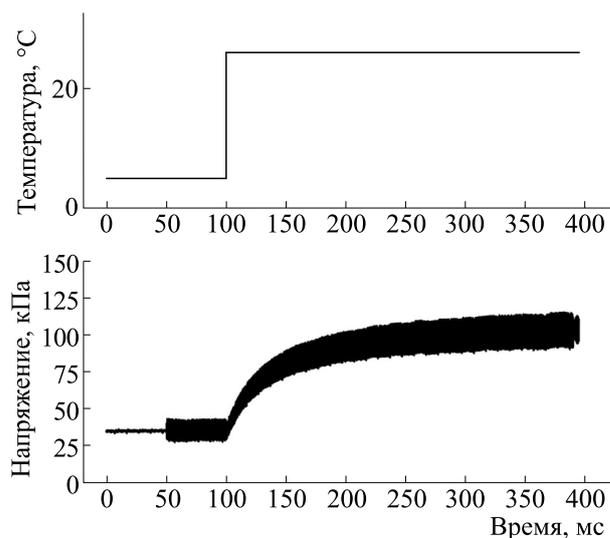


Рис. 1. Экспериментальный протокол. Синусоидальные изменения длины прикладывали к волокну за 50 мс до скачка температуры. Продолжительность записи варьировали так, чтобы было достигнуто установившееся значение напряжения при высокой температуре.

ческой жесткости медленных волокон при более высоких значениях температуры вплоть до физиологической.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были выполнены на лабораторной установке, основные узлы которой описаны в работах [4, 18]. В качестве объекта исследования нами были выбраны демембранизованные медленные мышечные волокна из камбаловидной (*m. soleus*) мышцы кролика. Состав растворов, методика выделения и работы с одиночным мышечным волокном описаны в работе [19]. После завершения экспериментов волокна подвергали гель-электрофорезному анализу, показывающему содержание в волокне различных изоформ миозина. Во всех экспериментальных образцах была обнаружена только тяжелая цепь миозина 1 – медленная изоформа миозина.

Волокно, закрепленное одним концом на линейном моторе, а другим – на датчике силы, перемещали из камеры с расслабляющим раствором в камеру с активирующим раствором при температуре 2°C , где его выдерживали около 5 с. Активированное волокно перемещали в воздушную камеру с температурой 5°C , где к волокну были приложены синусоидальные изменения длины и джоулев скачок температуры (рис. 1). Амплитуда скачка температуры составляла от 15°C до 30°C . Скачок температуры получали пропусканием высоковольтного импульса переменного тока частотой 40 кГц и длительностью 0.2 мс. До-

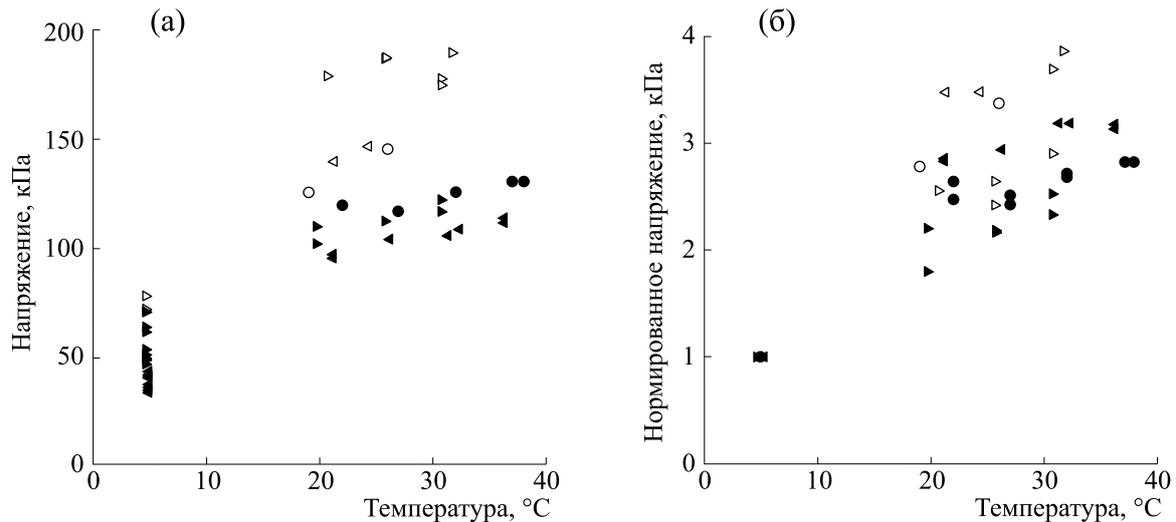


Рис. 2. Изменение напряжения волокна в ответ на скачок температуры: (а) — абсолютные значения напряжения до (5°C) и после скачка температуры; (б) — те же значения, нормированные на соответствующее напряжение до скачка температуры. Разные символы соответствуют разным волокнам ($n = 6$). Светлые и темные символы соответствуют двум сериям экспериментов.

полнительно для компенсации остывания волокон прикладывали малоамплитудный импульс переменного тока продолжительностью до 400 мс. Частота синусоидальных изменений длины волокна составляла 1.6 кГц, амплитуда — 0.1% длины волокна. Все измерения на волокне происходили под контролем длины саркомеров, начальная длина саркомеров в центральной части волокна была 2.4–2.5 мкм. К сожалению, не удалось получить достоверного сигнала изменений длины саркомеров в ответ на синусоидальные изменения длины волокна до и после скачка температуры. Количество циклов «активация–расслабление» одного волокна составляло от 6 до 12.

Для обработки результатов экспериментов была написана программа на языке Python. Жесткость оценивали как отношение амплитуд синусоид, аппроксимирующих изменения напряжения и длины волокна. Интервал для аппроксимации составлял два полных периода колебаний длины с центром в выбранной точке по времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В наших экспериментах к волокнам были приложены скачки температуры от 15°C до 32°C , что соответствовало финальным температурам волокна от 20°C до 37°C соответственно. При меньших амплитудах скачка температуры не удавалось обеспечивать подогрев волокна в течение такого времени, какое было необходимо для достижения медленными мышечными волокнами стационарного напряжения.

Значения стационарного напряжения при различных значениях финальной температуры показаны на рис. 2. Видно, что основные изменения напряжения происходили в интервале температур от 5°C до 20°C , а в диапазоне 20 – 37°C изменения были незначительны.

Абсолютные и нормированные на соответствующее значение при 5°C величины напряжения и жесткости, наблюдавшиеся в экспериментах, сведены в группы по значениям температуры, достигнутой после скачка, и показаны в таблице. Видно, что разброс абсолютных значений напряжения и жесткости был достаточно большим, но после нормирования разброс существенно уменьшался. Изменения жесткости наблюдали при изменении температуры от 5°C до 20°C , в дальнейшем жесткость оставалась постоянной в пределах статистической погрешности. На рис. 3 показана зависимость абсолютных и нормированных значений жесткости от напряжения.

Кинетику изменений напряжения и жесткости характеризовали «полувремением», т.е. временем, за которое изменение величины достигало половины своего максимального значения. Температурные зависимости полувремени роста напряжения и жесткости показаны в координатах Арениуса на рис. 4. Видно, что несмотря на существенный разброс данных, напряжение имеет большую температурную зависимость, чем жесткость. Угол наклона аппроксимирующей прямой для напряжения составлял -5.03 ± 0.95 ($n = 32$, здесь и далее: взвешенное среднее \pm взвешенное стандартное отклонение), соответствующее значение для жесткости -2.86 ± 0.61 ($n = 7$).

Экспериментальные данные

Средняя температура	Напряжение T , кПа	T_{norm}	$t_{0.5T}$, мс	Жесткость S , МПа	S_{norm}	$t_{0.5S}$, мс
5	44.1 ± 14.1 (38)	1		9.03 ± 2.65 (21)	1	1
21	120.0 ± 26.2 (9)	2.6 ± 0.5 (9)	47.0 ± 18.4 (2)	12.61 ± 2.61 (6)	1.51 ± 0.28 (6)	52.7 ± 15.2 (2)
26	132.6 ± 32.2 (10)	2.7 ± 0.5 (9)	24.5 ± 4.9 (2)	14.18 ± 3.66 (7)	1.54 ± 0.33 (7)	35.7 ± 9.5 (2)
31	137.9 ± 32.6 (9)	3.0 ± 0.5 (9)	14.5 ± 1.4 (2)	13.18 ± 2.97 (6)	1.47 ± 0.33 (6)	23.5 ± 1.4 (2)
37	121.0 ± 10.4 (4)	3.0 ± 0.3 (4)	10 (1)	10.10 ± 0.25 (2)	1.47 ± 0.22 (2)	18 (1)

Примечание. Значения, измеренные после скачка температуры, сгруппированы по финальной температуре. Отклонения температуры от среднего значения, указанного в таблице, не превышали 1°C. В каждой клетке показано среднее значение \pm стандартное отклонение. В скобках указано число измерений. Для сравнения относительных изменений напряжение и жесткость нормировали на соответствующие значения до скачка температуры, при 5°C, нормированные значения обозначены T_{norm} и S_{norm} . $t_{0.5T}$, $t_{0.5S}$ – полувремени ответов напряжения и жесткости.

Для оценки температурной зависимости жесткости использовали два волокна (рис. 4б). Температурная зависимость напряжения для соответствующей пары волокон (рис. 4а, точки) имела угол наклона -4.51 ± 0.41 ($n = 14$). Сгруппированные по величине финальной температуры значения полувремени для напряжения и жесткости показаны в таблице. Можно заметить, что полувремя для ответа жесткости всегда было больше, чем полувремя для ответа напряжения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интересно сравнить полученные результаты с соответствующими параметрами волокон быстрой (m. psoas) мышцы кролика [4, 20]. В экспериментах, описанных в работе [20], исследуемый диапазон температур составлял 5–20°C и не достигал значений, близких к физиологическим. В работе [4] было показано, что рост изометрического напряжения происходит во всем диапазоне температур 5–37°C. При температурах выше 30°C

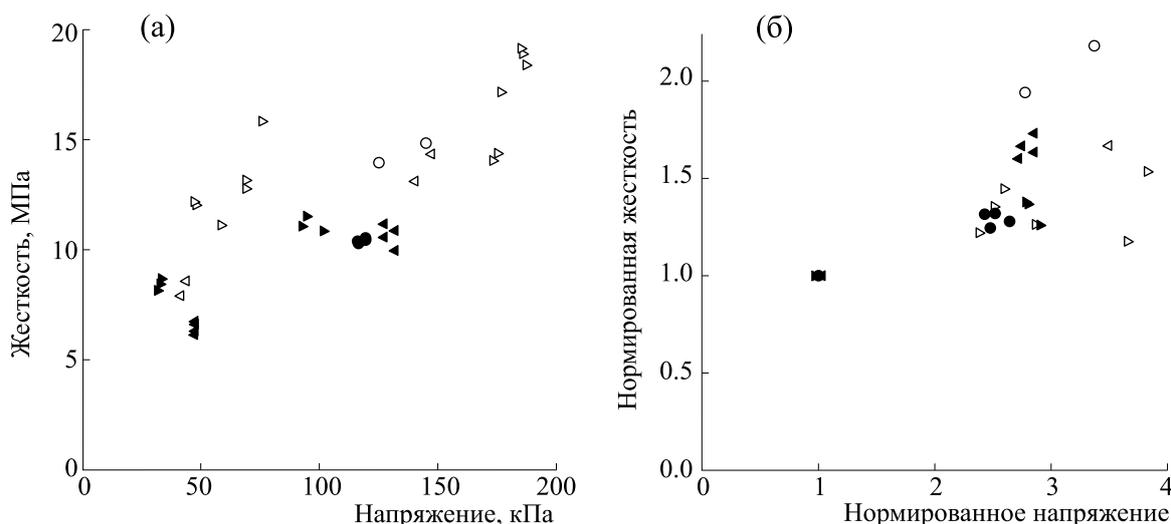


Рис. 3. Изменение жесткости волокна в ответ на скачок температуры: (а) – абсолютные значения напряжения до скачка температуры (5°C) и установившиеся после скачка температуры; (б) – те же значения, нормированные на соответствующее напряжение до скачка температуры. Разные символы соответствуют разным волокнам ($n = 6$). Светлые и темные символы соответствуют двум сериям экспериментов.

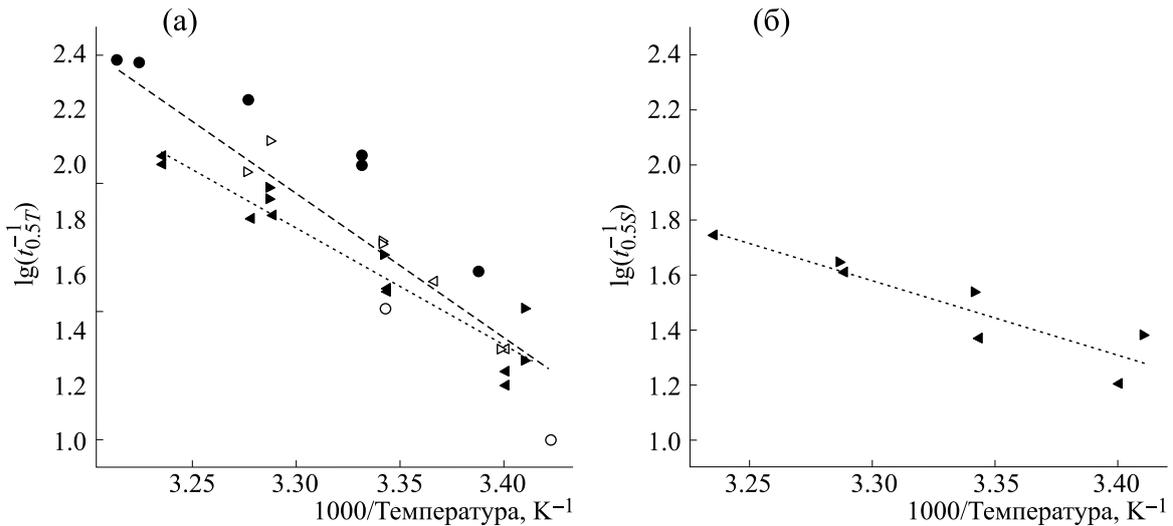


Рис. 4. Температурные зависимости изменений напряжения (а) и динамической жесткости (б) в ответ на скачок температуры, выраженные графиками Аррениуса. По оси x отложены обратные температуры в градусах Кельвина, умноженные на тысячу. По оси y – десятичный логарифм величины, обратной времени достижения напряжением либо жесткостью половины разницы между стационарными значениями. Соответствующие «полувремена» обозначены $t_{0,5T}$ и $t_{0,5S}$. Угловый коэффициент для напряжения составлял $k = -5.0$ (пунктирная линия, 6 волокон, 32 точки); для двух волокон, использовавшихся для определения температурной зависимости жесткости $k = -4.5$ (точечная линия, 2 волокна, 15 измерений). Для жесткости $k = -2.9$ (линия показана точками, 2 волокна, те же символы, что и на рис. (а), 7 измерений).

рост замедлялся, однако напряжение по-прежнему увеличивалось с увеличением температуры [4]. В наших экспериментах рост напряжения в диапазоне температур 20–37°C был постоянным, но незначительным. Основные изменения напряжения в медленных волокнах происходили в интервале 5–20°C. Рост напряжения при изменении температуры от 5°C до 20°C составил 2.61 (см. таблицу), а от 5°C до 30°C был трехкратным. Небольшое и статистически недостоверное падение напряжения при возрастании температуры до 37°C, по-видимому, связано с недостаточной мощностью подогревающего импульса. В экспериментах на волокнах из *m. soleus* человека рост напряжения в диапазоне температур от 5°C до 20°C составлял 3.98 [16].

Наиболее яркие отличия между двумя типами мышц проявляются в температурной зависимости жесткости. Если в волокнах быстрой мышцы кролика изменение жесткости с температурой незначительно [4, 20], то в волокнах медленной мышцы человека четырехкратный рост напряжения при изменении температуры от 5°C до 20°C сопровождался двукратным ростом жесткости (2.18 по данным в работе [16]). В наших экспериментах жесткость при изменении температуры от 5°C до 20°C росла в среднем в полтора раза, при дальнейшем увеличении температуры до 30–37°C жесткость не изменялась (таблица).

Наши результаты согласуются и с данными работы [21], авторы которой также наблюдали из-

менения напряжения и жесткости в медленных *m. soleus* волокнах кролика в ответ на изменения температуры. Максимальные изменения были зарегистрированы в интервале температур от 5°C до 20°C, дальнейший рост напряжения был незначительным, жесткость в описываемых экспериментах также не зависела от температуры при температурах, больших 20°C. Отметим, что в работе [21] волокно активировали при высокой температуре, что ведет к неоднородной активации и разбросу длин саркомеров в волокне, а частоты синусоидальных колебаний не превышали 500 Гц, что не позволяет достоверно оценить динамическую жесткость, т.к. на этих временах успевают произойти изменения структурного и механического состояния миозиновых головок.

Значения изометрического напряжения и жесткости в волокнах *m. soleus* кролика были измерены при температуре 12°C и различных уровнях кальциевой активации [17]. Среднее напряжение при максимальном pCa составляло 141 кПа, что выше измеренного нами при 20°C. Податливость полусаркомера составляла 39.5 ± 4.7 нм/МПа, что для средней длины саркомера в указанных экспериментах 2.4 мкм соответствует удельной жесткости $2400/2/39.5 = 30.4$ МПа. Титрованием уровня кальциевой активации был получен широкий диапазон значений напряжения волокна и измерены соответствующие значения жесткости. Интересно, что, как и в наших экспериментах, при напряжениях ниже 120 кПа жесткость с ростом напряжения

существенно увеличивалась, но ее рост замедлялся до едва заметного при превышении этого уровня напряжения.

Известно, что в волокнах быстрой мышцы небольшой рост жесткости после скачка температуры опережает рост напряжения (см, например, рис. 8 в работе [4]). Мы характеризовали кинетику нарастания напряжения и жесткости в ответ на скачок температуры величиной полувремени изменения соответствующей величины (таблица, рис. 4). В отличие от волокон быстрых мышц в наших экспериментах рост напряжения не отставал от роста жесткости и даже опережал его.

Различия в кинетике механических процессов для медленного и быстрого миозина были описаны ранее. Максимальная скорость укорочения медленных волокон была примерно вдвое меньше, чем быстрых для мышц морской свинки [8], крысы [13], трески [12] и человека [22] в широком диапазоне температур вплоть до физиологической для животных данного вида. Еще большее, более чем пятикратное, различие скорости движения актиновых филаментов по поверхности, покрытой медленным и быстрым миозином из мышц крыс и кроликов, было обнаружено в экспериментах в искусственной подвижной системе (*in vitro motility assay*) [23]. Аналогичные результаты были получены в экспериментах, в которых изучали движение не актиновых филаментов, а реконструированных тонких нитей, причем для реконструкции использовали тропонин и тропомиозин из медленных и быстрых мышц соответственно [24]. В этой же работе в опытах с оптической ловушкой также было обнаружено трехкратное увеличение среднего времени пребывания одиночных головок медленного миозина в присоединенном к актину состоянии по сравнению с быстрым миозином [24]. Эти данные хорошо согласуются с результатами измерения АТФазной активности медленных и быстрых волокон человека, сокращающихся в изометрических и изотонических условиях при 10°C и 20°C [22], которые показали, что доля времени, которое головка миозина медленных мышц проводит в прочно связанном с актином состоянии, в несколько раз больше, чем для миозиновых головок в быстрых волокнах, а также с оценкой доли присоединенных к актину головок в активном изометрическом сокращении медленных и быстрых волокон кролика при 12°C – 0.47 и 0.29 соответственно [17].

Различия кинетики биохимических процессов, лежащих в основе механической активности медленных и быстрых мышц, еще более значительны. Скорость снижения механического напряжения в ответ на фотоиндуцированное увеличение концентрации неорганического фосфата в медленных волокнах мышц кролика при 20°C бы-

ла в 33 раза меньше, чем в быстрых; при 10°C различие становилось 84-кратным [25]. Снижение напряжения в этих экспериментах было связано с ассоциацией фосфата с комплексом миозин–АДФ, образовавшимся в результате сброса фосфата из активного центра миозиновой головки после гидролиза АТФ, и обращением ее силогенерирующего шага. Эксперименты, в которых механические и структурные изменения в медленных и быстрых волокнах мышц крысы были инициированы импульсным фотоиндуцированным выделением АТФ в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} , показали [26], что головки медленного миозина связывают АДФ намного прочнее и развивают активное напряжение примерно в пять раз медленнее, чем головки быстрого миозина. Простая кинетическая модель рабочего цикла миозиновой головки в медленной мышце была предложена в работе [16]. Тем не менее существующих экспериментальных данных еще недостаточно для определения всех параметров подобных моделей.

В нашей работе мы показали, что отличия в механических характеристиках медленных и быстрых волокон проявляются в широком диапазоне температур вплоть до физиологической. В ответ на скачок температуры в волокнах быстрых мышц происходит быстрый переход слабосвязанных миозиновых головок в силогенерирующее состояние без существенного увеличения числа присоединенных к актину головок [7]. Поскольку в медленных волокнах при увеличении температуры не только напряжение, но и жесткость изменяется существенно, мы полагаем, что в этих волокнах скачок температуры вызывает два процесса: увеличение доли силогенерирующих головок за счет слабосвязанных и увеличение общего числа присоединенных головок.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Г.В. Копыловой и А.М. Кочуровой за помощь в анализе изоформного состава миозина в экспериментальных образцах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 18-04-00599, и госпрограмм АААА-А18-118020590135-3 и АААА-А19-119012990119-3.

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. A. F. Huxley and R. M. Simmons, *Nature* **233**, 533 (1971).
2. K. C. Holmes, *Curr Biol.* **7** (2), R112 (1997).
3. S. Y. Bershitsky and A. K. Tsaturyan, *Biophys. J.* **56** (5), 809 (1989).
4. S. Y. Bershitsky, A. K. Tsaturyan, *J. Physiol.* **540** (1), 971 (2002).
5. A. K. Tsaturyan, S. Y. Bershitsky, R. Burns, et al., *Biophys. J.* **77** (1), 354 (1999).
6. G. Piazzesi, M. Reconditi, N. Koubassova, et al., *J. Physiol.* **549** (1), 93 (2003).
7. M. A. Ferenczi, S. Y. Bershitsky, N. Koubassova, et al., *Structure* **13** (1), 131 (2005).
8. J. Gulati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (12), 4693 (1976).
9. D. J. Stephenson and D. A. Williams, *J. Physiol.* **317**, 281 (1981).
10. D. J. Stephenson and D. A. Williams, *J. Physiol.* **360**, 1 (1985).
11. K. W. Ranatunga, *Exp. Neurol.* **70** (2), 211 (1980).
12. J. D. Altringham and I. A. Johnston, *J. Physiol.* **333**, 421 (1982).
13. K. W. Ranatunga, *J. Physiol.* **351**, 517 (1984).
14. P. J. Reiser, R. L. Moss, G. G. Giulian, et al., *J. Biol. Chem.* **260**, 9077 (1985).
15. M. Linari, R. Bottinelli, M. A. Pellegrino, et al., *J. Physiol.* **554**, 335 (2004).
16. B. Brenner, N. Hahn, E. Hanke, et al., *J. Muscle. Res. Cell Motil.* **33** (6), 403 (2012).
17. V. Percario, S. Boncompagni, F. Protasi, et al., *J. Physiol.* **596** (7), 1243 (2018).
18. A. K. Tsaturyan, S. Y. Bershitsky, N. A. Koubassova, et al., *Biophys. J.* **101** (2), 404 (2011).
19. П. В. Кочубей и С. Ю. Бершицкий, *Биофизика* **59** (5), 967 (2014).
20. M. Linari, M. Caremani, C. Piperio, et al., *Biophys. J.* **92** (7), 2476 (2007).
21. G. Wang and M. Kawai, *J. Physiol.* **531** (1), 219 (2001).
22. Z. H. He, R. Bottinelli, M. A. Pellegrino, et al., *Biophys. J.* **79** (2), 945 (2000).
23. R. Rossi, M. Maffei, R. Bottinelli, et al., *J. Appl. Physiol.* **99** (6), 2239 (2005).
24. Д. В. Шепкин, С. Р. Набиев, Н. А. Кубасова и др., *Бюлл. эксперим. биологии и медицины* **169** (3), 310 (2020).
25. N. C. Millar and E. Homsher, *Am. J. Physiol.* **262** (5), C1239 (1992).
26. K. Horiuti, N. Yagi, and S. Takemori, *J. Physiol.* **502** (2), 433 (1997).

Temperature Dependence of Mechanical Characteristics of Demembranized Rabbit Slow Muscle Fibres

S.R. Nabiev*, S.Y. Bershitsky*, A.K. Tsaturyan**, and N.A. Koubassova**

**Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya ul. 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

***Institute of Mechanics, Lomonosov Moscow State University, Mitchurinsky prosp. 1, Moscow, 119192 Russia*

We have studied the temperature dependences of the tension and stiffness of actively contracting single fibers from rabbit slow (soleus) muscle using joule temperature jump. We have shown differences in the characteristics between fibers from rabbit fast (psoas) and slow (soleus) muscles, assuming that these differences are due to differences in the kinetics of the myosin head cycle.

Keywords: muscle contraction, isometric tension, temperature jump

УДК 577.323

УРОВНИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА

© 2021 г. И.Ю. Митрошина*, Н.П. Сирота*, В.Н. Прокофьев**, Е.А. Кузнецова*

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

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

E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 25.11.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

Изучали уровни внеклеточных ядерной и митохондриальной ДНК сыворотки крови и повреждений ДНК лейкоцитов у здоровых доноров разного пола и возраста. Показано, что базовый уровень поврежденных ДНК лейкоцитов и уровни ДНК сыворотки сильно варьируют у разных доноров. Базовый уровень повреждений ДНК лейкоцитов не был ассоциирован с наличием хронических заболеваний или проф. вредности у пожилых доноров. Обнаружили, что концентрации внеклеточных ДНК в целом выше у мужчин, чем у женщин. Наблюдается тенденция увеличения определяемого по ΔC_t относительного количества копий митохондриальной ДНК у женщин по сравнению с мужчинами; у пожилых индивидов оно существенно варьирует у обоих полов, возможно, вследствие возрастных физиологических изменений. Необходимо учитывать пол и возраст пациентов при использовании такого показателя, как уровень внеклеточных ДНК сыворотки крови для диагностики и мониторинга.

Ключевые слова: доноры разного пола и возраста, внеклеточная ДНК сыворотки крови, %TDNA, Comet assay, митохондриальная ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302921020186

Поиск чувствительных и малоинвазивных биомаркеров, позволяющих выявить патологические состояния организма, в первую очередь — сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания, в настоящее время остается актуальным. Ранее в качестве одного из таких биомаркеров предлагалось использовать внеклеточную ДНК (вкДНК), которую можно сравнительно легко выделить из биологических жидкостей организма, например крови [1–3]. Считается, что вкДНК — это фрагменты ядерного (ядДНК) и митохондриального (мтДНК) геномов, попадающие в кровоток в результате разрушения клеток (апоптоз, некроз) или активной секреции ДНК во внеклеточное пространство [1, 4–7]. У здоровых людей концентрация циркулирующей вкДНК низкая, так как большинство нежизнеспособных клеток эффективно удаляются из кровообращения

фагоцитами [1, 2, 5]. У онкологических больных регистрировались повышенные уровни вкДНК, что, как правило, связывали с развитием опухоли [6, 8–10], среднее количество вкДНК плазмы варьировало от менее 10 нг/мл до более чем 1500 нг/мл [2]. Повышение уровня вкДНК наблюдали и у перенесших инфаркт миокарда, физическую травму, либо воспаление [1, 5]. Что касается состава выборки, то в большинстве случаев результаты исследований уровня вкДНК были получены на смешанных группах мужчин и женщин [11–15], что не позволяет выявить различия в ее концентрации в зависимости от таких параметров, как возраст и пол. Однако для практических целей необходимо знать, как изменяется концентрация вкДНК в сыворотке/плазме крови у представителей разных по возрасту и различающихся по полу групп доноров.

Известно, что у здоровых доноров источником основного количества вкДНК являются ядродержащие клетки крови [5]. Обнаружено, что уровень повреждений ДНК лейкоцитов периферической крови, определяемый методом «коме-

Сокращения: %TDNA — процент ДНК в хвосте кометы (per cent of DNA in a comet tail), вкДНК — внеклеточная ДНК, яДНК — ядерная ДНК, мтДНК — митохондриальная ДНК, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

та-тест» (Comet assay), различался у здоровых доноров [16]. В норме уровень повреждений ДНК клеток обусловлен как функционированием ДНК, так и процессами репарации, поскольку ДНК постоянно подвергается спонтанной тепловой и гидролитической деградации, окислению и метилированию [17]. Показано, что по сравнению со здоровыми донорами у пациентов с диабетом обоих типов, ишемической болезнью сердца, ожирением, рядом онкологических заболеваний регистрировалось увеличение уровня повреждений ДНК лейкоцитов [18–23], что, возможно, вносило вклад в уровень вкДНК. В настоящее время метод «комета-тест» используется, как правило, в токсикологических исследованиях для выявления одно- и двухнитевых разрывов и щелочеллабильных (апуриновых/апириимидиновых) сайтов в ДНК индивидуальных клеток. Однако предпринимаются попытки использовать уровень повреждений ДНК клеток для мониторинговых исследований [24]. Как соотносятся показатели уровня повреждений ДНК ядродержащих клеток крови и концентрации вкДНК сыворотки/плазмы крови у человека — не известно. С другой стороны, несмотря на то что такой показатель, как количество вкДНК, не является строго специфичным, он может быть дополнительной характеристикой патологического процесса в комбинации с другими маркерами [1].

В настоящей работе мы исследовали кровь только здоровых доноров из разных возрастных групп; у пожилых доноров, имеющих хронические заболевания, мы оценивали также уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови. Из-за специфичности митохондриального генома митохондрии являются чувствительной мишенью к воздействию различных повреждающих факторов [25]. Поскольку вклад в общий уровень вкДНК вносят яДНК и мтДНК, их уровни мы оценивали отдельно.

Целью настоящей работы было: выявить, как соотносится уровень суммарной вкДНК (ядерной и митохондриальной) и мтДНК сыворотки крови с возрастом и полом у здоровых доноров; как соотносится уровни повреждений ДНК с наличием хронических заболеваний у пожилых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы аликвоты венозной крови условно здоровых доноров разного пола и возраста, проходивших плановое обследование при соблюдении процедуры оформления письменного согласия. Условно здоровыми считались доноры, не имеющие на момент забора крови инфекционных или обострения хронических заболеваний. Первую группу (группа 1, $n = 30$) составили мужчины и женщины, средний

возраст которых был 65 лет (48–78 лет). Вторая группа (группа 2, $n = 20$) состояла из доноров, средний возраст которых был 26 лет (20–30 лет). Венозная кровь была собрана в пробирки, обработанные $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$. 500 мкл венозной крови центрифугировали при 400 g в течение 20 мин. Сыворотка была отобрана, перенесена в отдельную пробирку и заморожена при -20°C . Выделение вкДНК проводили после размораживания сыворотки по стандартной методике: обработка протеиназой К, фенольно-хлороформная экстракция с последующим осаждением двойным объемом этанола с ацетатом натрия до конечной концентрации 0.2 М.

Количественную оценку экстрагированной двуцепочечной ДНК выполняли с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit™ fluorometer (Invitrogen Corp., США). Оценку достоверности различий по уровню концентрации ДНК сыворотки крови осуществляли на основании U -критерия Уилкоксона (Манна-Уитни) ($p = 0.05$).

ВкДНК крови доноров использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, США) в Центре коллективного пользования ИТЭБ РАН. Праймеры для амплификации фрагментов генов ДНК человека: β -actin — F 5'-GCACCA-CACCTTCTACAATGA-3' R 5'-GTCATCT-TCTCGCGGTTGGC-3'; ND1 — F 5'-CCCTA-AAACCCGCCACATCT-3', R 5'-GAGCGATG-GTGAGAGCTAAGGT-3'. Реакционная смесь: 1× буфер SYBR® Green PCR Master Mix, 250 нМ праймеров, 4 нг матричной ДНК. Условия ПЦР: 50°C , 2 мин — 1 цикл; 95°C , 10 мин — 1 цикл; 95°C , 15 с, 60°C , 1 мин — 40 циклов.

ΔC_t рассчитывали по формуле $\Delta C_t = C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{ref}}}$, где $C_{t_{\text{target}}}$ — значения C_t , полученные в ходе ПЦР-РВ для митохондриального гена ND1, $C_{t_{\text{ref}}}$ — значения C_t , полученные в ходе ПЦР-РВ для ядерного гена β -actin. Оценку достоверности различий по значениям C_t осуществляли на основании U -критерия Уилкоксона (Манна-Уитни) ($p = 0.05$).

Расчет эффективности реакции ПЦР-РВ осуществляли по формуле $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, рекомендованной производителем. При построении графика зависимости логарифма концентрации продукта амплификации и значения C_t наблюдалась линейная зависимость. Коэффициенты наклона (slope) для ND1 составили -3.4 , для β -actin — 3.6 , что соответствует 96 и 90% эффективности соответственно.

Определение относительного количества мтДНК осуществлялось сравнительным методом $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t$ метод) по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{calib. sample}}$, где $\Delta Ct_{\text{test sample}}$ — значения ΔCt , полученные при обработке результатов в группах молодых женщин и обеих группах пожилых доноров; *calibrator sample* — значения ΔCt , полученные при обработке результатов в группе молодых мужчин. Данное значение ΔCt было взято в качестве калибратора, поскольку в молодом возрасте наблюдается более высокая по сравнению с пожилыми суммарная ферментативная активность, а мужской пол характеризуется большей стабильностью гормонального фона. Значения относительного количества мтДНК в исследуемых группах выражались в процентах относительно такового в группе молодых доноров-мужчин, взятого за 100%. При расчете групповых ΔCt значения Ct_{target} и Ct_{ref} были взяты как средние арифметические по каждой исследуемой группе.

Для определения уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови использовали щелочную версию метода «комета-тест» [26], эксперименты проводили, как описано в работе [16]. Для приготовления слайдов использовали цельную кровь, разведенную в шесть раз фосфатно-солевым буфером, рН 7.2, содержащим 0.001 моль/л ЭДТА. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, где реализованы алгоритмы расчета стандартных параметров комет [27]. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали параметр — долю ДНК в хвосте кометы в процентах (*per cent of DNA in a comet tail* — %TDNA). Для каждой экспериментальной единицы анализировали по три слайда, не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно работе [28]. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

В работе использовали фенол, хлороформ, ацетат натрия, агарозу, акриламид, азотнокислое серебро (ООО «Компания Хеликон», Россия). Флуоресцентный краситель SybrGreen10000X и реакционная смесь 2X SYBR® Green PCR Master Mix были приобретены у ООО «Биотех-Индустрия» (Россия) и Applied Biosystem (Великобритания) соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни повреждений ДНК лейкоцитов и содержание вкДНК сыворотки. Известно, что у здоровых доноров источником основного количества вкДНК являются ядросодержащие клетки крови [5]. Уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови различаются у разных доноров [16]. В наших условиях эксперимента средние значения %TDNA у здоровых доноров в основном не превышали 10% [16], что позволяет считать этот уровень базальным (контрольным). Поскольку в пожи-

лом возрасте люди, как правило, испытывают последствия работы во вредных условиях и наличия ряда заболеваний, то в этой связи исследовали уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови у 60–70-летних доноров, имеющих хронические заболевания вне фазы обострения или без них (табл. 1). Из табл. 1 видно, что наблюдаются существенные различия в базовых уровнях повреждений ДНК лейкоцитов венозной крови индивидуумов. %TDNA у доноров № 25 и № 30 был несколько выше контрольного. При этом значение %TDNA не было ассоциировано с наличием хронических заболеваний или проф. вредности, по-видимому, вследствие успешно применяемой терапии. Очевидно, что разница в уровнях %TDNA индивидуумов обусловлена их генетическими и эпигенетическими особенностями.

Из сыворотки этих проб крови и проб крови других доноров разного возраста была выделена ДНК. Обнаружили, что количество вкДНК, так же как и %TDNA, сильно варьирует у разных доноров. Поэтому мы предприняли попытку разграничения исследуемой популяции на четыре подгруппы по половому и возрастному признакам (табл. 2). Из табл. 2 видно, что концентрации суммарной ядерной и митохондриальной вкДНК в целом выше у мужчин по сравнению с женщинами, что согласуется с литературными данными [12, 13]. Обнаружено, что у доноров одного и того же пола концентрации вкДНК достоверно различались по *U*-критерию Манна–Уитни ($p \leq 0.05$) в зависимости от возраста: у молодых женщин она ниже, чем у пожилых; у молодых мужчин она выше, чем у пожилых. Обнаружены достоверные гендерные отличия в концентрации вкДНК для групп молодых доноров и отсутствие таковых в группах пожилых доноров. Отсутствие гендерных различий у пожилых доноров, возможно, связано с изменением клеточного метаболизма в пожилом возрасте. Так, показано, что с увеличением возраста доноров наблюдается тенденция к уменьшению величины %TDNA у лейкоцитов капиллярной и венозной крови [16]. Из изложенного видно, что в случае использования уровня вкДНК в качестве дополнительного средства в диагностике различных патологий, необходимо учитывать пол пациентов, особенно у доноров молодого возраста.

Уровни мтДНК сыворотки по результатам ПЦР-РВ. В образцах вкДНК сыворотки определяли уровни яДНК и мтДНК по *Ct*, полученные в ходе ПЦР-РВ для митохондриального гена ND1 и ядерного гена β -actin. В табл. 3 представлены значения *Ct*, условно соответствующие количествам копий ядерной и митохондриальной ДНК в исследуемом образце. По разнице между *Ct* для гена β -actin и *Ct* для гена ND1, иначе — ΔCt , можно судить об уровне мтДНК. Поскольку значения *Ct* находятся в обратной зависимости от

Таблица 1. Уровень повреждений ДНК лейкоцитов венозной крови мужчин и женщин 60–70 лет, имеющих хронические заболевания

№	Пол	Возраст, годы	Наличие хронических заболеваний	Профессиональная вредность	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Моноциты, $10^9/\text{л}$	Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	%ТДНК
1	ж	65	Распространенный ОХ	—	2.5	0.4	3.8	3.2 ± 0.6
2	ж	68	ГБ	—	1.7	0.2	3.2	2.8 ± 0.6
3	ж	62	Малярия в детстве	—	2.1	0.4	3.7	7.5 ± 1.0
4	м	60	ГБ	Химические реактивы	1.9	0.3	2.2	3.8 ± 1.7
5	ж	61	Ишемическая болезнь сердца, ГБ	Кислоты, щелочи	2.1	0.2	4.9	3.9 ± 0.6
6	м	60	ГБ	Вибрация, шум	1.8	0.3	1.5	8.9 ± 0.7
7	ж	61	Хронический геморрой	Вибрация, шум	2.9	0.3	2.9	5.3 ± 0.7
8	ж	65	Хронический холецистит	—	1.6	0.3	3.3	9.5 ± 0.9
9	ж	62	Хронический холецистит	Химические реактивы	3	0.3	5.8	4.3 ± 0.6
10	ж	67	ГБ	Кислоты, щелочи	3	0.5	4.5	9.4 ± 0.8
11	ж	64	ГБ	—	1.9	0.3	1.9	6.1 ± 1.1
12	м	69	Мочекаменная болезнь	—	2.5	0.4	4.6	6.8 ± 0.7
13	ж	68	Варикоз	—	1.8	0.4	3.9	3.9 ± 0.6
14	ж	67	ГБ	—	1.4	0.2	2.2	3.3 ± 0.7
15	ж	67	Ревматоидный артрит	—	2	0.3	2.6	2.4 ± 0.4
16	ж	66	ГБ, ОХ	—	2	0.2	1.2	4.8 ± 0.8
17	ж	61	ГБ, ОХ	—	2.5	0.4	4.2	4.5 ± 1.0
18	ж	65	Хронический холостопанкреатит	Органические растворители	3.4	0.5	1.6	10.9 ± 1.0
19	ж	67	Ревматизм	—	2	0.2	2.2	6.3 ± 0.8
20	м	68	—	—	1	0.2	3.5	6.5 ± 1.2
21	м	60	—	—	1.9	0.2	2.3	9.7 ± 1.5
22	ж	64	—	—	1.9	0.2	2.7	8.7 ± 1.0
23	ж	67	—	—	2.3	0.4	4.2	11 ± 1.3
24	м	64	—	Тетраэтилсвинец	2.9	0.6	6.5	8.3 ± 1.5
25	м	70	—	Тетраэтилсвинец	2.7	0.3	4.9	16.5 ± 1.8
26	ж	70	—	—	2.4	0.4	2.5	3.0 ± 0.6
27	ж	67	—	—	2.6	0.4	4.1	5.1 ± 1.0
28	м	68	—	Тетраэтилсвинец	2.4	0.6	3.6	5.3 ± 0.7
29	ж	60	—	—	3.4	0.5	3.8	2.6 ± 0.6
30	ж	65	—	—	3.2	0.4	4.0	13.4 ± 2.2

Примечание. ОХ – остеохондроз, ГБ – гипертоническая болезнь. Данные по %ТДНК приведены в виде $M \pm m$.

Таблица 2. Концентрация суммарной вкДНК в сыворотке крови доноров разного пола и возраста

Доноры	Возраст, годы	Количество доноров	Концентрация вкДНК, мкг/мл
Мужчины	20–32	10	1.3 ± 0.3 (0.7 – 1.8)
	60–74	14	0.6 ± 0.4 (0.25 – 1.5)
Женщины	20–30	10	0.1 ± 0.1 (0.05 – 0.4)
	71–78	23	0.4 ± 0.3 (0.1 – 1.0)

Примечание. Данные по концентрации вкДНК приведены в виде $M \pm SD$.

Таблица 3. Уровни яДНК и мтДНК сыворотки крови доноров

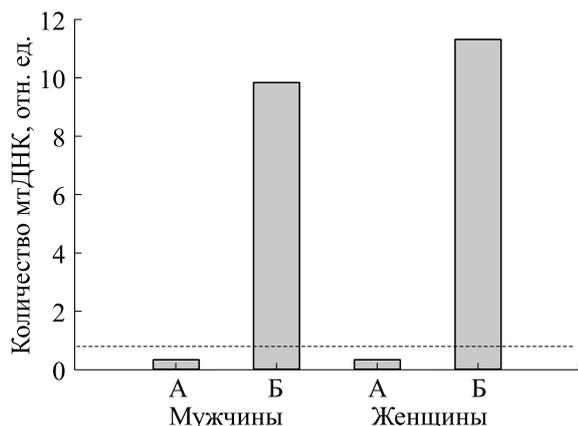
Группы доноров	Подгруппы	<i>Ct</i> ND1	<i>Ct</i> β-actin	Δ <i>Ct</i>	Количество доноров
Молодые мужчины (20–30 лет)	–	17.3 ± 1.1	23.8 ± 0.9	6.5 ± 1.6	10
Молодые женщины (20–30 лет)	–	15.3 ± 1.5*	25.4 ± 1.6*	10.1 ± 2.0*	10
Пожилые мужчины (48–74 лет)	А	18.0 ± 1.8	23.0 ± 1.3	5.0 ± 0.7*	8
	Б	17.3 ± 2.1	27.1 ± 2.7*	9.8 ± 1.8*	15
Пожилые женщины (53–78 лет)	А	18.6 ± 1.6	23.4 ± 1.3	4.8 ± 1.0*	7
	Б	15.0 ± 2.0*	25.0 ± 2.3	10.0 ± 2.2*	16

Примечание. Данные приведены в виде $M \pm SD$. * – Достоверные отличия от группы молодых мужчин по *U*-критерию Манна–Уитни ($p \leq 0.05$).

количества копий изучаемых фрагментов ДНК, то видно, что количество копий мтДНК в группе молодых женщин превышает таковое в мужской группе, и эти различия достоверны. По литературным данным, в экспериментах на цельной крови пожилых доноров было показано, что содержание мтДНК значительно выше у женщин по сравнению с мужчинами, и эти различия были связаны не только с полом, но и с возрастом; содержание мтДНК незначительно увеличилось до пятого десятилетия жизни и уменьшилось у более пожилых индивидов и у женщин в постменопаузе [29, 30]. Следует отметить, что в этих экспериментах значительный вклад в определяемый уровень вкДНК вносили клетки крови. Тем не менее можно предположить, что тенденция более высокого уровня мтДНК крови у женщин по сравнению с мужчинами сохраняется и в уровнях мтДНК из сыворотки крови, что видно из данных, полученных на молодых донорах (табл. 3).

Достоверных гендерных отличий в группах пожилых доноров выявлено не было. Однако было обнаружено очевидное разделение, как мужчин,

так и женщин, на две подгруппы по значению Δ*Ct* со средними значениями примерно 5 и 10 (подгруппы А и Б соответственно). При расчете относительного количества мтДНК по методу ΔΔ*Ct* эти различия сохранялись (рисунок). Видно, что уровень мтДНК в подгруппах Б у мужчин и женщин существенно выше, чем в подгруппах А. Возможно, что это разделение связано с физиологическими изменениями у доноров, ассоциированными с возрастом. Из литературы известно, что содержание мтДНК падало с ростом количества лейкоцитов и возрастало при увеличении уровня тромбоцитов, что было связано и с гендерными различиями. У женщин по сравнению с мужчинами наблюдали большее количество тромбоцитов и лейкоцитов, что, по мнению авторов, отражалось на уровне мтДНК [29]. Возможно, что обнаруженное нами разделение пожилых доноров по уровням мтДНК ассоциировано с изменениями соотношений лейкоцитов и тромбоцитов в крови, а также и с различным уровнем повреждений ДНК лейкоцитов (табл. 1 и 2). Кроме того, как известно из литературных данных, на уровень вне-



Относительное количество мтДНК в сыворотке пожилых доноров подгруппы А ($\Delta Ct = 4.8-5.0$) и подгруппы Б ($\Delta Ct = 9.8-10$). Горизонтальная линия – относительное количество мтДНК в группе молодых мужчин..

клеточных ДНК оказывала влияние и гормональная регуляция: было показано, что содержание мтДНК в крови женщин снижалось при потреблении эстропрогестагена [29]. Поскольку с увеличением возраста доноров в целом наблюдали уменьшение уровня мтДНК [29, 30], то возможно также, что тенденция к понижению уровня вкДНК в крови связана и с уменьшением базового уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови с возрастом, что было показано нами ранее [16]. Следует отметить, что в этой работе представлены средние значения уровня мтДНК по группам, мы не соотносили уровни вкДНК с %TDNA для отдельных доноров, что было бы интересно для выявления индивидуальных особенностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что базовый уровень повреждений ДНК лейкоцитов крови, как и уровни вкДНК сыворотки, сильно варьируют у разных доноров. Концентрации вкДНК в целом выше у мужчин по сравнению с женщинами. Относительное количество копий мтДНК сыворотки, определяемые по ΔCt , в целом больше у женщин, чем у мужчин. Уровни мтДНК у пожилых индивидов могут сильно различаться, и эти различия наблюдаются у обоих полов. Необходимо учитывать пол и возраст пациентов при использовании такого показателя, как уровень внеклеточных ДНК сыворотки крови для диагностики и мониторинга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в рамках базовой части государственного задания Министерства образования и науки НИР №1878 «Разработка

фундаментальных аспектов молекулярной диагностики и митохондриальной фармакологии».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Kohler, Z. Barekati, R. Radpour, and X. Y. Zhong, *Anticancer Res.* **31**, 2623 (2011)
2. Y. I. Elshimali, H. Khaddour, M. Sarkissyan, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **14** (9), 18925 (2013). DOI: 10.3390/ijms140918925
3. D. Chandrananda, N. P. Thorne, M. Bahlo, *BMC Med. Genomics.* **8**, 29 (2015). DOI: 10.1186/s12920-015-0107-z
4. R. R. Zachariah, S. Schmid, N. Buerki, et al., *Obstet. Gynecol.* **112** (4), 843 (2008). DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181867bc0
5. С. Н. Тамкович, В. В. Власов и П. П. Лактионов *Молекуляр. биология* **42** (1), 12 (2008). DOI: 10.1007/s11008-008-1002-x
6. M. Yu, *Mitochondrial DNA* **23** (5), 329 (2012). DOI: 10.3109/19401736.2012.696625
7. S. Rapisuwon, E. E. Vietsch, and A. Wellstein, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**, 211 (2016). DOI: 10.1016/j.csbj.2016.05.004
8. K.-A. Yoon, S. Park, S. H. Lee, et al., *J. Mol. Diagn.* **11** (3), 182 (2009). DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080098
9. W. Chen, F. Cai, B. Zhang, and X. Y. Zhong, *Clin. Chem. Lab. Med.* **50** (2), 261 (2011). DOI: 10.1515/cclm.2011.773
10. A. Szpechcinski, J. Chorostowska-Wynimko, and R. Struniawski, et al., *Br. J. Cancer* **113** (3), 476 (2015). DOI: 10.1038/bjc.2015.225
11. G. Sozzi, D. Conte, L. Mariani, et al., *Cancer Res.* **61** (12), 4675 (2001).
12. S. N. Tamkovich, O. E. Bryzgunova, E. Yu. Rykova, et al., *Clin. Chem.* **51** (7), 1317 (2005). DOI: 10.1373/clinchem.2004.045062
13. X. Y. Zhong, S. Hahn, V. Kiefer, and W. Holzgreve, *Ann. Hematol.* **86** (2), 139 (2007). DOI: 10.1007/s00277-006-0182-5
14. D. Czeiger, G. Shaked, H. Eini, et al., *Amer. Soc Clin. Pathol.* **135** (2), 264 (2011). DOI: 10.1309/AJCP4RK21HVKTZV

15. J. Jylhava, T. Kotipelto, A. Raitala, et al., *Mech Ageing Develop.* **132** (1–2), 20 (2011). DOI: 10.1016/j.mad.2010.11.001
16. Н. П. Сирота и Е. А. Кузнецова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **145** (2), 154 (2008).
17. E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett.* **327**, 48 (2012) DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
18. M. P. A. Hannon-Fletcher, M. J. O’Kane, K. W. Moles, et al., *Mutat. Res.* **460** (1), 53 (2000). DOI: 10.1016/S0921-8777(00)00013-6
19. M. Harangi, E. Remenyik, I. Seres, et al., *Mutat. Res.* **513** (1–2), 17 (2002). DOI: 10.1016/S1383-5718(01)00285-6
20. P. Sanchez, R. Penarroja, F. Gallegos, et al., *Arch. Med. Res.* **35** (6), 480 (2004). DOI: 10.1016/j.arcmed.2004.11.008
21. J. Blasiak, M. Arabski, and R. Krupa, *Mutat. Res.* **554** (1–2), 297 (2004). DOI: 10.1016/j.mrfmm.2004.05.011
22. R. Demirbag, R. Yilmaz, A. Kocyigit, *Mutat. Res.* **570** (2), 197 (2005). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.11.003
23. A. J. Sigurdson, M. Hauptmann, B. H. Alexander, et al., *Mutat. Res.* **586** (2), 173 (2005). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.07.001
24. A. Collins, M. Milic, S. Bonassi, and M. Dusinska, *Mutat. Res.* **843**, 1 (2019). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.002
25. W. Copeland and M. J. Longley, *DNA Repair (Amst.)* **19**, 190 (2014). DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.010
26. P. Møller, L. Knudsen, S. Loft, and H. Wallin, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9** (10), 1005 (2000).
27. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558**, 27 (2004). DOI: 10.1007/1-4020-4278-7_7
28. D. P. Lovell and T. Otori, *Mutagenesis* **23** (3), 171 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gen015
29. J. Knez, E. Winckelmans, and M. Plusquin, *Am. J. Epidemiol.* **183** (2), 138 (2016). DOI: 10.1093/aje/kwv175
30. C.-Y. Xia, Y. Liu, H.-R. Yang, et al., *Chin. Med. J.* **130** (20), 2435 (2017). DOI: 10.4103/0366-6999.216395

Levels of Circulating DNA in Blood Serum and DNA Damage in Leukocytes of Healthy Donors of Different Gender and Age

I.Yu. Mitroshina*, N.P. Sirota*, V.N. Prokofiev**, and E.A. Kuznetsova*

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

** *Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovsky, Southern Federal University, prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

We studied the levels of extracellular nuclear and mitochondrial DNA of blood serum and DNA damage in leukocytes of healthy donors of different sex and age groups. The baseline level of DNA damage in leukocytes and serum DNA levels have been shown to vary greatly among different donors. The baseline level of DNA damage in leukocytes was not associated with the presence of chronic diseases or an occupational health risk for elderly donors. It was found that extracellular DNA concentrations are generally higher in men than in women. There is a tendency towards an increase in the relative mitochondrial DNA copy number determined by ΔC_t in women but not in men; the relative mtDNA copy number in elderly individuals varies significantly in both sexes, possibly due to age-related physiological changes. It is necessary to take into account the gender and age of patients when using an indicator such as the level of extracellular DNA of blood serum for diagnosis and monitoring.

Keywords: donors of different gender and age, extracellular DNA of blood serum, %TDNA, Comet assay, mitochondrial DNA

ПОДСТРОЙКА ЭХОИМПУЛЬСОВ, ОТРАЖЕННЫХ ОТ РАСПОЛОЖЕННЫХ НА РАЗНЫХ ДИСТАНЦИЯХ ОБЪЕКТОВ, ПОД СЛУХОВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У ДЕЛЬФИНОВ: МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2021 г. Л.К. Римская-Корсакова*, А.А. Родионов**, М.П. Иванов***

*АО «Акустический институт имени академика Н.Н. Андреева», 117036, Москва, ул. Шверника, 4

E-mail: lkrk@mail.ru

**Институт океанологии РАН (Санкт-Петербургский филиал),
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 5

E-mail: sPPP@spbrc.nw.ru

***Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: 20mivanov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.05.2020 г.

После доработки 14.07.2020 г.

Принята к публикации 23.12.2020 г.

Дельфины при эхолокации во время охоты излучают зондирующий импульс и принимают эхоимпульс, на основании которого обнаруживают и идентифицируют жертву в фазе поиска. В фазе захвата дельфины нуждаются в стабильной слуховой реакции на эхоимпульс. Для объяснения особенностей восприятия эхоимпульсов в фазах поиска и захвата моделировали вызванную импульсами реакцию ансамбля высокочастотных периферических волокон. Пара импульсов с центральными частотами в 70 кГц, разными межимпульсными интервалами и пиковыми амплитудами была моделью зондирующего импульса и эхоимпульса. Импульсы поступали на вход модели, имеющей разные этапы обработки, включая преобразование рецепторного потенциала волосковых клеток в последовательность потенциалов действия ансамбля волокон слухового нерва. Показано, что для воспроизведения временной структуры импульсов в реакции ансамбля необходимо соответствие возникшего рецепторного потенциала порогам реакций большинства волокон ансамбля. При коротких интервалах между импульсами в паре воспроизведению временной структуры второго импульса (эхоимпульса) способствовало повышение порогов реакций волокон ансамбля за счет рефрактерных свойств, вызванных действием первого импульса (модели зондирующего импульса). При больших интервалах между импульсами в паре за воспроизведение структуры второго импульса (эхоимпульса) могли отвечать вариации пиковых значений амплитуд первого импульса (модели зондирующего импульса). Показано, что метод моделирования – удобный способ для выявления различий способов согласования эхоимпульсов со слуховой чувствительностью дельфинов в фазах поиска и захвата жертвы.

Ключевые слова: эхолокация, периферическое кодирование, волокна слухового нерва, воспроизведение временной структуры эхоимпульсов.

DOI: 10.31857/S0006302921020198

Дельфины используют эхолокацию для навигации и во время охоты [1, 2]. Они излучают зондирующие импульсы и принимают отраженные от объектов эхоимпульсы. Зондирующие импульсы имеют малую длительность (<100 мкс), высокую частоту (50–130 кГц) и интенсивность (~ 230

дБ отн. 1 мкПа). Анализируя эхоимпульсы, дельфины определяют направление на источник с точностью $\pm 1^\circ$, обнаруживают и распознают объекты, незначительно отличающиеся по размеру, форме и материалу. Эхолокатор дельфина имеет преимущества перед средствами гидроакустики при поиске малоразмерных объектов, расположенных в толще воды, на дне, под слоем ила или подо льдом, т.е. при наличии шумов, донной и объемной реверберации, рассеяния звуков на

Сокращения: ЗИ – зондирующий импульс, ЭИ – эхоимпульс, СВП – слуховые вызванные потенциалы, ВВК – внутренние волосковые клетки, ВСН – волокна слухового нерва.

границах сред. Поэтому изучение эхолокационных механизмов у дельфинов, в том числе методами моделирования, имеет фундаментальное и практическое значение.

Дельфины кормятся во время охоты, в которой выделяют фазы поиска и захвата жертвы [3]. Слуховой анализ эхоимпульсов в фазе поиска позволяет дельфину обнаружить и идентифицировать жертву, а в фазе захвата – иметь стабильную от нее реакцию.

Стабилизацию слуховых реакций на эхоимпульсы наблюдали при лоцировании дельфинами алюминиевого цилиндра на дистанциях в 1–8 м, т. е. при интервалах между зондирующими импульсами (ЗИ) и эхоимпульсами (ЭИ) в 1–10 мс [4–6]. Зарегистрированные на этих дистанциях слуховые вызванные потенциалы (СВП) ствола мозга дельфинов в ответ на ЭИ были постоянными. Постоянству амплитуд СВП при уменьшении дистанции, как полагали авторы, способствовало снижение слуховой чувствительности к ЭИ за счет повышения эффекта маскировки, вызванной ЗИ, но рост пиковых амплитуд ЭИ за счет уменьшения затухания звука в воде. Временная маскировка способствовала подстройке чувствительности слуха дельфина под интенсивность отраженного от объекта ЭИ, и поэтому получению стабильной информации о жертве в фазе захвата на дистанциях в 1–8 м.

На средних дистанциях до объектов, составляющих примерно 20–60 м, дельфины излучают каждый следующий ЗИ после приема предыдущего эхоимпульса. При этом дельфины варьируют в широком диапазоне интенсивность зондирующих импульсов при обнаружении или распознавании объектов как в экспериментальном бассейне [1, 7], так и при свободном плавании [8, 9]. На целесообразность вариаций интенсивности ЗИ как способа подстройки эхоимпульсов под слуховую чувствительность дельфина в точке приема указывали данные моделирования свойств периферического кодирования импульсных звуков [10].

На больших дистанциях до объектов, превышающих 100 м, дельфины излучали пачки ЗИ с периодами следования в 140–160 мс [11]. Внутри пачки имели место вариации интенсивностей ЗИ и задержек между ЗИ от 15 до 20 мс. При таких задержках временная маскировка не должна влиять на слуховое восприятие отдельных эхоимпульсов в пачке [6]. Поэтому можно предположить, что вариации интенсивности ЗИ в пачке могли подстраивать интенсивность эхоимпульсов под слуховую чувствительность дельфина в точке приема и тем самым способствовать идентификации жертвы (объекта) на этапе его обнаружения.

Целью данной работы было моделирование свойств *временного* периферического кодирования

высокочастотных звуков в интересах объяснения особенностей слухового приема дельфинами эхоимпульсов, отраженных от объектов, расположенных на коротких и дальних дистанциях. Также ставились задачи определения целесообразности варьирования амплитуд ЗИ в пачках при поиске жертвы на дальних дистанциях и определения причин, по которым вызванная эхоимпульсом реакция ансамбля могла быть стабильной в фазе захвата жертвы.

Считается, что на периферии слуховой системы млекопитающих тонкая временная структура сигналов с частотами выше 4 кГц не воспроизводится, поскольку импульсные отклики базилярной мембраны сглаживают реакции рецепторных внутренних волосковых клеток (ВВК), обладающих интегрирующими свойствами [12]. Постоянную времени интегрирования оценивают примерно в 0.2 мс. Сглаживание компенсируют реакции наборов волокон слухового нерва (ВСН), связанных с одной ВВК, а также генерация потенциалов действия (спайков) ВСН, приуроченных к возрастающей части рецепторного потенциала ВВК [13, 14]. Ограничения числа ВСН, имеющих свойства восстановления возбудимости (рефрактерностью и адаптацией), могут привести к появлению особенностей периферического кодирования временной структуры высокочастотных импульсов, рассмотрению которых посвящена данная работа. Под периферическим кодированием импульсов мы понимали преобразование аналогового рецепторного потенциала ВВК в последовательность спайков ансамбля ВСН.

Следует отметить, что возникшая в ответ на высокочастотный импульс реакция ансамбля ВСН вызывает последовательные реакции нейронных структур прямого слухового пути, которые ответственны за формирование СВП и слуховые реакции дельфинов в целом. Учитывая потребность дельфинов в быстром реагировании на принятые эхоимпульсы, учитывая короткий путь формирования слуховых реакций, можно ожидать проявлений свойств периферического кодирования в характеристиках СВП и слуховых реакциях дельфинов.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИЙ АНСАМБЛЯ ВОЛОКОН СЛУХОВОГО НЕРВА

В работе была использована модель волокна слухового нерва [10, 13–15], включающая несколько этапов преобразований входного сигнала $X(t)$. К ним относятся:

1. Полосовая фильтрация сигнала $X(t)$, воспроизводящая фильтрующие свойства базилярной мембраны (выходная функция $Y(t)$).

2. Детектирование и интегрирование, участвующие в формировании рецепторных потенциалов моделей ВВК (выходная функция $R(t)$).

3. Формирование синаптического потенциала модели волокна слухового нерва (выходная функция $G(t)$) в виде пуассоновского случайного процесса со средней и дисперсией, пропорциональные функции $R(t)$; для воспроизведения спонтанной активности дисперсию функции $G(t)$ увеличивали на некоторую величину.

4. Генерация потенциалов действия (спайков P_i) при условии, что функция $G(t)$ превышает пороговую функцию $H(t)$;

5. Изменение пороговой функции $H(t)$ модели волокна после генерации спайка, включающее мгновенное повышение порога и его постепенное восстановление за 20–30 мс до начального значения, а также повышение текущего значения порога на остаточное значение порога, бывшее в момент генерации нового спайка после генерации предыдущего спайка. Такой механизм повышения порога позволял достоверно воспроизводить в моделях ВСН свойства рефрактерности и адаптации реальных ВСН [16].

Параметры моделей ВСН были подобраны так, чтобы воспроизвести известные свойства реакций реальных ВСН наземных млекопитающих. Дельфины не являются обычными лабораторными животными, и прямые исследования реакций ВСН у дельфинов невозможны. Поэтому адекватность использованной модели подтверждали путем воспроизведения свойств реальных СВП дельфинов, особенностей слухового восприятия импульсных звуков у дельфинов [17–19]. Модельные СВП получали путем свертки реакции ансамбля ВСН с «элементарным» СВП, в основе которого был реальный СВП дельфина, полученный на одиночный щелчок.

Следует отметить, что на этапе моделирования импульсных откликов базилярной мембраны мы не учитывали нелинейные свойства смещений базилярной мембраны [20]. Динамический диапазон используемой модели периферии был существенно уже реального динамического диапазона слуховой системы дельфина, достигающего почти 200 дБ отн 1 мкПа. Поэтому моделирование было направлено на выявление качественных закономерностей кодирования тонкой временной структуры эхоимпульсов, у которых пиковые значения амплитуд менялись в динамическом диапазоне модели периферии. Нас интересовали свойства преобразования профиля входного сигнала ($X(t)$) в последовательность потенциалов действия (спайков), которую генерировал ансамбль ВСН ($P_i(t)$).

Входными сигналами модели $X(t)$ были одиночные импульсы, а также пары или тройки импульсов, временные профили которых спадали в

течение 50 мкс и были близки профилям и длительностям зондирующих импульсов дельфиноафалин [1]. Центральная частота импульсов была равна 70 кГц. Эхоимпульсы, отраженные от реальных жертв дельфинов, а также от мишеней, используемых в экспериментах, чаще всего состоят из наборов отражений зондирующих импульсов, интервалы между которыми могут быть менее ста микросекунд. Поэтому моделями эхоимпульсов были пары и тройки коротких импульсов с межимпульсными интервалами меньшими 100 мкс.

Характеристическая частота моделей ВСН, соответствующая частоте настройки фильтра базилярной мембраны, была равна 70 кГц. Шаг вычисления составлял 1 мкс. В ответ на однократное предъявление одиночных, пар или троек импульсов получали реакцию ансамбля из 300 моделей волокон в виде гистограммы $P_i(t)$. Пиковые амплитуды импульсов выражали в дБ относительно амплитуды одиночного импульса на пороге реакции ансамбля.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Восстановление временной структуры импульсов в реакции ансамбля моделей волокон. На рис. 1а представлены реакции разных блоков модели на пару надпороговых импульсов с амплитудами в 19 дБ и межимпульсными интервалами T в 12.8 мс. Показаны профили входных сигналов $X(t)$ и импульсных откликов базилярной мембраны $Y(t)$, сглаженные рецепторные потенциалы ВВК $G(t)$, а также суммарные реакции ансамбля волокон $P_i(t)$. Данные рис. 1а показали, что профиль функции $G(t)$, вызванный первым импульсом, не соответствует профилю $Y(t)$. За счет интегрирующих свойств ВВК потенциал $G(t)$ сначала возрастал, а потом плавно спадал до нуля. Максимум потенциала $G(t)$ приходился на окончание функции $Y(t)$. Интегрирующие свойства ВВК способствовали повышению отношения сигнал/шум, но нарушали воспроизведение временной структуры импульса. Структуру восстанавливала суммарная реакция ансамбля ВСН.

При низких пиковых амплитудах импульсов (19 дБ) каждое волокно ансамбля (из-за рефрактерности) могло генерировать не более одного спайка в момент, когда положительный градиент потенциала $G(t)$ превышал пороговую функцию $H(t)$. За счет внутреннего шума (спонтанной активности) профили функций $G(t)$ в разных волокнах ансамбля отличались случайным образом, поэтому возникшие в разных волокнах спайки были не синхронизированы. Появление спайков было приурочено к разным частям возрастающей части потенциала $G(t)$, и поэтому суммарная реакция ансамбля $P_i(t)$ восстанавливала профиль функции $Y(t)$ (рис. 1а). Данный способ кодирова-

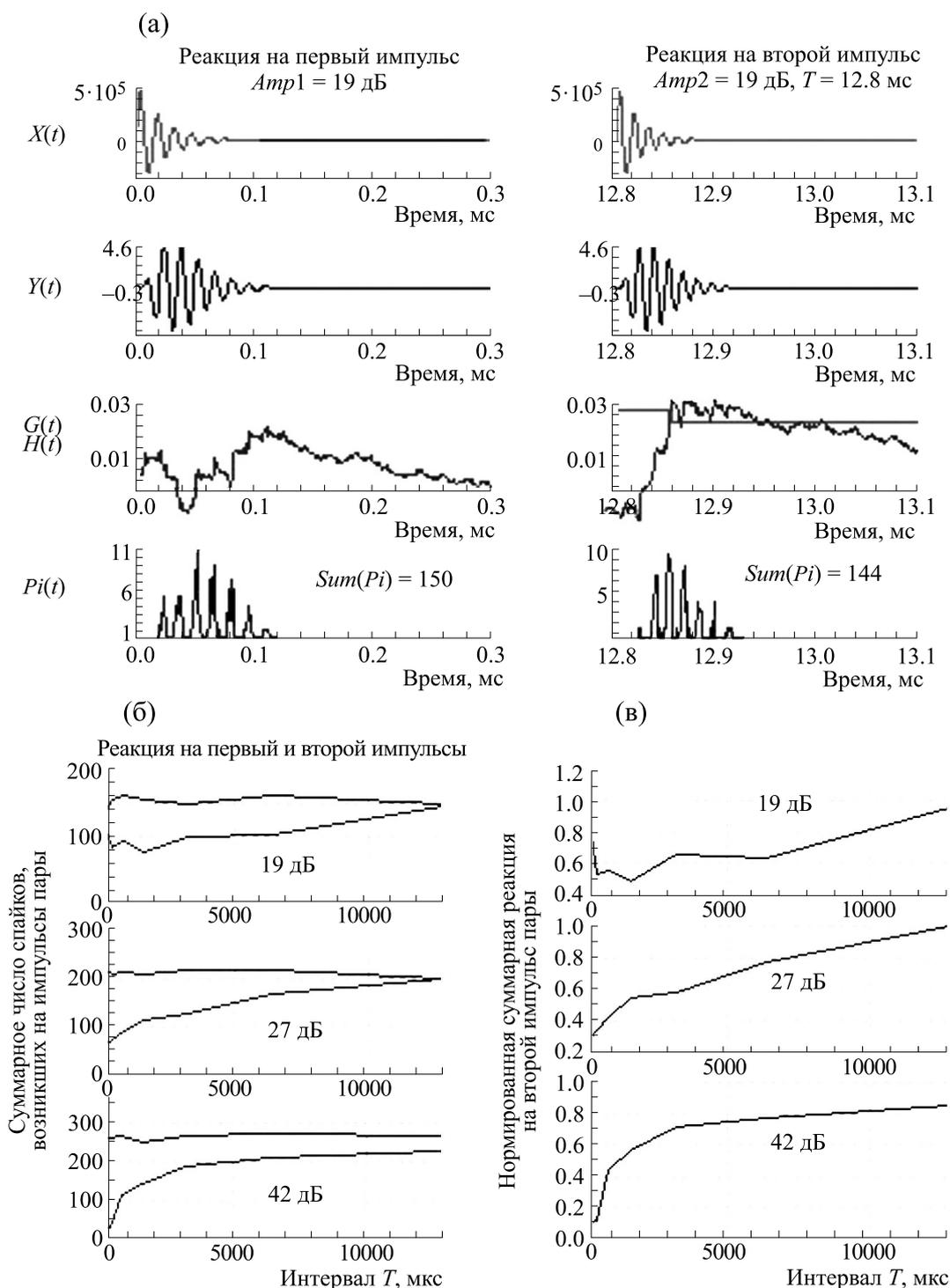


Рис. 1. Реакции разных блоков модели на пару равновеликих импульсов с пиковыми амплитудами в 19 дБ и задержкой T в 12.8 мс (а); зависимости от задержки T суммарного числа спайков, вызванных импульсами пары (б) и нормированной суммарной реакции на второй импульс пары (в). Параметры на (б) и (в) – значения пиковых амплитуд импульсов в дБ относительно амплитуды импульса на пороге. По осям абсцисс: на (а) – время в мс, на (б) и (в) – величина интервала T в мс; по осям ординат: на (а) – амплитуды в усл. ед.; на (б) – число спайков на каждом шаге; на (в) – отношение суммарной реакции на второй импульс. $Sum(Pi)$ – суммарное число спайков, возникшее в ансамбле в ответ на экосигнал. $X(t)$, $Y(t)$, $G(t)$, $H(t)$, $Pi(t)$ и $Sum(Pi)$ – см. объяснения в тексте.

ния пар низко амплитудных импульсов в ансамбле ВСН был назван стохастическим [21].

На рис. 1б показаны зависимости суммарного числа спайков, возникших на импульсы пары, от интервала между ними, а на рис. 1в — кривые восстановления реакции на второй импульс как зависимости нормированной амплитуды реакции на второй импульс от интервала между импульсами пары. Зависимости были получены при трех амплитудах импульсов (19, 27 и 47 дБ).

При амплитудах импульсов в 19 и 27 дБ и межимпульсном интервале в 0.8 мс суммарное число спайков, возникших на первый импульс в паре, соответствовало числу среагировавших волокон и было больше числа спайков (волокон), возникших на второй импульс (рис. 1б). Уменьшение суммарной реакции $Sum(P_i)$ на второй импульс обусловлено конечным числом волокон в ансамбле, рефрактерными свойствами и низкими значениями потенциалов $G(t)$. При низких амплитудах на второй импульс могли ответить только те волокна, которые *еще не ответили* на первый импульс. При интервале в 13 мс реакция на второй импульс восстановилась полностью (рис. 1в): суммарные реакции $Sum(P_i)$, а также профили реакций на первый и второй импульс были одинаковыми (рис. 1а). Реакция на второй импульс при увеличении интервала повышалась, так как с течением времени увеличивалось число волокон, готовых ответить в случайный момент времени. Чем меньше были амплитуды импульсов, тем меньше волокон отвечало на первый импульс, тем больше волокон отвечало на второй, тем меньше реакция на второй импульс зависела от межимпульсного интервала.

При наибольшей амплитуде импульсов в 42 дБ практически все волокна в ансамбле ответили на первый импульс (т.е. $Sum(P_i) \sim 280$) (рис. 1б). Поэтому при интервале в 0.8 мс число спайков, вызванных вторым импульсом, было почти равно нулю. Восстановление реакции на второй импульс отличалось от такового при амплитудах импульсов в 19 и 27 дБ (рис. 1в). При амплитуде в 42 дБ восстановление было более быстрым при задержках в 1–7 мс. Однако при задержке в 13 мс суммарная реакция на второй импульс была меньше таковой на первый импульс. При высоких амплитудах на второй импульс отвечали те волокна, которые уже ответили на первый импульс. Поэтому восстановление реакции на второй импульс соответствовало изменению порогов волокон вследствие рефрактерности и адаптации. Такой способ кодирования пары импульсов был назван детерминистическим [19].

Таким образом, воспроизведение временной структуры пары импульсов зависело от амплитуд импульсов и интервалом между ними. Стохастический способ кодирования, реализуемый ансам-

блем волокон слухового нерва, позволяет воспроизвести временную структуру низкоамплитудных импульсов, входящих в пару, а также структуру пар импульсов. Воспроизведение структуры тем точнее, чем точнее соответствие потенциала $G(t)$ порогу реакции волокон в ансамбле. Способ кодирования пар высокоамплитудных импульсов — детерминистический. Восстановление реакции на второй импульс определяется свойствами рефрактерности и адаптации волокон ансамбля. Воспроизведение структуры пары импульсов зависело от интервала между ними.

Моделирование эффекта стабилизации слуховых реакций. Учитывая рассмотренные выше свойства, можно объяснить эффект стабилизации реакции на эхоимпульс, наблюдаемый у дельфинов при эхолокации объектов на коротких дистанциях [6]. В модельном эксперименте входным сигналом $X(t)$ была пара разновеликих импульсов (рис. 2). Первый импульс пары был моделью зондирующего импульса (ЗИ), а второй — моделью эхоимпульса (ЭИ). Чтобы учесть уменьшение амплитуды ЭИ при увеличении задержки между ЗИ и ЭИ за счет свойств распространения звука в воде, амплитуду модели ЭИ уменьшали согласно выражению $Amp2 = Amp1/(2TV)$, где $Amp1$ и $Amp2$ — амплитуды моделей ЗИ и ЭИ; T — задержка ЭИ относительно ЗИ; V — скорость звука в воде. Поэтому при пиковой амплитуде модели ЗИ в 42 дБ при задержке между ЭИ и ЗИ в 39 мс амплитуда ЭИ составляла 6 дБ (рис. 2а), а вызванные ЗИ и ЭИ реакции $Sum(P_i)$ — 286 и 20 спайков соответственно (рис. 2а).

При приближении к жертве дельфин генерировал стабильные по амплитуде ЗИ и принимал ЭИ, амплитуды которых возрастали при уменьшении задержки. При высокой амплитуде ЗИ ансамбль волокон кодировал пару, включающую ЗИ и ЭИ, детерминистическим способом, а реакция на ЭИ была под влиянием свойств рефрактерности и адаптации волокон ансамбля. За счет двух взаимоисключающих процессов — повышения амплитуды ЭИ вследствие распространения звука в воде и уменьшения реакции ансамбля, вызванной ЭИ, вследствие рефрактерных свойств волокон — реакция на ЭИ была постоянной при $T < \sim 10$ –13 мс (рис. 2г).

Таким образом, моделирование объяснило наблюдаемую при коротких задержках T стабилизацию слуховых реакции на эхоимпульсы у дельфинов при их приближении к объекту [4–6] или жертве в фазе захвата.

Роль варьирования амплитуд зондирующих импульсов в пачках при поиске жертвы на дальних дистанциях. Оценим значение варьирования амплитуд зондирующих импульсов в пачке, излучаемой дельфинами в фазе поиска жертвы на

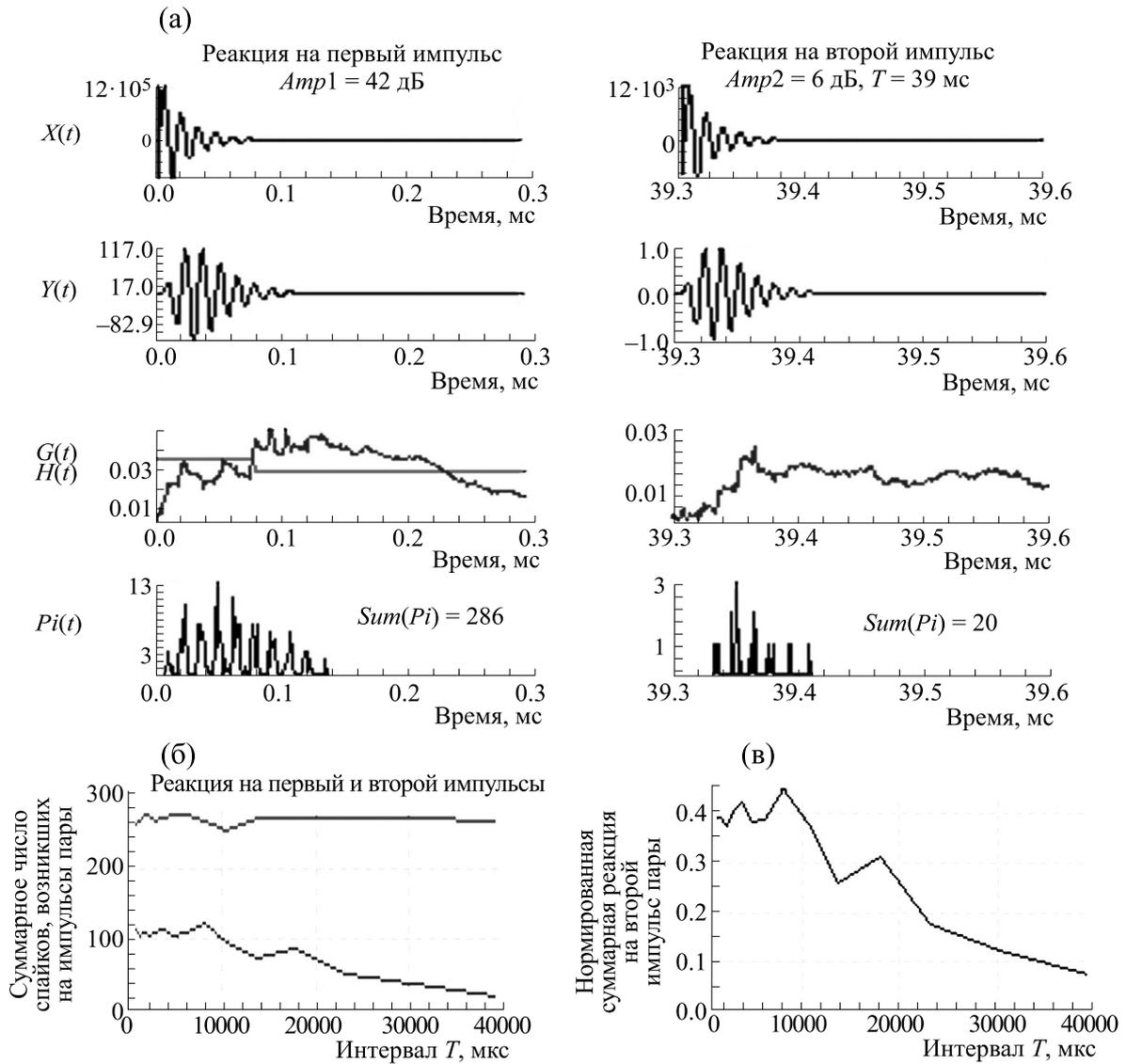


Рис. 2. Реакции блоков модели на пару разновеликих импульсов, имеющих пиковую амплитуду первого и второго импульсов в 42 и 6 дБ соответственно и с межимпульсным интервалом T в 39 мс (а). Зависимости суммарного числа спайков, возникших на импульсы пары (б) и нормированной суммарной реакции на второй импульс (в) от величины интервала T . Остальные обозначения, как на рис. 1.

дальних дистанциях [11]. После излучения пачки ЗИ дельфин принимает пачку эхоимпульсов. Временная структура ЭИ формируется при отражении ЗИ от жертвы и может включать в себя несколько импульсных компонентов. В нашем случае моделью пачки ЭИ (рис. 3) были три импульсных комплекса, каждый из которых включал в себя три импульсных компонента с одинаковыми частотами в 70 кГц, амплитудами, равными Amp , $Amp/10$, $Amp/3$, и интервалами между компонентами в 90 и 70 мкс (функция $X(t)$). Интервалы между ЭИ были равны 10 мс. Амплитуду Amp варьировали вблизи порога реакции большинства моделей волокон в ансамбле, полагая, что такая

ситуация имеет место при приеме ЭИ, пришедших с дальних дистанций.

Значения пиковых амплитуд компонентов ЭИ превышали пороги реакции волокон ансамбля не более чем на 15 дБ. При задержках между ЭИ в 10 мс реакция, вызванная предыдущим ЭИ, уже не влияла на реакцию, вызванную последующим ЭИ (рис. 1г). Увеличение амплитуды Amp приводило к росту суммарного числа спайков, вызванных ЭИ (рис. 3): при Amp в 3 или 8 или 11 дБ значения $Sum(Pi)$ составили 15 или 73 или 121 спайков.

Ансамбль волокон кодировал каждый из трех низкоамплитудных комплексов (модель ЭИ) сто-

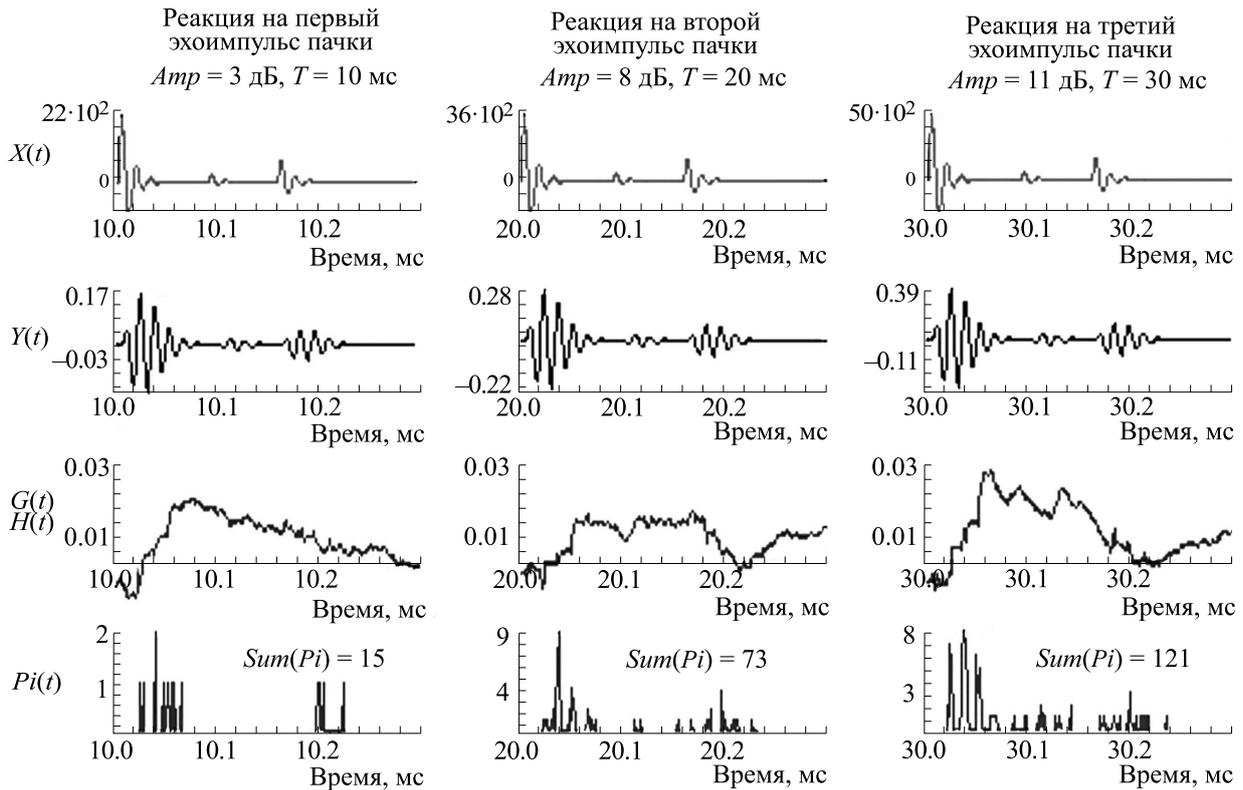


Рис. 3. Реакции разных блоков модели на пачку из трех импульсных комплексов (моделей эхоимпульсов пачки), каждый из которых имел три импульсных компонента. Интервалы между комплексами в пачке — 10 мс. Импульсные компоненты имели амплитуды Amp , $Amp/10$ и $Amp/3$. Задержки второго и третьего комплексов были равны 90 и 70 мкс. Остальные обозначения, как на рис. 1.

хастическим способом. При таком способе каждое волокно в ансамбле могло ответить только один раз, поэтому эффекты маскировки отдельных компонентов ЭИ при интервалах в 90 и 70 мкс не возникали (рис. 3). Профиль реакции на первый комплекс с амплитудой Amp в 3 дБ воспроизводил только два наибольших компонента. Реакции на двух других комплексах с амплитудами Amp в 8 и 11 дБ выявили три компонента. При Amp в 11 дБ реакция на средний наименьший компонент комплекса была подчеркнута по сравнению с таковой в профиле $X(t)$. Это важное свойство кодирования импульсных звуков. За подчеркивание компонентов комплексов отвечали интегрирующие свойства ВВК и стохастический способ кодирования в ансамбле ВСН.

Таким образом, при большой скважности пачки, состоящей из трех моделей ЭИ (рис. 3), периферическое кодирование каждого из них осуществлялось стохастическим способом и не зависело от кодирования других импульсов. Близкорасположенные импульсные компоненты моделей ЭИ также не маскировали друг друга. Вариации параметра Amp способствовали точности воспроизведения временной структуры модели ЭИ. Можно предположить, что излучение пачек

ЗИ и прием пачек ЭИ позволяет дельфину надежно обнаружить жертву на дальних дистанциях, а варьирование амплитуд ЭИ вследствие варьирования амплитуд ЗИ позволяет дельфину идентифицировать жертву на этапе обнаружения.

Воспроизведение временной структуры подпороговых импульсов. Интегрирующие свойства ВВК направлены на повышение отношения сигнал/помех, но могут быть полезными при обнаружении эхоимпульсов дельфинами, например, в условиях реверберации.

На рис. 4 сравниваются реакции, полученные на одиночный импульс, и три импульса с межимпульсными интервалами в 100 мкс. Импульсы имели подпороговые амплитуды. Одиночный импульс и три импульса могли быть закодированы только стохастическим способом. Реакция ансамбля на одиночный импульс содержала 1 спайк, возникший в случайный момент времени. Однако реакция, вызванная тремя импульсами, точно воспроизвела реакцию на третий импульс, поскольку рецепторный потенциал $G(t)$ имел нарастающий профиль. Таким образом, воспроизведению временной структуры импульсов способствовали интегрирующие свойства рецепторных потенциалов $G(t)$ и стохастический способ

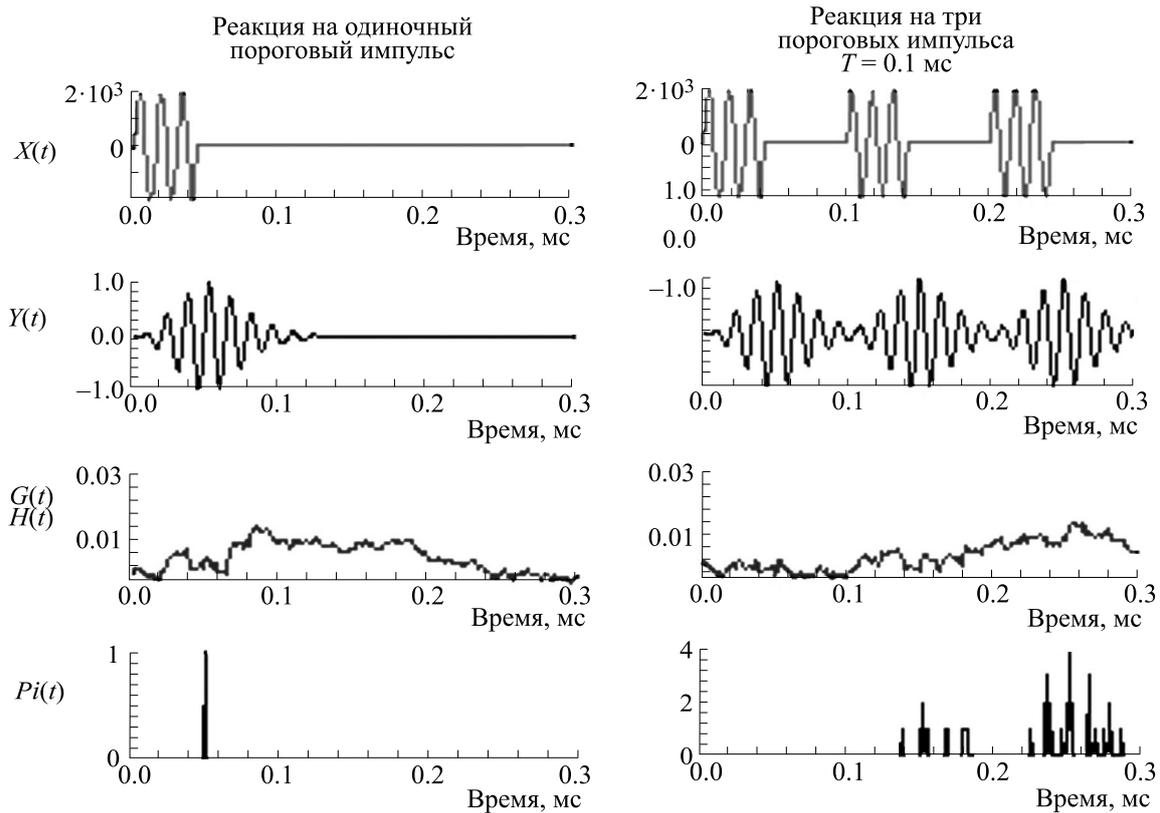


Рис. 4. Реакции разных блоков модели на одиночный импульс и три пороговых импульса с межимпульсными интервалами в 100 мкс. Остальные обозначения, как на рис. 1.

кодирования импульсов в ансамбле, а также соответствие потенциалов $G(t)$ порогу реакции большинства волокон в ансамбле (рис. 4). Группа из трех импульсов могла воспроизводить случай обнаружения эхоимпульсов в присутствии отражений у дельфинов.

Воспроизведение временной структуры импульсов в шуме. Пример выделения временной структуры пары равновеликих импульсов в шуме показан на рис. 5.

Дисперсия шума в этом примере соответствовала пиковой амплитуде импульсов. Поэтому профиль пары импульсов не проявился в профиле смеси сигнала и шума (в функции $X(t)$). Однако модели волокон обладали свойствами адаптации, т.е. волокна могли менять свою чувствительность под действием продолжительных тонов или шумов (в моделях волокон повышение потенциалов $G(t)$ вызывало повышение порогов $H(t)$). Пару импульсов предъявляли через 30 мс после начала шума, т.е. после изменения порогов $H(t)$ волокон. Поэтому ансамбль ВСН мог выявить присутствие пары импульсов в шуме. Чем больше волокон в ансамбле (в приведенном примере число волокон было увеличено в три раза), тем точнее ансамбль воспроизводил структуру входного сигнала.

Таким образом, интегрирующие свойства рецепторных потенциалов $G(t)$ и увеличение числа волокон в ансамбле способствует повышению отношения пиковых амплитуд эхоимпульсов к уровню шума, при котором возможно воспроизведение временной структуры эхоимпульсов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим значение и место данной работы в широком поле исследований эхолокационных способностей дельфинов.

Целенаправленные изменения частоты следования и интенсивности зондирующих импульсов при лоцировании дельфинами объектов в экспериментальных условиях выявлены давно [1, 2, 22]. У диких дельфинов разных видов обнаружена динамическая связь между частотой повторения, интенсивностью излучаемых зондирующих импульсов и дистанцией до объекта локации [8, 9]. Специальная система регистрировала зондирующие импульсы (ЗИ), оценивала расстояние до дельфина, интенсивность (уровень звукового давления) и частоту повторения ЗИ. По мере приближения к объекту дельфины корректировали частоту повторения. Интенсивности ЗИ, как пра-

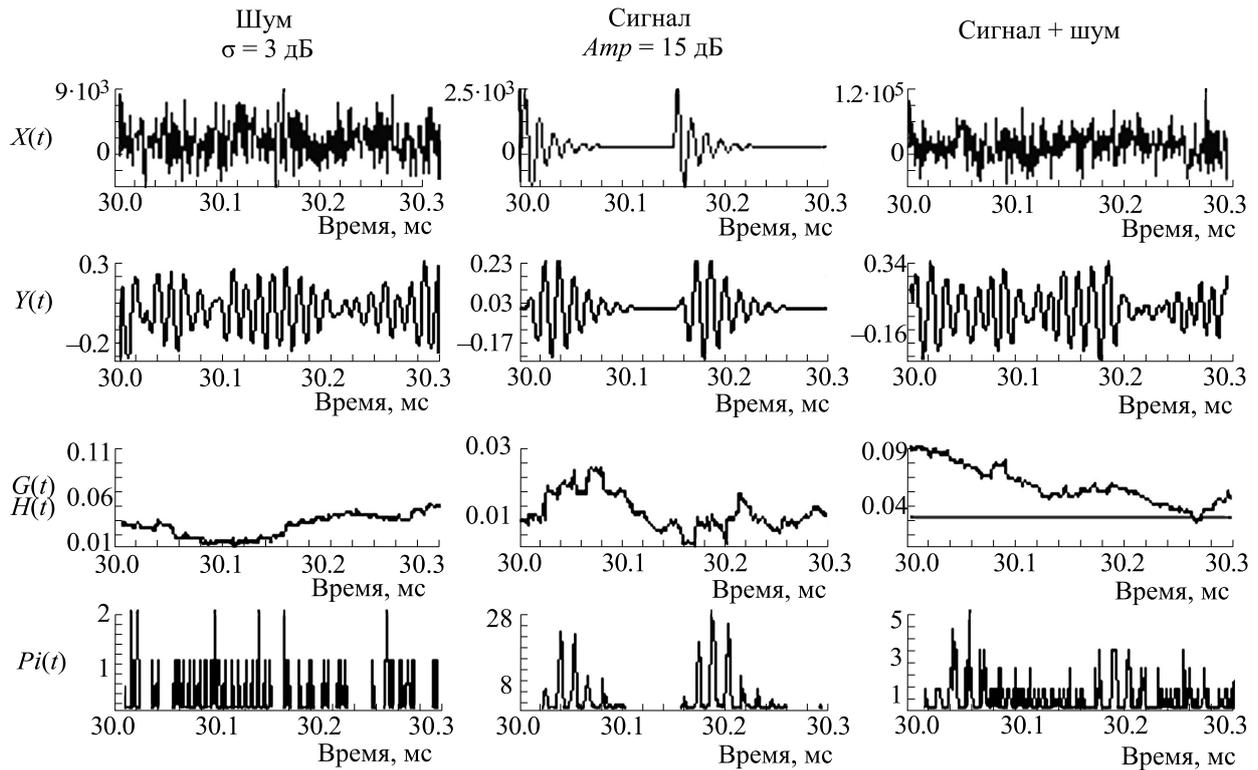


Рис. 5. Реакции разных блоков модели на полосовой шум, пару импульсов с межимпульсным интервалом в 150 мкс и смесь пары импульсов и шума. Остальные обозначения, как на рис. 1.

вило, были высокими при низкой частоте повторения, но уменьшались при увеличении частоты повторения. Изменчивость интенсивности ЗИ при изменении дистанции до объекта наилучшим образом аппроксимировала функция вида $Amp(R) = 20 \log R$, где R – дистанция. Выявленная зависимость указывала, что эхолокатору дельфина присущи свойства систем с автоматической регулировкой усиления (АРУ). Однако регулировка осуществлялась не при приеме эхоимпульсов, а при излучении зондирующих импульсов. Это явление назвали динамическим управлением уровня эхолокационного источника. Есть мнение [23], что динамическое управление является не результатом познавательного процесса, а естественным следствием способа генерации ЗИ у дельфинов. Дельфины генерируют каждый следующий ЗИ после приема отраженного от объекта ЭИ, поэтому частота повторения ЗИ повышается при приближении дельфина к объекту. Щелчки генерируются в назальной системе дельфина путем управления потоком воздуха через акустические губы. Сначала дельфин создает повышенное давление в своей назальной системе, а затем испускает серию ЗИ с относительно низкой

частотой повторения. Авторы предположили, что дельфины способны поддерживать излучаемую акустическую энергию относительно постоянной для каждого цикла повышения давления, поэтому амплитуда ЗИ могла быть высокой при низкой частоте повторения, но должна снижаться по мере увеличения частоты повторения. Было также показано [8, 9], что пиковые амплитуды ЗИ, зарегистрированные на одном и том же расстоянии до объекта, варьировали в диапазоне ± 20 дБ. Причины таких значительных вариаций точно неизвестны.

В данной работе приводятся аргументы в пользу целесообразности вариаций интенсивности зондирующих импульсов. Интенсивность эхоимпульсов зависит от интенсивности ЗИ, расстояния до объекта, силы цели объекта, поглощения звука в среде. При отсутствии априорной информации об объекте вариации интенсивности ЗИ могут помочь дельфину выявить объект за счет подстройки ЭИ под слуховую чувствительность, имеющую место в точке приема ЭИ. Однако надо признать, что значительные вариации интенсивности зондирующих импульсов у дельфинов имеют место как на стадии поиска объекта, так и после его обнаружения.

Другим аргументом в пользу целесообразности варьирования интенсивности ЗИ мог быть способ кодирования высокочастотных импульсов во внутреннем ухе дельфинов, направленный на сохранение максимально полной частотной и временной информации об ЭИ. Под кодированием мы понимали преобразование аналогового рецепторного потенциала внутренних волосковых клеток в последовательность потенциалов действия (спайков) ансамбля волокон слухового нерва. Одиночное инерционное волокно не может воспроизвести временную структуру высокочастотного звука, но, согласно принципу, это может сделать реакция ансамбля ВСН. Принцип залпов был декларирован, но специально не исследован. Морфологические изменения в улитке дельфинов подчеркивают роль реакции ансамбля ВСН в слуховом анализе ЭИ. Количество рецепторных ВВК у дельфинов сопоставимо с таковым у других млекопитающих, в том числе человека, но число клеток спирального ганглия улитки, связанных с одной рецепторной клеткой, у дельфина заметно больше [24–26]. На ~3500 волосковых клеток у человека приходится ~30000 спиральных нейронов, а у афалины – ~95000 спиральных нейронов. В данной работе показано, что для точного воспроизведения тонкой временной структуры ЭИ в реакции ансамбля ВСН важна подстройка рецепторного потенциала $G(t)$ под чувствительность большинства волокон ансамбля. При такой подстройке реализуется стохастический способ кодирования ЭИ, эффективность которого тем выше, чем больше число волокон в ансамбле. Однако не только вариации интенсивности ЗИ могут способствовать подстройке.

Путем регистрации слуховых вызванных потенциалов у дельфинов [4, 5, 20] показано, что на коротких дистанциях до объектов за такую подстроку могло отвечать взаимодействие ЭИ и ЗИ. Высокоинтенсивный ЗИ мог маскировать ЭИ. Согласно полученным нами данным, основой такой маскировки, могли быть рефрактерные свойства волокон ансамбля, вызванные зондирующим импульсом. За счет этих свойств, пороги реакции волокон в ансамбле повышались и подстраивались под вызванный эхоимпульсом рецепторный потенциал волосковых клеток, поэтому реакция ансамбля воспроизвести временной профиль ЭИ (рис.2).

Еще один вариант слухового взаимодействия ЗИ и ЭИ на коротких дистанциях до объектов рассмотрен в работах [5, 6]. Авторы оценили слуховую чувствительность касатки по порогам появления СВП в ответ на тональные сигналы, которые излучали во время лоцирования животным мишеней. Показано, что пороги возникновения СВП, вызванные тональным сигналом одной и той же интенсивности, различались на 20 дБ, если

при предъявлении тонального сигнала дельфин лоцировал пространство, в котором присутствовала или отсутствовала мишень. При отсутствии мишени пороги были ниже. По мнению авторов, причиной наблюдаемых изменений порогов обнаружения могли быть стремянный рефлекс среднего уха или эффект слуховой адаптации. Эти эффекты могли подавлять реакцию на ЭИ.

Действительно, адаптацию, которая снижает слуховую чувствительность, вызывают длительные звуковые воздействия. На рис. 5 в данной работе приведен пример, в котором адаптация, вызванная шумом, способствовала обнаружению импульсного сигнала. Помимо этого, проведенные исследования [27, 28] показали, что благодаря свойствам адаптации выделение и анализ импульсных звуков, предъявляемых на фоне помеховых сигналов, может быть лучше, чем в тишине.

Известно, что громкие звуки провоцируют стремянный рефлекс, вызывающий защитное снижение слуховой чувствительности уже на уровне среднего уха. У летучих мышей чувствительность слуха понижается за счет сокращения мышц в среднем ухе непосредственно перед излучением ЗИ [29]. Однако роль среднего уха и механизмы его функционирования у дельфинов не ясны [24, 25]. Цепочка слуховых косточек усилена и жестко связана с кольцевыми связками, а сами косточки плотнее и массивнее, чем у наземных млекопитающих соответствующего размера. Такие изменения могут препятствовать рефлексу среднего уха [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Слуховое периферическое кодирование высокочастотных эхолокационных импульсов включает в себя преобразование рецепторных потенциалов волосковых клеток в последовательность потенциалов действия (спайков) ансамбля волокон. Моделирование показало, что ансамбль волокон может кодировать короткие звуки двумя способами. Низкоамплитудные импульсы могут быть закодированы ансамблем волокон стохастическим способом. При таком способе каждое волокно в ансамбле отвечает один раз, поэтому составляющие импульсных звуков не маскируют друг друга. Этот способ кодирования позволяет восстановить тонкую временную структуру короткого импульса. Восстановление тем точнее, чем ближе амплитуда одиночного импульса к порогу реакции большинства волокон слухового нерва. Способ кодирования пар высокоамплитудных импульсов с интервалами, превышающими единицы миллисекунд, детерминистический. В этом случае в ответ на пару импульсов волокна в ансамбле отвечают более одного раза. Реакция на второй импульс определяется свойствами вос-

становления возбудимости волокон ансамбля (рефрактерностью и адаптацией), вызывающими снижение возбудимости волокон после реакции на первый импульс. Поэтому восстановление временного профиля второго импульса пары может зависеть от амплитуд импульсов пары и задержки между ними.

2. Моделирование воспроизводит стабилизацию слуховых реакций на ЭИ, наблюдаемую при коротких задержках T между ЗИ и ЭИ. Пара импульсов (ЗИ и ЭИ) закодирована ансамблем волокон детерминистическим способом. Реакция на второй импульс (ЭИ) формируется с учетом рефрактерных свойств волокон ансамбля, возникающих под действием первого импульса, а также свойствами распространения ЭИ в воде. Такое взаимодействие может подстроить чувствительности слуховой системы дельфина под амплитуду отраженного от объекта ЭИ и обеспечить стабильную реакцию на ЭИ во время охоты в фазе захвата.

3. На средних дистанциях до объектов дельфины излучают следующий ЗИ после приема ЭИ, но варьируют интенсивность ЗИ в широком диапазоне. Моделирование указывает на целесообразность варьирования амплитуд ЗИ. Варьирование представляется механизмом подстройки интенсивности ЭИ под чувствительность слуха дельфина в точке приема, сформированную окружающими шумами.

Для обнаружения объектов на дальних дистанциях или объектов с малыми силами цели на средних дистанциях дельфины могут излучать пачки переменных по амплитуде ЗИ. Излучение пачек ЗИ и прием пачек ЭИ помогает дельфину надежно обнаружить жертву на дальних дистанциях, а варьирование амплитуд ЗИ (и поэтому ЭИ) позволяет идентифицировать жертву на этапе обнаружения.

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. В. М. Белькович и Н. А. Дубровский, *Сенсорные основы ориентации китообразных* (Наука, Л., 1976).
2. W.W. L. Au, *Sonar of Dolphins* (Springer, N. Y., 1993).
3. В. М. Белькович, Е. Е. Иванова и О. В. Ефременкова, в сб. *Поведение и биоакустика дельфинов* (ИОАН, М., 1978), сс. 67–78.
4. А. Ya. Supin, P. E. Nachtigall, and M. Breese, *J. Acoust. Soc. Am.* **115**, 3218 (2004).
5. А. Ya. Supin, P. E. Nachtigall, and M. Breese, *J. Acoust. Soc. Am.* **123**, 534 (2008).
6. В. В. Попов и А. Я. Супин, *Слух китов и дельфинов* (ООО «Товарищество научных изданий КМК», М., 2013).
7. Н. А. Дубровский, Л. К. Римская-Корсакова и Р. П. Трошенкова, в сб. *Докл. XI Всесоюз. акустич. конф-ии*, секция Ц (М., 1991), сс. 9–12.
8. W. W. L. Au and K. J. Benoit-Bird, *Nature* **423**, 861 (2003).
9. S. Li, D. Wang, K. Wang, and T. Akamatsu, *J. Acoust. Soc. Am.* **120**, 1803 (2006).
10. Л. К. Римская-Корсакова и Н. А. Дубровский, *Акустич. журн.* **52**, 521 (2006).
11. М. П. Иванов, в сб. *Труды IY между. конф. «Морские млекопитающие Голарктики»* (СПб, 2006), сс. 218–222.
12. P. M. Sellick and I. J. Russell, *Hear. Res.* **2** (3–4), 439 (1980).
13. Л. К. Римская-Корсакова и Н. А. Дубровский, *Сенсорные системы* **4**, 92 (1990).
14. N. A. Dubrovsky and L. K. Rimskaya-Korsakova, in *Marine Mammal Sensory Systems* (Plenum Press, N.Y., 1992), pp. 223–233.
15. N.A. Dubrovsky and L.K. Rimskaya-Korsakova, *Neural Network World* **6**, 577 (1996).
16. Н. Г. Бибииков и Г. А. Иваницкий, *Биофизика* **30**, 141 (1985).
17. Н. Г. Бибииков, Л. К. Римская-Корсакова, А. В. Занин и Н. А. Дубровский, в сб. *Электрофизиология сенсорных систем морских млекопитающих*, под ред. В. Е. Соколова (Наука, М., 1986), сс. 56–84.
18. Л. К. Римская-Корсакова, *Сенсорные системы* **12**, 376 (1998).
19. Л. К. Римская-Корсакова и Н. А. Дубровский, *Сенсорные системы* **17**, 1 (2003).
20. L. Robles and M. A. Ruggero, *Physiol. Rev.* **81**, 1305 (2001).
21. Л. К. Римская-Корсакова, *Акустич. журн.* **63**, 436 (2017).
22. Л. Р. Гиро и Н. А. Дубровский, *Морское приборостроение, сер. Акустика.* **2**, 84 (1972).
23. S. H. Ridgway, W. W. L. Au, *Encyclopedia of Neuroscience* **4**, 1031 (2009).
24. D. R. Ketten, *Bioacoustics* **8**, 103 (1997).
25. D.R. Ketten, in *Hearing by Whales and Dolphins*, Ed. by W. W. L. Au, A. N. Popper, and R. R. Fay, (Springer-Verlag, N.Y., 2000), pp. 43–108.
26. E. G. Wever, J. G. McCormic, H. Palin, and S. H. Ridgway, *Proc. Math. Acad. Sci. USA* **68**, 2381 (1971).
27. Л. К. Римская-Корсакова, *Изв. РАН. Сер. физ.* **70**, 138 (2006).
28. L. K. Rimskaya-Korsakova, *J. Optic. Technol.* **72**, 383 (2005).
29. L. A. Simmons, A. J. M. Moffat, and W. M. Masters, *J. Acoust. Soc. Am.* **91**, 1150 (1992).

Distance-Dependent Gain Control of Echo-Pulses to Auditory Sensitivity in Dolphins: Simulation Experiments

L.K. Rimskaya-Korsakova*, A.A. Rodionov**, and M.P. Ivanov***

*JSC Andreyev Acoustics Institute, ul. Shvernika 4, Moscow, 117036 Russia

**Saint Petersburg Branch of the Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 5, St. Petersburg, 199034 Russia

Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint-Petersburg, 199034 Russia

Dolphins use echolocation during hunting. They emit acoustic pulses and analyze returning echoes to detect and identify the prey during the search phase. However, in the hunting capture phase, dolphins must have a stable sonar system in response to echo information they receive. In order to explain the features of echolocation in dolphins during the search and capture phases, the responses of the ensemble of high-frequency peripheral fibres were simulated. Pairs of pulses with central frequencies of 70 kHz, different inter pulse intervals and peak amplitudes were models of probing and echo pulses of dolphins. Pulses arrived at the input of a model with different stages of peripheral processing, including the transformation of the receptor potential of inner hair cells into a sequence of action potentials (spikes) generated by the ensemble of auditory nerve fibers. It is shown that an important condition for the reproduction of the fine temporal structure of an echo pulse in a synchronous ensemble reaction is the correspondence of the arising receptor potential to the thresholds of most fibers in the ensemble. For short delays between the pulses of the pair (in the capture stage), this correspondence causes an increase in the fiber thresholds due to the refractory properties of the fibers caused by the first pulse (models of the probing impulse). For long delays between the pulses of the pair (in the search stage), variations in the peak amplitudes of echo pulses could help to such a correspondence (models of the probing impulse). Modeling indicates a difference in the methods of matching echo pulses with the auditory sensitivity of dolphins in the phases of search and capture of the prey.

Keywords: echolocation, peripheral coding, auditory nerve fibers, reproduction of the temporal structure of echo pulses

НЕПРЕРЫВНАЯ МОДЕЛЬ ТРЕХ СЦЕНАРИЕВ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ФАКТОРАХ ЗАПАЗДЫВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

© 2021 г. А.Ю. Переварюха

Санкт–Петербургский институт информатики и автоматизации РАН,
199178, Санкт–Петербург, 14–я линия, 39

E-mail: temp_elf@mail.ru

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.

После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 20.11.2020 г.

Рассмотрены модели развития инфекции как регулируемые нелинейные процессы. Актуальным вопросом для анализа оказались существенные различия в динамике протекания вызванного коронавирусом нового заболевания. Множество факторов рассматриваются как причины явления, когда инфекция протекает столь вариативно у разных людей и распространяется в локальных популяциях с различной скоростью. Репликация копий вируса в зараженных им клетках и выработка ответа от иммунных клеток организма это два взаимообусловленных процесса с последствием и зависящие от предшествующих состояний. Моделирование их свойств требует получения разных сценариев без возмущений параметров. Важнейшим фактором является эффективность иммунного ответа, включающая время реакции трех компонентов сложнейшей системы организма. Нами предложено вычислительное описание сценариев развития инфекции на основе уравнения с двумя параметрами запаздывания. Переходы между фазами течения инфекционного заболевания в модели обусловлены аспектами уровня первичного заражения и запаздывающей реакции при выработке иммунного ответа. Вариации дозы заражения и времени ответа способны приводить к переходу острой фазы заболевания с выраженными симптомами в хроническое течение либо к летальному результату. В разработанной модели рассмотрен бессимптомный вариант развития – быстрого эффективного подавления вируса после краткой фазы его активной репликации, но сохранении малого количества в организме. Анализ режимов поведения модели соответствует теории, что начальное количество вирионов способно повлиять на качество иммунного ответа. Индивидуальные различия в протекании заболевания COVID-19 и формирование типов иммунного ответа к вирусу явно велики, но сейчас недостаточно понятны. Модельные сценарии ориентируются на изученные варианты протекания вирусного гепатита С.

Ключевые слова: моделирование инфекционных процессов, запаздывающая регуляция, иммунный ответ, модель хронизации гепатита С, начальная доза заражения, эпидемии, скорость распространения вируса, бессимптомный сценарий, варибельность COVID-19.

DOI: 10.31857/S0006302921020204

В статье развивается тематика исследований предыдущей работы о моделировании экстремальных и особых переходных режимов существования агрессивного вида в новой среде [1], но с использованием иного математического аппарата для этой актуальной задачи. Для специфической биологической коллизии необходимо конструировать и выбирать наиболее подходящий метод моделирования. Общим должен оставаться принцип рассмотрения логики развития ситуации – как набора вычислительных сценариев. Процессы взаимодействия видов редко протекают по единственному возможному пути [2]. Значительна вариативность развития динамики инвазий при вселении чужеродных видов в разные ареалы [3]. Аналогично отличаются непостоян-

ством темпы распространения инфекционных заболеваний в субпопуляциях. Заражение патогенным вирусом можно отнести к частной форме инвазионных процессов, но протекающих с активным сопротивлением, где решается исход борьбы систем защиты организма и эволюционирующего в нем паразита.

Цель работы заключается в обосновании феноменологической модели, способной описать видимые различия в форме протекания заболевания в зависимости от начальной дозы вируса при инфицировании и времени, которое затрачено для выработки эффективного ответа. Поэтому если в модели вспышки численности вредителей леса мы использовали итерационную хаотическую динамику траектории с набором управляе-

мых бифуркаций, то для объяснения вариантов исхода в ситуации противоборства с вирусом больше подходит непрерывная модель. Формализуем запаздывающую регуляцию при формировании ответной реакции в уравнении с учетом предпороговой величины вирусной нагрузки, когда влияние инфекции на организм становится значимым фактором. Введенная предкритическая концентрация вместе с двумя показателями запаздывания ответа должна различаться для разных организмов, что объяснит вариативные сценарии протекания заболевания при различной начальной дозе заражения. Модель разрабатывалась для описания сценариев хронизации вирусного гепатита С после острой фазы. В модели рассмотрен «бессимптомный» вариант развития с сохранением возбудителя — актуальное обстоятельство необычного протекания новой болезни COVID-19.

В год пандемии интересно обсудить, почему скорость распространения инфекции так неравномерна и при этом наблюдается несколько вариантов фазы затухания локальных эпидемий, в том числе с точки зрения эффективности ограничительных мер. В первой части статьи анализируем текущую информацию о качественной динамике эпидемии вируса SARS-CoV-2, предложим некоторые объяснения различий с точки зрения неопределенности регуляции процессов. Отметим необычные аспекты — переходные типы и математическую классификацию сценариев в отдельных регионах, на которые специалистам нужно обратить пристальное внимание при моделировании сроков завершения эпидемического процесса и прогнозирования рецидивов распространения нового РНК-вируса, возможно мутировавшего.

РАЗЛИЧИЯ И ОБЩНОСТЬ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ГЛОБАЛИЗАЦИИ

Давно известен факт, что эпидемии в странах развиваются по различным сценариям. Например, существенные отличия установлены для вируса Эбола в регионах Африки [4]. Есть несколько отличительных черт и странных явлений у современной пандемии, что расширит пространство для построения гипотез. После окончания пандемии SARS-CoV-2 многие эпидемиологи и математики продолжат несколько лет анализировать эффективность изоляционных мер в разных странах, сравнивать графики и строить модельные прогнозы для будущих эпидемий, проводя обработку текущих данных о новом бетакоронавирусе; разумеется, они придут к противоположным выводам, что мы уже видели по многим другим примерам [5].

По сравнению с эпидемической волной в США в Мексике количество заболевших увеличивается на порядок медленнее. В США по общим данным видим пример худшей формы стремительной эпидемии, реализации затяжного П-образного пика. Разнообразие в формах качественной динамики эпидемий по отдельным штатам США столь сильно выражено, что специалистам трудно обосновать прогноз заболеваемости в соседних штатах.

Разница в темпах распространения вируса так очевидна, что со стороны Мексики шутят о готовности самим достроить стену на границе. Вирус оказался бессилён во Вьетнаме — на момент написания статьи ни одного летального исхода в их статистике. После 180000 проведенных тестов 20 апреля 2020 г. Вьетнам заявил об отражении угрозы и снятии ограничительных мер. Национальные стереотипы поведения не стоит игнорировать в предсказаниях. Итальянцы могли сильнее пострадать из-за своей общительности и разговорчивости [6], и этому есть физическое обоснование. В исследовании о путях передачи вируса [7] объясняется, что при интенсивном разговоре создаются вихри микроскопических капель слюны, разносящих вирус, и чем громче разговор, тем больше разбрасывается вирионов и выше вероятность переноса возбудителя.

Пример разных последствий «испанки» в двух городах США сто лет назад стал хрестоматийным. Графики эпидемии гриппа (считали смертность на 100000 человек) в Филадельфии и Сент-Луисе показывают два основных сценария. На дихотомию пути развития эпидемического процесса 1919 г. опирались в марте директивы при вводе ограничений мобильности. Так обосновывают изоляционные меры, которые успели ввести в Сент-Луисе, и отменить все мероприятия и удачно избежали взрывообразной фазы процесса — с Λ -образным пиком (смертности). Объединять в статистике столь несхожие локальные сценарии совершенно нецелесообразно, агрегированные данные по заболеваемости введут в заблуждение. Спустя два месяца эпидемии единичный Λ -пик уже не кажется таким ужасным на фоне экономического коллапса. Во многих городах США «выход на плато» сменяется вдруг повторным ростом. Замедлившаяся динамика заражений коронавирусом неожиданно вновь ускоряется и таким образом дифференциация эпидемических сценариев в 2020 г. увеличивается.

Вопрос о причинах дихотомии эпидемических сценариев — краеугольный [8]. Либо в первые две недели произойдет стремительный рост, когда ресурсы системы здравоохранения не справляются с потоком тяжелых больных, либо процесс перейдет в плавную (или спорадическую) форму. Отметим, что Филадельфия с классиче-

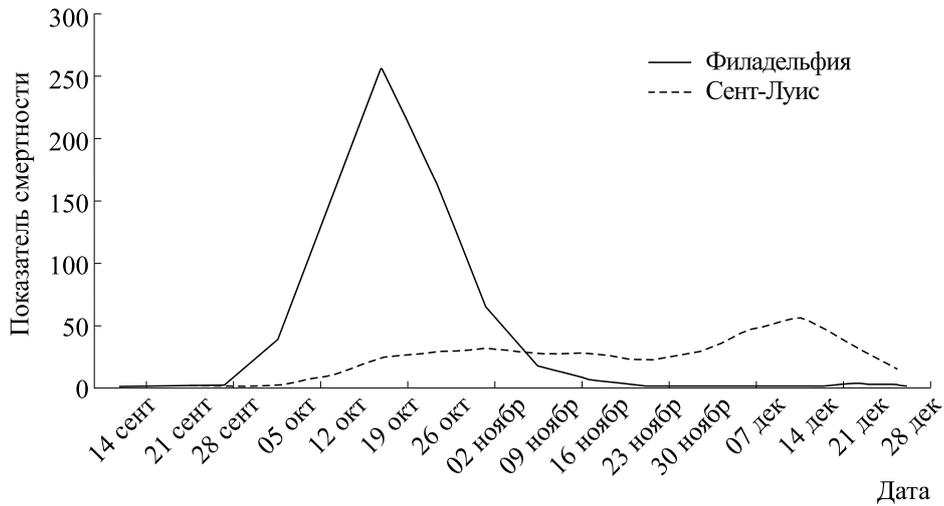


Рис. 1. Сравнение развития в 1918 г. эпидемии испанки (по смертности) в двух городах США.

ским Λ -пиком является портовым городом и центром коммуникаций. Следовательно, изначально в исходных условиях для запуска эпидемии в двух городах предполагается существенное отличие. Каждый исходный распространитель вызывает цепочку заражений и иногда непредсказуемо массовых.

Логично, что в портовый город проникает большее количество инфицированных и из очагов заражения, возможно, скрытых носителей, так называемых «нулевых пациентов», что может сократить интервал перехода к ускоряющемуся росту числа заражений и не оставить времени для принятия необходимых мер. На графики, приведенные на рис. 1, часто ссылаются как на наглядный назидательный пример, но нужно признать, что два города в точке отсчета не были в одинаковых исходных условиях. Точно не доказано, откуда появился вирус в 1918 г. и был ли повар военного лагеря в Канзасе первой жертвой. После повторного пика в крупных городах с большей смертностью «испанка» загадочно навсегда исчезла из Европы в июне 1919 г. [9], хотя «синюю смерть» ждали и в 1920 г. Прогнозировать время завершения эпидемии — сложная и достаточно многофакторная задача для детерминированных моделей.

Критическая ситуация в США с коронавирусом наблюдалась Нью-Йорке в апреле 2020 г. Это крупнейший центр китайской диаспоры и исторически эмигрантские ворота Северной Америки. Рано или поздно новый вирус привезут повсюду — это следствие глобализации. В некоторые города прибудет сразу много распространителей вируса. Цепочки распространения умножатся, и тогда местные больницы окажутся сразу перед фактом серии эпидемических волн.

Обоснована теория [10], что эпидемия (как и вспышка численности инвазионного вида) стремительно ускоряется при достижении некоторого порога — концентрации заболевших в популяции — и аналогично резко затухает, когда образовывается достаточный коллективный иммунитет у переболевших и невосприимчивых. Математически идея базируется [11], в том числе, на модификациях пороговой теоремы Уитла, когда эпидемия представляется как ветвящийся случайный процесс [12], в котором для всех есть априорная вероятность перехода узла из временного состояния «больной» в положение «иммунизированный» [13].

После достижения 500 случаев в день эпидемия в США, судя по обновляемому графику, действительно резко ускорилась. Число заболевающих в сутки моментально увеличилось в четыре раза. Это выглядит на графике как «скачок» через порог, где за созданием критической концентрации стоит цепь событий. На самом деле эти люди болели уже давно, так как график выявленных случаев — это фиксация состояния эпидемического процесса (с неполными данными) с неопределенным запаздыванием. Реальное пороговое состояние — концентрация инфицированных, после которого запущена эруптивная фаза вспышки в очаге, пройдено немного левее по оси времени и при меньшем числе (фиксированных) случаев заражения.

На обновляемом графике текущей статистики по странам мира (например, на сайте Financial Times) видно, что карантинные ограничительные меры эффективно сработали, если были введены после первых единичных случаев, как было четко организовано в Южной Корее. Когда «stayhome» вводится позже и вяло, то это совсем не быстро меняет качество процесса. Эпидемический про-

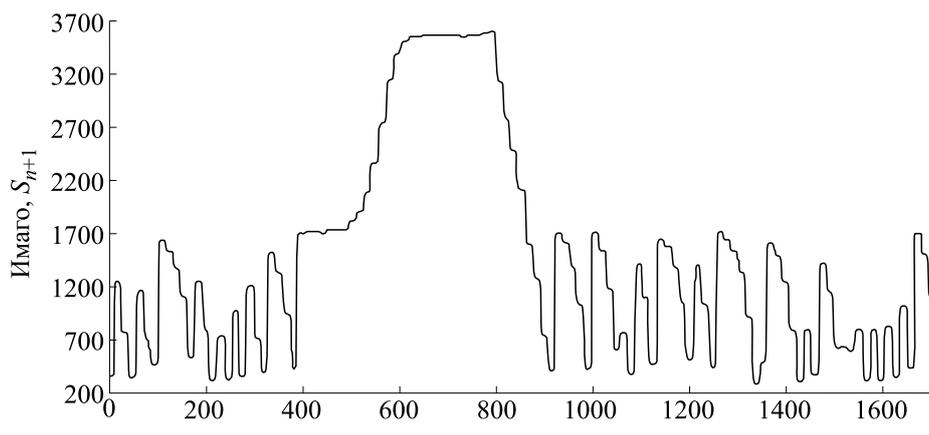


Рис. 2. Моделирование порогового сценария популяционной вспышки затуханием (из работы [1]).

цесс оказывается инерционным. Ирландия ввела «stayhome» 20.03.2020 г. и ужесточила карантин 24.03.2020 г. К 08.04.2020 г. Ирландия вышла на «плато» — по гладкой логистической кривой было 380 новых случаев, потом эпидемия вдруг резко ускорилась и 09.04.2020 г. наблюдалось 500 случаев, а 11.04.2020 г. уже оказалась превышена «психологически важная отметка» в 1500 случаев за сутки. Ирландия — интересный пример, когда достижение модельного равновесия, где рост должен остановиться («плато»), оказывается вдруг пороговым значением и неожиданно для всех резко ускоряет эпидемию. К 05.05.2020 г. суточные показатели Ирландии так и не снизились до уровня, наблюдавшегося 8 апреля. Вероятно, итоговые показатели по смертности на 100 000 человек не будут сильно различаться с «бескарантинной» Швецией. Гипотеза, которая возникает после анализа, состоит в том, что если принцип «сидим дома» запоздал, то пика никак не избежать, работает принцип «если опоздали, то опоздали».

Швеция не вводила принцип «сидим дома», там не было классического эпидемического Λ -пика, но будет тянуться долго перемежающаяся волнительная динамика роста/сокращения новых случаев. 21.04.2020 г. в Швеции было выявлено 700 заболевших, а в Италии, где давно введено положение «stai a casa», — 3500 случаев. При качественном анализе эпидемического процесса данные заболеваемости по мегаполисам нужно анализировать отдельно от агрегированной статистики по всей стране, что особенно актуально для Москвы, Нью-Йорка, Мехико, где плотность населения много больше, чем в среднем по стране. Некоторые страны (Франция) вносят задним числом сразу ранее пропущенные случаи, что искажает сценарий процесса и создает ложные максимумы в статистике заражений.

Как оказалось, китайские антиэпидемические методы работают только в Китае. Гонконг и Сингапур уже заявляли о победе над эпидемией, но власти Сингапура ждут повторные вспышки из-за потребности в иностранных рабочих. После пика статистика ежедневных случаев заражения часто становится перемежающейся, действует фактор неоднородной задержки в процедуре выявления. Чаще больной выявляется, когда возникают симптомы и уже есть иммунный ответ. Важен фактор скрытого развития инфекционного процесса внутри организма, что создает эффект комплексного запаздывания при распространении, потому временный спад числа заражений не нужно трактовать как успех. В Иране с июня сообщают об уже очевидной «второй волне» эпидемии после затишья.

Эпидемия в Германии развивалась по плавному сценарию (здесь акцентируем внимание на второй производной) по сравнению с Италией и Испанией, где от старта до первого максимума прошло соответственно 16 и 20 дней. Сценарий с быстрым пиком похож на пороговый запуск вспышки численности после длительной стабилизации в окрестности неустойчивого равновесия из нашей предыдущей работы [1] (см. рис. 2). После «плато» здесь развивается турбулентный режим.

В случае эпидемии сходство наблюдается в некоторых случаях у фазы порогового перехода от флуктуаций к быстрому росту. Завершение эпидемии редко бывает аналогично резким, как при падении численности размножившихся насекомых. Так, в Италии и в Испании долгое медленное снижение ежедневных случаев перемежается локальными пиками.

COVID-19 распространяется быстрее «свиного гриппа» со средним инкубационным периодом 5.5 суток [14], но с диапазоном инкубационного периода от 0 до 15 суток (по данным из Уханя

[15]). Уже в Ухане отмечали возможностью передачи вируса на бессимптомной стадии — при развитии инфекции при попустительстве адаптивного иммунитета. Интервал до основной неспецифической реакции организма на респираторную инфекцию — повышения температуры (и до выброса пирогенных интерлейкинов) у COVID-19 в среднем больше [16], чем был в 2003 г. у родственного SARS-вируса. В работе [17] отмечено, что нейтрализующие антитела были обнаружены (с использованием псевдовиральных частиц) в 79, 92 и 98% проб, взятых соответственно через 13–20, 21–27 и 28–41 сутки после появления симптомов у зараженных сотрудников больниц, которым не требовалась госпитализация. Это однозначно медленная реакция по сравнению с ответом на большинство вирусов острых респираторных инфекций. О Т-киллерах данных нет. По важной, но неясной еще причине медиаторы иммунитета значительной доли инфицированных не сильно торопятся активироваться в ответ на SARS-CoV-2. Вирусу это выгодно для скрытого распространения, но может оказаться, что видимая неспешность ответа предохраняет от большего риска, когда начальная доза не расщепляется как критическая.

Биологические причины такой большой для острых респираторных вирусных инфекций дисперсии латентной фазы болезни еще долго останутся предметом исследований и дискуссий медиков. Уделяют внимание необычным сопутствующим признакам — другим невыраженным и необычным для острых респираторных вирусных инфекций симптомам, таким как потеря обоняния и вкуса [18]. Разумно предположить, что есть пороговое значение концентрации вирионов, после которого резко проявляются симптомы. В работе [19] итальянскими медиками опубликованы неожиданные результаты. Они дважды протестировали большую часть (90 и 80%) жителей муниципалитета. 40% выявленных случаев названы бессимптомными. Итальянцы утверждают, что определенная ими вирусная нагрузка у носителей вируса с явными симптомами и «бессимптомными» людьми не отличалась. Наблюдение сейчас не имеет достоверного объяснения. Осторожнее говорить не о «бессимптомном», а о вялотекущем сценарии болезни. Математически это значит сохранение репликации вируса в стабильном равновесии (на неопределенный срок). Если симптомы не появились через неделю, не факт, что они не проявятся через год. Есть вирусы, которые годами пребывают в субклинической стадии (например, ВИЧ). Другие средства сдерживания инфекции могут начать истощаться или вирус сможет их обманывать путем антигенного дрейфа в организме. Объясняется различие скорости прогрессирования болезни ВИЧ тем, что у одних людей антитела способны связываться большей до-

лей вариаций вирусного гликопротеина, у других авидитет получается с малой долей вирионов. Иммунитет реагирует на антигены, отдельные части белков возбудителя, но эти участки бывают изменчивы. Одни участки изменятся быстро, а другие консервативны. Количественные показатели иммунного ответа по антителам не говорят об эффективности подавления вируса, когда не находится стабильно аффинных вариантов иммуноглобулинов. Это вероятный фактор эффективности ответа. Известны ситуации, когда вирус уходит, но спровоцированное системное воспаление останется.

В 2020 г. сложилась уникальная возможность для специалистов по моделированию следить за эпидемическими траекториями стран в реальном режиме и делать быстро проверяемые прогнозы, но предсказания рушатся одно за другим из-за особых свойств COVID-19. В сложившейся ситуации информативными данными являются изменения доли положительных тестов от числа проведенных за сутки, но такие сведения не публикуются. Невозможно строить долгосрочные модельные прогнозы по будущему COVID-19, пока не установлено главное — как формируется иммунитет, с какой скоростью реагируют разные компоненты системы и как долго сохраняется защита у переболевших. Интересно для моделирования получить данные о самой ранней стадии развития COVID-19, так как в нелинейных системах переходные режимы и пороговые эффекты распространения инфекции могут зависеть от начальных условий. Другой важный вопрос — влияет ли начальная доза заражения и на скорость развития пневмонии, и на иммунный ответ, который бывает агрессивен сродни цепной ядерной реакции и притом безрезультатен. Актуальная модель вариантов развития нового заболевания должна обладать чувствительностью к $N(0)$.

ОСОБЕННОСТИ ВОСПРИЯТИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СТАТИСТИКИ

Наличие статистических данных о распространности вируса не гарантирует правильных выводов. Систематически тестировать все население начали сразу только Исландия и отчасти Австралия, когда поняли, что инфицированный через три дня уже является распространителем. Для будущих работ по анализу COVID их данные послужат эталоном статистики. На острове поняли, что изолировать нужно инфицированных, а не здоровых. Деньги же эффективнее тратить на средства для массового тестирования. На рис. 3 приведено сравнение с данными процентного распределения коронавирусной статистики Нидерландов, где тестировали только попадавших в лечебные учреждения с симптомами острых респираторных вирусных инфекций. Не зная этого

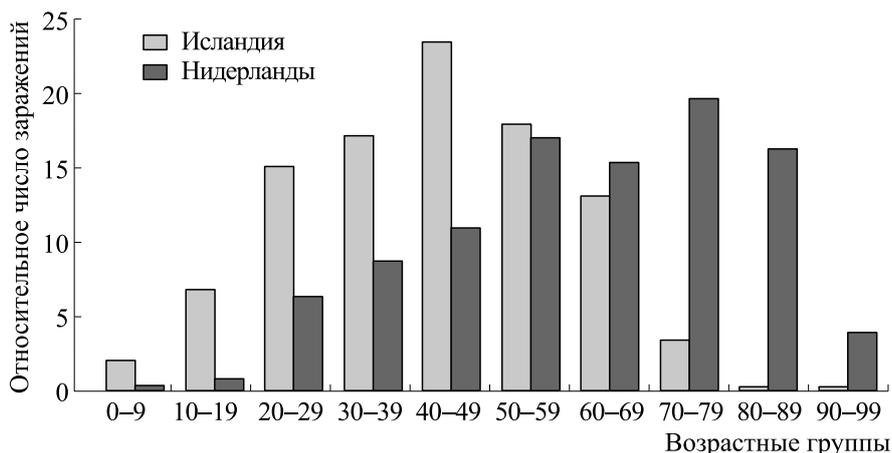


Рис. 3. Распределение относительного числа заражений коронавирусом по возрастным группам по данным из Исландии и Нидерландов (с сайта <https://www.covid.is>).

факта, впоследствии биолог или статистик может решить, что популяция исландцев имела какие-то генетические отличия в восприимчивости к вирусам, накопленные в долгой изоляции на острове при низком генетическом разнообразии.

Данные из Исландии разрушают миф о том, что коронавирусом болеют чаще люди старшей возрастной группы. Чаще болеют люди среднего возраста. У пожилых в среднем интенсивнее проявляются осложнения. Тогда если тестировать только тех, кто обратился к врачам, то максимум придется на 60+. COVID – это не первая инфекция, которую более юные переносят легче. Многие знают, как неприятно заболеть краснухой в зрелом возрасте. Наш иммунитет – обучаемая самонастраиваемая система защиты из нескольких уровней, которой легче воспринимать и побеждать новое в молодости, чем в дальнейшем срочно переучиваться для внезапных угроз. Когда существует простое объяснение, то для математических моделей лучше использовать наиболее логичные связи между фактами.

ПРОБЛЕМЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И СОПОСТАВЛЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ЭПИДЕМИЙ

Для вызывающих эпидемии вирусов устанавливается оценка базового репродуктивного числа R_0 . Это число предполагает, сколько один носитель в среднем заражает других. Для вируса SARS-CoV-2 определяли $R_0 = 2.0$ по результатам математического моделирования [20] и $R_0 = 2.5$ [15] по статистике из Уханя (есть основания считать, что данные занижались), но это значение R_0 скорее является статистическим показателем для справочников. Эта характеристика не объясняет стремительных локальных вспышек. В Италии базо-

вое репродуктивное число явно увеличилось [19]. Пусть среднестатистический больной COVID-19 заражает 3.5 других, но есть способные заразить и намного больше. Существует гипотеза суперраспространителей и указываются примеры такой активности [21]. Так, например, объясняется возникшая эпидемия ВИЧ в 1980 г. из-за действий одного канадского бортпроводника, заразившего сотни человек по всей Северной Америке, хотя вирус попал в США десятилетиями ранее. Первый подтвержденный случай ВИЧ был датирован 1966 г. в Сент-Луисе, но быстрая фаза эпидемии не разразилась во время «лета любви» 1969 г., а медленно тлела целых 11 лет. В XIX в. описаны единичные случаи распространителей брюшного тифа, которые от симптомов тифа не страдали, но вызывали массовые заражения.

В классических моделях с использованием систем обыкновенных дифференциальных уравнений триггерные эффекты и импульсную активность учесть затруднительно. Актуально рассматривать именно импульсные сценарии с учетом массовых случаев одномоментного заражения и их пролонгированных последствий, эффект инерции в динамике эпидемии. Триггерами ускорения эпидемии стали футбольные матчи: например, Аталанта против Валенсии. Одно событие привело к появлению группы инфицированных активных распространителей болельщиков «тифози» в Бергамо, что спровоцировало Λ -образный пик эпидемии с оцененной на данный момент смертностью 12%. Именно смертность является ключевой характеристикой при сравнении разных эпидемий, а не только скорость роста заболевших.

Сравнивать можно то, что сопоставимо – страны, близкие по уровню доступности медицины и ведущие непредвзятую статистику. Столь драматичную разницу в показателях смертности

стран (например, соседние Испания – 10%, Португалия – 4%) объяснить чрезвычайно сложно уровнем качества медицины. Объяснение может базироваться в рамках гипотезы «иммунологического импринтинга». Если вы первым переболели в детстве вирусом гриппа типа HxNx, то стали навсегда устойчивы именно ко всем схожим с данным типом штаммам, но перед HxNy окажитесь беззащитны и будете болеть каждый год, так как иммунная система не заметит различий – активизируются В-клетки памяти, хранящие старый антиген. Из истории вакцинации помним, что коровья оспа обеспечивала стойкость к натуральной, тогда их неразличимость играла на нашей стороне. В работе [22] в серии опытов на мышах был подтвержден эффект «слепого пятна» (blind spot) иммунной системы – предел различимости вариантов вирусных белков. В результате зараженные новым штаммом гриппа продуцируют антитела против старых вариантов белков вирусных штаммов. Плохо связывающиеся с мишенью антитела только мешают. В гипотезе предполагались типы гриппа нейраминидаза/гемагглютинин, но коронавирусы человеческой популяции просто менее изучены, вакцины от них не тестировали, тут может вмешиваться фактор неопределенности, увеличивая дифференцировку сценариев болезни. Нет гарантии, что максимум частоты из многообразия возможных антител всегда придется на нужный нам белок. Несколько бета-коронавирусов давно присутствуют среди наших сезонных острых респираторных вирусных инфекций, но раньше распространенность типов коронавирусов в регионах пристально не анализировали. Из данной гипотезы следует, что люди, которые не сталкивались с коронавирусами, справляются с COVID-19 легче, чем уже заражавшиеся другими представителями из семейства *Orthocoronavirinae*. Люди старшего возраста могли переболеть близким по антигенным признакам штаммом в 80-е гг. прошлого века, и сейчас одно из звеньев их иммунитета генерирует малоэффективный ответ. Формирование иммунного ответа при презентации антигенов получает некоторую вероятностную составляющую, неравномерное распределение по частоте. Трансмембранные Spike-белки у видов РНК-вирусов значительно отличаются. Участки торчащих шипов априори считаются иммунодоминантными, но консервативные нуклеопротеины, массивные белки, упаковывающие РНК в вирион, тоже иммуногенны (допустимые мишени для Т-клеток). Клетки иммунной памяти, хранящие антигены нуклеопротеинов, могут стать помогающим фактором при столкновении с вирусом, использующим модифицированные участки «шипов короны».

Для проверки гипотезы «слепого пятна» в иммунной памяти интересно сравнивать варианты антител при легком и летальном развитии заболе-

вания – и на две части Spike-белка, и на альтернативные N-протеины с анализом их частотного распределения. Косвенным подтверждением реальности гипотезы будет расхождение – значимая доля отрицательных (стандартизованных) тестов на антитела для подтвержденных ПЦР-тестами случаев COVID-19 с сильными симптомами и положительных тестов на антитела при нескольких отрицательных ПЦР-тестах. Возрождение против объяснения на базе идеи «первородного антигенного греха» – в условиях глобализации в Европе циркулирующие типы вирусов должны были равномерно перемешаться. Генетики уже ищут объяснения различий смертности от COVID-19 в частоте вариантов участков генов гистосовместимости, отвечающих за иммунитет.

Методов моделирования распространения болезни известно несколько, как мы видим, не все они оказываются пригодны для прогнозирования пандемии и, главное, методов оценки будущих показателей смертности. Популярны модификации SIRS-модели распространения, исследованные как в форме систем дифференциальных уравнений, так и в дискретной алгоритмической форме. Алгоритмы применялись как полностью детерминированные [22], так и с учетом вероятностных характеристик исхода – заражения, выздоровления, смерти [23]. Существуют камеральные SIRS-модели, где выделяют субпопуляции и различные группы риска при распространении особого рода инфекций. В работе [24] рассмотрены аспекты применения терапии и выделены отдельно инфицирование «чувствительным вариантом» и заражение «устойчивым вариантом». В автоматных SIRS-моделях «заболевший» с некоторой вероятностью становился «мертвым» или «иммунным», но пока непонятно, как включить формат переходов в состояние «бессимптомных носителей». В Италии сообщают, что молодые люди со слабыми симптомами остаются заразными носителями (у них подтверждают наличие РНК-вируса) в течение двух месяцев, но для модели нужны данные динамики иммунного ответа.

В настоящее время нет единых критериев, по которым правительства стран должны вводить ограничительные меры для остановки заражения. Вводить ограничительные меры эффективно всем странам вместе и сразу. Всемирная организация здравоохранения 11 марта 2020 г. объявила о пандемии, но уже постфактум. Прогнозы и математические модели сценариев распространения новой коронавирусной инфекции у руководства организации имелись, но они не сыграли особой роли в принимаемых решениях. Наличие многих математических моделей [25] не помогает при отсутствии воли у чиновников Всемирной организации здравоохранения в принятии решений и обязательных для всех алгоритмах действий. О возможной эпидемии при передаче че-

ловеку одного из SARS-вирусов, которые циркулирует в популяции рукокрылых, говорилось еще в 2007 г. (см. работы [26, 27]).

Важный вопрос для прогнозов — когда оптимально выходить из ограничительных мер, не провоцируя повторный всплеск, или понять, что повторного увеличения заболеваемости в данном сценарии никак не избежать. Опыт былых эпидемий показывает, что часто бывают повторные пики через два-четыре месяца после затухания первой волны инфекции, как это было и с «испанкой», и с чумой в Марселе в 1720 г. Прогноз возвратной волны эпидемии — актуальная задача моделирования именно сейчас. Важно отличать фазу осцилляции при колебательном развитии эпидемического процесса и повторную вспышку как события. Критически важно для моделирования и построения прогнозов знать ключевые аспекты: как формируется постоянный иммунитет, сколько он действует, возможна ли «реактивация» вируса при сохранении скрытого очага в организме. Появляются сообщения, что иногда вирус исчезает, но его вновь находят в организме, это тревожно и неясно, насколько такие случаи редки.

Недостатком многих SIRS-моделей, по нашему мнению, является отсутствие зависимости качественных режимов поведения от начального состояния в момент запуска локального эпидемического процесса. Различие в исходном количестве зараженных (по одной из гипотез) может являться объяснением столь разных эпидемических сценариев в разных регионах, помимо других факторов, основным из которых является слабоформализуемая в уравнениях характеристика — плотность социальных контактов.

Для современного моделирования эпидемии востребовано, чтобы показатель смертности был не априорным параметром в системе уравнений, пусть заданным случайной величиной с известным законом распределения по возрастным группам, но функционалом. Модель станет прогностической, если вероятную смертность оценить в вычислительных экспериментах из демографических и иммунологических показателей субпопуляций.

Сегодня вычислительные мощности позволяют строить детализированные сетевые модели передачи вируса в гетерогенном социуме, но свойства вируса по скрытому распространению не позволяют в данный момент ориентироваться на медицинскую статистику. Традиционные методы моделирования, безусловно, полезны для рассмотрения локальных вариантов смены фаз процесса с изменением доли выздоравливающих в зависимости от динамики числа заражений и сценариев течения инфекции в организме.

ФОРМАЛИЗАЦИЯ ЗАПАЗДЫВАЮЩЕЙ РЕГУЛЯЦИИ В ПОПУЛЯЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ

Феноменологические модели могут быть актуальны, когда истинные механизмы нам пока неизвестны и непосредственно их описать нет возможности, либо их сложность не подлежит формализации. Математическому моделированию функционирования подсистем иммунитета посвящено значительное число работ [28]. В построении моделей долго придерживались разделения на гуморальный и клеточный виды иммунного ответа. В работах группы Г.И. Марчука даже был рассмотрен аспект старения иммунной системы из-за повышенной «антигенной нагрузки» [29]. Однако до результатов последних лет структура врожденного и сложность запуска адаптивного иммунитета не была ясна. Исследования подтипов клеток Т-хелперов и алгоритма выбора рецепторов далеко не закончены. Открытия Р. Меджитова и Ч. Джейнуэя [30] в трактовке биологической кибернетики означают, что система регуляции иммунных ответов работает триггерно, т.е. каскадом сигналов, и относится к парадигме дискретно-непрерывных и гибридных типов динамических процессов [31].

Существует проблема моделирования непосредственного взаимодействия вредителя и леса или вируса и организма как несопоставимость временных шкал этих борющихся видов (в частности, вирион ВИЧ живет до полусуток). Если классифицировать феноменологические модели биологии, то в случае иммунитета и вируса мы описываем не взаимодействия типа «хищник—жертва» или «паразит—хозяин», эта коллизия ближе к «модели войны» — противостояния двух сражающихся армий. В моделях мы можем рассчитывать эффективность применения средств поражения противников, не описывая внутреннюю механику их оружия. Также актуально рассматривать в моделях именно сценарии завершения экстремального взаимодействия.

Популярным способом построения биологических моделей со сложной динамикой является использование уравнений с запаздыванием [32] (синоним «эредитарности» у Вольтерра). В таком подходе регуляция текущего процесса отбрасывается на некоторое время в прошлое состояние системы [33]. В биологии запаздывание отражает целый комплекс действующих временных факторов [34] и не ограничивается временем достижения зрелости. Внутриклеточные процессы, например, при экспрессии белков с использованием матричной РНК включают несколько временных характеристик [35].

Факторы запаздывания реакций важны для ситуации выработки иммунного ответа. Они оказываются зависимыми на узком промежутке вре-

мени от частоты случившихся встреч активных клеток с вирусом. В организме есть процедуры немедленного реагирования на вторжение и целенаправленного, ориентированного на эту мишень, но опаздывающего, так как дендритные клетки сперва должны выставить антигены вируса (по аналогии, как представляет фоторобот полиция).

В. Вольтерра первым в математической биологии рассмотрел уравнения с $N(t - \tau)$. Самые известные биологические модели с запаздыванием — это модели Хатчинсона, Николсона и Гополсами, имеющие ряд модификаций [36]. Уравнение Хатчинсона не было сформулировано самим Хатчинсоном в 1948 г., как часто можно прочитать (старые работы оцифрованы и доступны, теперь можно увидеть труды классиков, а не просто ссылаться на них по привычке). В работе [37] он кратко изложил гипотезу влияния прошлых состояний на эффективность воспроизводства, что совсем не являлось основной идеей той статьи. В работе [38] было указано, что модель предложена Райтом, но в работе [39] видим уже несколько иную запись:

$$y'(t) = -\alpha y(t-1)[1 + y(t)], \alpha > 0.$$

По-видимому, Р. Мэй [40] первым выписал уравнение в таком привычном виде:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t-\tau)}{K} \right). \quad (1)$$

Уравнение (1) фактически является усложнением «логистической» модели Ферхюльста с введением запаздывания τ для регуляции, которая определена значением K , важнейшим понятием емкости «экологической ниши», теоретически обоснованной именно экологом Г. Хатчинсоном. K — больше чем константа в модели, это принцип внутривидовой регуляции теоретической экологии [41], исходящий из существования априори предельно допустимой равновесной величины популяции, существующей $\forall t$. Из математической модели возникли популярные теории об « r - и K -стратегиях» эволюции видов, хотя у Ферхюльста это было умозрительным математическим описанием для социума Европы середины XIX века и никогда не предполагалось для экстремальных ситуаций при инвазиях новых видов.

Уравнение при небольших запаздываниях τ феноменологически описывает реально наблюдающийся режим затухающих популяционных колебаний $N(t) \rightarrow K$. Траектория (1) при $r\tau \approx \pi/2 \pm \varepsilon$, $N(0) < K$ опишет характер волнообразной эпидемии — например, повтор фазы роста числа случаев COVID в Техасе (рис. 4а), но не в Нью-Йорке и не в Италии. В Иране без усреднения на графике наблюдается (рис. 4б) явный осцилляционный сценарий эпидемии, который многие назовут «вторая волна», но математически эта «волна»

часть единого затухающего колебательного процесса. В работе [42] мы указывали отличия для двух ситуаций — повторной вспышки вредителей эвкалиптового леса как отдельного стохастического события и реализации продолжающихся колебаний листовертки в Канаде как целостного длительного популяционного явления.

Для уравнений «логистических» моделей Ферхюльста, Гомпертца, Ричардса и др. выполняется условие $\forall t, N(0) < K, N(t) \leq K$, что не соответствует быстрым инвазивным сценариям. Сценарий при $\exists t_\sigma < t_m, N(t_\sigma) > K$ и $N(t_m) < K$ соответствует хрестоматийной σ -образной кривой, показанной в книге «Экология» Ю. Одум для типичного сценария динамики роста инвазионной популяции с «овершутом» $N(t_\sigma) > K$, но без фазы экстремальной вспышки. Популяция вселенца не может моментально остановить прирост численности из-за достижения K -ниши (она о нем не подозревает), потому происходит превышение $N(t_\sigma) > K$ до момента остановки прироста $N(t_\sigma) = 0$ и невынужденного снижения до приемлемого равновесия с биотическим окружением. Это превышение не относится к экстремальным переходным режимам. Рост численности останавливается сам по себе ($N(t_\infty) = K$), как регулируемый без внешнего противодействия. Динамика, представленная уравнением (1), может описывать сценарий только «мирного», не разрушающего среду заполнения экологической ниши с конкурентным вытеснением и без резкого снижения численности после «овершута» — превышения априорной емкости ниши. Известны случаи полной гибели чрезмерно агрессивной чужеродной популяции. Для многих актуальных ситуаций достижение точки нулевого прироста численности совсем не означает баланса со средой. Например, K — предельное число доступных для заражения вирусом клеток, что определяется в организме эффективностью действия интерферонов.

Решение уравнения (1) диссипативно: $N(t) \leq (-1) + \exp(r\tau)$ независимо от $N(0)$ [43]. Свойства уравнения (1) с образованием орбитально устойчивого цикла и негармоническими колебаниями хорошо известны [45] как образование автоволн в системах с запаздыванием [44]. Траектория уравнения (1) переходит в циклический режим для популяции с репродуктивным потенциалом r после бифуркации Андронова—Хопфа при значении произведения бифуркационных параметров $r\tau > \pi/2$ [46]. В биологических задачах уравнение (1) анализируют с константной предысторией $\forall t \in [-\tau, 0], N(t) = N(0)$. В математических работах рассматривается однопараметрическая форма записи: $\dot{N} = \lambda[1 - N(t-1)]$, потому эти результаты трудно перевести обратно в терминологию экосистемных процессов. Обоб-

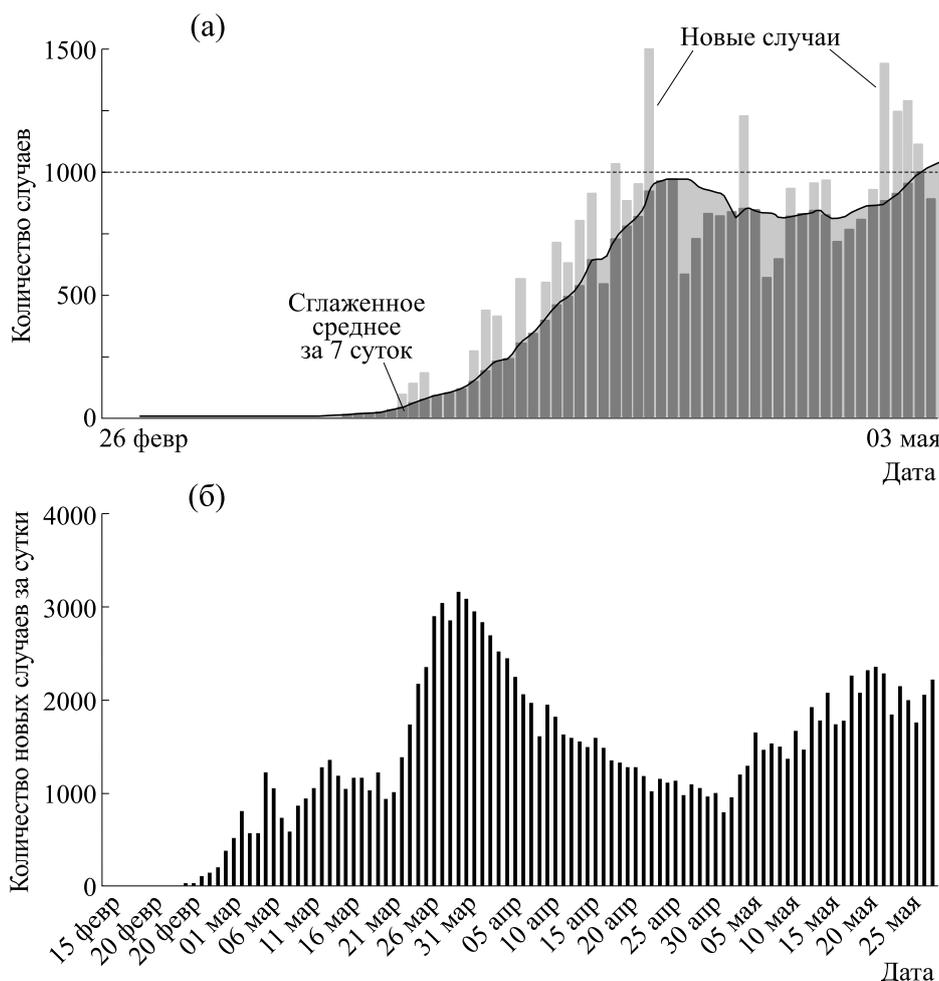


Рис. 4. (а) – Динамика новых случаев COVID в Техасе со сглаживанием – усреднением по данным за семь суток (данные New York Times); (б) – осциллирующая эпидемии COVID в Иране.

шение уравнения Хатчинсона для учета возрастной структуры популяции можно записать так:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = r \left(1 - \frac{1}{K} \int_{-\tau_1}^{-\tau_2} dv(s) N(t+s) \right) N. \quad (2)$$

Недостатки уравнения Хатчинсона и его обобщений хорошо известны специалистам в области практической экологии [47]. При увеличении амплитуды минимумы релаксационного цикла (1) становятся длительными и глубокими, фактически попадают в ϵ -окрестность нуля. Для интерпретации свойств изолированной популяции режим нереалистичен. Обоснованно сказать, что модель теряет возможности существенной биологической интерпретации поведения при больших значениях τ и не может описать резкие стремительные изменения.

Альтернативное известное уравнение осциллирующей динамики «мясных мух» (blowflies

equation) не использует в явном виде значение предельной емкости ниши:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t-\tau) \exp(-bN(t-\tau)) - \delta N(t). \quad (3)$$

В работе [48] модель в форме дифференциального уравнения предложена для описания колебаний с большой амплитудой у лабораторной популяции мух в экспериментах Николсона. Уравнение (3) использует для формализации внутривидовой конкуренции при повышении плотности известную функцию Рикера, только с запаздыванием при репродуктивном сомножителе, аналог уравнения $x_{n+1} = ax_n e^{-bx_n} - \delta x_n$. Итерация функции Рикера, давно применяемая в промысловой ихтиологии модель пополнения популяции рыб с изъятием, имеет хаотический режим по сценарию удвоения периода Фейгенбаума. Циклы итераций $\Psi^n(x) = \Psi^{(n+p)}(x)$, $p = 2^\phi$ не подходят описания популяционных флуктуаций.

Удвоение периода p рождает пары точек вокруг неустойчивой точки x^* , но популяционные циклы — это последовательные перестановки с максимумом в конце периода $x_{p-i-1}^* < x_{p-i}^*, i = 0..p-1$. Анализ уравнения (3) относится к области хаотической динамики [49] и выходит за рамки статьи. Мальтузианский коэффициент r уже отражает разность между естественной рождаемостью и смертностью, тогда δ в уравнении (3) соответствует дополнительной убыли как внешнему фактору.

Максимумы колебательного режима после бифуркации рождения цикла в модели Гополсами [50] более соответствуют представлениям о регулярных колебаниях:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(\frac{K - N(t - \tau)}{K + jN(t - \tau)} \right). \quad (4)$$

Экологическим моделям с отклоняющимся аргументом посвящено множество работ, обзор многообразия модификаций моделей с запаздыванием приведен в работах [51, 52].

Далее предложим модификации модели с точки зрения описания редких и специфичных биологических процессов, которые подразумевают вариативность сценариев. Эпидемии, к нашему счастью, не формируют устойчивые циклы. Колебания в популяционных процессах чаще спорадические, без постоянного периода — перемежающиеся флуктуации. Описать сценарий спонтанного завершения быстрой фазы инвазии важно в том случае, когда достижение равновесия $\lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = K$ является нереальным сценарием для среды. Циклическая динамика — не главное ключевое свойство для эпидемических моделей.

МОДИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ ДЛЯ ЦИКЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ

Для получения реалистичных с точки зрения экодинамики форм осцилляций нами предложено следующее уравнение с запаздыванием на основе уравнения (3), но с формализацией нелинейного порогового противодействия, которое имеет режим спонтанного затухания осцилляций, возникших после бифуркации Андронова—Хопфа:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t - \tau) \exp(-bN(t - \tau)) - q \frac{N(t - 2\tau)}{A - N(t - \tau)}. \quad (5)$$

Модель (5) может описывать специфическую динамику эпидемии COVID в штате Мичиган в форме серии затухающих пиков после основной и резкой вспышки (рис. 5). В штате Вайоминг эпидемия коронавируса аналогично развивалась пульсирующими пиками, но второй пик там был

гораздо сильнее первого. Подобный сценарий давно известен в динамике активности насекомых-вредителей как «sawtooth-like oscillation» — пилообразная вспышка численности с разновеликими затухающими пиками. В совершенно разных биологических процессах может наблюдаться идентичная динамика смены фаз, что объясняется нами общностью математической формы их функций регуляции [53].

Модельный сценарий актуален в предположении, что эпидемия полностью не затухнет, но потеряет «пандемический» статус и станет обычным среди других спорадически активных острых респираторных вирусных инфекций. Вредители после окончания вспышки не исчезают, но их становится мало, и их активность не фиксируется в лесных отчетах. В модели (5) вызвать новый переходный режим с колебаниями способно резкое изменение значения $N(t)$ — без бифуркаций.

Сравнение подтверждает, что затухание эпидемии после пика — процесс немонотонный и достаточно волатильный, со стохастической компонентой и локальными всплесками. Гладкое снижение — признак умышленной фальсификации статистики для отчета. При сознательном искажении статистики уменьшается дисперсия ряда. В реальной эпидемии, как видим, обычное явление — это разброс числа ежедневных случаев заражения при колебаниях $>25\%$.

Для дальнейших модификаций целесообразно принять гипотезу, что экологическая ниша представляется относительным регулирующим фактором, а не фиксированным — незыблемым априорным значением. Переход к вспышке в реальных популяциях насекомых не может начинаться от единичных особей. Нужно учитывать, что на графиках динамики вспышек численности приводятся данные о поражениях леса, а не о численности самих вредителей. В малых группах эффективность размножения низка и зависит от случайных событий. Для запуска вспышки нужна достаточно плотная группа особей, которая при эффективном размножении способна вызвать вспышку. Мы предложили простую модификацию уравнения (4) с неравномерным увеличением нелинейности в числителе и знаменателе при регуляции воспроизводства и относительностью ниши:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(\frac{C - N^2(t - \tau)}{K + \gamma N^3(t - \tau)} \right), C < K. \quad (6)$$

Таким образом, с помощью уравнения (6) можно получить режим пилообразных колебаний (рис. 6), где серии пиков численности начинаются после бифуркации Андронова—Хопфа от окрестности существовавшего до бифуркации стационарного состояния, когда первый трехугольный пик переходного режима имеет боль-

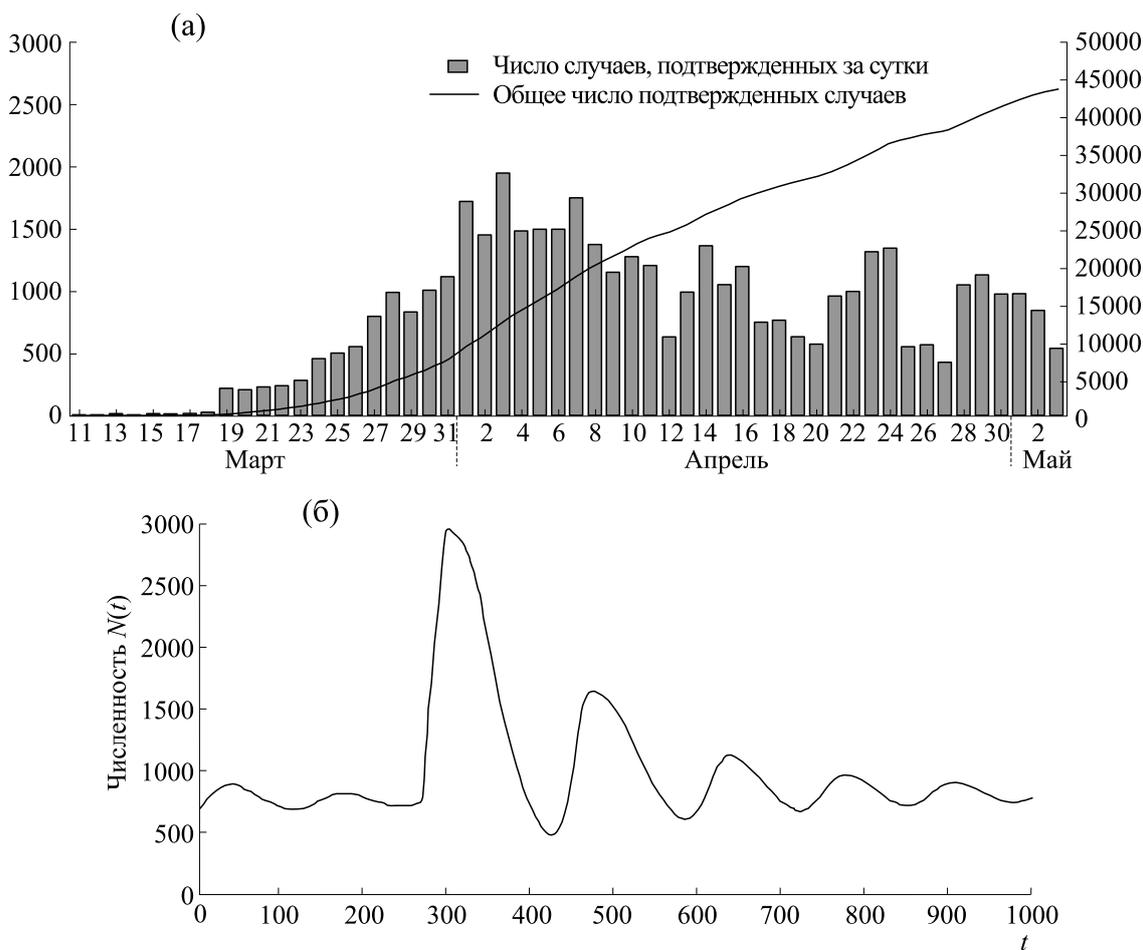


Рис. 5. (а) – Серия уменьшающихся пиков эпидемии в штате Мичиган; (б) – спонтанно затухающие осцилляции в нашей модели (5) после бифуркации из-за увеличения параметра r .

шую амплитуду, чем последующие. В случае уравнения (6) для запуска пульсирующей вспышки требуется первичный индуцирующий фактор. Некоторое воздействие на регулирующие меха-

низмы вызывает потерю устойчивости у существовавшего ранее в среде равновесия.

Сопротивление среды вторжению агрессивного вида можно учесть с помощью дополнительно-

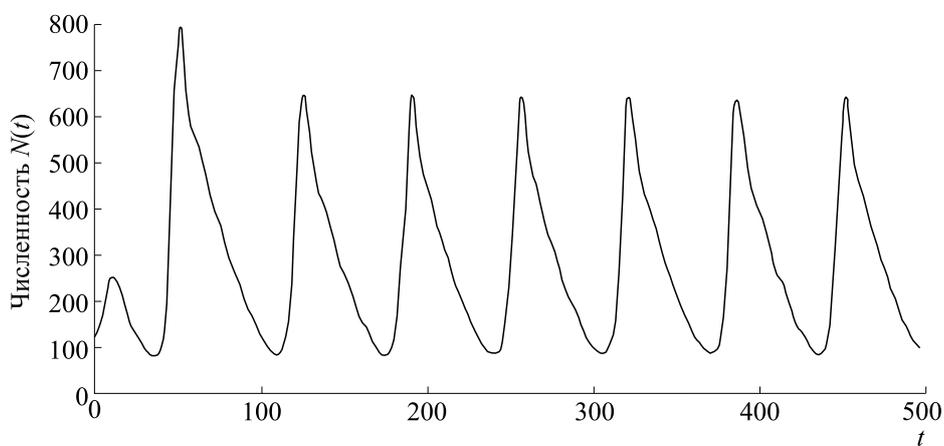


Рис. 6. Λ -образные пики пульсирующей вспышки в модели (6) без изменения параметров.

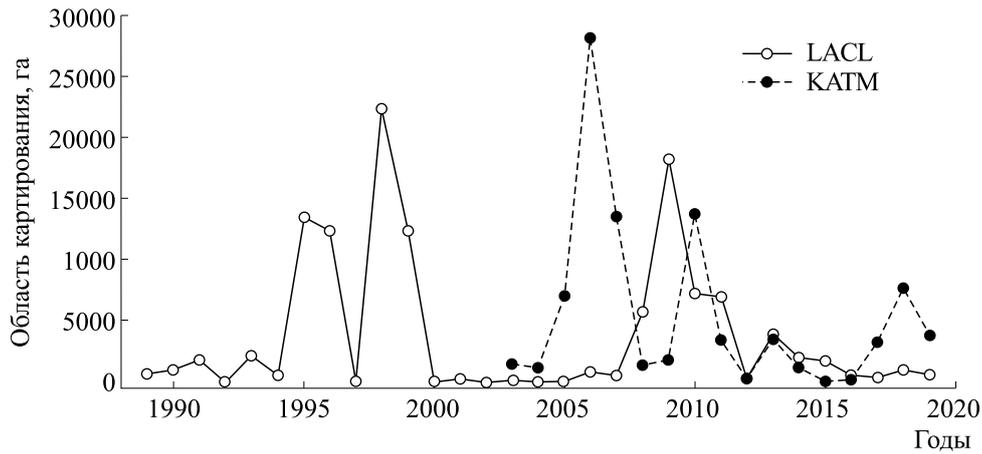


Рис. 7. Динамика поражения двух регионов лесов Аляски после начала осциллирующей вспышки елового лубоеда *Dendroctonus rufipennis* (из отчета службы лесного хозяйства [54]).

го нелинейного члена Ψ с запаздыванием в правой части уравнения (6):

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(\frac{C - N^2(t - \tau)}{K + \gamma N^3(t - \tau)} \right) - \Psi[N^k(t - h)]. \quad (7)$$

С помощью уравнения (7) можно получить серию разновеликих пиков и колебания с нестационарным периодом. Специфический режим соответствует сценарию запуску пульсирующей вспышки насекомых с Λ -образными перемежающимися пиками, который внезапно начинается после достижения значительной средней численности. На рис. 7 показана динамика поражения площади лесов в двух регионах Аляски из-за активности жука-вредителя *Dendroctonus rufipennis*, которая наблюдается на протяжении десятилетия в форме вспышки с серией Λ -пиков. В Канаде и на Аляске открыты многолетние достоверные сведения о состоянии лесного фонда за вековой период и размерах поражения лесов различными

насекомыми, потому для подтверждения адекватности при моделировании экстремальной активности в биологических процессах лучше ориентироваться на данные из Канады. Динамика, представленная на рис. 7, подтверждает гипотезу — популяционные колебания насекомых вредителей лесов в природе, в отличие от устойчивых циклов «вольтерровских» систем уравнений, — это нестабильные переходные режимы и спорадические явления в экосистемах.

На рис. 8 показана иная регулярно осциллирующая активность комаров вида *Aedes aegypti*, являющихся переносчиками вируса лихорадки Денге в Южной Азии. В работе [55] отмечено, что порог, от которого начинается новый пик, повышается из-за потепления.

В модели (6) значима близость численности инвазивной популяции к некоторому предпороговому уровню, при котором давление популяции вселенца (или вируса) на среду уже велико. Для

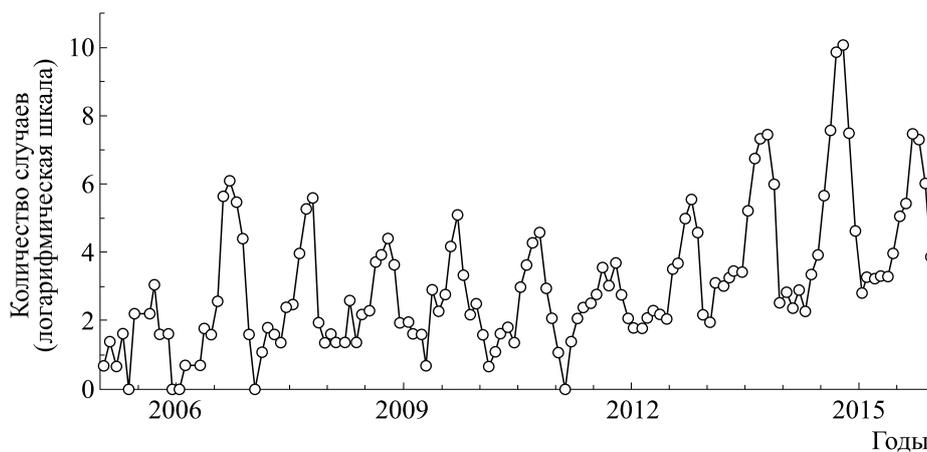


Рис. 8. Пики активности переносчиков лихорадки Денге на юге Китая (из работы [55]).

каждой биосистемы (или организма) этот уровень различен. Наблюдаемые у некоторых насекомых вспышки «пилообразной» формы — появление колебаний с быстрой серией пиков (sawtooth-like oscillations) — относятся к типам экстремальной динамики. Подобные сценарии выходят за рамки теории плотностной регуляции и стремления биосистем к равновесию. Относительное балансовое равновесие «емкость ниши» становится нижним значением для вспышечной активности. Регулярные серии вспышек бабочек *Malacosoma disstria* и *Lymantria dispar* обычно имеют тенденцию затухания. Нам важна общность регулирующих функций у таких явлений.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ АГРЕГИРОВАННОГО ЗАПАЗДЫВАНИЯ

Параметр «запаздывания» не обусловлен характеристиками биологического вида, длиной этапов его жизненного цикла. Бабочка листовертка *Choristoneura fumiferana* в Нью-Брансуке генерирует длительные циклы активности [56] с десятилетними промежутками между катастрофическими вспышками. Интервалы между пиками не соотносятся с длиной развития поколений насекомых. Запаздывание, которое включено в популяционные модели (1) и (2), — это именно феноменологическое описание изменений в динамике численности [57]. Таким способом расширяются возможности для описания изменений режимов поведения траектории, но при изменении параметров. В известных уравнениях исключен фактор изменения качественной динамики сценариев в зависимости от начальных условий [58]. Динамика инфекционных заболеваний не обязана следовать единственному сценарию, так как иммунитет у всех индивидуален, но есть маловероятные варианты и частные случаи.

Бифуркационным параметром в уравнении (6) мы считаем не репродуктивный потенциал r , а величину τ . По нашему представлению, запаздывающая регуляция в модели — это адаптационная и агрегированная характеристика. Величину τ мы полагаем результатом взаимодействия вида и конкретной биотической среды, формирующаяся в данном ареале. В действующую величину запаздывания (5) входят онтогенетическая задержка этапов развития, скорость восстановления ресурсов, время выработки ответа со стороны паразитов и патогенов, миграция. Запаздывание при анализе моделей имеет смысл разделить на репродуктивное «регуляционное» и «адаптационное», которое необходимо популяции (или организму) на выработку приспособительных реакций, данная величина может изменяться в процессе инвазии. В организме, если речь идет о борьбе иммунитета и вируса, запаздывание — индивидуально зависящая характеристика всех ре-

акций активации, ее среднее значение может варьировать в локальных субпопуляциях (не обязательно из-за генетических факторов).

Уравнения Хатчинсона и Николсона не могут описать завершение вспышки или эпидемии, которая в реальности не способна быть устойчивым циклом, продолжаться при $t \rightarrow \infty$. Вспышки численности насекомых и эпидемии вирусов — это ограниченные во времени переходные режимы, имеющие фазы и развития и окончания. Наша модель (5) показывает возможный путь завершения, но не обладает вариабельностью. Все экстремальные процессы в биологии обязательно завершаются, пусть даже состоянием полной деградации среды и гибелью бурно размножившегося вида. Возможны несколько сценариев завершения, в частности, достижения минимального уровня равновесия, скрытого очага инфекции, не оказывающего видимого воздействия на среду. В предыдущей работе [1] о триггерной итерационной модели вспышки численности псиллид мы отметили, что описание сценария запуска эруптивной фазы и моделирование завершения вспышки — это две отдельные задачи, и сложнее именно самостоятельное снижение численности. У вируса меньше требований к среде, потому в случае инфекции триггерным действием будет обладать включение механизмов его подавления. Рассмотрим «безбифуркационную» модель для сценариев развития инфекции.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ СЦЕНАРИЕВ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Комплексом ответных действий организма, направленных на подавление проникшей инфекции, управляет сложнейшая система взаимодействующих разнотипных клеток. Иммунный ответ — это кооперативная реакция. Каждому звену может быть определена узкая роль или несколько, как у B -лимфоцитов [59]. Каждое звено в иммунных реакциях требует определенных шагов в алгоритме активации, требуется время для их включения. Иммунитет включает два больших связанных структурных комплекса — врожденный и адаптивный. Для задачи моделирования инфекционных сценариев главное их отличие — разное время активации. Необходимо захватить антигены, провести презентацию антигенов для T -клеток «хелперов» (показать «особые приметы») и начать размножать именно требуемые антиген-специфичные клетки-киллеры, что не может происходить мгновенно. Презентация антигена — процесс, в результате которого зрелый T -лимфоцит мигрирует в ткани с целью распознать и убить там зараженную клетку, экспрессирующую на своей мембране этот антиген. Сократить время

получения ответа от адаптивного комплекса клеток — проблема.

Репликация вируса, в отличие от смены поколений насекомых, процесс непрерывный, поэтому для задачи анализа сценариев оправдано использовать дифференциальное уравнение с запаздыванием. Интересно моделировать смены фаз течения заболевания исходя из внутренней логики противодействия инвазии в сценариях без индукции «извне» и бифуркаций из-за колебаний внутренних параметров. Изменения параметров возможны в долгосрочной перспективе. Переходы между фазами при первичной инфекции нелогично описывать колебаниями характеристик и явными бифуркационными переменными.

Основная задача в модифицированной модели — рассмотреть сценарии спонтанного завершения экстремального процесса, перехода его в иное качество после фазы быстрого роста численности вирионов. В некоторых ситуациях считается важным начальное число попавших в организм вирионов [60]. Зависимость течения заболевания от начального $N(0)$ может быть нелинейной [61]. Во многих случаях необходимо принимать в расчет дозозависимый иммунный ответ «dose-dependent response», что важно для эффективной вакцинации [62]. После контакта с антигеном дендритные клетки должны взаимодействовать с лимфоцитами. При малом $N(0)$ вирус может ускользнуть от иммунных «сторожевых».

В работе [63] проводились эксперименты, в которых две группы мышей заражали разными дозами гриппа, низкой и очень высокой. Разница в 1000 раз интересна в опытах, в реальной жизни различие дозы в 10 раз уже велико. Было показано, что начальная инфекционная доза регулирует раннюю реакцию и выброс иммуномедиаторов цитокинов. Оказалось, что чем больше начальная доза вируса, тем сильнее симптомы воспаления, быстрее начинается индукция интерферонов и неожиданно наблюдалась более ранняя активная инфильтрация Т-клеток с рецептором CD8 в легкие. «Поразительно, хотя титры вируса в легких были значительно выше у мышей, зараженных высокой дозой в первые дни заражения, относительная вирусная амплификация была значительно выше (в 125 раз) на пике вирусной нагрузки у мышей, зараженных низкой дозой вируса». Начальная доза, согласно этим экспериментам, влияла только на реакцию клеточного иммунитета, генерация нейтрализующих антител в динамике оставалась независимой. Потом экспериментаторы снова заражали выживших животных и установили, что перенесшие большую дозу мыши приобрели устойчивость за счет оставшихся CD8.

К сожалению, авторы не использовали интегральные показатели иммунного ответа, тогда

обобщенный график позволил бы свести задачу на язык математического анализа с построением функциональной зависимости начальной дозы заражения и реакции иммунитета. Потом ее нужно аналогично тормозить, так, антитела подкласса IgG4 снижают воспаление, подавляя активность фагоцитирующих клеток [64]. В гипотетической зависимости дозы и скорости реакции наиболее интересны пороговые эффекты. Данные экспериментов показывают, что при развитии вирусных заболеваний начальная доза способна определять качественные характеристики и темп иммунного ответа, поэтому должна рассматриваться в модельных вычислительных экспериментах как влияющий фактор на реализацию сценария болезни.

Изменения поведения уравнений (5) и (6) мы наблюдаем при бифуркациях, вызываемых моментальными изменениями значений управляющих параметров, которые далеко не всегда можно объяснить существенными причинами. В каждом случае нужно теоретически обосновать механизмы увеличения значения r (или τ), которое провоцирует пульсирующую вспышку. Все характеристики видов в природе изменчивы, но обычно плавно.

Предложим новую модель исходя из значимости субкритического уровня присутствия патогена H — предпороговой величины вирусной нагрузки $N(0) < H < K$. Вместо квадратичной или экспоненциальной выберем логарифмическую функцию регуляции:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right) (H - N(t-h)). \quad (8)$$

Величина H отражает в уравнении (8) конкретное состояние организма при взаимодействии иммунитета с данной инфекцией, тогда как K играет роль априорно заданной пороговой величины, но не тождественной емкости ниши из логистической модели. Уровень предельного насыщения в нашем понимании — это состояние, которое достижимо и может быть незначительное превышено в кратком времени, но не сохраняется в среде. Роль этой характеристики оказывается двойкой: чем показатель меньше, тем слабее чувствуем симптомы, но тем ближе критический порог, переход через который необратим.

Рассмотрим два основных сценария новой модели (8). Будем считать, что h может быть только незначительно больше регуляционного запаздывания τ , так что $h = \tau + \xi$, но τ полагаем значительной величиной, а $H = K/3$ фиксируем. В первом сценарии фаза замедляющегося «логистического» роста численности будет идентична модели Хатчинсона при $r\tau \approx \pi/2$ с «овершутом» $N(t_m) > K$, $N(t) \rightarrow K$, но достигнутое равновесие после зату-

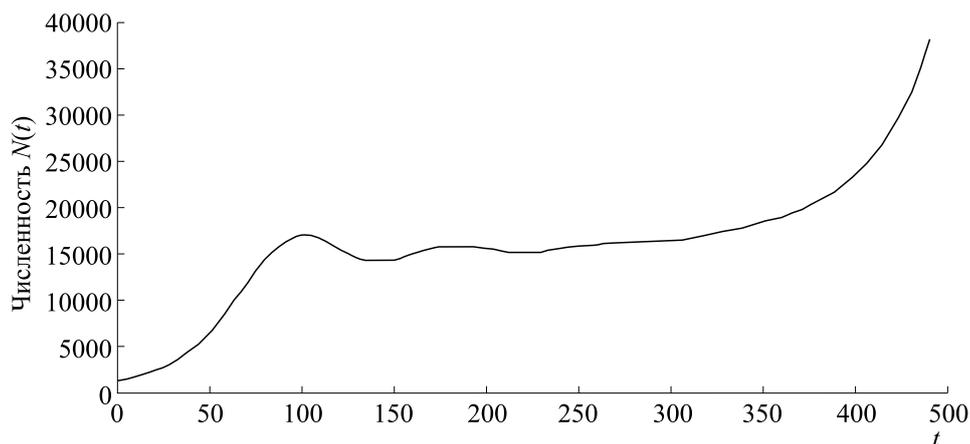


Рис. 9. Недиссипативная траектория решения модели (8) после состояния $N(t) \approx K$ в режим $N(t) \rightarrow \infty$ при $\tau = 58$, $K = 15000$, $H = 5000$, $r = 0.00000335$, $N(0) = 190$, $\xi = 2$.

хающих осцилляций оказывается неустойчиво. В этом сценарии нет конечного равновесия (рис. 9).

Траектория $t > t_m$ резко покидает окрестность K , так что $\lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = \infty$ и решение модели (8) при выбранном значении $N(0)$, τ становится более не диссипативным. Сценарий означает разрушение среды в том случае, когда имеющийся исходный иммунитет недостаточен для контроля инвазии. После фазы острой вирусемии и следующего после $\max N(t)$ этапа $t_K > 2\tau$ длительной псевдостабильности тяжелого заболевания в этом варианте происходит безвозвратная деструкция среды. В вычислительном эксперименте расчет переходного режима после выброса траектории заканчивается сообщением численного метода с контролем точности об ошибке переполнения при остановке вычислений.

Если начальная численность при заражении станет ближе к H , то в модели (8) реализуется совершенно иной сценарий. После сходной фазы

роста $N(t) \rightarrow K$ происходит переход от кратковременных колебаний в окрестности K к флуктуациям при значительно меньшей численности в окрестности H , которые медленно затухают ($\lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = H$). Мы видим более стремительную фазу роста, но меньшее время инфекции в окрестности K . В вычислительном эксперименте, представленном на рис. 10, траектория приходит в устойчивое равновесие после переходного режима $N(t) \approx K$ при аналогичных значениях параметров модели (8). Мы не рассматриваем условие $N(0) > H$ как недопустимое в реальности даже во время пандемии, заведомо летальные дозы вируса вкалывают только в экспериментах мышам.

Решение уравнения (8) имеет альтернативные сценарии асимптотического поведения без изменения ключевых характеристик взаимодействия. В контексте именно заражения организма вирусом значения r , τ , H – постоянные параметры. Важно значение начальной численности $N(0)$ от-

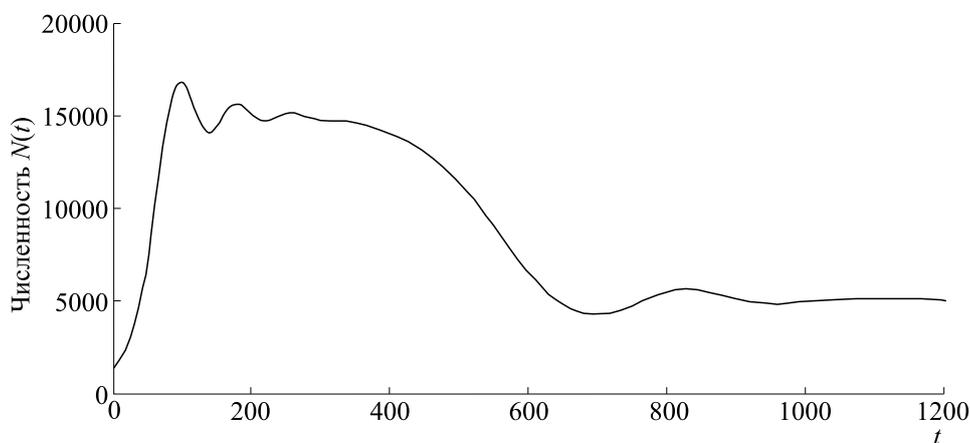


Рис. 10. Равновесие траектории модели (8) после $N(t) \approx K$ в состоянии $N(t) \rightarrow H$, $N(0) = 1099$.

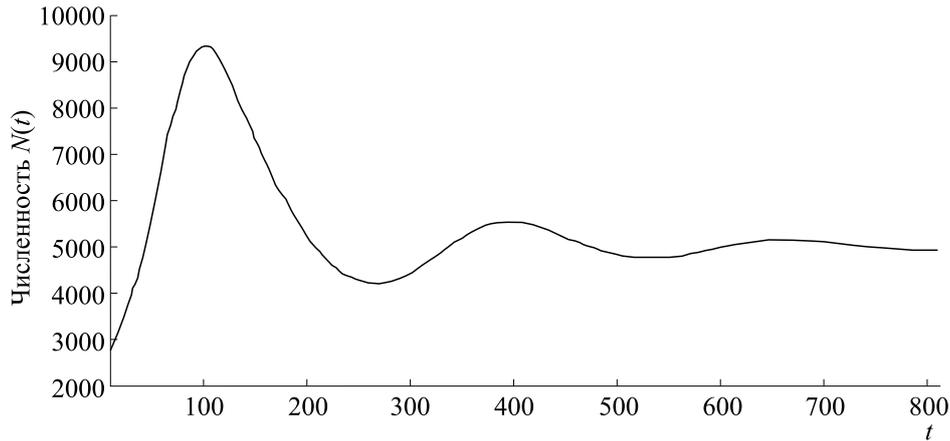


Рис. 11. Сценарий бессимптомной хронизации инфекции с $\max N(t) < K$ при уменьшенном регуляционном запаздывании в модели (8), $N(0) = 1200$.

носителем субкритической емкости среды H . Предполагается $N(0) \geq \mu_0$ – инфекция не начинается от околонулевого количества. Величины H и K мы трактуем как характеристики организма, свойства его врожденного иммунитета. K – вариативная величина в рамках популяции, что объясняет различную тяжесть симптомов. Значение H консервативнее, но не сохраняется с возрастом и является естественным изменчивым параметром среды, влияющим на поведение модели. Сокращение величины запаздывания до $3/4 h$ в модели (8) приводит к сценарию с менее выраженной острой фазой инфекции – мягкому течению заболевания (рис. 11). Непосредственное изменение параметров влечет более значительное изменение положения $\max N(t)$ в переходном режиме.

В переходной динамике симптомы воспринимаются краткими и незначительными из-за отсутствия стадии $N(t) \approx K$, но асимптотическое состояние процесса аналогично сценарию с сильными симптомами. Биологическое объяснение сценария в том, что врожденный иммунитет и антитела быстро остановили распространение вируса, но не убили все зараженные клетки – создано длительное равновесие. Можно сказать, что тут иммунитет стал «близорук» и недоработал (без действия Т-киллеров), но логичнее считать, что его реакцию просто затормозили. Существует петля отрицательной обратной связи у иммунных реакций, где начинают действовать клетки Т-супрессоры, подавляющие активность других лимфоцитов. Третий сценарий коварен, так как человек может долго не понимать, что он серьезно заболел. Одностороннее увеличение в модели (8) репродуктивной активности $r_m \gg r$ логично вызовет быстрый режим $N(t) \rightarrow \infty$ – как необратимый летальный вариант развития процесса с совсем недолгим пребыванием около неустойчивого равновесия.

Полученный в модели (8) качественный характер динамики заболевания наиболее типичен для заражения гепатитом С. На рис. 12 представлено реально встречающееся перетекание острой фазы инфекции вирусным гепатитом С в хроническое течение [65].

На графиках от начала инфекции показано как резко после достижения вирусом предельной окрестности K появляется аланинаминотрансфераза. Внутриклеточный фермент аланинаминотрансфераза обнаруживается в крови в значительной концентрации при разрушении клеток печени – тогда проявляются характерные острые симптомы. Пик выброса аланинаминотрансферазы происходит с запаздыванием по сравнению с ростом концентрации РНК вируса гепатита С в крови. Интерферон-стимулированные механизмы защиты активируются быстрее [66], но они не могут подавить вирус и в сценарии выполняют роль демпфирующего регулятора. Появление эффективных лимфоцитов, способных снизить концентрацию вирионов вирусного гепатита С и следом уменьшать присутствие фермента аланинаминотрансферазы, регистрируется со значительным запаздыванием. Нейтрализующие специфические антитела в этом сценарии появляются еще позднее. Экспрессия белков от большой группы чувствительных к интерферонам генов интерферон-стимулированных механизмов защиты (далеко не все гены изучены) тормозит распространение вируса в клетках [67], что создает предельный K -уровень – уровень временного неустойчивого баланса, при котором размножение инфекции остается гарантированно контролируемым. Превышение неустойчивого уровня K для количества вирусных частиц временно допустимо, как мы видим в сценарии хронизации с затухающими осцилляциями, но время превышения не должно превосходить τ .

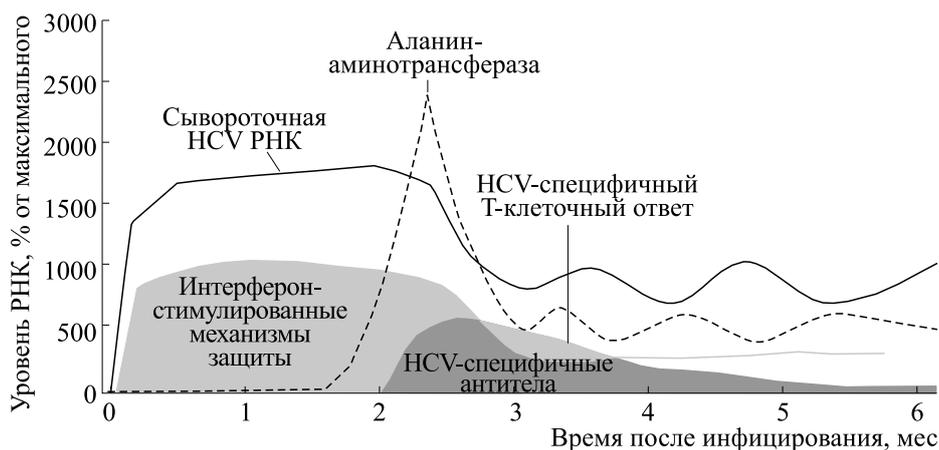


Рис. 12. Динамика концентрации РНК вируса гепатита С и выработка разных типов иммунного ответа при переходе острой инфекции в хронический сценарий (согласно работе [65]).

Противовирусные внутриклеточные белки интерферон-стимулированных механизмов защиты и ZAP (англ. Zinc-finger Antiviral Protein) математически переводят экспоненциальный рост в логистическую кривую. Эти регуляторы создают время на выполнение алгоритма ответа от клеточного иммунитета. Передовые средства защиты всегда работают с рождения и спасали бы, только при эволюции некоторые вирусы научились противодействовать синтезу интерферонов и избегать антивирусного белка ZAP. Клетки врожденного иммунного комплекса, не проходящие «антигенную настройку», справляются со многими вирусами плохо и с побочными последствиями. Своевременная генерация ответа в форме Т-клеток с рецептором CD8 имеет решающее значение для остановки инфекции, но потому мы и болеем гриппом неделю, что максимум их концентрации наблюдается в опытах через семь суток [68].

Реакция противодействия в рассмотренной группе сценариев не способна полностью подавить вирус, но может перевести инфекцию в состояние, когда оставшийся очаг вируса не угрожает жизнеспособности организма, однако становится скрытой угрозой. Вирус Эбола таится в клетках Сертоли. Интервал времени от заражения до начала действия специфических клеток иммунитета — важный фактор сопротивляемости организма, но в нашей модели дополнительно значим первичный уровень проникшей в организм инфекции. За двумя параметрами запаздывания в модели скрываются, во-первых, свойства алгоритма репликации и сборки вирионов, во-вторых, эффективность сложной группы медиаторов иммунного ответа — интерлейкиновая система взаимной стимуляции клеток. Запаздывание — атрибут системы «репликация—подавление».

Равновесное состояние не исключает возможности повторных пиков инфекции. Многие вирусные инфекции рецидивируют при долгой иммуносупрессии. Иммунный ответ на рис. 12 при уменьшении присутствия вируса гепатита С снижается, в плазме остаются обычно белки IgG. Для возмущающего воздействия в модели (8) даже не нужно менять ключевой параметр r , а резко варьировать H или τ , что вызовет новый переходный режим с фазой роста инфекции.

ВАРИАНТЫ МОДИФИКАЦИИ ИНФЕКЦИОННЫХ СЦЕНАРИЕВ С ТЕРАПИЕЙ

«Хронизация» в модели (8) — невынужденный переход траектории к стабильному равновесию через окрестность неустойчивого. Актуален сценарий окончательной гибели вторгшегося агрессивного вида в разрушаемой им среде. Модель эрадикации с $N(t_\infty) = 0$ можно предложить при использовании идеи уравнения Базыкина — включить явно критическое значение численности для существования вида L , но в степени $1/3$:

$$\frac{dN}{dt} = r \ln \left(\frac{K}{N(t-\tau)} \right) N(t) \sqrt[3]{N(t-\kappa) - L}, \quad 0 < \kappa < \tau. \quad (9)$$

В моделях с критическим нижним значением численности L требуется $N(0) > L$, и в таком сценарии (9) получим полное уничтожение очага болезни, но не рассмотрим варианты стремительной инвазии от исходно малой группы проникших патогенных организмов [69]. Вирусам не нужно искать партнеров для размножения, им достаточно где-то скрыться от средств иммунитета. По оценкам, сделанным в работе [70], заражение натуральной оспой способен вызвать единичный вирус. К счастью, обычные сезонные острые ре-

спираторные вирусные инфекции и даже COVID не так беспощадны.

С точки зрения вычислительного моделирования подсистемы иммунитета удобно классифицировать по времени начала их реакции на три группы. Третьим звеном будем считать нейтрализующие аффинные к постоянным антигенам вируса иммуноглобулины, клетки-киллеры. Для математической формализации не обязательно знать их физиологические механизмы, но важно время триггерного включения и поправочные факторы, корректирующие их эффект воздействия. Количественные показатели адап-

тивной составляющей иммунного ответа бывают значительными, но они могут реализоваться с критическим для организма опозданием, что приводит к реализации летального сценария. В отдельных случаях они становятся недостаточно специфичными – плохо взаимодействуют с подтипом вируса. Обосновано включить в инфекционную модель нелинейную составляющую $\Psi[N^k(t-h)]$ активного противоборства специальными средствами терапии или например, цитотоксическими лимфоцитами, клетками с рецептором CD8 следующим образом:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \ln\left(\frac{K}{N(t-\tau)}\right) (H - N(t-h)) - q \frac{N(t-2h)}{H_1 - N(t-2\tau)}. \quad (10)$$

Специальные клетки способны уничтожать внутриклеточных паразитов, оставшихся там, куда антитела проникнуть не могут. Дополнением в модели (10) можно получить сценарий очень медленного асимптотического приближения $N(t) \rightarrow 0$. В реальности активность лимфоцитов со временем начинает аналогично ингибироваться средствами самого организма [71]. Интересно рассмотреть модельный сценарий, когда длительность активности иммунных клеток-киллеров, проходящих сложную процедуру отбора и активных к конкретной мишени антигену, зависит непосредственно от начального состояния при заражении. Для таких целей нужно формализовать составляющую $\Psi[N(t-h), N(0)]$, что мы рассмотрим в следующей работе, когда будут получены данные о фазах протекания коронавирусной инфекции и динамике вырабатываемого организмом разных форм иммунного ответа. Есть все основания полагать, что будет установлено большее разнообразие вариантов развития заболевания и соответственно описан ряд динамических сценариев противоборства с компонентами нашего иммунитета. Подтверждаются наблюдения, что несбалансированный иммунный ответ, названный в работе [72] «дисрегуляция профиля экспрессии воспалительных цитокинов» (для группы, не только интерлейкина-6), осложняет тяжесть последствий у заболевания COVID.

Антивирусную терапию целесообразно моделировать другим способом, функционалом уменьшения репродуктивного потенциала $r(t)$, так как известные препараты против вирусного гепатита С и вируса иммунодефицита человека направлены на подавление репликации и ингибирование вирусной полимеразы, но без лизиса. Такой метод актуален, чтобы прогнозировать динамику после отмены терапии.

Отметим важный практический вывод из модельных сценариев: равновесие в сценарии хро-

низации – это асимптотически устойчивое состояние, а тривиальное равновесие неустойчиво. Если терапия начинает применяться в устойчивом положении системы, то она оказывается малоэффективной и достичь окончательного успеха трудно. Терапию нужно начинать применять при переходном режиме и неустойчивом балансе, тогда возможно быстрое достижение излечения, минуя хронизацию. Математическое решение может выразиться в переводе процесса снова в острую фазу, это вызовет включение иммунного ответа одновременно с началом терапии, но клиническая практика данный способ не одобрит. Возражение – положение K критического неустойчивого баланса у истощенного борьбой организма при повторной острой фазе может оказаться эфемерным; в нашем случае чем большего промежуточного значения достигает $N(t)$, тем сильнее симптомы и риски.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье мы сравнили три оригинальные модели (5), (6) и (8) для специфического развития процессов в биосистемах. В приведенных уравнениях экстремальная или пульсирующая динамика инвазии способна начинаться (и завершаться) различным образом: 1) вследствие увеличения показателя репродуктивной активности и бифуркаций; 2) из-за резких сдвигов численности самой популяции без изменений параметров; 3) в уравнении (8), актуальном для анализа фаз инфекции при запаздывании иммунного ответа, эти трансформации свойств переходного режима происходят в зависимости от начального количества вызывающего заболевание вируса и его новой среды, которое в наших вычислительных сценариях различалось в пять раз. В модели (8) возможны и бифуркационные сценарии изменений поведения. Метаморфозы предельных множеств траек-

тории для анализа быстрых фаз инвазий не столь значимы. Отдельно оценены модели с явным нелинейным противодействием в форме дополнительного функционала воздействия — по варианту (7).

В новой модели (8) последовательно рассмотрены альтернативные имитационные сценарии: летального развития инфекционного процесса, критически опасного течения острой инфекции с сохранением хронического очага и бессимптомного сценария с $\max N(t) \approx 2/3K$. Два варианта имеют существенно различающийся переходный режим, но аналогичную асимптотику. В достаточно простом и наглядном уравнении нет необходимости для каждого из трех сценариев настраивать репродуктивный r -коэффициент вируса или изменять другие параметры и вызывать бифуркации. В вычислительных экспериментах на основе формализации в уравнении запаздывающего взаимодействия мы варьировали начальные условия при попадании инфекции по отношению к субкритической для данного вируса концентрации, специфичной для текущего состояния инфицированного организма. Рассмотренные три сценария не означают, что смены режимов поведения модели (8) не способны вызываться непосредственно возмущением коэффициентов r и τ , но способ описания переходов между стадиями заболевания импульсами параметров не столь интересен. Структура предполагает спектр модификаций для анализа сценариев элиминации вируса $N(t) \rightarrow 0$ с дополнительным активным воздействием нелинейного характера в варианте модели (10).

Включенный в модель (8) при рассмотрении инфекционного процесса параметр K по своему смыслу не отождествляется с емкостью «экологической ниши» или величине доступного для заражения множества клеток просто потому, что летальный исход тогда наступал значительно ранее достижения такого уровня. Положение K — уровень инфекции, который может существовать в системе только ограниченное время, но среда данное значение не выдерживает, и этот уровень не будет постоянным для популяции. Соответственно процесс переходит в терминальную стадию, либо снижается до стабильно равновесного состояния. При эффективном и быстром срабатывании иммунитета критическое состояние K не достигается. Разумеется, в реальных процессах режим $N(t) \rightarrow 0$ реализоваться не должен. Вариант потери диссипативных свойств решения модели считаем терминальным сценарием при $N(t) = 5H$. Очевидно, в модели (8) есть простой и быстрый летальный сценарий при очень большом и некомпенсируемом репродуктивном r -параметре, подобный $N(t) = N(0)e^{rt}$. Чем больше оказываются значения K и r , тем труднее организму преодолеть

фазу острой инфекции. Важнейшая рассчитываемая в модели (8) характеристика переходного процесса — тот интервал времени t_K , который траектория проводит в окрестности предельного уровня заражения. Включенные в модель (8) $t - \tau$ и $t - h$ мы полагаем агрегированными характеристиками.

В предыдущей нашей итерационной модели [1] псевдостабильзация происходила перед вспышкой насекомых у порогового состояния. В новой модели пороговое состояние будет длительно устойчивым, но равновесие при высокой численности K — репеллерное. Для опасного патогенного вируса нет продолжительной стабильной высокой численности, но возможно сохранение хронического очага. Существуют различные сценарии смены фаз течения многих инфекционных заболеваний даже внутри субпопуляции, что ярко демонстрирует COVID-19. Свойства модельных сценариев объясняют наблюдения итальянских медиков об одинаковости средней вирусной нагрузки. Математическое объяснение состоит в том, что имеется разный уровень предельного критического насыщения, но предпороговый асимптотический уровень одинаков и сохраняется долго. В работе [18] говорилось о сравнении средних показателей, но бывает так, что усреднение данных не все говорит о сути явления, важна величина разброса значений внутри сопоставляемых групп.

О динамике иммунного ответа и последовательности стадий коронавирусной инфекции в настоящее время информации уже много, но она противоречива. Логика подсказывает, что найдут много разнообразных вариантов усиления ответа. У пожилых людей с низким уровнем интерлейкина-7 и сниженной чувствительностью к γ -интерферону [73] наблюдается иммуносенция — останавливается пролиферация Т-лимфоцитов и иммунный ответ становится недостаточным. Однако летальные случаи отмечены у молодых и здоровых, не имеющих сопутствующих заболеваний людей, чаще всего — у медиков. Смертность врачей пока является главным аргументом влияния дозы инфекции.

Публикуются сообщения, что самые тяжелые последствия коронавируса для организма связаны с гиперактивной реакцией клеток собственного иммунитета [74]. Синдром высвобождения цитокинов существует как долгое системное воспаление, но «цитокиновый шторм» после каскадного выброса сигнальных молекул — экстремальная необратимая фаза [75]. После быстрой гиперцитокенимии апоптозу подвергаются и здоровые клетки.

Предположим, что алгоритм регуляции позволяет корректировать ответ, быстрый массивный или отложенный по времени, но ориентиро-

ванный на известные мишени. В таком ракурсе выбираемая иммунитетом при «бессимптомном» течении неспешная тактика управления ответом оказывается рациональным и предосторожным подходом. Запускается механизм созревания аффинности, который алгоритмически выглядит как задача поиска в пространстве из доступных аминокислотных последовательностей антител с повышенными константами связывания с антигеном. С точки зрения биологической кибернетики, если нет признаков экстремальности и ситуация позволяет, то оптимально выдержать время для создания средств с высоким сродством к антигенам: иммуноглобулинов IgG3 и зрелых CD8-киллеров, чем немедленно выбрасывать в легкие огромные порции нейтрофилов и макрофагов. По всей видимости, SARS-CoV-2 способен проникать в эти клетки и убивать лейкоциты, запуская таким образом петлю разрушительной обратной связи воспаления в альвеолярные мешочки легких. Для сценария гибкого регулирования необходимо функционирование промежуточного звена, роль которого могут успешно выполнить НК-клетки, количество которых составляет <10% от всех лимфоцитов. Важно исходное число средств сдерживания ответа – IgG4, Т-супрессоры, количество которых $\approx 5\%$ в популяции всех CD4 клеток, но они не разделяются в обычных анализах.

Если видим слабую корреляцию гуморального иммунного ответа, титров антител с падением вирусной нагрузки, то вероятно влияние эффекта антителозависимого усиления инфекции, когда несовершенные антитела создают непрочные соединения с вирусом, помогая таким образом вирусу проникать в лейкоциты, освобождаться и начинать репликацию в моноцитах и макрофагах. Из-за данного эффекта провалилась компания вакцинации от лихорадки Денге на Филиппинах. Оказалось [76], что непривитые и без антител болели вирусом легче, чем привитые, но с недостаточной аффинностью, плохо связывающимися IgG. В Китае к началу лета 2020 г. не заявили о создании вакцины, наиболее логично предположение, что разработчики столкнулись с признаками антителозависимого усиления инфекции (пусть даже в 5% случаев, но это увеличивает риски). Современное развитие молекулярного 3D-моделирования позволит решить проблему, точно выбрать оптимальный участок белка и собрать ген для его экспрессии в вакцинном штамме.

Известны примеры избегания серьезных последствий именно при своевременном сдерживании иммунной реакции [77]. Наиболее резонансный случай успешного контроля ответа – вирус иммунодефицита обезьян у некоторых их видов (например, мангобеев *Cercocebus atys*) не вызывает иммунодефицит, хотя реплицируется в организме, но у других приматов ведет к развитию

симптомов сходных человеческим вирусом иммунодефицита. У устойчивых обезьян оказалась ограничена иммунная активация, не запускалась пролиферация иммунных клеток CD4. Их дендритные клетки слабо выбрасывают сигналы тревоги цитокины при введении в опытах вируса [78]. Математически имеем следующий сценарий в наших обозначениях: $\forall N(0) < K: \lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = H, \forall t > 0, N(t) \leq H$.

Маленькие обезьяны получили оптимизационное решение проблемы инфекции вирусом иммунодефицита обезьян – не борясь с вирусом. Когда мы научимся оптимально управлять иммунными реакциями, то получим замечательный инструментарий борьбы даже с новыми угрозами без острой фазы. Геном SARS-CoV-2 большой [79] по сравнению с его родственниками, он кодирует с неясной целью несколько новых коротких белков [80]. Удалось экспрессировать 26 из 29 его белков. Пять вирусных белков действительно направлены на противоборство с внутриклеточным уровнем иммунитета [81]. Физически РНК будет реплицироваться и упаковываться дольше и, в силу непреодолимой статистики, со случайными ошибками, делая полупункциональные варианты вирионов внутри организма, но это увеличит антигенную дифференциацию инфекции.

Актуально провести эксперименты, насколько величина начальной дозы вируса может повышать вероятность запуска смертельного аутоиммунного сценария. В цитируемой ранее нами работе [63] отмечалось, что индукция цитокинов была значительно выше у мышей, инфицированных высокой дозой, по сравнению с мышами, которые первоначально получали низкую дозу вируса гриппа. Если предположить сильную зависимость между начальной дозой вируса и (максимальной) концентрацией основных типов цитокинов, то функциональная связь отразится не гладкой кривой, а ступенчатой функцией. В норме же ответ плавный [82].

Обратим внимание на работу [83], где в опытах с туляремией было отмечено, что гиперцитокинемия следует за начальной задержкой экспрессии цитокинов. Значит, наиболее вероятен пороговый запуск процесса. Сценарий шторма математически возможен, когда внезапно достигается порог и естественные средства иммуносупрессии не в состоянии контролировать цепную быструю активацию всех других типов клеток. Для стремительных переходов востребован метод триггерного описания изменения в развитии сценариев. В случае COVID начальная доза может быть не просто значимым, но важнейшим фактором риска развития летального сценария посредством стремительной гиперактивации воспалительных ре-

акций от собственной иммунной системы. Пороговое значение часто ближе, чем мы ожидаем.

Модель с неустойчивым достижимым равновесием K актуальна для прикладных задач экодинамики: биологической борьбы с опасными инвазивными видами [84], управления рыбными ресурсами [85] и биоремедиации водоемов после нефтяного загрязнения [86]. Уравнение предполагает широкие возможности дальнейших модификаций, как для оценки стратегии антивирусной терапии, так и сценариев заражения с учетом вакцинации, сокращающей время выработки эффективного ответа от клеточного иммунитета. Большинство современных вакцин оцениваются по величине титров антиген-специфических антител в сыворотке или слизи после вакцинации, но авторы работы [87] обосновывают как более значимый фактор оценки по скорости реакции от клеток иммунной памяти. В работе [88] отмечается «узкое место» работы самого эффективного звена иммунитета, скорость продвижения Т-лимфоцитов в лимфатические узлы может быть просто ограничена пропускной способностью венул с высоким эндотелием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-07-00125) и Проекта научных работ СПИИРАН по бюджетной теме № 0073-2019-0003.

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. A. Y. Perevaryukha, *Biophysics* **61** (2), 334 (2016).
2. M. Jeschke, *Diversity and Distributions* **20** (11), 1229 (2014).
3. А. В. Русаков, А. Б. Медвинский, Б. Д. Ли и М. М. Гоник, *Биофизика* **54** (4), 733 (2009).
4. В. В. Нечаев, К. В. Жданов и Г. И. Гришанова, *Журнал инфектологии* **7** (2), 21 (2015).
5. А. Б. Медвинский, *Биофизика* **51** (6), 1033 (2006).
6. S. Asadi, S. Wexler, and D. Cappa, *Sci. Rep.* **9** (6), 2348 (2019).
7. L. Anderson, P. Turnham, R. Griffin, and C. Clarke, *Risk Analysis* **40** (5), 902 (2020).
8. Э. М. Кольцова, Е. С. Куркина и А. М. Васецкий, *Comput. Nanotechnol.* **3** (1), 99 (2020).
9. А. Б. Белов и П. В. Куликов, *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* **18** (5), 109 (2019).
10. L. Allen, *An introduction to stochastic processes with applications to biology* (Pearson Prentice Hall, 2003).
11. Г. Ш. Цициашвили и М. А. Осипова, *Дальневосточ. мат. журн.* **2** (1), 58 (2001).
12. А. В. Нагаев и А. В. Старцев, *Мат. заметки* **3** (2), 179 (1968).
13. Ш. К. Форманов, А. Н. Старцев и С. С. Седов, *Дискретная математика* **25**, 103 (2013).
14. X. He, E. H. Y. Lau, and P. Wu, *Nature Med.* **26**, 672 (2020).
15. National Health Commission of the People's Republic of China. Decision of awarding outstanding groups and individuals in the National Health System for excellent work in the prevention and control of Covid-19 (March 5, 2020).
16. H. Nishiura, N. M. Linton, and A. R. Akhmetzhanov, *Int. J. Infect. Dis.* **93** (2), 284 (2020).
17. S. Fafi-Kremer, T. Bruel, Y. Madec, et al., medRxiv preprint (2020). DOI: 10.1101/2020.05.19.20101832
18. G. De Natale, V. Ricciardi, and G. De Luca, *J. Clin. Med.* **9**, 1564 (2020).
19. E. Lavezzo, E. Franchin, and C. Ciavarella, medRxiv preprint (2020). DOI: 10.1101/2020.04.17.20053157
20. L. Ferretti, C. Wymant, M. Kendall, et al., *Science* **368** (6491), eabb6936 (2020).
21. J. A. Al-Tawfiq and A. J. Rodriguez-Morales, *J. Hospital Infect.* **105** (1), 111 (2020).
22. J. H. Kim, I. Skountzou, and R. Compans, *J. Immunol.* **183** (1), 3294 (2009).
23. А. В. Гаврилина и С. В. Соколов, *Процессы управления и устойчивость* **11** (1), 229 (2018).
24. А. В. Шабунин, *Прикладная нелинейная динамика* **27** (2), 5 (2019).
25. А. Н. Герасимов, *Мат. моделирование* **31** (3), 109 (2019).
26. E. Waltersa, M. I. MeslébcIan, and M. Hall, *Epidemics* **25** (1), 8 (2018).
27. V. C. C. Cheng, *Clin. Microbiol. Rev.* **20** (4), 60 (2007).
28. M. A. Gouilh, S. J. Puechmaille, and J. P. Gonzalez, *Infection, Genetics and Evolution* **11** (7), 1690 (2011).
29. А. М. Молчанов, В. Г. Назаренко и И. Г. Шатурный, *Биофизика* **16** (4), 667 (1971).
30. Т. Е. Санникова, Г. И. Марчук, А. А. Романюха и А. И. Яшин, *Успехи геронтологии* **12**, 091 (2003).
31. R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, *Nature* **388** (6640), 394 (1997).
32. А. Y. Perevaryukha, *Cybernetics and Systems Analysis* **52** (4), 623 (2016).
33. Yu. S. Kolesov and D. I. Shvitra, *Lithuanian Math. J.* **19** (1), 81 (1979).

34. G. Bocharov and F. Rihan, *J. Comput. Appl. Math.* **125** (2), 183 (2000).
35. A. Y. Morozov, M. Banerjee, and S. V. Petrovskii, *J. Theor. Biol.* **396** (1), 116 (2016).
36. О. Ф. Воропаева и С. Д. Сенотрусова, *Мат. моделирование* **29** (9), 135 (2017).
37. R. E. Baker and G. Röst, *J. Nonlinear Sci.* **30** (2), 397 (2020).
38. G. E. Hutchinson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **50** 221 (1948).
39. S. A. Kashchenko, *Automatic Control and Comput. Sci.* **47** (3), 470 (2013).
40. E. M. Wright, *J. für die Reine und Angewandte Mathematik* **194** (1) 66 (1955).
41. R. M. May, *Stability and Complexity of Ecosystems* (Princeton University Press, 1974).
42. J. Van Dyken, *J. Theor. Biol.* **460** (1), 115 (2019).
43. А. Ю. Переварюха, *Биофизика* **65** (1), 138 (2020).
44. А. Ю. Колесов и Н. Х. Розов, *Мат. сборник* **202** (6), 51 (2011).
45. T. L. Kaplan and T. A. Yorke, *J. Math. Anal. Appl.* **48** (2), 317 (1974).
46. А. Ю. Колесов и Н. Х. Розов, *Труды Мат. института им. Стеклова* **277**, 101 (2012).
47. С. В. Лазаренко, *Мат. машины и системы* **1**, 28 (2019).
48. М. В. Глаголев, А. Ф. Сабреков и В. М. Гончаров, *Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата* **9** (2), 40 (2018).
49. W. S. Gurney, S. P. Blythe, and R. M. Nisbet, *Nature* **287**, 17 (1980).
50. С. Д. Глызин, *Модел. и анализ информ. систем* **3**, 365 (2017).
51. K. Gopalsamy, *Stability and Oscillations in Delay Differential Equations of Population Dynamics* (Springer, Netherlands, 1992).
52. N. A. Vasaer, *Short History of Mathematical Population Dynamics* (Springer, Berlin, 2011).
53. S. Ruan, in *Delay Differential Equations and Applications* (Springer, Berlin, 2006), pp. 477–517.
54. А. Y. Perevaryukha, *Cybernetics and Systems Analysis* **55** (1), 141 (2019).
55. U.S. Forest Service. 2018. Forest Health Conditions in Alaska – 2017. U.S. Forest Service, Alaska Region, Anchorage, AK. Publication R10-PR-43, 74 pp.
56. R. Lia, L. Xua, and N. Bjørnstad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 3624 (2019).
57. T. Royama, W. E. Mackinnon, and E. G. Kettela, *Ecology* **86** (5), 1212 (2005).
58. L. Geritz and S. A. Kisdi, *J. Math. Biol.* **65**, 1411 (2012).
59. Y. Kuang, *Delay Differential Equations with Applications to Population Biology* (Academic Press, New York, 1993).
60. P. Klein, J. Sterzl, and J. Dolezal, *J. Math. Biol.* **13** (1), 67 (1981).
61. T. J. Lunn, O. Restif, and J. Peel, *Phil. Trans. R. Soc. B* **374**, 20190016 (2019).
62. A. Paulo and M. Correia-Neves, *PLoS One* **5** (7), e11655 (2010).
63. V. Davids, W. Hanekom, and J. Gelderbloem, *Clin. Vaccine Immunol.* **14** (2), 198 (2007).
64. I. Marois, A. Cloutier, E. Garneau, and V. Richter, *J. Leukocyte Biol.* **92** (1), 107 (2012).
65. A. M. Collins and K. J. Jackson, *Frontiers Immunol.* **4** (2), 235 (2013).
66. E. Shin and S. Sung, *Nature Rev. Immunol.* **16**, 509 (2016).
67. Н. А. Арсентьева и А. В. Семенов, *Инфекция и иммунитет* **2** (4), 687 (2012).
68. J. Schoggins and C. Rice, *Curr. Opin. Virology* **1** (6), 519 (2011).
69. K. L. Yap, I. F. Ada, and G. L. McKenzie, *Nature* **273** (5659), 238 (1978).
70. А. Ю. Переварюха, *Журн. общ. биологии* **81** (3), 174 (2020).
71. N. Mark, A. E. Hubbard, and M. Jones, *Appl. Biosafety* **9** (3), 118 (2004).
72. N. Hanna, R. Kalderon, and D. Nelken, *Immunology* **29** (3), 433 (1975).
73. G. Siracusano, C. Pastori, and L. Lopalco, *Frontiers Immunol.* **11**, 1049 (2020).
74. И. М. Кветной и М. А. Пальцев, *Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии* (Наука, СПб, 2012).
75. P. Mehta, D. F. McAuley, and M. Brown, *Lancet* **395** (10229), 1033 (2020).
76. J. Teijaro, K. Walsh, S. Rice, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (10), 3799 (2014).
77. S. Halstead and P. Russell, *Vaccine* **34** (14), 1643 (2016).
78. N. R. Klatt, G. Silvestri, and V. Hirsch, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2** (1), a007153 (2012).
79. J. Mandl, A. Barry, and T. Vanderford, *Nature Med.* **14**, 1077–1087 (2008).
80. F. A. Isihak, M. A. Hamad, and N. G. Mustafa, *Инфекция и иммунитет* **10** (2), 247 (2020).
81. E. S. Brielle, D. Schneidman-Duhovny, and M. Linial, *Viruses* **12** (5), 497 (2020).
82. L. Malle, *Nature Rev. Immunol.* **20**, 351 (2020).
83. M. W. Deem and P. Hejazi, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Engineer.* **1** (1), 247 (2010).
84. C. A. Mares, S. S. Ojeda, and E. G. Morris, *Infection and Immunity* **76** (7), 3001 (2008).
85. А. Y. Perevaryukha, *Cybernetics and Systems Analysis* **56** (1), 139 (2020).
86. Е. А. Криксунов, А. Е. Бобырев и В. А. Бурменский, *Журн. общ. биологии* **71** (5), 436 (2010).
87. V. A. Gushchin, A. I. Sukhinov, and A. V. Nikitina, *Comput. Math. and Math. Physics* **58** (8), 1316 (2018).
88. J. Sarkander, S. Hojyo, and K. Tokoyoda, *Clin. Translat. Immunol.* **5** (12), e120 (2016).
89. А. В. Бондарь, Ю. П. Гумовская и А. В. Полевщиков, *Биофизика* **61** (5), 927 (2016).

Continuous Model for the Three Scenarios of the Infection Routes Given Delayed Immune Response Factors

A.Yu. Perevaryukha

*St. Petersburg Institute for Informatics and Automation, Russian Academy of Sciences,
14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia*

The article describes models of the course of an infection as controlled nonlinear processes. Understanding significant differences observed in the trajectory of the disease caused by a new coronavirus SARS-CoV-2 is of critical importance at the moment. Myriad of factors are regarded as causes of disease when symptoms are highly variable in different people and the transmission rate of infection with the new coronavirus through local population varies. Viral replication by which the virus makes copies of itself within a host cell and is able to infect other cells and the development of an immune response to its antigens within an organism are two interdependent processes which have aftereffects and depend on the previous conditions of the cell and virus populations. Different scenarios without altering input parameters are necessary for modeling the properties of these states. The most important factor is the effectiveness of the immune response, including the time of defense responses from the three levels of the immune system, the complex system in the body. We have proposed a computational description of infection development scenarios based on a delayed differential equation with two values of the delayed time. In a new model, transitions between phases during infectious disease result from the level of initial infection and a delayed immune response to infection. The variation in infectious dose and response time can lead to the transition from the acute phase of the disease with pronounced symptoms to a chronic stage, or fatal outcome. In the created model, we calculated and described asymptomatic transmission of viral infection by considering the possibility of rapid and effective suppression of the virus after active virus replication that occurs a short time but maintaining a small amount of the virus in the body. An analysis of the model's behavior is consistent with the theory that the initial number of HCV virions can affect the quality of the adaptive immune response. There are big differences in the trajectory of COVID-19 disease and the formation of the types of the immune system's response to coronavirus and these processes are not yet well understood. Model scenarios are developed based on the trajectories of the studied hepatitis C virus variants.

Keywords: modeling infection routes, delayed regulation, immune response, model for hepatitis C virus chronicity, initial infection dose, epidemics, virus spread rate, asymptomatic scenario, COVID-19 variability

ПРИНЦИП ЗАМКНУТОЙ ПЕТЛИ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ ОТ ЭНДОГЕННЫХ РИТМОВ ЧЕЛОВЕКА В СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ НЕЙРОБИОУПРАВЛЕНИЯ И АДАПТИВНОЙ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ

© 2021 г. А.И. Федотчев*, **, С.Б. Парин**, С.А. Полевая**

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

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

E-mail: fedotchev@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 21.08.2020 г.

Проанализированы особенности реализации принципа замкнутой петли обратной связи от эндогенных ритмов человека в двух перспективных технологиях нейроинтерфейсов — нейробиоуправления и адаптивной нейростимуляции. На примере собственных экспериментальных данных обоснованы преимущества адаптивной нейростимуляции — автоматическое замыкание петли обратной связи от эндогенных ритмов человека и вовлечение процессов восприятия и обработки значимых для человека interoceptивных сигналов в механизмы деятельности мозга, обеспечивающие нормализацию функционального состояния под влиянием стимуляционных процедур.

Ключевые слова: нейробиоуправление, интерфейс мозг-компьютер, эндогенные ритмы, замкнутая петля обратной связи, адаптивная нейростимуляция.

DOI: 10.31857/S0006302921010216

Принцип замкнутой петли обратной связи (closed-loop feedback) от собственных биоэлектрических процессов человека позволяет одновременно получать информацию о текущем состоянии организма и учитывать динамику его изменения в процессе терапевтических процедур [1]. К настоящему времени данный принцип успешно реализован в технологиях нейробиоуправления, где человеку предъявляются сенсорные стимулы (зрительные, слуховые, тактильные, электрические), отражающие информацию о текущей активности регуляторных нервных структур, которые лежат в основе его поведения или патологии. Позволяя выявлять причинные взаимоотношения между биоэлектрической активностью и поведением, такая обратная связь обеспечивает человеку возможность обучения осознанной регуляции собственных функций на основе сенсорной информации об их текущем состоянии [2].

Анализ литературных данных показывает, что наиболее распространенными являются процедуры нейробиоуправления, использующие сигналы обратной связи от системообразующих ритмических процессов человека — ритма сердечных

сокращений, ритма дыхания и ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Эти ритмические процессы тесно взаимосвязаны и составляют основу природной гомеостатической регуляции функций [3], они демонстрируют явления синхронизации и резонанса и характеризуются высокой чувствительностью к действию внешних факторов [4]. Благодаря этим свойствам, а также за счет ориентации на природные механизмы регуляции и пластичности мозга, нейроинтерфейсы на основе эндогенных ритмов обладают повышенной эффективностью.

Так, например, обратная связь от ритма сердечбиений успешно реализована в процедурах нейробиоуправления для подавления состояний тревоги и стресса [5, 6], а также для улучшения эмоционального состояния [7] и выработки навыка саморегуляции [8]. С помощью процедур респираторного нейробиоуправления эффективно формируются навыки спокойного диафрагмального дыхания с замедленным выдохом [9], что приводит к улучшению эмоционального и психологического состояния пациентов [10]. В модельных исследованиях показано, что взаимодействие эндогенных и экзогенных осцилляций при нейробиоуправлении по ЭЭГ открывает воз-

Сокращение: ЭЭГ — электроэнцефалограмма.

возможность персонализированного управления ритмами мозга, приводя к усилению когнитивной деятельности и улучшению самочувствия в целом [11]. Считается, что ЭЭГ-нейробиоуправление является эффективным средством тренировки мозга [12] и совершенствования когнитивных функций человека [13].

Эндогенные ритмы человека могут использоваться не только как информационный сигнал обратной связи при нейробиоуправлении, но и для автоматического управления параметрами лечебных процедур сенсорной стимуляции. Преимущества такого подхода впервые были теоретически обоснованы и экспериментально продемонстрированы четверть века назад в работе [14]. К настоящему времени принцип автоматического замыкания петли обратной связи от эндогенных ритмов человека реализуется в инновационной технологии адаптивной нейростимуляции, в которой целенаправленная модификация активности заинтересованных нервных структур достигается за счет сенсорной стимуляции с учетом текущего состояния организма [15].

Таким образом, ключевая особенность адаптивной нейростимуляции на основе эндогенных ритмов человека заключается в том, что регулировка параметров лечебного сенсорного воздействия осуществляется автоматически, без участия его сознания [16]. К настоящему времени принцип автоматического управления сенсорными воздействиями сигналами обратной связи от эндогенных ритмов человека успешно реализован в многочисленных исследованиях и стал основой нового направления нейрофизиологии — адаптивной нейромодуляции [17].

Так, например, показано, что при комплексных акустических воздействиях, автоматически управляемых текущими значениями вариабельности сердечного ритма пациента, наблюдаются позитивные релаксационные эффекты [18]. При предъявлении пациентам акустических воздействий, автоматически генерируемых путем трансформации определенных ритмов ЭЭГ, достигается эффективное устранение стресс-вызванных симптомов и улучшение показателей вегетативной нервной системы [19].

Одним из популярных направлений адаптивной нейростимуляции является преобразование текущих физиологических характеристик человека в музыку. Ярким примером такого подхода является нейроинтерфейс «Biomusic», предложенный для мониторинга и коррекции функционального состояния человека [20]. Авторы исходили из того, что физиологические сигналы вегетативной нервной системы свидетельствуют о функциональном состоянии организма, но их обычно трудно интерпретировать. В разработанном нейроинтерфейсе эти физиологические сиг-

налы преобразуются в музыкальные (электродермальная активность в мелодию, температура кожи — в музыкальную тональность, частота сердечных сокращений — в звуки барабана, а дыхание — в приятные подсвистывания, напоминающие звуки при выдохе). Компьютерные преобразования текущих значений ЭЭГ ритмов пациента в музыкалоподобные воздействия успешно использованы в нейроинтерфейсе «Энцефалотон», предназначенном для коррекции состояния пациентов с двигательными расстройствами [21], а также в интерфейсе «мозг—компьютер», предложенном для эффективной коррекции эмоционального состояния человека [22].

В наших исследованиях экспериментально протестированы несколько вариантов адаптивной нейростимуляции на основе эндогенных ритмов человека. В одном из них обратная связь от ритма дыхания была использована для устранения рисков надежности специалистов высокотехнологических видов деятельности, у которых в результате чрезмерного напряжения малых групп мышц при интенсивной работе на компьютере формировались стойкие болевые синдромы. Установлено, что быстрое снятие болевых синдромов и сохранение эффектов обезболивания на длительный срок наблюдалось даже при однократном применении электронейростимуляции, автоматически управляемой ритмом дыхания пациента [23].

В другом исследовании была использована обратная связь от ЭЭГ. Установлено, что предъявление испытуемым, находящимся в состоянии тревоги и стресса, световых ритмических воздействий, автоматически формируемых в реальном времени на основе их ЭЭГ, приводит к достоверному увеличению мощности ЭЭГ, а также снижению уровня эмоциональной дезадаптации и стрессированности пациентов [24].

В наших недавних исследованиях успешно апробированы аудио-визуальные воздействия, автоматически управляемые двойной обратной связью от ритмов ЭЭГ и ритма сердечбиений человека [25, 26]. Мы исходили из того, что биопотенциалы мозга и сердца являются источником interoцептивных сигналов, которые играют важную роль в поддержании оптимального физического, эмоционального и психического здоровья человека [27, 28], а их использование в процедурах биоуправления с обратной связью является «дорожной картой» в развитии нейротехнологий [29]. Именно благодаря вовлечению процессов восприятия и обработки значимых для человека interoцептивных сигналов в механизмы мультисенсорной интеграции, нейропластичности и резонансные механизмы мозга, в предпринятых нами исследованиях была достигнута эффектив-

ная коррекция стресс-индуцированных сдвигов функционального состояния.

Таким образом, можно заключить, что принцип замкнутой петли обратной связи от эндогенных ритмов человека успешно используется как в современных технологиях нейробиоуправления, так и в методах адаптивной нейростимуляции. Перспективы развития этих технологий определяются, главным образом, их высокой персонализацией через использование обратной связи от собственных ритмических процессов пациента. Предпринятый анализ показывает, что сравнительно новая технология адаптивной нейростимуляции обладает и дополнительными преимуществами. Во-первых, это вовлечение процессов восприятия и обработки значимых для человека interoцептивных сигналов в механизмы мульти-сенсорной интеграции, нейропластичности и резонансные механизмы мозга, обеспечивающие нормализацию функционального состояния под влиянием стимуляционных процедур. Во-вторых, это автоматическое, без осознанных усилий пациента, управление лечебными сенсорными воздействиями, дающее возможность использовать адаптивную нейростимуляцию для коррекции неблагоприятных сдвигов состояния у пациентов с измененным уровнем сознания, пожилых людей и детей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты №№ 18-013-01225 и 19-013-00095.

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. N. R. Provenza, E. R. Matteson, A. B. Allawala, et al., *Front Neurosci.* **13**, 152 (2019).
2. R. Sitaram, T. Ros, L. Stoeckel, et al., *Nat. Rev. Neurosci.* **18** (2), 86 (2017).
3. F. Riganello, V. Prada, A. Soddu, et al., *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16** (13), 2336 (2019).
4. S. Haegens and E. Z. Golumbic, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **86**, 150 (2018).
5. V. C. Goessl, J. E. Curtiss, and S. G. Hofmann, *Psychol. Med.* **47** (15), 2578 (2017).
6. V. Deschodt-Arsac, R. Lalanne, B. Spiluttini, et al., *PLoS One* **13** (7), e0201388 (2018).
7. P. Lehrer, K. Kaur, A. Sharma, et al., *Appl. Psychophysiol. Biofeedback*, **45**, 109 (2020). DOI: 10.1007/s10484-020-09466-z
8. O. Jafarova, K. Mazhirina, E. Sokhadze, and M. Shtark, *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* **45** (2), 87 (2020).
9. A. Zaccaro, A. Piarulli, M. Laurino, et al., *Front. Hum. Neurosci.* **12**, 353 (2018).
10. J. Blum, C. Rockstroh, and F. S. Göritz, *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* **45**, 153 (2020). DOI: 10.1007/s10484-020-09468-x
11. И. В. Нуйдель, А. В. Колосов, В. А. Демарева и В. Г. Яхно, *Современные технологии в медицине* **11** (1), 103 (2019).
12. E. Dessy, O. Mairesse, M. van Puyvelde, et al., *Front. Hum. Neurosci.* **14**, 22 (2020).
13. D. Valeriani, C. Cinel, and R. Poli, *Brain Sci.* **9** (2), 22 (2019).
14. А. И. Федотчев, *Биофизика* **41** (3), 718 (1996).
15. T. Oxley and N. Opie, *World Neurosurg.* **122**, 415 (2019).
16. X. Zhou and J. P. Miller, *Neurosurgery* **85** (3), E440 (2019).
17. M. C. Lo and A. S. Widge, *Int. Rev. Psychiatry* **29** (2), 191 (2017).
18. B. Yu, M. Funk, J. Hu, and L. Feijs, *Behav. Inform. Technol.* **37**, 800 (2018). DOI: 10.1080/0144929X.2018.1484515
19. C. L. Tegeler, H. A. Shaltout, S. W. Lee, et al., *Glob. Adv. Health Med.* **9**, 2164956120923288 (2020).
20. S. Cheung, E. Han, A. Kushki, et al., *Front. Neurosci.* **10**, 401 (2016).
21. T.A. Deuel, J. Pampin, J. Sundstrom, and F. Darvas, *Front. Hum. Neurosci.* **11**, 213 (2017).
22. S. K. Ehrlich, K. R. Agres, C. Guan, and G. Cheng, *PLoS One* **14** (3), e0213516 (2019).
23. A. I. Fedotchev, V. M. Kruk, S. J. Oh, and G. I. Semikin, *Int. J. Industr. Ergonomics* **68**, 256 (2018).
24. А. И. Федотчев, *Биофизика* **64** (2), 358 (2019).
25. А. И. Федотчев, С. Б. Парин, К. Н. Громов и др., *Журн. высш. нерв. деятельности* **69** (2), 187 (2019).
26. А. И. Федотчев, С. Б. Парин и С. А. Полевая, *Вестн. РФФИ. Общественные и гуманитарные науки*, № 1, 144 (2019).
27. L. Quadt, H. D. Critchley, and S. N. Garfinkel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1428** (1), 112 (2018).
28. О. Р. Добрушина, Л. А. Добрынина, Г. А. Арина и др., *Журн. высш. нерв. деятельности* **70** (2), 206 (2020).
29. S. S. Khalsa, R. Adolphs, O. G. Cameron, et al., *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* **3** (6), 501 (2018).

The Principle of a Closed Feedback Loop of Human Endogenous Rhythms in Modern Technologies of Neurofeedback and Adaptive Neurostimulation

A.I. Fedotchev*, **, S.B. Parin**, and S.A. Polevaya**

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

***National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

This study aimed to analyze the implementation feature for the principle of a closed feedback loop of human endogenous rhythms in two perspective technologies of neurointerfaces – neurofeedback and adaptive neurostimulation. Based on our experimental data, main advantages of adaptive neurostimulation approach have been validated, namely, the feedback loop of human endogenous rhythms is closed automatically and the processes of perception and processing of interoceptive signals significant for a person are involved in the mechanisms of brain activity, that contribute to normalization of the functional state under the influence of stimulation procedures.

Keywords: neurofeedback, brain-computer interface, endogenous rhythms, closed feedback loop, adaptive neurostimulation

ИЗМЕНЕНИЯ РЕАКЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НЕТЕПЛОВОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

© 2021 г. Ж.М. Ибрагимова*, А.М. Гаджиев*, А.Ш. Ибрагимов**

*Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджана,
AZ1100, Баку, ул. Шарифзаде, 78, Азербайджанская Республика
E-mail: jaluzi2009@gmail.com, ahmed.hajiyev@yahoo.com

**Лицо Публичного Права объединение СМЭ и ПА Минздрава Азербайджанской Республики,
Баку, ул. М. Мир-Касимова, 1, Азербайджанская Республика
E-mail: medkrim@list.ru

Поступила в редакцию 28.11.2019 г.

После доработки 11.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Исследовано состояние редокс-гомеостаза в хрусталиках глаз у крольчат (породы «Шиншилла») первого месяца жизни, которых во время внутриутробного развития подвергали сочетанному воздействию гипоксии и электромагнитного излучения нетепловой интенсивности. Взрослые самки кроликов (12 особей) были разделены поровну на опытную и контрольную группы. После спаривания беременных животных из опытной группы в течение шести суток подвергали гипоксии и облучали электромагнитным излучением, а контрольную группу подвергали ложному облучению без гипоксии. После рождения крольчат из них также были сформированы соответствующие контрольная и опытная группы. Крольчат забивали на 20-е и 30-е сутки после рождения и изымали у них хрусталики глаз. Об интенсивности перекисного окисления липидов в хрусталике глаз судили по накоплению молекулярного продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида. Было установлено, что реакции перекисного окисления липидов в хрусталиках крольчат подвержены сдвигу в сторону окисления в связи со сбоем в механизме антиоксидантной защиты. Тем самым было определено, что процессы, приводящие к смещению редокс-гомеостаза, которые запускаются во внутриутробной стадии животных, продолжают негативно сказываться и в постнатальном периоде. Степень изменений в протекании процессов перекисного окисления липидов на 20-е и 30-е сутки постнатального периода почти не отличаются.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, хрусталик глаза, электромагнитное облучение, внутриутробное развитие, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302921020228

Давно известен тот факт, что электромагнитное излучение имеет пагубное влияние на человека. Мы повсюду окружены техникой, проводами, бытовыми приборами и т.д. Переизбыток таких воздействий влечет за собой изменения в иммунном фоне человека, что приводит к различным заболеваниям, которых можно было избежать, находясь в нормальной среде и окружении. В указанном контексте изучение влияния неионизирующего электромагнитного излучения (ЭМИ) на органы зрения людей и животных в последние десятилетия является весьма актуальной проблематикой [1, 2]. Имеется достаточно много фактов,

свидетельствующих о том, что длительное облучение живых организмов ЭМИ дециметрового диапазона (нетепловая интенсивность) вызывает изменения в хрусталике глаза и служит одной из причин развития катаракты [3–5]. С учетом приведенных фактов было решено изучить состояние редокс-гомеостаза в хрусталике глаза у детенышей кроликов, подвергавшихся воздействию неионизирующего ЭМИ во время внутриутробного развития.

Конкретной целью представленной работы было исследование интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в хрусталике детенышей кроликов в возрасте 20 и 30 дней, которых во время зародышевой, предплодной и плодной фазы пренатального развития подверга-

Сокращения: ЭМИ – электромагнитное излучение, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МДА – малоновый диальдегид.

ли воздействию гипоксии и неионизирующего ЭМИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

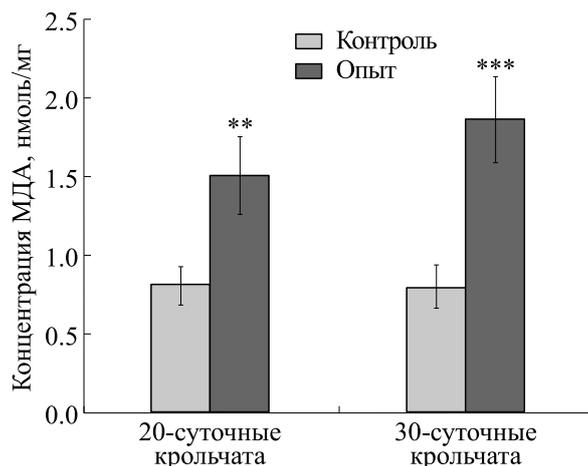
Исследовали кроликов (половозрелые самки и их приплод — крольчата первого месяца жизни) породы «Шиншилла». Изучаемая группа (12 особей) была разделена поровну на контрольную, которую подвергали ложному облучению, и опытную группы. Контрольную группу животных подвергали тем же процедурам «облучения» (т.е. ложное облучение), только при выключенном аппарате. Остальные условия для опытной и контрольной группы старались создать максимально приближенными. Перед началом опытов обе группы животных в течение нескольких дней помещали в камеру облучения для адаптации к условиям эксперимента. Группу животных в качестве контроля без выключенного аппарата (в отсутствие аппарата) не использовали.

После спаривания беременные животные из опытной группы в течение шести суток подвергали гипоксии. На первом этапе эксперимента моделировали гипоксию в специально вентилируемой камере, куда подавали воздушную смесь (95% азота и 5% кислорода) в течение 20 мин. Априори предполагалось, что гипоксия должна ослаблять механизмы антиоксидантной защиты и на этом фоне удастся более отчетливо зафиксировать пагубное действие ЭМИ на окислительно-восстановительные процессы. После этого животных подвергали облучению с помощью физиотерапевтической установки «Волна-2». Аппарат представляет собой генератор ЭМИ, позволяющий в терапевтических целях осуществлять дозированное воздействие на животных (а также на пациентов в физиотерапевтических лечебницах) электромагнитным полем с частотой 460 МГц. Проникающая способность дециметровых волн в ткани составляет примерно 8–11 см. Облучение сразу всех животных (опытная группа) проводили в специальной цилиндрической камере и в зависимости от цели эксперимента для реализации режимов высокой и низкой интенсивности облучения применяли выходную мощность излучателя 20 Вт в дециметровом диапазоне (длина волны 65 см), где плотность потока энергии в камере составляла 30 мкВт/см². Ввиду того, что период беременности у кроликов длится 28–30 суток, интервал с первых по седьмые сутки считается зародышевым периодом, во время которого и было проведено облучение. За одну условную физиотерапевтическую единицу времени принято время от 5 до 15 мин. Дальше этих пороговых значений наблюдаются негативные явления. Опыты проводили в утренние часы при естественном освещении.

После рождения детенышей были сформированы контрольная и опытная группы (по 20 крольчат). На 20-е сутки после рождения половину крольчат из опытной и контрольной групп забивали и извлекали хрусталики (на холоду) для исследования. Другую партию животных забивали на 30-е сутки после рождения. После декапитации животных хрусталики извлекали из обоих глаз и препарировали на холоду исследуемую ткань, из которой готовили гомогенат в физиологическом растворе (0.9% NaCl) для дальнейшего биохимического анализа. Процедура работы с лабораторными животными соответствовала требованиям международной конвенции по защите животных.

Количество белка в гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорда [6]. Реактив Бредфорда готовили к каждой серии экспериментов: 100 мг красителя кумасси бриллиантового голубого (G250) растворяли в 50 мл этилового спирта, добавляли 100 мл 85% раствора фосфорной кислоты и объем доводили бидистиллированной водой до 1 л. Калибровочную кривую для приготовленного реактива строили на основе растворов бычьего сывороточного альбумина с известными концентрациями. Для определения количества белка к 0.05 мл гомогената исследуемой ткани (10%-я суспензия) добавляли 2.5 мл реактива Бредфорда. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре Spekol-221 (Германия) на длине волны 595 нм (не ранее чем через 2 мин и не позже 1 ч). Количество белка в пробе определяли по калибровочной кривой.

Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА), которое определяли по методу, описанному в работе [7]. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.2 N глицин-HCl-буфере (pH 3.6), получали 10%-ю суспензию. Данный метод предусматривает определение параллельно двух промежуточных продуктов ПОЛ — гидроперексидов и МДА, поэтому отбирали две пробы по 0.1 мл 10%-й суспензии и к одной из них добавляли 0.1 мл 0.27% раствора FeCl₃·6H₂O; 1.5 мл 0.2 N глицин-HCl-буфера (pH 3.6); 1.5 мл реагента, содержащего 0.5 г 2-тиобарбитуровой кислоты и 0.3 г додецилсульфатанатрия в 100 мл воды. Во вторую пробу для определения МДА добавляли 0.1 мл 0.27% раствора ионола в этиловом спирте; 1.5 мл 0.2 N глицин-HCl-буфера (pH 3.6); 1.5 мл тиобарбитурового реагента. Затем пробы кипятили 15 мин, охлаждали в ледяной бане, добавляли по 1 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл хлороформа. После этого пробы центрифугировали 10 мин при 2500 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре Spekol-221 (длина волны 532 нм). Расчет со-



Интенсивность реакции перекисного окисления липидов при воздействии электромагнитного излучения нетепловой интенсивности в пренатальном периоде.

держания МДА и гидроперекисей липидов проводили по формуле:

$$C = D/\varepsilon \cdot l,$$

где C – концентрация МДА и гидроперекисей липидов; D – оптическая плотность исследуемого образца; ε – молярный коэффициент экстинкции, равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; l – длина оптического пути, равная 1 см. Концентрацию МДА выражали в нмоль/мг белка.

Вариационный анализ и сравнение групп по изучаемым характеристикам проводили с помощью стандартных биометрических методов [8]. В частности, использовали двухвыборочный U -критерий Манна–Уитни для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В одной из работ нами была сделана попытка истолкования процесса перехода энергии ЭМИ в энергию превращений свободно-радикальных процессов [9]

Наши эксперименты на крысах показали, что при относительно интенсивном (30 мкВт/см^2) облучении до 14 суток в корковой части хрусталика происходит постепенный переход скрытых в структуре белка тиоловых групп в открытое (реакционноспособное) состояние, тогда как в ядре хрусталика проявляется обратный процесс – растет содержание скрытых (неракционноспособных) белковых тиолов. Низкоинтенсивное облучение (10 мкВт/см^2) приводит к снижению содержания легкодоступных тиолов (глутатиона и поверхностно расположенных белковых тиолов) в коре (и не так заметно в ядре) хрусталика на фоне низкого уровня ПОЛ. Причиной этому, по-видимому, является переход части белковых открытых сульфгидрильных групп в замаскированную

форму в результате процессов глутатионилирования и умеренного образования белковых дисульфидов. Переход белковых тиолов из одного состояния в другой под действием физического фактора позволяет выдвинуть идею о надмолекулярном механизме регуляции гомеостаза (в частности, тиолового) в высокобелковых образованиях, который может реализоваться путем агрегации–деагрегации белковых молекул.

Настоящее исследование показало, что в хрусталиках глаз кроликов, изъятых у 20-суточных крольчат, в пренатальном периоде жизни подверженных электромагнитному облучению и гипоксии, происходят изменения в протекании процессов ПОЛ. У животных, облученных и подвергшихся гипоксии в пренатальном периоде жизни (опытная группа), концентрация МДА составила в среднем 1.50 нмоль/мг , а у животных из контрольной группы – 0.81 нмоль/мг . Отсюда следует, что в опытной группе мы наблюдаем повышение концентрации МДА на 85.5% (достоверность различий между группами надежная: $p < 0.01$). Следовательно, имеет место смещение редокс-гомеостаза, сопровождающееся увеличением интенсивности ПОЛ. После соответствующей лучевой нагрузки у 30-суточных животных концентрация МДА в гомогенате хрусталиков составила 1.88 нмоль/мг белка, а у не подвергавшихся облучению и гипоксии так же, как и в предыдущем случае, составляла 0.81 нмоль/мг белка, т.е. мы видим повышение концентрации МДА на 131.7%. Достоверность различий между показателями в контрольной и опытной группе оказалась высокой – $p < 0.001$. Результаты экспериментов представлены на рисунке.

Гистограммы показывают содержание МДА (нмоль/мг белка) в структурах хрусталика глаз 20- и 30-суточных кроликов, в пренатальном воз-

Сравнение активности ПОЛ в хрусталиках глаз 20- и 30-суточных крольчат, подвергавшихся и не подвергавшихся ЭМИ и гипоксии в пренатальном периоде жизни

Возраст	Контроль	Опыт
20 суток	0.81	1.89
30 суток	0.82	1.90

расте подвергнутых гипоксии и облученных ЭМИ (аппарат «Волна-2», частота 460 МГц, плотность энергии 30 мкВт/см²) в течение шести суток (ежедневное моделирование гипоксии и облучение по 20 мин).

Наше исследование показало, что в пренатальном периоде жизни в хрусталиках глаз кроликов, находящихся под воздействием гипоксии и электромагнитного облучения, происходит смещение редокс-гомеостаза, которое характеризуется изменениями в протекании процессов ПОЛ.

На следующем этапе работы мы наблюдали динамику процессов ПОЛ в хрусталиках глаз 30-суточных крольчат, которых во время предплодной фазы пренатального развития подвергали сочетанному воздействию гипоксии и неонизирующего электромагнитного излучения. Данные, полученные в ходе этих исследований, показали, что как у 20-суточных детенышей, так и у 30-суточных крольчат также происходит смещение окислительно-восстановительного состояния хрусталиков в сторону окисления в раннем постнатальном онтогенезе. Для наглядности сравнительные данные по изменениям МДА для двух разных сроков постнатального развития представлены в таблице.

Из таблицы видно, что у 20-суточных животных по отношению к контролю перекисное окисление липидов в опытной группе возрастает на 233%. То же самое можно сказать про 30-суточных животных, где концентрация МДА в группе облученных животных увеличивается на 232% относительно группы контрольных животных.

ВЫВОДЫ

1. Наблюдаемый в наших опытах вектор изменений указывает на то, что окислительно-восстановительные реакции в хрусталиках глаз животных под воздействием гипоксии и ЭМИ определенной интенсивности подвержены сдвигу в сторону окисления в связи со сбоями в механизме антиоксидантной защиты.

2. Установлено, что механизм, запущенный во внутриутробной стадии жизни организма, продолжает негативно сказываться и в постнатальном периоде. Сопоставимые по степени измене-

ния в протекании процессов ПОЛ наблюдаются на 20-е и 30-е сутки постнатального периода.

3. Результаты работы являются серьезным посылком для проведения дальнейших исследований. Важным моментом в данном аспекте является выяснение конкретного механизма преобразования энергии (или иного воздействия) ЭМИ в соответствующих биохимических процессах.

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. Ж. М. Дадашева, Э. Ю. Юсифов и А. М. Гаджиев, в сб. *Материалы 5-й Междунар. конф. «Экология и безопасность жизнедеятельности»* (Баку, 2004), сс. 49–50.
2. Л. Ф. Исмаилова и А. М. Гаджиев, в *Сб. науч. трудов Ин-та физиологии НАН Азербайджана* (Баку, 2002), т. 20, сс. 117–125.
3. Ж. М. Ибрагимова, Дис. ... канд. мед. наук (Баку, 2009).
4. Н. Н. Омельчук и Ю. Г. Симаков, *Инновации и инвестиции*, № 4, 163 (2014).
5. A. Spector, *FASEB J.* **9**, 1173 (1995).
6. M. M. Bradford, *Biochemistry* **72**, 248 (1976).
7. T. Asakawa and S. Matsushita, *Lipids* **15** (3), 137 (1980).
8. С. А. Гланц, *Медико-биологическая статистика* (М., 1999).
9. А. М. Гаджиев и Ж. М. Ибрагимова (Санкт-Петербург, 2018).

Changes in Lipid Peroxidation Resulting from Exposure to Electromagnetic Radiation of Nonthermal Intensity in the Prenatal Period

J.M. Ibragimova*, A.M. Gadjev*, and A.Sh. Ibragimov**

**Institute of Physiology named after A.I. Karaev, Azerbaijan National Academy of Sciences, ul. Sharifzadeh 78, Baku, AZ1100 Republic of Azerbaijan*

***Scientific, Practical and Education Unit "Forensic Medicine Expertise and Pathological Anatomy", Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, ul. M. Mir-Kasimova 1, Baku, Republic of Azerbaijan*

The study focused on redox homeostasis in the ocular lens of 20- and 30-day-old baby chinchillas (kits) exposed to combination of hypoxia and electromagnetic radiation at non-thermal intensity during intrauterine development. Adult female rabbits (called does) ($n = 12$) were divided into equal-sized experimental and control groups. After mating, pregnant animals from the experimental group were exposed to hypoxia and electromagnetic radiation for 6 days, and the control animals were sham-irradiated but not exposed to hypoxia. After the day of birth, newborn rabbits were also divided into experimental and control groups. Kits were slaughtered on the 20th and 30th days after the day of birth and the ocular lens were removed. The lipid peroxidation intensity was estimated by the measurement of malondialdehyde in lens tissue samples. It was found that redox status in the lenses of experimental rabbit kits changed towards oxidation, probably due to the antioxidant defense system impairment. Thus, it was proven that prenatally induced disturbance of redox homeostasis negatively affects the postnatal period as well. No significant differences were found between the extent of lipid peroxidation by the 20th and 30th days of the postnatal period.

Keywords: lipid peroxidation, eye lens, electromagnetic irradiation, intrauterine development, hypoxia